

**EKZOJEN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ’NÜN
TÜKÜRÜK BEZİ OKSİDAN OLAYLARINA
ZAMAN BAĞIMLI ETKİSİ**

Seda TAŞIR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2007
ANKARA**

Seda TAŞIR tarafından hazırlanan EKZOJEN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ'NÜN TÜKÜRÜK BEZİ OKSİDAN OLAYLARINA ZAMAN BAĞIMLI ETKİSİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Şule COŞKUN
Tez Yöneticisi

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

Başkan: : Prof. Dr. Zekiye SULUDERE

Üye : Doç Dr. Şule COŞKUN (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Metin AKTAŞ

Üye : Doç. Dr. Nesrin ÖZSOY

Üye : Yrd. Doç. Dr. Barbaros BALABANLI

Tarih : 29 /01/2007

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

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

Seda TAŞIR

**EKZOJEN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ’NÜN
TÜKÜRÜK BEZİ OKSİDAN OLAYLARINA
ZAMAN BAĞIMLI ETKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Seda TAŞIR

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2007**

ÖZET

Epidermal büyüme faktörü (EGF), çenealtı tükürük bezi (submandibular bez) ve tükürükte yüksek konsantrasyonda bulunur. EGF gibi çeşitli büyüme faktörleri yara iyileşmesi sürecinde önemli rol oynarlar. Ağız yaralarına uygulanan EGF’nin tükürük bezi oksidatif olaylarına etkilerinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple ağız mukozasında cerrahi kesi yarasına EGF uygulamasının, tükürük bezi oksidatif olayları üzerine etkilerini, zaman bağımlı olarak araştırmayı planladık.

Deneylerde Yeni Zelanda albino tavşanlar (erkek, $n=43$, $2,5 \pm 0,4$ kg) kullanıldı. Submukozal kesi yapıldıktan sonra tavşanlar iki eşit gruba ayrıldılar: 1- Tedavi edilmeyen yaralar, 2- EGF implante edilmiş yaralar. Yaralanmadan sonraki 1., 3. ve 5. günlerde tavşanlar kulak veninden aşırı dozda sodyum pentobarbital verilerek feda edildiler. Tükürük bezleri hemen çıkarılarak, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), önemli antioksidanlar olan glutatyon (GSH), askorbik asit (AA) ve oksijene bağlı savunma mekanizmalarında konakçı savunmasında rol alan enzimlerden olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar Anova Varyans Analizi ve Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı.

Sonuç olarak ekzojen EGF uygulamasının yara iyileşmesindeki olumlu etkileri nedeniyle, tükürük bezi dokusunda kontrollerle kıyas edildiğinde, TBARS düzeylerinde bir azalmaya neden olurken; MPO aktivitesini arttırmıştır. Bunlara ilaveten enzimatik olmayan antioksidanlardan GSH düzeylerinde değişmeye neden olmamıştır, AA düzeylerinde ise azalmaya neden olmuştur.

Bilim Kodu : 203.1.057
Anahtar Kelimeler : EGF, submandibular bez, lipit peroksidasyonu, antioksidan, MPO, vitamin C
Sayfa Adedi : 88
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Şule COŞKUN

**THE TIME COURSE EFFECT OF EXOGENOUS EGF
ADMINISTRATION ON OXIDATIVE STRESS OF
SUBMANDIBULAR GLAND**

(M.Sc. Thesis)

Seda TAŞIR

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

January 2007

ABSTRACT

Epidermal growth factor (EGF) is found in high concentrations in submandibular gland (SMG) and saliva. Various growth factors such as EGF play significant roles during wound healing process. There are limited numbers of studies on the effect of exogenous EGF implantation on oxidative events of salivary gland. That is why we planned to investigate the effects of oral submucosal implanted EGF on the oxidative stress of salivary gland.

In this study we used New Zeland albino rabbits (male, n=43, 2,5 ± 0,4 kg). After submucosal incisions were made the rabbits were divided into two equal groups: 1- Untreated wounds 2- EGF implanted wounds. The rabbits were killed by excess of sodium penthobarbitale anesthesia on the 1st, 3th and 5th days of postwounding. Submandibular glands were excised immediately. The levels of thiobarbituric acid substances (TBARS), last products of lipid peroxidation, glutathione (GSH) and ascorbic acid (AA), important antioxidants, and the activity myeloperoxidase (MPO) enzyme that takes role in oxygen-mediated host defence mechanisms were measured by spectrophotometrically. Results were compared by Anova Variance Analysis and Mann Whitney U test.

In conclusion, exogenous EGF treatment caused a decrease in TBARS levels of salivary gland and increase in MPO activity of salivary gland because of its

positive effects on wound healing. GSH levels of salivary gland were not changed. And finally, AA levels of salivary gland were decreased.

Science Code : 203.1.057

Key Words : EGF, salivary gland, lipid peroxidation, antioxidant, MPO, Vitamine C

Page Number : 88

Adviser : Doç. Dr. Şule COŞKUN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince benden yardım ve desteğini esirgemeyen, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Şule COŞKUN'a burada tekrar sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Kıymetli tecrübelerinden faydalandığım hocalarım, G.Ü. Fen-Edebiyat Fak. Öğr. Üyesi Yrd. Doç. Dr. K. Barboros BALABANLI'ya ve A. Ü. Tıp Fak. Öğr. Üyesi Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a, ayrıca EGF formülasyonlarının hazırlanmasındaki katkılarından dolayı, G. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK'e ve laboratuvarındaki çalışmalarım sırasında, yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Uzm. Bio. Gülçeri GÜLEÇ ve Uzm. Bio Kadriye YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmanın tamamlanmasında bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen çok sevgili eşim İlker YILMAZ'a ve yanımda oldukları için aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Tükürük Bezleri	7
2.1.1. Major tükürük bezleri (Glandulae salivariae majores).....	7
2.1.2. Minör bezler (Glandulae salivariae minores)	10
2.2. Tükürük Bezleri Mikro Anatomi ve Histolojisi.....	10
2.2.1 Tükürük bezi bölümleri.....	11
2.3. Tükürük Bezleri Embriyolojisi.....	14
2.4. Tükürük Fizyolojisi.....	15
2.5. Tükürük Bezlerinden Organik Bileşenlerin Salgılanması	16
2.5.1 Tükürüğün bileşenleri	17
2.6. Tükürük Salgılanmasının Kontrolü	17
2.6.1. Tükürük yapımı.....	18
2.7. Tükürük Fonksiyonları.....	19

	Sayfa
2.8. Büyüme Faktörleri	21
2.8.1. Büyüme faktörlerinin reseptörleri	24
2.8.2. Büyüme faktörleri ve yara iyileşmesi	25
2.9. Yara	25
2.9.1. Yara iyileşmesi	25
2.10. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	30
2.10.1. EGF ve yara iyileşmesi	33
2.10.2. EGF ve tükürük bezleri	34
2.11. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	35
2.11.1. Oksijen ve canlılar	35
2.11.2. Reaktif türler olarak radikaller	37
2.11.3. Oksijen radikallerinin biyolojik reaksiyonları	45
2.11.4. Serbest oksijen radikallerinin yara iyileşmesindeki rolleri	49
2.11.5. Serbest radikallere karşı koruyucu sistemler (Antioksidanlar)	52
3. MATERYAL-METOT	63
3.1. Deney Protokolü	63
3.2. EGF Preparatının Hazırlanması	63
3.3. Yara Modelinin Oluşturulması	63
3.4. Yöntemler	67
3.4.1. Dokuda TBARS tayin yöntemi	67
3.4.2. Dokuda GSH tayin yöntemi	67
3.4.3. Dokuda AA tayin yöntemi	67
3.4.4. Dokuda MPO tayin yöntemi	67

	Sayfa
3.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	68
4. BULGULAR	69
4.1. Tükürük Bezi TBARS Düzeyleri	69
4.2. Tükürük Bezi GSH Düzeyleri	69
4.3 Tükürük Bezi MPO Düzeyleri	69
4.4 Tükürük Bezi AA (Vitamin C) Düzeyleri	70
5. SONUÇ	74
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Makrofajların yara iyileşmesindeki rolü ve etki mekanizması.....	28
Çizelge 4.1. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi TBARS, GSH, AA. düzeyleri ve MPO aktivitesine etkilerini gösteren çizelge.....	71

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tükürük bezi salgı ve kanal kısımları	11
Şekil 2.2. Tükürük bezleri oluşumu	15
Şekil 2.3. Büyüme faktörlerinin hücrel fonksiyon yolları	22
Şekil 2.4. Yara iyileşmesinin şematik gösterimi	27
Şekil 2.5. Yara iyileşmesinin fazları	29
Şekil 2.6. Prepro EGF' nin şekli	30
Şekil 2.7. EGF' nin yapısı.....	33
Şekil 2.8. Lipit peroksidasyonu	47
Şekil 2.9. Malondialdehit (MDA)	48
Şekil 2.10. Solunumsal patlama.....	51
Şekil 2.11. Antioksidan savunma sistemleri	53
Şekil 4.1. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi TBARS düzeylerine etkileri.....	72
Şekil 4.2. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi GSH düzeylerine etkileri.....	72
Şekil 4.3. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi MPO aktivitesine etkileri	73
Şekil 4.4. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi AA düzeylerine etkileri.....	73

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. İntramüsküler enjeksiyon.....	65
Resim 3.2. Ağızın açılıp, dilin ekarte edilmesi.....	65
Resim 3.3. 1.5 cm uzunluğunda posterio-anterior yönde insizyon	66
Resim 3.4. Yara dudaklarına sütür uygulanması	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
cm	Santimetre
Da	Dalton
e-	Elektron
Fe⁺²	Demir iyonu
g	Gram
H⁺	Hidrojen iyonu
HCL	Hidroklorik Asit
HOCL	Hipokloröz asit
H₂O₂	Hidrojen peroksit
H₂SO₄	Sülfürik Asit
K⁺	Potasyum iyonu
kDa	Kilodalton
L[·]	Lipit radikali
mg	Miligram
ml	Mililitre
Na⁺	Sodyum iyonu
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NO	Nitrik oksit
NO₂	Azot dioksit
O₂^{·-}	Süperoksit radikali
OH[·]	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksi Nitrit
ROO[·]	Peroksil Radikali
µl	Mikrolitre

Kısaltmalar**AA****ACTH****bFGF****BHT****CAT****DTNB****EDTA****EDRF****EGF****ER****GH****GSH****GSH-Px****GSSG****HMV****HOB_r****HOI****IgA****IgG****IgM****LH****LOOH****MDA****MPO****NGF****NOS****PCA****PDGF****PEG****PLC****Açıklamalar**

Askorbik asit

Adrenokortikotropik Hormon

Basit Fibroblast Büyüme Faktörü

Bütilhidroksi Toluen

Katalaz

5,5 ditiobis 2-nitrobenzoik asit

Etilendiamin tetra asetilasit

Endotel Kaynaklı Gevşetme Faktörü

Epidermal Büyüme Faktörü

Endoplazmik Retikulum

Büyüme Hormonu

Glutasyon

Glutasyon Peroksidaz

Okside Glutasyon

Yüksek molekül ağırlık

Hipobromür

Hipoiodür

İmmünglobilin A

İmmünglobilin G

İmmünglobilin M

Yağ Asidi

Lipit Peroksit

Malondialdehit

Miyeloperoksidaz

Sinir Büyüme Faktörü

Nitrik Oksit Sentaz

Perklorasetik asit

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

Polietilen Glikol

Fosfolipaz C

Kısaltmalar**PRL****ROT****SMG****SOD****TBA****TBARS****TCA****TGF****TGF- β** **UroEGF****UV****Açıklamalar**

Prolaktin

Reaktif Oksijen Türleri

Submandibular bez

Süperoksit Dismutaz

Tiyobarbitürik asit

Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri

Triklorasetik asit

Tümör Nekroz Faktörü

Dönüştürücü Faktör-beta

Urogastron Epidermal Büyüme Faktörü

Ultraviyole

1. GİRİŞ

Ekzojen olarak uygulanan antioksidanlar ya da büyüme faktörlerinin, yara iyileşmesi üzerine olan olumlu etkileri bilinmektedir [1,2]. Bu büyüme faktörlerinden en önemlisi Epidermal Büyüme Faktörü' dür.

Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF)' de yara iyileşmesini hızlandıran önemli bir büyüme faktörüdür [3]. Sistemik ya da topikal olarak EGF uygulanmasının yara iyileşmesine olumlu katkılarının bulunduğunu gösterir pek çok çalışma mevcuttur [4–7]. EGF, çenealtı tükürük bezinde ve tükürükte yüksek konsantrasyonda bulunur [8].

53 aa 'li, tek zincirli ve 3 adet disülfid bağı içeren bir polipeptid olan EGF, pek çok mezodermal ve ektodermal kökenli hücreler için mitojenik özelliktedir [9–11]. Diğer birçok büyüme faktöründe olduğu gibi EGF reseptörü de, sinyalin başlatılmasında rol oynayan tirozin kinaz aktivitesine sahiptir [12].

Aynı zamanda EGF, ağız epitelyal bariyerinin devamlılığı için önemlidir ve oral mukozal yara iyileşmesinde ve oral mukozanın devamlılığında çok önemli bir role sahiptir [13].

Tükürük bezleri büyüme, farklılaşma ve yara iyileşmesinde etkili olan, doku sağlığının korunmasında önemli rol oynayan, biyolojik olarak aktif peptidlerin zengin kaynağıdır. Tükürük bezleri, EGF ve NGF gibi gelişmeyi destekleyen faktörler salgırlar [14,15]. Tükürük, içerdiği immünglobulinler, büyüme faktörleri ve antibakteriyel yapılarla yara iyileştirici özelliğe sahiptir [16].

EGF' nin yüksek miktarda bulunduğu tükürük bezi ekstrelerinin, yara iyileşmesini hızlandırıcı etkilerinin olduğu gösterilmiştir [17]. Tükürük bezleri çıkarılmış sıçanlarda hem gingival hem de dermal yara iyileşmesinin geciktiği görülmüştür [16].

Tükürük bezinde bulunan Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Sinir Büyüme Faktörü (NGF), ve Dönüştürücü Faktör-beta' nın (TGF), özafagus ve mide mukozasını

koruyucu, intestinal lezyonları iyileştirici ve yara dokusunda epitelizasyonu ve yara kontraksiyonunu arttırıcı etkileri bilinmektedir [14].

Tükürük bezleri, ağız içerisindeki bütünlüğün devamlılığını sağlamada önemli bir rol oynar [18].

Tükürük bezleri, tükürük salgısı sayesinde zorlu oral doku dengesinin korunmasından büyük ölçüde sorumlu, sekresyon organlarıdır [19-22].

Tükürük bezlerinde sentezlenen EGF' nin, dermal ve gastrik yara iyileşmesinde etkili olduğu ve doku hasarının tükürükte EGF sentezinin artmasına yol açtığı pek çok çalışma mevcuttur [23-26].

Ağız içerisine yapılan uygulamaları takiben, büyüme faktörlerinden EGF' nin kaynağı olan çene altı tükürük bezlerinde, hem oksidan olaylarla ilgili olarak hem de EGF reseptör tutulumuyla ilgili olarak değişiklikler gözlemlendiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [27,28].

Aynı zamanda, ağız içerisinde oluşturulan hasarların tükürük bezlerinin fonksiyonu üzerine de etki ettiği bilinmektedir [29]. Ağız içindeki patolojik değişikliklerde, tükürük bezlerinde, tükürük oranının ve bileşiminin değiştiğini gösterir çalışmalar mevcuttur [30]. Avula ve arkadaşlarının, tükürük bezlerinin, oksidatif hasara karşı çok duyarlı olduğunu gösteren çalışmaları mevcuttur [31].

Ağız sağlığı için mutlak faktör olan tükürüğün önemli ölçüde antioksidan özellikleri olduğu bilinmektedir [32]. Takahaski ve arkadaşları da çalışmalarında, tükürüğün yüksek miktarlarda glutatyon (GSH) içerdiğini rapor etmişlerdir [33].

Campos ve arkadaşları, ratlarda alkolizmle gerçekleşen oksidatif hasarın, tükürük ve parotid bezlerinde meydana gelen değişiklikleri göstermek amacıyla yapmış oldukları çalışmalarında, parotis bezi, submandibular bez ve majör bezlerde antioksidan savunma sistemlerinin harekete geçtiğini göstermişlerdir [29].

Bodner ve arkadaşları, damakta mukoza ve submukozayı içeren kesi yarası oluşturdıkları ve tükürük bezlerini çıkardıkları ratlarda, özellikle tükürükle direkt temas eden mukozal bölümün submukozaya göre daha geç iyileştiğini saptamışlardır ve tükürükteki faktörlerin, epitelizasyondan daha ziyade yara kontraksiyonuna etkili olduğu görüşünü ortaya atmışlardır [16].

Yaralanma ile bozulmuş doku bütünlüğünün yeniden tamiri esnasında oksidatif olaylar gelişmektedir. Yaralanma ve bunu takiben tamiri sürecinde artmış bulunan serbest radikaller oksidatif hasara neden olmaktadır [34].

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir [35]. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\cdot$)' ve geçiş metallerinin iyonlarıdır. Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler en hassas olanlarıdır. Serbest radikaller, organizmada lipitler üzerine etkili olarak lipit peroksidasyonuna neden olurlar [34].

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden en çok etkilenen hücre elemanları, membran lipitleridir. Oksidatif atak özellikle poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu ile kendisini gösterir [36]. Lipit peroksidasyonu, hücre membranında bulunan doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen radikalleri ile reaksiyona girmesi ve oksidatif yıkıma uğramasıyla sonuçlanan bir olaydır [37,38]. Lipit peroksidasyonu sonucu lipit radikalleri oluşur. Bu radikaller bir araya gelerek konjuge diene'leri yaparlar. Devam eden oksidasyonla bu diene'ler de parçalanır [36]. Doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda tiobarbitürik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA), bu zincir sırasında bir ara ürün olarak oluşur [34,36]. Bu nedenle malondialdehit düzeyi, oksidatif poliansatüre yağ asitleri (PUFA) hasarının bir göstergesi olarak kabul edilir. Malondialdehit miktarının artması hasarı gösterir [36]. Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), oksidatif hasarın yaygın indikatörü olarak kullanılmaktadır.

Yara iyileşmesi rejeneratif bir süreçtir ve oksidatif hasarın oluşmasına neden olan bir olaydır [34].

Yaralanmış dokularda ya da yara yapılmış hayvanların çeşitli dokularında TBARS seviyelerinin artmış bulunduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur [39,40]. Ancak ağız içerisinde submukozal olarak yapılmış yara modelleri ve bu modellerin tükürük bezine olan etkilerini gösterir çalışmalar çok azdır.

Hücreler serbest radikalleri uzaklaştırmak için çok sayıda mekanizmaya sahiptir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için organizmada birçok enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır [34].

Oral kavitedeki infeksiyonlar, tükürükte lipit peroksidasyon düzeylerini yükseltmekte ve antioksidan aktivitenin düşmesine yol açmaktadır [41,42].

Önemli antioksidanlardan biri olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır [34].

Dokuda glutatyon miktarının artması hücrelerin oksidatif stresden korunduğunun bir göstergesidir [36].

Enzimatik olmayan antioksidanlardan olan askorbik asit (C vitamini, AA), organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kuvvetli indirgen aktivitesinden dolayı, güçlü bir antioksidandır [34].

Askorbik asit antioksidan etkilerini, redükte glutatyon veya E vitamini ile etkileşerek ya da tek başına gerçekleştirir [43]. Askorbik asit, organizmada oluşan tüm reaktif oksijen türlerinin doğal süpürücüsüdür [44].

Askorbik asit, tükürük bezlerinin ekzokrin asinisinde oldukça yüksek miktarlarda bulunur. Bu nedenle tükürük bezi fonksiyonlarındaki rollerinin araştırıldığı pek çok çalışma mevcuttur [45,46]. Askorbik asit miktarı, lipit metabolizmasını etkiler [47].

Serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu hasarı önlemek için ekzojen radikal temizleyicisi üzerinde çalışılmıştır. Bunlardan biri de endojen bir antioksidan olan askorbik asittir. Askorbik asit (Vitamin C) membran içindeki ve ekstrasellüler sıvılardaki lipit peroksidasyonunu önler, geniş dozaj limiti içerisinde toksik etkiye sahip değildir. Operasyon gibi fiziksel stresler, plazma ve dokuda askorbik asit seviyesinde düşüşe neden olur. Literatürde E vitamini ile birlikte verilen askorbik asidin serbest oksijen radikallerini temizleyici etki gösterdiğini bildiren yayınlar vardır [36].

Askorbik asidin, tükürük bezlerinden salgılanan granüllerin bileşenlerini oluşturduğu ve salgı oluşumunda önemli role sahip olduğu belirtilmiştir. AA, tükürük bezlerinin fonksiyonunda önemli rol oynar ve tükürük sekresyonunu etkilemektedir [46].

Askorbik asit eksikliğinde, tükürük bezlerinden salgılanan ve önemli savunma proteinlerinden olan peroksidaz ve sindirim enzimi olan amilazın üretiminde azalma olduğu rapor edilmiştir.

Tükürükteki peroksidazlar, ağızdaki bakteriler tarafından sekrete edilen H_2O_2 ' yi ortadan kaldırırlar. Aynı zamanda da ağızdaki bakteri metabolizmasının potansiyel inhibitörlerini devam ettiren iyonun okside formlarını vermek için tiyosiyanatın peroksidasyonun katalizler [48].

Vitamin C eksikliği yapılmış Gine Pig' lerde, çenealtı tükürük bezinde asetil kolin reseptöründe azalma tespit edilmiştir [45].

Askorbik asit düzeyinin düşük olması, tüm kronik inflamatuvar hastalıklarda ve lipit peroksidasyonunun artmış olduğu durumlarda önemli rol oynar [34].

Askorbik asit eksikliğinde insanlarda majör tükürük bezleri şişmesiyle lakrimal sekresyon ve tükürükte azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [49].

İnfeksiyöz olaylarda başta Staphylococcus aureus gibi patojenler ayrıca lökotrienler, prostaglandinler gibi mediyatör maddeler nötrofil, eosinofil ve makrofajları aktive ederler, membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi yoluyla reaktif oksijen türlerinin

(ROT) salgılanmasına yol açarlar. Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyal savunma mekanizması myeloperoksidaz enzimidir. Süperoksit radikalının dismutasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit, myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla reaksiyona girerek güçlü bir antibakteriyal ajan olan hipoklorik asidi oluşturur. İnfeksiyöz ajanlarla savaş için gerekli olan ROT'lar, kan hücreleri tarafından aşırı salgılanacak olurlarsa bu kez yarar yerine zararlı olmaya başlarlar [50].

Yara iyileşmesinin inflamasyon fazında rol alan nötrofillerin, fagositoz sırasında büyük miktarda oksijen kullanmaları nedeniyle solunumsal patlama ortaya çıkar [51]. Solunumsal patlamanın amacı, fagositler tarafından mikroorganizmaların yok edilmesinde kullanılabilecek oksidan ajanlar sağlamaktır. Bu oksidan ajanları kullanan mikrobisidal sistemlerden biri de Miyeloperoksidaz (MPO) Sistemi dir. Nötrofil ve monositler, primer lizozomal granüllerinde bir hem enzimi olan MPO ihtiva ederler [51,52].

Ağız dokusunun inflamasyonu veya infeksiyonuyla, tükürük bezinde MPO içeren lökositlerin sayısında artış olduğu tespit edilmiştir [53].

MPO, tükürükteki peroksidaz resaksiyonlarının büyük bir bölümünden sorumludur [53]. Bu çalışmada da, EGF terapisi ile tükürük bezi MPO aktivitesinde değişimler belirlenmeye çalışılmıştır.

Tüm bu bilgilerin ışığında, oral mukozadaki yaraya ekzojen olarak uygulanan EGF'nin, hedef doku dışındaki tükürük bezlerinde gerçekleşen oksidan olaylara ne gibi etkilerde bulunduğunu göstermek amacıyla, TBARS düzeyi, mieloperoksidaz (MPO) aktivitesi ve organizma için önemli antioksidanlar olan ve birlikte etkileşim gösteren glutatyon (GSH) ve askorbik asit (AA) düzeylerini, zaman bağımlı olarak araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tükürük Bezleri

Tükürük adı verilen ve önemli fonksiyonları olan salgı, tükürük bezleri tarafından oluşturulur [54,55]. Tükürük bezleri ağız ve boğaz çevresinde yerleşmişlerdir. Ağız sindiriminde çok önemli görevleri vardır ve salgılarını ağız boşluğuna akıtırlar [56]. Tükürük bezleri majör (*Glandula salivariae majores*) ve minör tükürük bezleri (*Glandula salivariae minores*) olmak üzere iki gruba ayrılır [54,55]. Kulakaltı (Parotis), çenealtı (submandibular) ve dilaltı (sublingual) tükürük bezi olmak üzere 3 çift majör tükürük bezi var olup bunlar tükürük üretiminde ana role sahiptir [27,54]. Yaklaşık 600–1000 adet kadar olan minör tükürük bezlerinin ise tükürük üretimine küçük bir katkısı vardır [54,55]. Hepsi de ağız içerisine tükürük salgırlarlar. Kulakaltı tükürük bezleri (parotis) üst azı dişlerin yanından, çenealtı tükürük bezleri (submandibular) dilin altında ön taraftan ve dilaltı (sublingua) tükürük bezleri ağız tabanında birçok ufak noktadan tükürük salgırlar. Bu bezlerle birlikte, dudaklar, yanakların iç kısmı ve ağız ile boğazın bütün yüzeylerinde yüzlerce ufak tükürük bezi bulunur. Tükürük bezleri, ağız ıslak tutan, sindirimi başlatan ve dişleri çürükten koruyan tükürüğü salgırlarlar [56].

2.1.1. Major tükürük bezleri (*Glandulae salivariae majores*)

Kulakaltı tükürük bezleri (*Glandula parotidea*, Parotis bezi)

En büyük tükürük bezi olan parotis bezi, kulağın ön ve aşağısında ve ramus mandibulanın arkasında yer alır [54-56]. 3-4 cm. boyutlarında olup ortalama ağırlığı 20-30 gr. olan düzensiz, geniş şekilli ve unilobular bir bezdir [54,55,57]. Salgı hücrelerinin tamamı seröz tipte olan birleşik tübüloalveolar bir bezdir [27]. Salgı granülleri yüksek amilaz aktivitesine sahiptir ve proteinlerden zengindir. Bağ dokusu birçok plazma hücreleri ve immünglobin A (IgA) salgırlarlar. Bezin çevresindeki kapsülden bez içine bağ dokusundan uzantılar sokulur, bunlar bezi lob ve lobcuklara ayırır. Parotis bezi, 3 yüzeyel ve 2 derin olmak üzere 5 parçaya sahiptir. Parotis bezi, etrafı kaslarla çevrili üçgen şekilli bir alanda oturur. Parotid kompartmanda yerleşik

olup bu trianguler boşluk, fasial sinir ve dallarını, sensoriyel ve otonomik sinirleri, eksternal karotis arteri ve dallarını, retromandibular veni (Posterior fasial ven) ve parotid lenfatikleri içerir [54,55]. Bez, fibröz bir kapsül ile örtülüdür. Nervus facialis, bezi derin ve yüzeysel olmak üzere iki parçaya ayırır. Yüzeysel lobun büyük kısmı deriye yakın olarak uzanır ve bezin şiştiği (parotitis gibi) hallerde belirginleşir.

Parotis bölgesindeki tabakalar özetle;

1. Yüzeysel tabaka (Sinir tabakası)
2. Orta tabaka (Ven tabakası)
3. Derin tabaka (Arter tabakası) 'dır.

Kulaklatı tükürük bezinde önemli sayılacak miktarda lenf dokusu vardır. Bunların bir kısmı kapsül altında ayrı lenf bezleri olarak bulunur. 15-20 kadar lenf folikülü ise bez içinde dağılmıştır. Lenf akımı derin juguler zincire boşalır. Parotisin hücreleri seröz salgı yapar, fakat mukus salgılayan bazı hücreler de vardır. Parotis kanalı (Stenon, Stensen kanalı), bezin ön kenarından çıkar. Kanal, 2. üst molar diş hizasında ağza açılır. Kanal, tragustan üst dudakın ortasına çekilen bir doğru üzerinde bulunur ve yaklaşık olarak 5 cm. uzunluğundadır [57].

Çenealtı tükürük bezleri (Glandula submandibularis, Submandibular bez)

Çenealtı tükürük bezleri, kulakaltı tükürük bezinin yarı ağırlığında olup sıklıkla submaksiller bez olarak ta adlandırılır. Çünkü İngiliz anatomisyenler mandibulayı, submaksilla olarak da adlandırırlar. Bu bez digastrik kasın, anterior ve posterior karınları ve mandibulanın inferior sınırı arasında kalan çenealtı üçgen içerisinde yer alır [54,55]. Ağız tabanında her iki tarafta, korpus mandibula'nın iç tarafında bulunur ve aşağıda çenealtı üçgene doğru uzanır [57]. Kulakaltı tükürük bezi gibi, çenealtı tükürük bezinin de derin boyun fasyasından oluşan sağlam bir kapsülü vardır [54,55,57]. Arkada, stilomandibüler membran, çenealtı tükürük bezini parotisten ayırır. Bezin yüzeysel ve derin iki lobu vardır. Çenealtı bez kanalı (Wharton kanalı), Nervus lingualis ve Nervus hypoglossus arasında derin loptan çıkar ve lingual frenulumun iki

yanında ağız boşluğuna açılır. Yaklaşık olarak 5 cm uzunluğundadır [57]. Wharton kanalı, ağız tabanının anteriorunda lingual frenulumun lateralinde intraoral kaviteye boşalır. Lingual sinir Wharton kanalının etrafını sarar. Kulakaltı ve çenealtı bez kanalları arasında farklılıklar mevcuttur. Kulakaltı tükürük bezi kanalı oldukça dar iken tam olarak esnek değildir. Çenealtı tükürük bezi kanalı ise geniştir [54,55]. Bezi, Arteria lingualis ve Arteria facialis besler, Vena facialis anterior boşaltır. Lenf akımı, çenealtı lenf bezlerine, oradan da juguler lenf bezlerine olur [57]. Çenealtı tükürük bezlerinin innervasyonu iki önemli kaynaktan gelir.

1- Sempatik innervasyon; lingual arter boyunca superior servikal gangliyondan sağlanır.

2- Parasempatik innervasyon ise; lingual sinir yoluyla çenealtı ganglion tarafından sağlanır [54,55].

Çenealtı tükürük bezinin salgı hücrelerinin tamamı seröz ve müköz tiptedir. Salgı hücreleri protein salgı granülleri içerir [27].

Dilaltı tükürük bezleri (Glandula sublingualis, Sublingual bez)

Majör bezlerin en küçüğüdür. Badem şeklindeki bez, ağız tabanı mukozasının derininde, Frenulum linguae'nin iki yanında, mandibula ve genioglossus kası arasında yer alır. Dilaltı bölgesinde plika sublingualis adlı kabartıyı yapar, ortalama 3–4 cm uzunlukta ve 1 cm kalınlığındadır. İnferiorda mylohyoid kasla sınırlıdır. Wharton kanalı ve lingual sinir, dilaltı bez ve genioglossus kası arasında ilerler.

Kulakaltı ve çenealtı bezlerin aksine dilaltı tükürük bezinin gerçek bir kapsülü yoktur. Aynı zamanda kulakaltı ve çenealtı bezin aksine dilaltı bezin tek dominant kanalı olmayıp bunun yerine yaklaşık olarak 10 tane küçük kanal (Rivinius kanalları) tarafından drene edilirler. Bu kanallar bezin superiorundan çıkarlar, ağız tabanında dilaltı oluk boyunca plika sublingualislerde boşalırlar. Bunun sonucunda anteriordaki duktusların birkaçı birleşerek ortak bir kanal oluşturabilirler (Bhartolin kanalı). Bu kanalda tipik olarak Wharton kanalına dökülür. Dilaltı bezin kanalları kontrast madde

enjeksiyonu için çok küçüktür [54,55]. Lenf akımı submental ve çenealtı lenf bezlerine olur [54,55,57]. İnnervasyonu iki önemli kaynaktan olmaktadır.

- 1- Sempatik innervasyon; fasial arter boyunca servikal zincir gangliyonlarından,
- 2- Parasempatik innervasyon; çenealtı tükürük bezleri gibi çenealtı gangliyondan innerve edilir.

Arteriyel beslenmesi; lingual arterin sublingual dalı ve fasial arterin submental dalı ile olurken venöz drenaj arteriyel beslenme gibi olup vena jugularis internaya dökülürler [57].

2.1.2. Minör bezler (*Glandulae salivariae minores*)

Majör tükürük bezlerinin aksine minör tükürük bezlerini drene edebilecek kanallardan yoksundurlar. Bunun yerine her tükürük ünitesi kendi tek kanalına sahiptir. Minör tükürük bezleri yanak, dudak, damak ve dil bölgelerinde lokalize olmuştur. Ayrıca minör tükürük bezleri tonsillerin superior polünde de bulunurlar (Weber bezi). Tonsiller, plikalar, dil tabanı (Von Ebner bezi), molar, retromolar (Carmalt bezleri), paranazal sinüsler, larinks, trakea ve bronşlarda da bulunurlar.

Minör tükürük bezlerinden kaynaklanan en yaygın tümör bölgeleri, üst dudak ve yanaklardır [54,55]. Minör tükürük bezlerinin salgısı seröz veya müköz olabilir, fakat müköz bez terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır [57].

Minör bezlerin birçoğu parasempatik innervasyonu, lingual sinir yoluyla alır. Damağın minör tükürük bezleri ise sfenopalatin gangliyondan, palatin sinirler yoluyla alır [54,55].

2.2. Tükürük Bezleri Mikro Anatomi ve Histolojisi

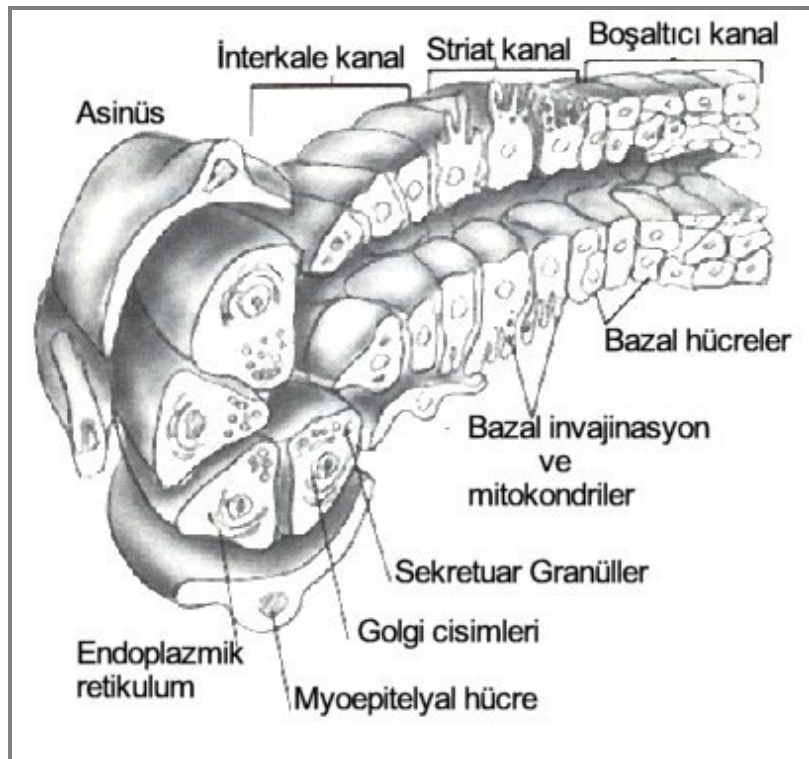
Tükürük bezleri çift taraflı olarak kulaklatı (parotid), çenealtı (submandibular) ve dilaltı (sublingual) bezlerdir. Bunlar konnektif doku kapsülünün septalarıyla oluşan lob ve lobülüslerden ibaret tübüler ve tübüloalveolar bir yapı gösteren dış salgı bezleridir. Merokrin bez grubuna dahil edilirler. Tükürük bezleri parankim ve stromadan

oluşmuşlardır. Parankim, asini, salgı kanalı ve boşaltım kanallarını içerir. Stroma ise bağ dokusundan müteşekkil olup parankime destek sağlar. Kan damarları, lenf damarları ve tükürük kanaliküllerini içerir. Stromayı oluşturan bu bağ dokusu bazı bezlerde fibröz kapsülü teşkil eder [54,55].

2.2.1 Tükürük bezi bölümleri

Her bir tükürük bezinin Şekil 2.1’ de görüldüğü gibi salgılayıcı (sekretuar) ve kanal (duktal) bölümleri vardır.

Salgılayıcı ünite (tükürük ünitesi); asiniler, miyoepitelyal hücreler, birleştirici kanallar, salgı (çizgili kanal) kanalları ve boşaltıcı kanallardan oluşur. Tüm tükürük asiner hücreleri, salgılayıcı (sekretuar) granüller içerir. Seröz bezlerde bu granüller amilaz, müköz bezlerde ise mûsin içerir [54,55].



Şekil 2.1. Tükürük bezi salgı ve kanal kısımları [54]

Salgılayıcı (sekretuar) ünitenin yapısı

Asini primer salgının yapımından sorumlu olup üç tipe ayrılır.

1- Seröz (Protein salgılayan) asini; zimojen granüllerden zengin sferikal hücrelerdir [54,55]. Gerçekte serömüköz hücrelerdir. Çünkü önemli miktarda polisakkaritleri ve proteinleri salgılarlar [27].

2- Müköz (Musin salgılayan) asini; şekilleri daha tübüler olup, musinojen granülleri Hematoksilen-Eozin boyasında yıkandığı için boş hücre görünümü verir [54,55].

3- Serömüköz (Karma) asini, seröz demilünler veya birkaç seröz asiniler arasında ağırlıklı olarak müköz asiner hücrelerden oluşur.

Miyoeptelyal hücreler, asinilerin etrafına belirgin yapılar gönderir. Bu yapılar proksimal kanal sisteme de gider ve salgıları boşaltıcı kanallara doğru hareket ettirir. Sempatik sistemin, miyoeptelyal hücreler için motor sinir taşıdığı gösterilmiştir. Parasempatik sistemle de uyarılırlar (stimüle edilirler). Bu hücrelerin kontraksiyonu tükürüğün ilk hareketini sağlamaya yardım eder [54,55].

Kanal (duktal) ünitenin yapısı

Asini lümeni kanal sistemle devam eder. Sırasıyla; birleştirici, salgı (çizgili kanal) ve boşaltıcı kanalları oluşturur.

Birleştirici kanallar, karbonik anhidrazdan zengin küçük kuboid epitelyal hücrelerle çevrilidir. Bu hücreler duktal lümene bikarbonat sekrete edip, lümeden klorid absorbe ederler. Salgı kanallar ise basit kuboid epitelyal hücrelerle çevrili olup proksimalde bazal ve bazolateral plazma membranı, mitokondri nedeniyle girintiler oluştururlar [27, 54,55]. Bu hücreler lümeden sodyum absorbe edip potasyum ve aşırı hipotonik bir sıvı salgılarlar. Tükürük akımı arttıkça bu hücrelerin aktivasyonu için geçen süre kısılır ve daha az hipotonik bir tükürük oluşur.

Boşaltıcı kanallar proksimalde basit kuboidal ve strafiye kuboidal hücrelerle, distalde ise psödostrafiye kolumnar epitelle çevrilidirler. Bu hücreler tükürüğün modifikasyonunda rol oynamazlar.

Birleştirici kanallar kısa olup müköz bezleri daha azdır. Salgı kanallar ise müköz bezlerden yoksundur. Ancak her iki kanalda seröz bezlerden zengindir ve sekresyonu çok fazla modifiye ederler. Müköz bezlerden ise tam tersi olarak primer sekresyonu çok fazla modifiye edemezler.

Kulaklatı tükürük bezi tamamen seröz bir bezdir. Bezin kendine has özelliği birçok yağ hücresi içermesidir ki kulakaltı tükürük bezinde adiposit/asiner hücre oranı 1/1'dir.

Çenealtı tükürük bezleri, tubuloasiner veya karma fakat ağırlıklı olarak seröz bir bezdir. Yaklaşık %10 asini musinözdür.

Dilaltı tükürük bezleri ise karma olup ağırlıklı olarak müközdür. Miks asinilerde, seröz hücreler müköz hücrelerin etrafında yarım ay gibi dizilmişlerdir bunlara Ginuzzi yarım ayı denir.

Majör bezlerden dilaltı tükürük bezleri basit bir transport sistemi kullanırken, kulaklatı ve çenealtı bezler daha karmaşık sistemler içerir. Dilaltı bezde karma fakat müköz ağırlıklı bir bezdir. Saf seröz asini nadir veya yoktur.

Tükürük bezi stroması lenfosit ve plazma hücrelerinden zengin olup bu hücreler IgA üretiminden sorumludur. IgA bazal membran üzerindeki salgılayıcı parçalara yapışır ve epitelyal hücre üzerinden transport edilerek kanal lümenine salgılayıcı IgA şeklinde bırakılırlar.

Sonuçta; kulaklatı sadece seröz bir bezdir. Çenealtı ve dilaltı bezler seröz ve müköz olarak karma bezlerdir. Çenealtı bez daha çok seröz iken, dilaltı bez daha çok müközdür [54,55].

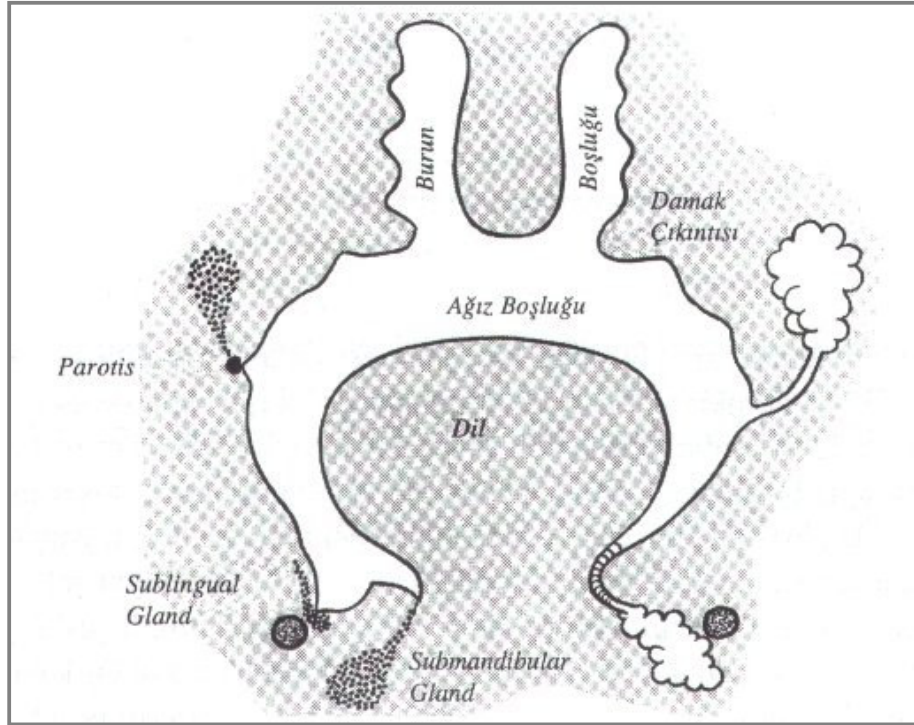
2.3. Tükürük Bezleri Embriyolojisi

Majör tükürük bezleri gebeliğin 6. ve 8. haftaları arasında oral ektodermden mezenşimal yüzeye doğru gelişir (Şekil 2.2). Ağız boşluğunu döşeyen epitelin poliferasyonu ile oluşan solid hücre kümeleri mezenkim içine doğru yönelerek bez taslağını oluşturur. Majör ve minör tükürük bezleri esas olarak aynı gelişim şeklini gösterirler.

Önce parotis gelişir, parotis taslağı primitif ağız kıvrımından solid hücre yığınlarının kordon şeklinde yanağın iç tarafından arka ve üst kısımlara doğru uzanmasıyla meydana gelir. Yani yanak epitelinin iç yüzeyinin invajinasyonu olur. Epitel kordonları yana ve arkaya doğru masseter adalesinin dış yüzeyinden kulak taslağına doğru ilerler ve böylece parotis taslağı posteriora doğru ilerlerken fasial sinir anteriora doğru ilerler. Sonuçta gelişimini tamamlayan parotis fasial siniri çevreler. Taslağı oluşturan kordonlardan terminal duktus ve sekretuar asiniler gelişir. Bu asini hücreleri gelişmelerini en son tamamlar. Sekretuar kısımlar ise duktal sistemden sonra gelişir. Fasial sinir bez içinde daha az dirençli bölgelere doğru ilerlerken sinir dalları arasındaki boşlukları parankim dokusu doldurur. Ancak parotis bezi en son kapsüle olur. Bu lenfatiklerin gelişiminden sonra olur ve sonuçta bu bez parankimi içerisinde lenfatiklerin bulunduğu anatomik bir yapıyı oluşturur. Sıklıkla bu lenf nodları içerisinde tükürük epitelyal hücreleri bulunur. Bunun Wharton tümörü ve Lenfoepiteloid kist oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer majör tükürük bezleri intraparakimal lenf nodu içermezler.

Çenealtı tükürük bezi, parotis bezi gibi ektodermal kökenli olup 6. haftada en erken yerine geçen bez olup doğumda bu bezin lobu tamamlandığı halde parotis tam gelişmemiştir. Dilaltı bez, embriyonel hayatın 8. haftasında bağımsız ve ayrı duktusları olan küçük bez sıraları şeklinde gelişir. Doğum sırasında lobları tam olarak gelişmiştir. Onuncu haftada bezler son yerlerini almış olup 22. haftada kanalları geçirgendir. Yeni doğanda tükürük salgısı kalitatif olarak tam değildir. Minör tükürük bezleri oral ektodermden ve nazofarengeal endodermden oluşur ve bu bezler majör tükürük bezlerinin gelişiminden sonra ortaya çıkarlar. Fötal hayatın 3. ayında gelişmeye başlarlar.

Bezlerin gelişimi sırasında otonom sinir sistemi önemli olup sempatik sinir sistemi stimülasyonu asiner diferansiyasyonu, parasempatik sinir sistemi ise bezin tamamının gelişimi için gereklidir [54,55].



Şekil 2.2. Tükürük bezleri oluşumu [58]

2.4. Tükürük Fizyolojisi

Tükürük bezleri, büyüklüklerine göre çok fazla tükürük üretirler. İnsanlarda bu miktar bezin 1 gr' ı için dakikada 1 ml' ye ulaşabilir. Tükürük salgısı, hem parasempatik hem de sempatik sistemin uyarılması ile meydana gelir. Parasempatik uyarı esastır, sempatik uyarı daha çok tükürüğün yapısını düzenler. Psikik etkilerle tükürük salgısı azalır veya çoğalır. Korku salgıyı azaltır. Yiyecek kokuları ve kuduz, ensefalit, epilepsi, parkinson hastalığı gibi bazı hastalıklar tükürük salgısını artırır. Tükürük bezlerinin sinirsel kontrolü VII. ve IX. kafa çiftleri ile taşınan parasempatik sistemin pregangliyonik lifleri ile sağlanır. İnsanlarda 24 saat içinde salgılanan tükürük miktarının 1000-1500 ml olduğunu ileri sürenler yanında, 500-700 ml' nin daha gerçekçi olduğunu savunanlar da vardır [54,55]. Bir günlük tükürük salgısının %71'ini

çenealtı tükürük bezleri oluşturur [54,55,59]. Minör tükürük bezlerinin salgısı çok azdır ve günlük üretimin sadece %5 gibi bir oranda toplam tükürük salınımına katılırlar. Salgı hızı, öğünler esnasında artar [54,55,60]. Durağan haldeki bezlerden gelen tükürüğün pH'sı 7.0'den biraz az olduğu halde aktif salgılama esnasında bu değer 8.0'e yaklaşmaktadır [60]. Tükürük iki sindirim enzimi içerir. Bunlar dil üzerindeki bezlerden salgılanan lingual lipaz ve tükürük bezlerinden salgılanan pityalin (α -amilaz)' dir. Tükürük aynı zamanda ağız mukozasını koruyan, besinleri kayganlaştıran glikoprotein yapıdaki müsinleri de içerir. Tükürük bunlara ilave olarak bakteri ve virüslere karşı ilk immünolojik savunmayı yapan IgA'yı; bakterilerin duvarlarına saldıran lizozim'i; demire bağlanan ve bakteriyostatik etkisi olan laktoferrini; dişlerin minesini koruyan ve toksik taninleri bağlayan prolinden zengin proteinleri de içerir [59].

Tükürüğün iyonik bileşimi türden türe ve bezden beze önemli değişiklikler göstermektedir. Genelde, asinide salgılanan tükürük muhtemelen, izotonik olup içerdiği Na^+ , K^+ , Cl^- ve HCO_3^- yoğunlukları plazmadakine yakındır. Kanallar suya nispeten geçirimsiz olduğundan, tükürük kanal sisteminde hipotonik hale gelir. Bundan dolayı, yavaş tükürük akımlarında ağza ulaşan tükürük hipotonik, alkali ve K^+ dan zengin, fakat Na^+ ve Cl^- dan nispeten fakirdir. Tükürük akımı hızlı olduğunda ise kanallarda iyonik bileşimin değişimi için daha az zaman kalır. Sonuç olarak insanlarda tükürük bu durumda hala hipotonik olmakla beraber daha yüksek Na^+ ve Cl^- yoğunluğu nedeniyle izotoniğe daha yakındır [59].

2.5. Tükürük Bezlerinden Organik Bileşenlerin Salgılanması

Tükürük bezlerinden esas olarak iki büyük grup protein salgılanır. Bunlar müsinler ve sindirim enzimleridir. Müsinler, moleküler ağırlıklarının % 60-80'i karbonhidratlardan oluşan glikoproteinlerdir. Epitel dokunun mekanik etkilerden ve dehidratasyondan korunması, katı gıdalar için yağlama fonksiyonu, mikroorganizmaların tutulması, mide ve ince barsak epitelinin asit ve sindirim enzimlerinin zararlı etkilerinden korunması gibi fonksiyonları üstlenir [14,61].

İnsanlarda tükürükteki başlıca sindirim enzimi esas olarak parotis bezinden salgılanan α -amilazdır. Amilaz diğer canlılarda ise çenealtı bezin intralobüler kanallarından salgılanır. Tükürük amilazının ana fonksiyonu, dış çevresindeki gıda artıklarının temizlenmesiyle oral hijyeni sağlamasıdır. Tükürük bezi hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan tükürüğün organik komponentlerine ek olarak, tükürük bezi kanal sistemi tarafından da bazı proteinler sentezlenir, depolanır ve salınır. Bunlar; NGF, EGF ve eritropoietin gibi büyüme faktörleri, ribonükleazlar, proteazlar, renin ve homeostatik esteroproteazlar, kallikrein, tanin ve çeşitli α -amilazlar gibi enzimlerdir [14,61].

2.5.1 Tükürüğün bileşenleri

Organik maddeler şunlardır;

Proteinler: α -amilaz, β -glukoridinaz, karbohidrataz, esteraz, lipaz, laktat dehidrojenaz, lizozim, peptidaz, fosfataz, ribonükleaz, laktoperoksidaz, süperoksit dismutaz (SOD)

Glukoproteinler: müsin, prolinden zengin peptid, histidin ve tirozinden zengin peptid.

Küçük organik moleküller: glukoz, lipit, azot, sialik asit, üre, ürik asit.

Diğer polipeptitler: staterin ve sialin, albumin, fibronektin, gustin, IgA, IgG, IgM, laktoferrin, kallikrein, NGF, EGF, vitamin bağlayan protein.

İnorganik maddeler şunlardır;

NH_4^+ , HCO_3^- , Ca^{++} , Cl^- , F^- , I^- , Mg^{++} , PO_4^{-3} , K^+ , Na^+ , SO_4^{-2} , tiyosiyanat iyonları ve non spesifik tamponlardır [27].

2.6. Tükürük Salgılanmasının Kontrolü

Tükürük salgılanması sinirsel kontrol altındadır [27]. Parasempatik sinir sistemi tükürük salgılanmasının primer oluşturucusudur [22,54,55]. Tükürük bezlerine giden parasempatik innervasyonun kesilmesi atrofi ile sonuçlanır. Ancak sempatik innervasyonun kesilmesi herhangi bir değişiklik yapmaz [54,55]. Parasempatik sinir

uyarımı, organik madde miktarı nispeten düşük, sulu ve bol miktarda tükürük salgılanmasına neden olur. Sempatik sinir uyarımı, vazokonstriksiyona ve insanlarda çenealtı bezlerden, organik içeriği zengin, az miktarda ve visköz tükürük salgılanmasına neden olur.

Ağızda besinin bulunması ve özafagusun gastrik ucundaki vagal afferent liflerin uyarılması, tükürüğün refleks salgılanmasına neden olur. İnsanlarda besinin görülmesi, koklanması ve hatta düşünülmesi tükürük salgılanmasına yol açar [59].

Tükürük bezleri salgıyı sürekli olarak yapmazlar. Salgı aktivitesi parasempatik innervasyonla uyarılır. Innervasyon, intraepitelyal veya subepitelyal olabilir. Subepitelyal innervasyonda, aksonların son uzantıları asinar hücrelerle sinaptik bağlantı yapmaz, bunun yerine hücrenin bazal plazmalemmasından yaklaşık olarak 100–200 nm. uzaklıkta salgı granüllerinin yakınındaki asetilkolini salar. Böylece aktive olmuş hücre, sıkı bağlantılar yolu ile komşu hücreleri uyarır. Salgı ürünlerini asini lümenine seröz sıvıya salarlar. Simpatetik innervasyon, tükürüğün müköz komponentinin salınmasından sorumludur. Bu komponent, yutmayı kolaylaştıran kaygan bir yüzeyin oluşturulması bakımından lokma içersine besin partiküllerinin yapışmasından sorumludur [62].

Tükürük salgılanması, nörohumoral agonistlerin salgı yapan hücrelerin üzerindeki yüzey reseptörlerine bağlanması ile başlar ve salgılamadan sorumlu hücresel mekanizmaları aktive eden hücre içi sekonder aracılara uyarır [14,61]

2.6.1. Tükürük yapımı

Parasempatik sinir sistemi yoluyla nöronal olarak kontrol edilirler [54,55,59]. Duyusal uyarımlar arasında hiyerarşi mevcuttur. Sırasıyla yutma, çiğneme, tat, koklama, görme ve en son düşünme. Stimülasyon total tükürük akımının 0,3 cc/dk' dan 1 cc/dk' nın üzerine çıkmasına neden olur. Ek olarak cevabın büyüklüğü kişinin açlık durumuyla da ilişkilidir.

Tükürük yapımı iki fazda oluşan aktif bir süreçtir.

1- Primer salgı; asiner hücrede oluşur. Bu salgı sonucunda yapı ve osmolalite açısından plazmaya benzer bir salgı oluşmaktadır.

2- Kanal salgısı; hipotonik tükürük salgısı olur. Sonuçta azalmış sodyum ve artmış potasyum içerikli bir salgı oluşur [54,55].

Tükürük akımı

24 saatlik periyot boyunca ortalama tükürük salınımı 1-1,5 litredir (~1 cc/dk) büyük kısmı yemekler sırasında salgılanır.

Bazal tükürük akım hızı 0,001–0,2 ml/dk/bez'dir. Uyarımla tükürük akım hızı 0,18–1,7 ml/dk/bez'dir. Tükürük akım hızı minör tükürük bezlerinde uyarımdan bağımsızdır. Toplam tükürük çıkışının %7-8'ini oluşturur.

Dilaltı ve minör tükürük bezleri toplam tükürüğün %10'unu oluşturmalarına rağmen birlikte müköz salgının büyük kısmını yaparlar ve oral mukozayı örten müköz tabakanın devamlılığında kritik rol oynarlar [54,55].

2.7. Tükürük Fonksiyonları

Tükürük bezlerinin çiğneme ve yutmayı kolaylaştıran salgı kapasitesi o kadar fazladır ki, tükürük salgısını yaygın şekilde azaltan hastalıklar dışında eksikliği fark edilmez [57].

Tükürük alınan besinlerin çözülmesi için sıvı bir ortam sağlar. Yutma ve çiğneme de yağlayıcı bir ortam oluşturularak kolaylık sağlar [27,57]. Ağız boşluğunu nemli tutar ve temizler, ağızdaki infeksiyon ajanlarının gelişmesini önler. Bu olay ağız ve dişin irrigasyonu ile primer olarak sağlanır. Buna ek olarak antibakteriyel ve antiviral özelliğe sahip lizozim, peroksidaz ve immunglobulinleri içerir. Nemli bir yanak kavitesi düzgün konuşmak için esastır [61]. Gebelik, testosteron ve tiroksin tükürük yapımını artırır. Menopozda ise tükürük salgısı azalır [57].

Tükürük için birçok majör fonksiyon tanımlanmıştır.

1- Oral mukozayı nemlendirir. Gerçekte oral mukozadaki musin tabaka, oral kavitedeki en önemli non-immün defans mekanizmasıdır.

2- Kuru yemekleri nemlendirir. Sıcak yemekleri soğutur. Lokmanın oluşumuna yardım eder. Yutmayı kolaylaştırır.

3- Çözünmüş durumdaki yemeklerin tat cisimlerini stimüle etmesine yardım eder. Tat cisimlerini sürekli temizleyerek yeni uyarımlara hazır hale getirir.

4- Oral kavite içeriklerini tamponlar. Tükürük bikarbonat yönünden zengindir.

5- Sindirim; α -amilaz (pityalin) tükürükte bulunur bu ise 1-4 glikozit bağlarını kırar, lingual lipaz ise yağ yıkımından sorumludur. Amilaz nişastaya etki ederek onu maltoz ve dekstrine parçalar.

6- Oral floradaki bakteriyel florayı kontrol eder.

7- Diş minesini onarımı ve yeni diş mineralizasyonu, tükürük yüksek düzeyde kalsiyum ve fosfat içermektedir.

8- Koruyucu tabaka oluşturarak dişlerin korunması antibakteriyel bileşikler içeren bir protein tabakası dişleri sarar. Bunun için tükürük bezleri ile ilgili problemler genelde kötü ağız hijyenine sebep olur.

9- Konuşmaya yardım eder. Yanak ve yutak mukozanın ıslatılması konuşma yönünden gereklidir.

10- Hormonal etki; tükürükte parotin adlı protein tanımlanmıştır. Bu hormon mezenkimal dokunun gelişmesine yardım eder ve kemik gelişiminde önemli rol oynar.

Lizozim, sekretuar IgA ve tükürük peroksidazı, tükürüğün antibakteriyel özelliklerinde önemli rol oynar. Lizozim bakteri ile aglütine olup otolizini aktive eder. IgA mikroorganizmaların dokulara adezyonunu engeller. Peroksidaz tükürük tiyosiyanatını yıkarak bakteriyel glikozitte yer alan enzimleri okside eder. Bu yüzden tükürük akım hızı oral hijyen için diğer faktörlerden daha önemlidir.

Tükürük hipofonksiyonunun intra oral komplikasyonları:

- 1- Candidiyazis,
- 2- Oral liken planus (genelde ağrılı),
- 3- Yanan ağız sendromu (normal mukoza görünümlü mukoza ile sübjektif yanma),
- 4- Rekkürren aftöz stomatit,
- 5- Diş çürükleri,

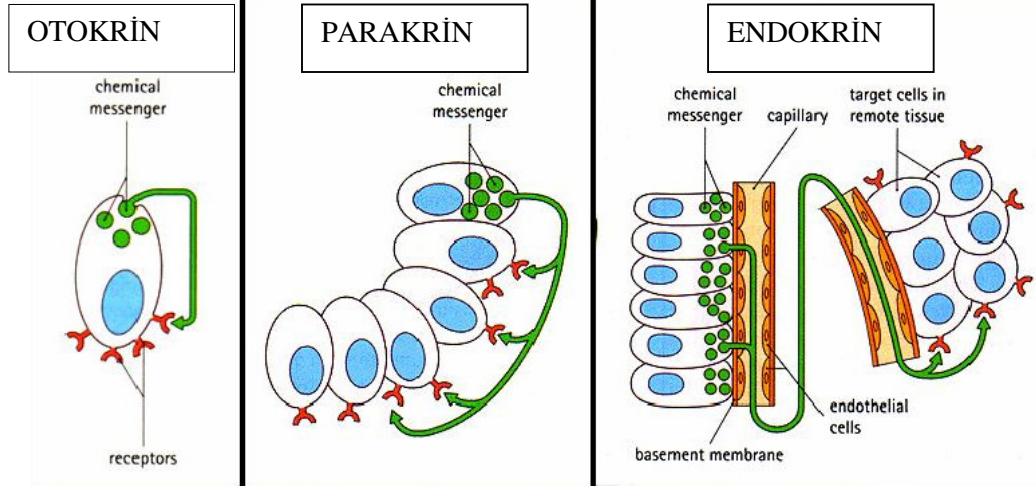
Ateşli hastalıklarda stomatit ve paslı dil görünmesinin sebebi, azalan tükürük salgısıdır. Ateş tükürük salgısını azaltır.

Tükürük bezleri, EGF ve NGF gibi gelişmeyi destekleyen faktörler salgırlar. Tükürük, kürklü memelilerde ısınsın düzenlenmesine yardım eder. Bazı memeli olmayan türlerde, örneğin yılanlarda tükürük bezleri zehir salgılamakta, timsahlarda ise tuz salgılayan bezler olarak iş görmektedir. Yeni doğmuş memelilerde tükürük, meme başı ve dudaklar arasındaki boşluğu dolduran sıvı olarak görev yapar [61].

2.8. Büyüme Faktörleri

Peptit büyüme faktörleri, çok hücreli organizmalarda bulunan önemli düzenleyici maddelerdir. Bunlar hücre büyümesini düzenlemede, özel metabolik işlemlerin kontrolünde ve farklılaşmasında görev alan biyolojik sinyalleri temsil ederler. Belli hormon ve peptit büyüme faktörleri özel tipteki hücrelere etki ederler. Ancak diğerleri, farklı hücre ve doku tiplerinin aktiviteleri için geniş ve çok genel bir spektruma sahip olabilir. Hormonlar, çok hücreli organizmaların endokrin bezlerinden sentezlenmiş, hücre dışı vücut sıvısına salınmış ve bu aracılıkla uzak hücrelere taşınmış kimyasal mesajcılar olarak tanımlanırlar. Klasik hormonların aksine, büyüme faktörleri özel endokrin organlardan salgılanmak durumunda olmayıp çok çeşitli hücre ve dokularda oluşturulur ve salgılanırlar [63]. Büyüme faktörleri, Şekil 2.3’de görüldüğü gibi hücresel fonksiyonlarını endokrin, parakrin veya otokrin mekanizmalarla sağlarlar [64]. Bu maddelerin kana salınımı uzak hedeflere ulaşmasını ve buradaki hücreleri

etkilemesini sağlar ki bu endokrin yoldur [65]. Parakrin yolda ise hücre orijinli büyüme faktörleri diğer hücreleri etkileyebilmek için kısa mesafelere difuz edebilir ve komşu hücreleri etkileyebilir. Büyüme faktörleri otokrin yol ile üretildikleri hücrede faaliyet gösterebilir. Bu farklı yollar, doku onarımı sırasında aktif olabilirler [64-66].



Şekil 2.3. Büyüme faktörlerinin hücresel fonksiyon yolları [67]

Peptit hormonlarıyla büyüme faktörleri arasında kesin bir fark olmayabilir ancak, birçok büyüme faktörü ve büyüme faktörlerinin proteolitik ürünleri kanda dolaşabilir ve salgılandıkları yerlerden uzak bölgelerde faaliyet gösterebilir ya da özel düzenleyici fonksiyonlar yüklenebilirler. Büyüme faktörleri ya da büyüme faktörü benzer aktivitelere sahip maddeler, sadece omurgalılarda olmayıp, omurgasızlarda da ve hatta sitokin olarak adlandırılan biyolojik olarak aktif ajanlar tarafından temsil edildikleri bitkilerde de bulunabilirler [63].

Büyüme faktörleri, ağırlıkları 4000–60000 Da arasında değişen, çok az miktarları bile hücresel aktiviteleri etkileyebilen proteinlerdir [62]. Stanley COHEN, 1974 yılında “büyüme faktörü” terimini, çözülebilir olan, T lenfositleri ve makrofajlar tarafından üretilen bir madde için kullanmıştır [68].

Büyüme faktörleri reseptörleri tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hücreler arası proteinlerin fosforilasyonu uyarılarına tepki verir. Büyüme faktörleri normal ve neoplastik hücreler tarafından in-vitro ya da in-vivo üretilirler. Bunlar in-vitro

kültürdeki hücrelerin yaşaması ve büyümesi için gerekli olan ortamın temel bileşenleridir ve hücreleri ölüme karşı koruma özelliğindedirler. Büyüme faktörleri hücre yaşamasında in-vivo görev alırlar. Organ ve doku gelişimi mekanizmaları rolünde çok önemli görevleri vardır. Büyüme arttırıcı ve farklılaşmayı indükte edici aktivitelere ek olarak, hedef hücreler üzerinde çok çeşitli etkiler gösterebilirler.

Büyüme faktörleri, yangı (inflamasyon), bağışıklık tepkileri ve doku onarımı gibi fizyolojik işlemlerde de önemli roller alırlar. Yara iyileşmesi degeratif ve rejeneratif işlemlerin yakın kontrolünü gerektirir. Yara iyileşmesi; biyokimyasal yollar ve epidermal büyüme faktörü arasındaki birçok karmaşık etkiyi ve sayısız hücre tipini içerir.

Büyüme faktörlerinin, yara iyileşmesindeki etkileri; hücrelerin yara bölgesine nüfuzunu arttırmayı, epitelyal hücrelerin ve fibroblastların proliferasyonunu, matrikslerin oluşmasını ve etkilenen bölgenin yeniden şekillenmesini içerir. Büyüme faktörleri, hedef hücrenin proliferasyonunun uyarılmasını indükte edici özelliğiyle tanınır [63].

Büyüme faktörlerinin biyolojik özellikleri in-vitro ya da in-vivo incelenebilir. Büyüme faktörlerinin izolasyonu, hücrelerin belirli bir proteinsiz aracıda kültürlenmesiyle sağlanır [63]. Büyüme faktörlerinin klinikte birçok sebepten karıştırılabilmesi dolayısıyla büyüme faktörlerini tanımlamak için nomenklatür isimlendirme kullanılmıştır. Her şeyden önce büyüme faktörlerinin isimleri, hücre içindeki spesifik etkilerinden ziyade, görüldükleri durumlar baz alınarak seçilmiştir. Böylece FGF' ler çok potansiyelli anjiogenetik faktörlerdir. TGF- β ' lar da hücre dönüşümü yapmaz ve aslında kanseri önlemede önemlidir. Büyüme faktörü terimi genel anlamda, hücre proliferasyonunu, mitolojik aktiviteyi ve hücre dışı matriks oluşumunu fazlaştıran maddeleri göstermek için kullanılır. Büyüme faktörlerinin yer aldığı kategoriler, hangi durumda keşfedildiklerine bağlıdır. Örneğin bir biyokimyacı, bir immünolojist ve bir hematolojist tarafından büyüme faktörü, sırasıyla interlökin, koloni stimüle edici faktör olarak adlandırılabilir [65].

2.8.1. Büyüme faktörlerinin reseptörleri

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucunda hücre içinde özgün bir cevaba sebep olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörleri bulunur [64,69].

Büyüme faktörleri reseptörleri, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hücreler arası proteinlerin fosforilasyonu uyarılarına tepki verir [68].

Büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve peptit ya da protein hormonların hücresel ve çekirdek fonksiyonlarının düzenlenmesi, hücre yüzeyi reseptörlerinin aktivasyonu ile başlar. Tüm reseptörler iki ana bileşene sahiptir.

1- Ligand spesifikasyonu sağlayan, ligand bağlayıcı bir alan (domain)

2- Ligand bağlanmasından sonra biyolojik cevabın oluşmasını başlatan bir alan

Aktive edilmiş reseptör, daha sonra sinyal iletimi işlemi bitirmek için diğer hücre bileşenleriyle etkileşime girer. Birçok büyüme faktörü G proteinleri aracılığıyla zar sınırı fosfolipaz C' ye bağlanan (PLC) reseptörlere bağlanır. Büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin reseptörleri, ligant-reseptör etkileşimi sonucu aktive edilen protein tirozin kinazlardır. Bu protein kinazların herhangi birinin aktivasyonu hücre içindeki diğer proteinlerin fosforilasyonunu katalize ederler [60]. Büyüme faktörleri bilimindeki son on yılda gerçekleşen ilerlemeler, reseptörlerin bağlanması sonucu oluşan kompleks haber yollarını açıklamada ve kendi özel hücresel reseptörlerini açıklamada yol kat etmiştir. Tirozin kinaz reseptörler zardan yayılan moleküllerdir ve sitoplazmik etki alanlarında kinaz aktiviteye sahiplerdir. Kinaz aktivitesi; fosfat grubu ekleme yani fosforilasyon becerisidir. Kinaz aktivitesi, büyüme faktörünün bağlanmasıyla aktive edilir. Yaklaşık 60 tane tirozin kinaz tanımlanmış ve bunlar 14 gruba ayrılmıştır. Aktivasyon sonrası reseptör, fosfat gruplarını belli alt hedeflere ekleyebilir ya da kendi fosfotirozin artıkları olması durumunda, diğer molekülleri haberleşme komplekslerine dönüştürebilir [65].

2.8.2. Büyüme faktörleri ve yara iyileşmesi

Büyüme faktörleri, kemotaksis ve hücrel proliferasyonu uyarak, aynı ve farklı tipteki hücreler arası haberleşmeyi sağlayarak, hücre dışı matriks oluşumu ve anjiyogenezi kontrol ederek, yara büzölme işlemini düzenleyerek ve doku bütünlüğünü yeniden kurarak, yara onarımı işleminde temel bir rol alır. Büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki rolü, deri yaralarında ve gerçek granülasyon dokusunda detaylı biçimde incelenmiştir. Çok sayıdaki büyüme faktörünün bu işlemde yer aldığı gösterilmiştir [63].

Kan damarları açılır açılmaz, çok miktarda trombosit yara içine girer ve PDGF ve TGF- β ' yı da içeren birçok büyüme faktörü serbest kalır. Bunlar ve diğer büyüme faktörleri, makrofaj, fibroblast, endotelyal hücreler gibi onarım işleminde kritik rol alan birçok hücre tipleri için kemotaksi özelliğine sahiptir. Yara tamirinin diğer basamakları sırasında büyüme faktörleri, yara iyileşmesinde önemli yeri vardır. Büyüme faktörlerinin faaliyetlerinin yara kapanması ve dokunun yeniden oluşumu ile bitmemesi ayrıca doku bütünlüğü ve hücreler arası iletişimde de anahtar rol oynaması mümkündür [65].

2.9. Yara

Herhangi bir ajanın fiziksel bir hasar yaratmasıyla vücuttaki normal bütünlüğün bozulmasına yara denir. Yara deyiminin karşılığı olarak erozyon, ülser, fissür deyimleri de kullanılır. Erozyon, dermise geçmeyen fokal (odaksal) epidermis kayıplarını belirleyen bir deyimdir, iz bırakmaz, kronik değildir. Fissür, çatlak şeklindeki dikey yararlı belirleyen doku kayıplarıdır. Epidermisi veya dermisi tutabilir. Ülser ise dermis ve epidermiste doku kayıplarıyla seyreden lokal yaralardır [70].

2.9.1. Yara iyileşmesi

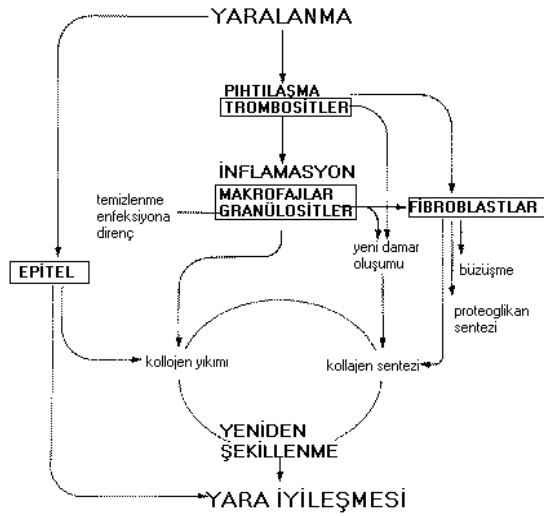
İyileşme, yapının ve fonksiyonun yenilenmesi anlamına gelir. Yaralar yeniden oluşum sürecinde ilerliyorsa ve bu ilerleme sürecinde devamlı anatomik yapı ve fonksiyon sağlanıyorsa “akut” adını alır. Buna örnek olarak birkaç gün içinde kapanan kesik örneği verilebilir. Eğer sonuç devamlı değilse ya da yeniden oluşum süreci kesiliyor

veya tamamlanamıyorsa yara, “ kronik” adını alır. Buna örnek olarak da kapanması daha uzun süren ve sürekli olarak açılıp kapanan kesik örnek verilebilir.

Yara iyileşim sürecini anlama konusunda çok önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Hücre tipleri ve bunların yara iyileşim sürecinde açığa çıkma sıraları belirlenmiştir. Birçok büyüme faktörü ve bunların fonksiyonları açıklanmıştır. Yara iyileşmesi bilimini anlamadaki gelişmelere, ilerlemelere rağmen hala söz konusu süreçteki birçok aşama keşfedilmeyi ve açıklanmayı beklemektedir. Vücudun zarar görmüş dokuyu nasıl tamir ettiği ve hangi faktörlerin yara iyileşmesine etki ettiği, cerrahın ameliyattan sonra kabul edilebilir bir sonuç almasına yardım eder [71].

Yara iyileşme mekanizmaları

Yara iyileşmesindeki mekanizmalar, epitelizasyon, büzülme, bağlayıcı doku (Matriks) yer değişimidir. Bu mekanizmaların her birinin gerçekleşmesi, yaranın tipine, lokalizasyonuna ve çevre faktörlerine bağlıdır. Epitelizasyon, keratinositlerin alt deriden göçü ve bölünmesi, büzülme ise yaranın büzülmesi, daralması ve kapanması süreçleri olarak tanımlanmaktadır. Bunların yanı sıra fibroblastların bölgeye gelmesi, yeni matriks oluşturması ve kollajenlerin bu şekilsiz madde üzerinde ve arasında açığa çıkması, bağlayıcı doku yer değişimi olarak ifade edilen süreçtir (Şekil 2.4). Matriks oluşumundan sonra kollajen, elastin, fibronektin, laminin, proteoglikan içeren tamir sistemi oluşturulur. Bu yapılar ve kimyasallar yara bölgesine güç ve destek sağlar, büyüme ve büzülmeye izin verir, hücre hareketi için yüzey oluşturur ve gerekli kimyasal reaksiyonların oluşmasına yardım ederler [72].



Şekil 2.4. Yara iyileşmesinin şematik gösterimi [73]

Yara iyileşmesinin morfolojisi

Yara iyileşmesi işlemi dört fazda gerçekleşir. Bu fazlar Şekil 2.5’de de görüldüğü gibi hemostasis, inflamasyon faz (yangısal faz), proliferatif faz, olgunlaşma ve yeniden şekillenme (remodeling) fazlarıdır [74].

Hemostasis: Doku zedelenmesi öncelikle yarayı cansız dokudan ve yabancı maddelerden temizleyen ve yüzeyi sonraki doku iyileşmesine ve rejenerasyonuna hazırlayan bir cevap başlatır. Birinci vasküler cevap, kısa ve geçici bir damar daralması ve hemostasis içerir. Kanamayı azaltmaya yardım eden 5–10 dakikalık şiddetli damar daralması (vazokonstriksiyon) periyodunu, kılcal damar geçirgenliğinin artmasıyla birlikte, yangısal hücrelerin yara yatağına nüfuz etmesini sağlayan aktif damar genişlemesi (vazodilatasyon) takip eder. Bir fibrin pıhtısı boyunca toplanmış trombositler, doku onarımıyla sonuçlanacak olan bir takım düzenli olaylar dizisini kuran, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinleri salgırlarlar [71,72,74].

Yangısal faz (İnflamasyon): Yara oluşumu sırasında ortaya çıkan kollajen, yangısal fazı başlatan pıhtılaşma basamağını aktive eder [71]. Yangısal faz kendini kızarıklık, kabarma, yanma ve sıklıkla acıyla belli eder. Yangısal faz cevabı damar geçirgenliğini artırır. Bunun sonucunda nötrofiller ve monositler yarayı çevreleyen dokuya göç

ederler. Nötrofiller nonspesifik savunma sisteminin elemanı olarak, yara yüzeyindeki ana görevi; yabancı cisim ve bakterilerin fagositozu ve proteaz salınımıyla da travmadan zarar gören hücre kalıntılarının yara bölgesinden temizlemesidir. Nötrofiller bu görevleriyle enfeksiyona karşı ilk savunma hattını sağlarlar ve görevlerini tamamladıktan sonra makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Eğer yara kirlenmemişse yaralanmadan birkaç gün sonra içinde nötrofil göçü durur [71,74].

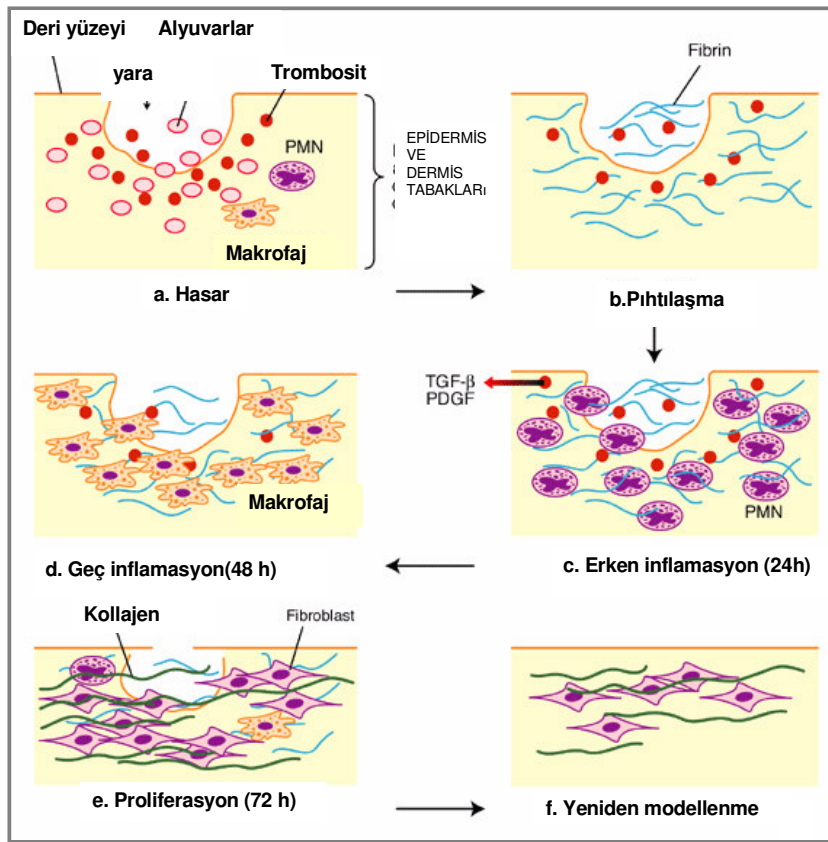
Geç yangısal fazda, monositler dokuda makrofajlara döndürülür. Makrofajlar, bakteriyel patojenleri sindirir ve öldürür, doku artıklarını yok eder ve kalan nötrofilleri parçalarlar. Makrofajlar, hücre göçünü, proliferasyonunu ve doku matriksinin oluşumunu uyaran çok çeşitli kemotaktik hücreleri ve büyüme faktörlerini salgılayarak işlemlerin yangısal fazdan yara tamirine kadar gerçekleştirirler. Makrofajlar sistemik dolaşımdaki monositlerden veya mevcut dokudaki mononükleer hücrelerden kaynaklanan, fagositoz yapan hücrelerdir. Makrofajlar sadece fagositoz yapmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli sitokin, büyüme faktörleri ve nitrik oksit sentezlerini gerçekleştirirler (Çizelge 2.1) [74].

Çizelge 2. 1. Makrofajların yara iyileşmesindeki rolü ve etki mekanizması [75,76]

Etki	Mekanizma
Fagositoz ve antimikrobiyal etki	Oksijen radikalleri, nitrik oksit
Yara Debridmanı	Fagositoz, enzimler, kollajenaz, elastaz
Matriks sentezi	Büyüme faktörleri, sitokinler, enzimler, kollajenaz,
Hücre aktivasyonu	Büyüme faktörleri, sitokinler, fibronektin
Anjiyogenez	Büyüme faktörleri, sitokinler

Çoğalma fazı (Proliferatif faz): Proliferatif faz, granülasyon doku oluşumu, epitelizasyon, anjiyogenez ve kollajenlerin çapraz bağ yapması olayları baskınlığındadır. Süresi yaranın büyüklüğüne bağlıdır. Trombositler ve makrofajlardan salgılanan kemotaksi ve büyüme faktörleri yara fibroblastlarının aktivasyonunu ve göçünü uyarırlar. Bu fibroblastlar yara tamiri açısından çok önemli olan çeşitli maddeler üretirler. Bunların içinde glikozaminoglikanlar ve kollajenler de vardır. Bunlar hücre göçü için gerekli olan jel benzeri, şekilsiz bağlayıcı doku matriksini oluştururlar. TNF-alfa tarafından uyarılan anjiyogenez, endotelial hücre nüfuzu ve

kılcalların oluşmasıyla meydana gelir. Anjiogenez yeni damar oluşumudur. Yeni kılcalar yaraya besin sağlar ve doku yatağı granülizasyonunun sağlanmasına yardım eder. Kılcal damar büyümesi, metabolik ihtiyaçları karşılaması için yara içine doğru fibroblast büyümesine eşlik etmek zorundadır. Kollajen sentezi ve çapraz bağlanma, damar bütünlüğü ve yeni kılcal damar yataklarının gücünden sorumludur. Kollajen liflerinin düzgün çapraz bağlanamaması, normal pıhtılaşma parametrelerine sahip hastalarda ameliyat sonrası kanamalarından sorumludur. Proliferasyon fazının ilk aşamalarında fibroblast aktivitesi hücrel replikasyon ve hücrel göç ile sınırlandırılmıştır [71,72,74].



Şekil 2.5. Yara iyileşmesinin fazları [77]

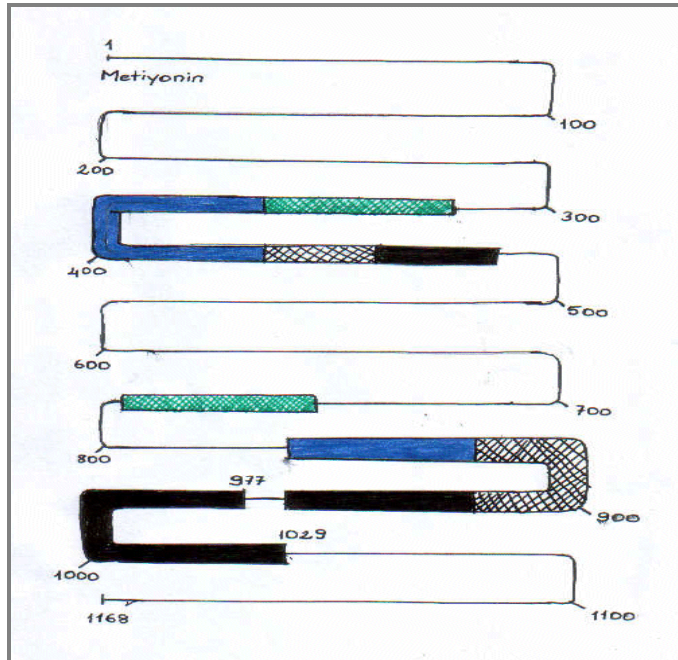
Yeniden modelleme (Remodeling): Proliferasyon fazının sona ermesiyle yeniden şekillenme fazı başlar. Bu faz, yeni kollajen liflerinin yeniden organizasyonunu içerir. Yeniden şekillenme döneminde kollajen sentezi ve yıkımı devam eder ama kollajen miktarı değişmez. Kılcalların yoğunluğu ve fibroblastların sayısı azalır. Bu işlem yara

gerilme gücünü sürekli arttıran daha organize kafes (ağ) yapısını meydana getirir. Gerilme kuvvetiyle kollajen fibrillerinin kalınlığı arasında doğru orantı vardır. Fakat epiderm hiçbir zaman eski şeklini alamaz.

Yara iyileşmesinde bütün bu safhaların sonucunda yaralarda morfolojik olarak 3 ana özellik olan yara kontraksiyonu, epitelizasyon ve bağ dokusu birikimi sağlanarak yara iyileşmesi tamamlanmış olur [71,74].

2.10. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Epidermal büyüme faktörü (EGF), ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare çenealtı tükürük bezinden izole edilmiştir [78,79]. Cohen, erkek fare çenealtı tükürük bezinde, sinir büyüme faktörü (NGF) izole etmeye çalışırken, bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken göz kapağı açılışına ve erken diş sürmesine neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve epidermis gelişimini hızlandırıcı etkisi nedeni ile bu maddeye “Epidermal Büyüme Faktörü” (EGF) adını vermiştir [79,80].



Şekil 2.6. Prepro EGF' nin şekli (olgun EGF 'yi 977–1029 arası aa dizisi oluşturmaktadır) [27]

EGF amino asit dizisinde lizin, fenilalanin ve alanin bulundurmayan 53 amino asitten oluşmuş 6,000 dalton moleküler ağırlığında tek zincirli bir polipeptittir (Şekil 2.7) [81-85]. Molekülün bir ucu $-NH_2$ grubu, diğer ucu ise $-COOH$ grubu ile sonlanmaktadır. Polipeptit, 6 sistein köküne sahiptir ve üç tane disülfid bağı içerir. Bu disülfid bağları molekülün biyolojik aktivitesi için çok gereklidir [86]. EGF'nin öncül (prekürsör) molekülü ise 1217 amino asit içerir. Bu sayılar olgun EGF ' den 24 kat daha büyüktür ve prepro EGF olarak adlandırılır (Şekil 2.6) [86].

EGF, çenealtı tükürük bezinin homojenatında moleküler ağırlığı 29.000 olan bir arjinin esteraz proteinine bağlı olarak bulunur. İki molekül arjinin esteraz ile iki molekül EGF birlikte yüksek molekül ağırlık "High Molecular Weight (HMW)" kompleksini oluşturur. Radioimmunoassay ile yapılan ölçümlerde erkek fare çenealtı tükürük bezinde 1000 ng, dişi fare çenealtı tükürük bezinde 70 ng EGF bulunduğu tespit edilmiştir [86].

EGF erkek farede toplam bez proteinin % 0,5 ' i kadardır. EGF, fare çenealtı tükürük bezinde sentezlenerek tübüler kanal hücrelerinde depo edilmektedir. Ancak farelerde çenealtı tükürük bezinin çıkarılması sonrasında plazma EGF düzeyinde herhangi bir değişikliğin olmaması EGF' nin organizmada başka bir yerde de sentezlendiğini düşündürmektedir. İnce barsaklardaki Brunner bezleri önemli miktarda EGF sentezler ve salgılarlar [86].

EGF en yüksek miktarda çenealtı tükürük bezinde bulunur [10]. Daha sonra duodenum, Brunner bezleri, tiroid, pankreas, adrenal bez, ovaryum, parotis bezi, karaciğer, özofagus, mide, ince bağırsak, kolon, kalp, böbrek, prostat, iskelet kası, düz kas, akciğerler, timus bezi bunlar arasında sayılabilir [87]. Bunların yanı sıra EGF, idrarda, gastrik sıvıda, tükürükte, safrada, prostatik ve seminal sıvıda, terde, gözyaşında, amniyotik sıvıda ve anne sütünde, plazma ve serumda bulunur [88].

EGF, pek çok mezodermal ve ektodermal kökenli hücreler için mitojenik özelliكتedir [9-11]. EGF endojen olarak insan çenealtı tükürük bezinden salgılanmaktadır [89]. Gregory ve arkadaşları insan idrarının köpeklerde mide asit salgısını inhibe ettiğini göstermişler ve izole ettikleri etken maddenin adını "Urogastrone" koymuşlardır. İzole

edilen bu maddenin fare EGF' sine benzerlik göstermesi üzerine Urogastrone'a (URO) insan EGF' si denilmiştir. EGF URO, insanda tükürük bezleri ve Brunner bezlerinde tespit edilmiştir [27].

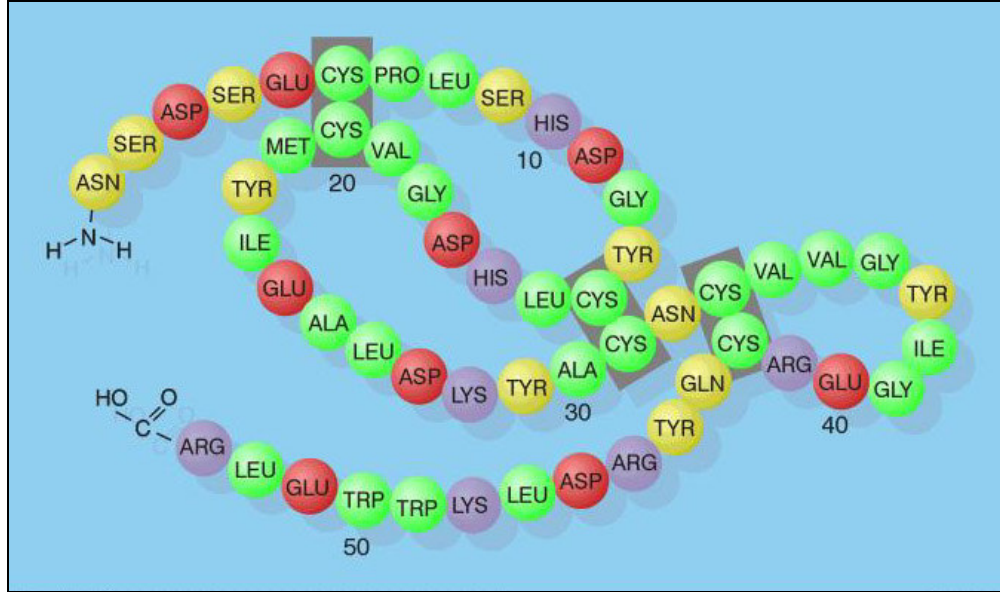
EGF, etkin olduğu hücrelerde de iyon alımını, glikolizi, DNA ve RNA sentezini arttırıcı özelliğe sahiptir [90,91]. EGF farklılaşma ve büyümeyi etkileyerek organizmanın gelişiminde rol oynar [86]. Çeşitli epitel hücre kültürlerinde EGF büyümeyi, çoğalmayı ve farklılaşmayı arttırmaktadır [81]. EGF gibi peptit büyüme faktörleri keratinositlerin ve fibroblastların mitogenezini, keratinositlerin göçünü ve doku ve granülasyon gelişimini uyarırlar [3].

EGF' nin bol miktarda bulunduğu çenealtı tükürük bezi ekstrelerinin yara iyileşmesi üzerinde hızlandırıcı etkisi olduğu birçok çalışmada deneysel olarak gösterilmiştir. Erbaş ve arkadaşları, EGF' nin yara iyileşmesindeki hızlandırıcı etkilerini gösterdikleri çalışmalarında, EGF' nin serum çinko düzeyini arttırdığını bildirmişlerdir [17].

Son zamanlarda gerek genel tıp alanında, gerekse ağız cerrahisinde yapılan çalışmalarda, EGF' nin yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir [92].

EGF, neonatal kemiricilerde diş patlamasına ve göz kapaklarının erken açılmasına neden olur, fetal sıçanlarda, koyunlarda ve tavşanlarda akciğerin olgunlaşmasını başlatır, organ kültürlerinde damak gelişimine yardımcı olur, gastrointestinal, karaciğer ve pankreatik olgunlaşmayı stimüle eder, tiroid ve adrenal bezin gelişimine yardımcı olur, meme bezi gelişimi ve yara iyileşmesini stimüle eder, gastrik asit sekresyonunu inhibe eder, büyüme hormonu (GH), prolaktin (PRL) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) ' u içeren hipofiz hormon sekresyonunu uyarır, plasenta dokusundan plasental laktogen ve koriyonik gonadotropin (CG) sekresyonunu stimüle eder [6,86].

Çeşitli epitel hücre kültürlerinde EGF, çoğalmayı, büyümeyi ve farklılaşmayı arttırmaktadır [83].



Şekil 2.7. EGF' nin yapısı [93]

EGF, diğer tüm büyüme faktörleri gibi yüksek eğilimli ve düşük kapasiteli reseptörleri ilgili hücre yüzeyine bağlar. EGF reseptörünün içindeki aktivite, EGF bağlanmasına karşı gerçekleşen tirozin kinaz aktivitesidir. EGF reseptörünün kinaz etki alanı, EGF reseptörünün kendisini fosforile eder. Buna da otofosforilasyon denir. Bu işlem sinyal iletimi basamağındaki diğer proteinler için de geçerlidir [94]. EGF reseptörü ile birleşip agregasyon ve fosforilasyon olayı meydana geldikten sonra EGF+reseptör birlikte sitoplâzmaya geçerler. Orada lizozomlar ile birleşerek reseptozomları oluştururlar ve parçalanırlar [95]. EGF özellikle keratinosit ve fibroblast gibi hem mezodermal hem de ektodermal orijinli hücreler üzerinde proliferatif etkiye sahiptir. EGF granülasyon dokusu, kollajen ve glikozaminoglikan düzeyini artırır, sonuçta epitelizasyon hızlanır ve yara gerilim kuvveti artar [94]. EGF' nin içinde bol miktarda bulunduğu çenealtı tükürük bezi ekstreleri yara iyileşmesini hızlandırıcı etki göstermektedir [17].

2.10.1. EGF ve yara iyileşmesi

Yapılan hayvan çalışmalarında sistemik ya da topikal olarak uygulanan EGF' nin yara iyileşmesine olumlu katkılarının olduğu gösterilmiştir [5,6]. Ağız cerrahisinde, ağız içinde oluşan yaralanmalarda iyileşme sürecinin hızlı olarak gerçekleştirilmesinin

oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Oluşan yaralanmalarda, cerrahi işlemlerden sonra ve oral mukoza ülserlerinin tedavilerinde EGF' nin olumlu etkisinin olduğu bildirilmiştir. Farklı formlarda EGF, yara iyileşmesini hızlandırmaktadır [96].

Arıcıoğlu ve arkadaşlarının EGF ve lazerin farelerde bistüri ile oluşturulan insizyon (kesi) yaralarını iyileştirilmesinde lipit peroksidasyon üzerine etkilerinin incelenmesi adlı çalışmalarının sonucunda, yara iyileşmesinde 1. ve 3. günlerde anlamlı bir fark olduğunu bildirmişlerdir [97].

Diş etlerinde ülserler oluşturulmuş tavşanlardan izole edilen dokuların in vitro kültürlerinde EGF ve bFGF'nin fibroblastların proliferasyonunu; sadece EGF'nin de keratinositlerin proliferasyonunu geliştirdiği bildirilmiştir. Tükürük bezleri çıkarılmış, diş etlerinde ülser oluşturulmuş tavşanlarda EGF ve bFGF' nin sistemik enjeksiyonu ve bFGF' nin topikal uygulaması yara iyileşmesini hızlandırmıştır [96].

EGF' nin domuz yara modelinde ve tavşan korneasında epitelizasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, hayvan modellerinde yara gerilim kuvvetini de arttırdığı bildirilmiştir [98].

2.10.2. EGF ve tükürük bezleri

EGF ilk defa Stanley Cohen tarafından erişkin erkek fare tükürük bezinde gösterilmiş ve saflaştırılmıştır [78,79]. Fare tükürük bezinin, proteazlar, kallikreinler, renin, NGF gibi polipeptitler yanında zengin bir EGF kaynağı olduğu bilinmektedir. Bu proteinler granüler kıvrımlı tüpler (GCT) de sentezlenmekte, depo edilmekte ve GCT hücrelerinin farklılaşmasının ve gelişiminin, glukokortikoidler, tiroid hormonları ve androjenler tarafından modüle edildiği bilinmektedir. En yüksek EGF ve proEGF, mRNA düzeyleri erişkin erkek fare tükürük bezlerinde gözlenmiştir ve EGF konsantrasyonu fare tükürüğünde en fazladır [27].

Fare tükürük bezindeki EGF' nin arjinin esteraza bağlanan 30 kDa' luk bir proteinle birlikte bulunduğu gösterilmiştir [99].

Ağız cerrahisinin tükürük bezinde, yara iyileşmesini sağlayan büyüme faktörlerinin sentezini ve sekresyonunu uyardığı bilinmektedir [100].

Tükürük bezlerinde sentezlenen EGF' nin, dermal ve gastrik yara iyileşmesinde etkili olduğu ve doku hasarının tükürükte EGF sentezinin artmasına yol açtığı pek çok çalışma mevcuttur [23,24].

Bodner ve arkadaşları, damakta mukoza ve submukozayı içeren kesi yarası oluşturdıkları ve tükürük bezlerini çıkardıkları ratlarda, özellikle tükürükle direkt temas eden mukozal bölümün submukozaya göre daha geç iyileştiğini saptamışlardır ve tükürükteki faktörlerin epitelizasyondan daha ziyade yara kontraksiyonuna etkili olduğu görüşünü ortaya atmışlardır [16].

EGF tükürüğe salınmaktadır ve tükürük bezi EGF konsantrasyonları, erişkin erkek farelerde 100–300 µg/ ml' ye ulaşan seviyelerde ve oldukça yüksektir [101].

İlginç bir şekilde, insan tükürük bezlerindeki ve tükürükteki EGF konsantrasyonu, fareninkinden azdır [87]. Sıçanlarda tükürük bezi ve tükürük EGF miktarı, farelerinkinden daha düşüktür [27].

2.11. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

2.11.1. Oksijen ve canlılar

Atom sayısı itibariyle %54 gibi bir oranla gezegenimizde en bol bulunan bir element olan oksijen, atmosferimizde fotosentetik canlıların faaliyeti sonucu oluşmaya başlamıştır [102].

Oksijen bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olup; hidrojen, karbon, nitrojen ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısal atomlarını oluşturur. Bunun yanında, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle, oksijen hayati bir öneme sahiptir. Çok sayıda hidroksilaz ve oksidaz enzimleri oksijeni substrat olarak kullanıp organik moleküllerin yapılarına katılımını katalizler. Bu nedenle yapısal görevi dışında oksijenin fonksiyonel görevleri de vardır.

Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki şekli ile oksijene gereksinim duysalar da, serbest formdaki moleküler oksijen her canlı türü için aynı anlamı ifade etmez. Aerobik canlılar, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarken, anaerobik canlılar büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik canlılarda savunma sisteminin bulunmamasıdır. Herhangi bir canlı türünün aerobik ortamda yaşayabilmesi için, hiç metabolize etmese bile, oksijenden kaynaklanabilecek reaktif türleri inaktive edecek korunma mekanizmalarına sahip olması gerekir. Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, fakat yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan yüksek yapıllı canlılarda da toksik etkilidir ve oksijenin toksik etkileri atmosferdeki derişiminin üzerine çıkıldıkça net bir şekilde ve kısa sürede görünmeye başlar.

Oksijenin canlılardaki toksik etkileri başlıca iki tür mekanizma ile gerçekleşir:

Aerobik canlılarda gözlenen oksijen toksisitesinin ilk açıklaması, moleküler oksijenin bazı enzimleri inhibe ettiği şeklindedir.

Oksijenin enzim inhibisyonu etkisi sınırlı ve çok zayıftır. İlk kez 1954 yılında, oksijenin biyolojik sistemlerde görülen toksik etkilerinin, oksijenin bazı reaktif türlerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Bugün, oksijenin canlılardaki toksik etkisinin “oksijen radikalleri” olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir [102].

Oksijenin aktivasyonu

Atmosferik oksijenin kendi temel durumunda, diğer gaz halindeki elementlerden ayıran özelliği biradikal olması, diğer bir deyişle iki eşlenmemiş elektrona sahip olmasıdır [103]. Bu elektronlar spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler [102]. Bu özellik oksijeni paramanyetik yapar. Bu aynı zamanda oksijenin aktive olmadığı durumlarda, organik moleküllerle reaksiyona girme ihtimalinin düşük olmasını sağlar [103]. Yani oksijenin reaktivitesi beklenenin aksine

çok düşüktür [102]. Aktivasyona gerek duyulmasının sebebi, oksijenin iki eşlenmemiş elektronunun paralel spinlere sahip olmasıdır. (Daha kararlı bir molekül olması iki eşlenmemiş elektronun farklı spinlere sahip olması gerekir). Sonuç olarak oksijen ters yönde spinlerdeki elektronlara sahip organik moleküllerle reaktif özellik göstermez [103]. Çünkü başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde farklı spinlere sahip eşlenmiş elektronlara sahiptirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu olarak oksijeninin diğer moleküllerle olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “spin kısıtlaması” olarak adlandırılır [102]. Bu spin kısıtlaması genel oksijen indirgenme mekanizmalarında (biyokimyasal reaksiyonlarda) sadece bir elektronun transfer olması durumunu doğurur. Buna tek değerlikli indirgenme denir.

Oksijenin aktivasyonu iki farklı mekanizmayla gerçekleşir. Bunlar: eşlenmemiş elektronlardan birinin spinini (dönme yönünü) ters çevirecek şekilde yeterli enerji emilimidir ya da tek değerlikli indirgenmedir [103].

2.11.2. Reaktif türler olarak radikaller

Atomlar, proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşur. Elektronlar hem partikül, hem de dalga özelliğine sahip olup, çekirdek etrafında ışık hızı ile hareket ederler. Bu nedenle elektronların çekirdek etrafındaki yeri tam olarak tarif edilemez, yalnızca bulunma olasılığının en yüksek olduğu yerden bahsedilebilir. Belirli elektronların bulunma olasılığının en yüksek olduğu yer “orbital” olarak adlandırılır [102].

Radikaller, dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir [102].

Serbest radikal

Serbest radikal dış orbitalinde bir veya birden çok eşlenmemiş elektron içeren bir maddedir ve bu elektron, atomik veya moleküler orbitalde tek başına bulunur. Bir veya birden çok eşlenmemiş elektronun bulunması o maddenin manyetik bir alana çekilmesine yol açar ve bazen o maddenin son derece reaktif olmasına neden olur [102,104]. Reaktif oksijen türleri (ROS) oksijenden elde edilmiş birçok kimyasal reaktif molekülü içerir [105].

Radikal oluşumu

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Hücresel koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir.

Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur;

Kovalent bağların homolitik kırılması ile; yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.

Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile; radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur.

Normal bir moleküle elektron transferi ile; radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir [102].

Radikal kaynakları

Başlıca serbest radikal kaynaklarını şu şekilde sınıflandırabiliriz:

Endojen kaynaklar

- Mitokondrial elektron transport zinciri
- Endoplazmik retikulum
- Redoks döngüsü
- Araşidonik asit metabolizması
- Fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelyal hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar.
- Ksantin Oksidaz, NADPH Oksidaz gibi oksidan enzimler.
- Otooksidasyon reaksiyonları.

Ekzojen kaynaklar

Diyet faktörleri: yanmış yağ, alkol, katı yağ, şişmanlık

Çevresel faktörler: radyasyon, ultraviyole ışık, X ışını, gamma radyasyon, hava kirliliği

İlaçlar: aminotriazol, bleomisin, klonazin [50,106].

Reaktif oksijen türleri (Oksijen türevi serbest radikaller)

Reaktif oksijen türevleri (ROT) aerobik organizmalarda bazı fizyolojik olaylar esnasında oluşur. Bunların fizyolojik şartlardaki başlıca kaynağı mitokondriyal elektron transport zinciridir [102,103]. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, singlet oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir [102,103].

Singlet oksijen

Oksijenin biradikal formu, triplet temel durumundadır. Çünkü elektronlar paralel spinlere sahiptir. Eğer triplet oksijen yeterli enerji emerse (eşlenmemiş elektronlardan birinin spinini ters çevirecek kadar) singlet durumuna geçer. Bu durumda elektronlar ters spinlere sahiptir. Bu aktivasyon spin kısıtlamasının üstesinden gelir ve bunun

sonucunda singlet oksijen oluşur [103]. Singlet oksijen formunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönüşebilir [102]

Süperoksit (O_2^-)

O_2^- , moleküler oksijene ekstra bir elektron bağlanmasıyla meydana gelir. O_2^- , oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür [106]. Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikaldır [102].

Süperoksit, hidrojen peroksidin kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. Süperoksit fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleştiğinde reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Böylece NO etkisi inhibe edilir. Peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır [34].

Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve bulundukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Yani radikal yapımı bazı hücresel fonksiyonlar için gerekli de olabilir [102].

Hidrojen peroksit radikali (H_2O_2)

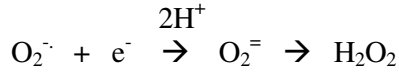
Süperoksitin tek değerlikli indirgenmeleri sonucu serbest bir radikal olmayan H_2O_2 ortaya çıkar. H_2O_2 serbest radikal değildir. Çünkü tüm elektronları eşlenmiştir [103].

Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır [100]. Oksijenin ara indirgenme ürünlerine serbest radikal yerine, aktive olmuş demek daha uygun olacaktır. Çünkü triplet oksijen bir radikaldır fakat H_2O_2 değildir [103,106].

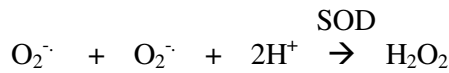
Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir.

H₂O₂ son derece güçlü bir oksitleyici bir ajan olmasına rağmen nispeten yavaş reaksiyon verir [102,103,106].

Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir.



Bu tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olduğundan tercih edilmez. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H₂O₂'e çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir [102].



SOD tarafından katalizlenen bu tepkime “dismutasyon tepkimesi” diye adlandırılır. Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H₂O₂'e çevrilebilir [102-104].

SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez [102].

Hidroksil radikali (OH[·])

OH[·] radikali biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü radikaldır [104].

H₂O₂' in genel olarak bilinen reaktivitesi kendi reaktivitesinden kaynaklanmaz, metal bir indirgeyicinin ortamda bulunmasına ihtiyaç duyar (yüksek reaktif tür olan OH[·] radikalini oluşturmak için) [103,105].

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali canlılarda şu mekanizmalarda oluşur.

Fenton reaksiyonu: Fenton, 19. yüzyılın sonlarında (1894–1899) demir tuzu ile karıştırılmış hidrojen peroksidin okside etme potansiyelini tanımlamıştır. Bu olay aşağıdaki tepkime ile gösterilmiştir.



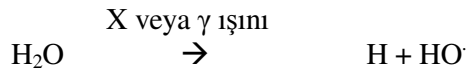
Bu reaksiyonda H_2O_2 , Fe^{+2} varlığında indirgenerek $\text{OH}^\cdot$ radikali oluşur.

Haber-Weiss Reaksiyonu: Haber-Weiss, 1934 yılında $\text{OH}^\cdot$ radikalini aşağıdaki reaksiyonlarda görüldüğü gibi okside türler olarak tanımlamıştır.

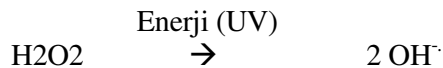


Bu reaksiyonda H_2O_2 , $\text{O}_2^\cdot$ ile reaksiyona girerek $\text{OH}^\cdot$ radikalini oluşturur.

Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla da $\text{OH}^\cdot$ radikali oluşur.



H_2O_2 'nin UV ışığına maruz kalması ile de $\text{OH}^\cdot$ radikali oluşabilir [102,103].



Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot\text{OH}$, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Hidroksil radikalinin tepkimeleri başlıca:

1- Elektron transfer tepkimeleri

2- Hidrojen çıkarma tepkimeleri

3- Katılma tepkimeleri

Bütün bu tepkimeler, $\cdot\text{OH}$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır.

Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.

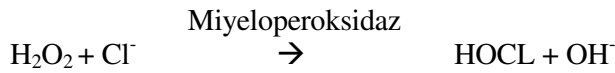
Hücre zarı su içermediğinden, OH'ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir [102,106]

Peroksil radikali (ROO·)

Karbon merkezli radikaller hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek peroksil (ROO·) radikalini oluştururlar. Peroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup çok uzun ömürlüdür [106].

Hipokloröz asit (HOCL)

HOCL' de radikal olmadığı halde ROT arasında yer almaktadır. Fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive edilen nötrofiller, eozinofiller, monositler ve makrofajlar süperoksit radikali üretirler. Radikal üretimi, fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofiller içerdikleri miyeloperoksidaz enzimi aracılığıyla, süperoksitin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klörür iyonu ile birleştirilerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCL' e dönüştürür [104,106].



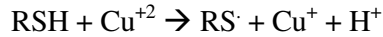
Alkoksil radikali (RO·)

Peroksil radikalinden bir O atomu çıkması sonucu oluşur.

Oksijen türevi olmayan serbest radikaller

Tiyil radikali (Sülfür radikali) (rs·)

Tiyol bileşikleri (R-SH) geçiş metallerinin varlığında oksitlenerek tiyil radikalini oluştururlar [106].



Karbon merkezli radikaller

Karbon merkezli radikaller de birçok biyolojik sistemde oluşabilmektedir [106].



Fosfor merkezli radikaller

Fosfor merkezli radikallerin de olduğu bildirilmiştir [106].

Nitrik oksit (NO)

Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türlerinin en önemlisi oksidasyon değeri +2 olan NO' dur. 1980 yılında Furchgott ve Zawadski asetilkolinin düz kas gevşetici etkisine aracılık eden ve endotelden salınan bir madde olan NO'yu keşfetmişler ancak bu maddeye önce "endotel kaynaklı gevşetme faktörü" (EDRF) demişlerdir. Daha sonra da bu EDRF' nin NO olduğu bildirilmiştir. NO, bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır [106]. Nitrik oksit, çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür [102].

Bu serbest radikal damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjinin' den sentezlenir. NOS' un birçok izoformu tanımlanmıştır. NO metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp azotdioksit (NO₂) oluşturur [106].

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikaller ile tepkimeye girmesi NO'e antioksidan bir etki de kazandırır. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan

peroksinitrit (ONOO^-), hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup, radikalik tepkimeleri başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur [102].

2.11.3. Oksijen radikallerinin biyolojik reaksiyonları

Serbest radikaller, normal hücre metabolizmasının toksik yan ürünleridir. Hücrelerimizdeki doğal maddeler (antioksidanlar) serbest radikalleri saptar ve nötralize ederler. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. Bu hasarlardan bazıları şunlardır:

- 1- *Proteinlere Etki:* Hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek, agregasyon ve çapraz bağlanma, tiyol grupları modifikasyonu meydana gelir.
- 2- *Yağ asitlerine Etki:* Membran lipit ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engeller, oluşan lipit peroksidasyon ürünleriyle membran akışkanlığını azaltır, permeabilite değişiklikleri yapar, membrana bağlı enzimlerin aktivitelerinde değişiklikler olur.
- 3- *DNA/RNA Üzerindeki Etki:* Nüklear membranını yararak nükleustaki genetik materyale etki edip DNA' yı kırıma ve mutasyonlara karşı açık hale getirmek, baz hasarı, translasyonel hatalar, protein sentezi inhibisyonu ortaya çıkar.
- 4- Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak .
- 5- *Karbonhidratlara Etki:* Özellikle monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksitler, oksoaldehitler oluşur. Bunlar yaşlanmada rol oynar.

Bu etkiler oksidatif stres olarak bilinen DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve hastalıkları gibi hasarlara neden olurlar. Serbest radikallerin en temel etkileri lipit peroksidasyonu, proteinler arasında disülfid bağı oluşumu ve DNA hasarıdır [106].

Artmış reaktif oksijen partiküllerinin zararları özetle şunlardır:

- Hücre organelleri ve membranındaki lipit ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,

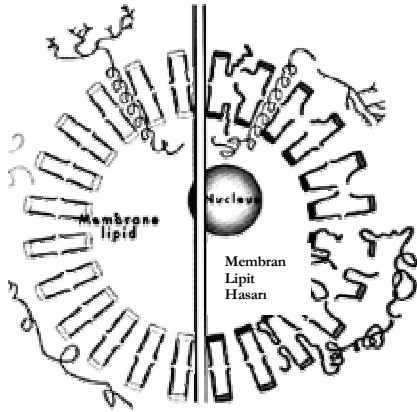
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,
- Hücrenin potasyum kaybını arttırırlar,
- Trombosit agregasyonunu arttırırlar,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar,
- Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar [50].

Lipit peroksidasyonu

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler en hassas olanlarıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar [34].

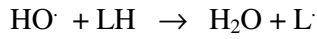
Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, ER, v.s.), membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı dolayısıyla, oksidatif ataklara duyarlıdır [106]. Hidroksil radikalının, membran fosfolipitleri komponentlerinden olan çoklu doymamış yağ asitleri üzerine etkisi, hücresel oksidatif hasarda başlıca etkin faktör olarak yorumlanmaktadır [103,104].

ROT'lar ile hücre hasarı meydana gelirken, lipit-serbest radikaller ve lipit peroksitler de oluşmaktadır. Bu tip reaksiyonlar “Serbest Radikal Otooksidasyonu” olarak isimlendirilir ve zincirleme reaksiyonun başlatılması için bir tetikleyici (başlatıcı, initiator) faktör gereklidir. Sözü edilen bu faktörün $OH^\bullet$ radikali olduğu kabul edilmektedir. Şekil 2.8’da görülen lipit peroksidasyonu, poliansatüre yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve dört aşamada oluşur:



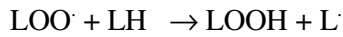
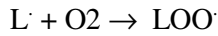
Şekil 2.8. Lipit peroksidasyonu [107]

1- *Başlatma (Initiation) safhası:* HO[•] radikali, bir yağ asitinin (LH) metilen kısmından bir hidrojen atomu (H⁺) kopararak bir lipit radikali oluşturur.



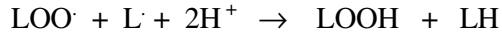
Bu reaksiyon hem membran lipitleri hem de besinsel yağlar için geçerlidir. Buna göre, gıdaların korunması için iyonizan radyasyon kullanılması sakınca arz etmektedir.

2- *İlerleme (Propagation) safhası:* Zincirleme reaksiyon, oluşan lipit radikaline O₂ ilavesi ile devam eder ve lipit peroksil radikali (LOO[•]) oluşur [106]. Peroksil radikalının oluşması önemlidir, çünkü komşu olan başka bir lipit molekülünden H atomu koparır, lipit hidroperoksit veya diğer adıyla lipit peroksit (LOOH) oluştururken geride yeni bir lipit radikali oluşur ki, bu safha ilerleme (propagation) safhasıdır [104].

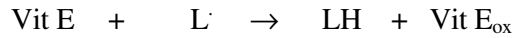
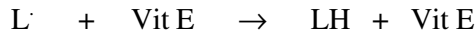


3- *Yıkım (Degredation) safhası:* Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma, lipitin parçalanması ile sonuçlanır. Sonuç olarak MDA (Malondialdehit)‘ ların da içinde bulunduğu aldehitler, hidrokarbonlar ve polimerizasyon ürünleri meydana gelir [103,104,106]. Malondialdehit (MDA) kan ile idrarda saptanabilir [106].

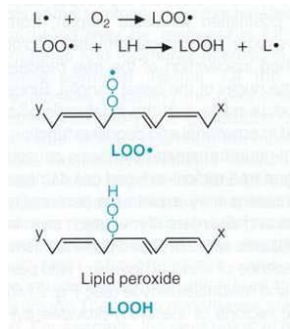
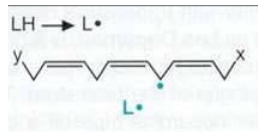
4- *Sonlanma (Termination) safhası*: Zincir reaksiyonu antioksidanlar (vitamin E gibi) tarafından sonlandırılabilir.



Veya



Yukarıdaki reaksiyon akışına dikkatli bakıldığında, lipit peroksidasyonunun, kendisini tetikleyerek yeniden lipit radikalleri ve peroksitleri oluşturduğu görülmektedir. Lipit peroksitlerinin konsantrasyonları arttıkça, membranların akışkanlıkları azalır ve kalsiyum gibi iyonların hücre içine geçişi kolaylaşır ve nihayet hücre fonksiyonlarında bozukluklar ortaya çıkar [106].



Şekil 2.9. Malondialdehit (MDA) [107]

Lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü Şekil 2.9'da görülen malondialdehittir (MDA). Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir.

Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir [35]. Çoklu doymamış yağ asitleri hücre membranı, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi hayati organeller için gereklidir. Bunların yapısal bozulmaları hücresel fonksiyonlar için çok önemli sonuçlar doğurabilir. Radikaller, aldehytler ve diğer lipit peroksidasyon ürünleri membran proteinlerinde ciddi hasarlara yol açarlar.

Genel olarak lipit peroksidasyonu, membranın akışkanlığını azaltır, normalde hücre içine geçemeyen maddelerin membrandan hücre içine girişlerini artırır, membrana bağlı enzimleri inaktive eder, protein sentezini inhibe eder, DNA replikasyonunu önler ve mitokondriyal solunumu durdurur [103,104].

Hücreler serbest radikalleri uzaklaştırmak için çok sayıda mekanizmaya sahiptir ve böylece zedelenmeyi azaltırlar. Serbest radikaller stabil değildir ve genellikle spontan olarak gücünü kaybeder. Ayrıca birçok enzimatik ve nonenzimatik sistem, serbest radikal inaktivite reaksiyonlarına katılır [108].

Radikalik tepkimeler şu durumlarda sona erer.

- 1- Oluşan radikallerin antioksidanlar ile indirgenmesi
- 2- Radikallerin birbirleri ile tepkimeleri
- 3- Ortamda tepkimeye girebilecek bileşik kalmaması [102].

2.11.4. Serbest oksijen radikallerinin yara iyileşmesindeki rolleri

Günümüze değin yapılmış yara iyileşmesiyle ilgili araştırmaların çoğunda yara iyileşmesinde oksijenin yararlı, hipoksinin ise zararlı etkilerinin olduğu sonucuna varılmıştır [109,110]. Yara infeksiyonun önlenmesinde de oksijenin rolü olduğu bildirilmiştir [111,112].

Serbest radikaller, normal metabolizmanın yan ürünü olarak oluşabildiği gibi, infeksiyon, inflamasyon, karsinogenezis, ilaç ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle de oluşabilmektedir [113].

İnflamatuvar hastalıklarda ve yara iyileşmesinin inflamasyon fazında aktif nötrofillerce aşırı miktarda üretilen ROT' nin doku hasarına yol açtığı bilinmektedir.

Yara iyileşmesinin geç yangısal fazında, monositler dokuda makrofajlara döndürülür. Bakteri ve endotoksinlerin dolaşıma translokasyonu ile makrofajlar stimüle olur [114]. Bu durumda bakteri etkeni ile karşılaşan makrofajların büyüklük ve aktivasyonu ile birlikte makrofajlarda mitokondri, lizozom sayısı ve süperoksit üretimi artar ve bu artan ROT metabolitleri makrofajların yok etme gücünü ileri derecede artırır. Ancak makrofajlar tarafından aşırı miktarda üretilen serbest radikaller rejenere olan deri hücreleri için son derece toksiktirler. Makrofajlar;

- Önce fibroblastlar üzerinde etkili olarak hücresel çoğalmayı geciktirirler
- Sonra endotelyal hücreleri etkileyerek yaranın revaskülarizasyonunu geciktirirler [114].

Makrofajlar, bakteriyel patojenleri sindirir ve öldürür, doku artıklarını yok eder ve kalan nötrofilleri parçalarlar. Makrofajlar, hücre göçünü, proliferasyonunu ve doku matriksinin oluşumunu uyaran çok çeşitli kemoktattik hücreleri ve büyüme faktörlerini salgılayarak işlemlerin yangısal fazdan yara tamirine kadar gerçekleştirirler. Makrofajlar sistemik dolaşımdaki monositlerden veya mevcut dokudaki mononükleer hücrelerden kaynaklanan, fagositoz yapan hücrelerdir. Makrofajlar sadece fagositoz yapmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli sitokin, büyüme faktörleri ve nitrik oksit sentezlerini gerçekleştirirler [74].

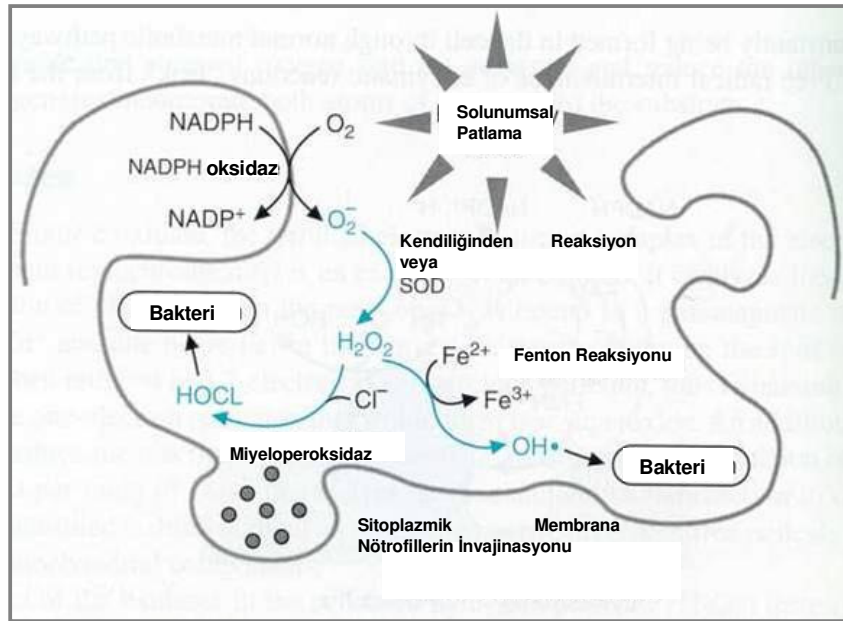
Fagositoz; Yabancı cisimciklerin, mikroorganizmaların, hasarlı ve ölü doku hücreleri ve savunma hücrelerinin hücre içine alınması, yıkılması ve ortadan kaldırılması işlemlerini kapsar.

Fagositozun ilk aşaması; Fagositik hücrenin bakteri ve virüslere yapışmasıdır. Bu süreç kapsülsüz bakteri ve proteinlere karşı duyarsızdır. Kan proteinleri virulent

bakterilerin etrafında bir film oluşturarak lökositlerin yapışmalarını sağlar ve onları fagositoza hazırlar. Diğer bakteriler yüzeylerinde böyle özel antikorlarla kaplanmazlarsa fagosite edilemezler. Sonraki aşamada fagositik hücrelerde psödopodlar (yalancı ayaklar) oluşur.

Psödopod, sitoplazmanın partiküllerin etrafına akışını ifade eder. Psödopodların, partikülün tamamını sarıp içlerine almaları sürecine de fagozom oluşumu adı verilir. Fagozom hücre içerisine alındıktan sonra lizozomla birleşir ve fagolizozom olarak adlandırılır. Bu yapı, hidrojen peroksit, reaktif oksijen türleri (serbest radikaller), peroksidaz, lizozom ve hidrolitik enzimleri ve etkileşimleri içerir [115].

Fagositozun son aşaması, mikropların öldürülmesi ve parçalanmasıdır. Bakteriler ve diğer mikropların öldürülmesi geniş ölçüde reaktif oksijen tüketiminde ani artış, glikojen katabolizması, glikoz oksidasyonunda artış ve ROT ile sağlanır.



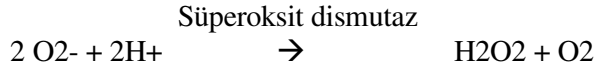
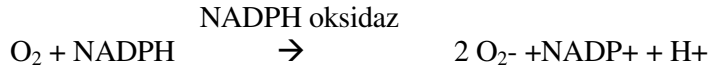
Şekil 2.10. Solunumsal Patlama [107]

Fagositozu takiben nötrofiller, monositler ve makrofajlar oksijen tüketiminde ani artış, glikoz oksidasyonunda artış ve reaktif oksijen metabolitlerinin üretimi ile karakterize olan oksidatif bir patlamayı uyarır. Pentoz fosfat yolunun aktivasyonunun neden olduğu bir glukoz katabolizmasında artış vardır. Bu olay "solunumsal patlama"

(respiratuar burst) olarak adlandırılır (Şekil 2.10) ve ROS'un üretim ve salınımıyla alakalıdır [52,116].

Nötrofillerin mikrobisit aktiviteleri, oksijeni toksik olan süperoksit anyonlarına (O_2^-) ve hidrojen perokside (H_2O_2) dönüştüren enzim sistemleri üzerine oturur.

Nötrofillerin hücre membranındaki NADPH bağımlı oksidaz sistemi, süperoksit oluşturan önemli bir kaynaktır. Bakteri, mitojen, opsonize partiküller, immün kompleksler, lektinler, araşidonik asit metabolizma ürünleri gibi etkenlerle bu enzim aktive olur. Oluşan süperoksit çoğu kez spontan dismutasyonla H_2O_2 'ye dönüşür. Üretilen H_2O_2 miktarı genellikle birçok bakteriyi öldürmeye yeterli değildir. Ancak nötrofillerin lizozomları miyeloperoksidaz enzimi içerirler ve klorür varlığında MPO enzimi H_2O_2 'yi $HOCl$ 'ye dönüştürür. $HOCl$ kuvvetli bir oksidan ve antimikrobiyal ajandır. Bakteriyi halojenasyonla veya lipit peroksidasyonu ile öldürür [113].



Oksidatif patlama ile fagolizosomal içerik sindirilir ve bundan sonra ekzositoz ile dışarıya atılır.

2.11.5. Serbest radikallere karşı koruyucu sistemler (Antioksidanlar)

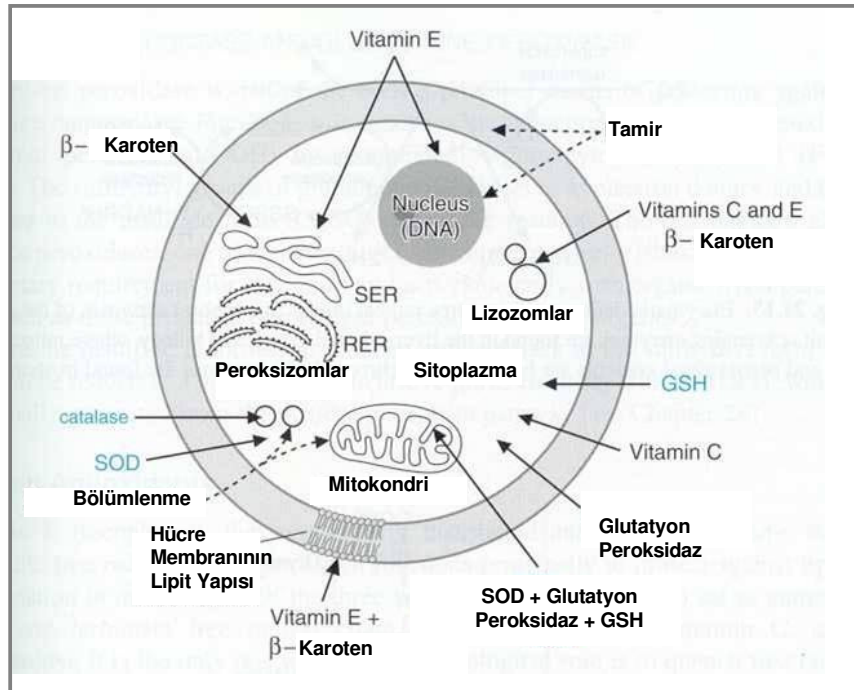
Canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir [50].

Çoğu elektronlar çift halde bulunurken, serbest radikaller bu elektronları birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurur. Ama sonuçta serbest radikal kendine bir çift elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektron ise serbest radikal olur. Antioksidanlar

ise serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturur. Bağlanan serbest, iki serbest radikali birleştirerek nötralize edebilme özelliğine sahip bir enzime (glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz) taşınana kadar radikalle stabil bir yapı oluşturur.

Canlı organizmada normal metabolizma sırasında ya da patolojik yolla ortaya çıkan serbest radikaller ve bunlara karşı koruyucu sistem olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması “oksidatif stres” olarak adlandırılır. Normal fizyolojik şartlarda serbest radikal ürünleri ve peroksitler etkili antioksidan sistemler tarafından dengelenir. Bu antioksidan moleküller serbest oksijen radikallerinin temizlenmesinde ve dolayısıyla oksidatif hasarın önlenmesinde oldukça önemlidirler.

Hücreler oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik olan antioksidan sistem ve moleküllerle korunurlar.



Şekil 2.11. Antioksidan savunma sistemleri [107]

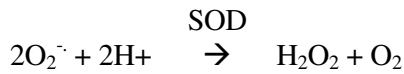
Hücresel seviyede etkili olan enzimatik sistemler içerisinde birincil olan antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon transferaz (GST) bulunur.

Enzimatik olmayan küçük moleküllü antioksidanlar ise glutatyon, N-asetilsistein ve tiyoller gibi protein olmayan sülfidriller, vitamin C, A, E ve daha başka moleküllerdir [50,103,106]. Şekil 2.11’de çeşitli antioksidan savunma sistemleri görülmektedir.

Enzim yapısındaki antioksidanlar

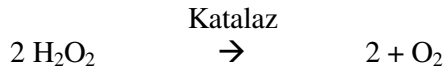
Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksiti, H₂O₂ ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir. Bu reaksiyon oksidatif strese karşı ilk savunma olarak da adlandırılır, çünkü süperoksit, zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır.



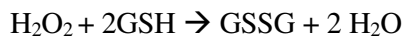
Katalaz (CAT)

H₂O₂ biyolojik sistemler için zararlıdır ve hidroksil radikali oluşumunu arttırmaktadır. Bu yüzden oluşan H₂O₂’ in uzaklaştırılması hücreler için avantajdır. Bu amaçla hücre içinde H₂O₂’ yi yıkan enzimlerden birisi katalazdır.



Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GSH-Px)

Enzim ilk kez 1957 yılında Amerika’ da keşfedilmiştir. Bu enzimin substratı küçük molekül ağırlıklı bir tiyol bileşiği olan GSH’ dir. Se-GSH-Px, aşırı H₂O₂ mevcudiyetinde GSH’ nin GSSG’ ye (okside glutatyon) oksidasyonunu katalize eder ve bu arada H₂O₂’ de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur.



Glutasyon s-transferaz (GST)

GST' ler ilk defa 1961 yılında tanımlanmıştır. Lipit peroksitlere (ROOH) karşı GST' ler, Se bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi göstererek bir antioksidan etkinlik gösterirler.



Miyeloperoksidaz enzimi ve aktivitesi

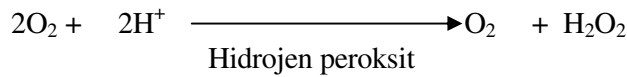
Miyeloperoksidaz (MPO), memeli nötrofillerinin granüllerinde yer alan bir enzim olup, fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Enzimin I,II ve III olarak tanımlanmış 3 tipi mevcuttur. Kristal yapısı X ışınlarıyla incelenmiş olup, her MPO molekülünün 2 alt birimden oluştuğu tespit edilmiştir. Toplam molekül ağırlığı 140000 Da olup, iki uzun iki de kısa polipeptit zinciri vardır. MPO, 1940'lı yıllarda Verdoperoksidaz olarak anılmakta iken sonradan Miyeloperoksidaz olarak isimlendirilmiştir. Enzimin toplam ağırlığının ortalama % 3-4'ü karbonhidrattır. Birçok enzimde olduğu gibi spesifik inhibitörü de bildirilmiştir, asidik olarak da bilinen bu inhibitör MPO aktivitelerini bloke etmektedir.

MPO' nun salyada bulunduğu dair deliller mevcuttur. Ancak kökeni tükürük bezi hücreleri olduğundan peroksidaz olarak tanımlanmaktadır.

Antibakteriyel etkisi; MPO, H₂O₂ (Hidrojen peroksit) ile birlikte tiyosiyonat iyonların veya halojen (halid) iyonlardan (iyodit, bromit, klorit) birinin de beraber bulunduğu bir ortamda antibakteriyel etki (oksijene bağlı) göstermektedir. Halojenler etki sıralamasında, iyodit, bromit ve klorit olarak yer alırlar. Yani kısacası, en etkili kombinasyon MPO+ H₂O₂ +1 üçlüsüdür. H₂O ve diğer halojenlerin konsantrasyonlarındaki artış, antibakteriyel etkiyi artırmaktadır. MPO'nun *Escherihia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus* ve *Actinobacillus actinomyeetemco-mitains* üzerine kesin bakterisit (öldürücü) etkisi vardır.

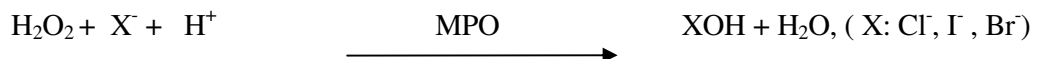
H₂O₂ 'nin antibakteriyel mekanizmadaki rolü, mikrobiyal metabolizma üzerine olan etkisidir. H₂O₂ 'in ayrıca tek başına da antibakteriyel etkisi vardır . Ortamdaki H₂O₂ ise, fagositoz yapan hücrelerden üretilip salınmaktadır. H₂O₂ 'in konsantrasyonu antibakteriyel mekanizma da çok olan önemli bir yer tutar. Optimal konsantrasyon 0,00005 M.' dir. Bu konsantrasyondaki azalma antibakteriyel etkiyi azaltmaktadır. MPO I, II ve III birbirlerinden bağımsız olarak antibakteriyel mekanizmada rol oynayabilirler. En güçlü etki MPO I ile oluşmaktadır. Bu etkinin farklılığı MPO formlarının hedef hücrelere bağlanabilme güçlerinden kaynaklanmaktadır [117].

Solunumsal patlama sırasında tüketilen oksijen, bakterisidal bir ajan olarak kullanıldığı hidrojen peroksit'e dönüştürülür [34].



Solunumsal patlamadaki amaç; fagositler tarafından mikroorganizmaların yok edilmesinde kullanılabilecek oksidan ajanlar sağlamaktır. Bu oksidan ajanları kullanan mikrobisidal sistemlerden biri de Miyeloperoksidaz (MPO) sistemidir. Nötrofil ve monositler, primer lizozomal granüllerinde bir hem enzimi olan MPO ihtiva ederler. Nötrofilde, antimikrobiyal aktiviteden sorumlu tutulan ilk oksidatif metabolizma ürünü hidrojen peroksittir. H₂O₂'in MPO ve bir halid ile kombinasyonu, güçlü antimikrobial sistem, çeşitli bakteri, mantar, virüs, mikoplazma, çok hücreli organizmalara ve memeli hücrelerine karşı etkilidir. MPO; çeşitli bileşikler okside edebilen bir enzim-substrat kompleksi oluşturabilmek için, substratı olan hidrojen peroksit ile birleşir. Bunlardan oluşan halidlerin oksidasyonu sonucu, çeşitli yollarla mikroorganizmayı etkileyebilen toksik ajanlar meydana gelir ve bunlar hücre ölümüne yol açarlar [51,52].

Çeşitli stimulusların etkisiyle fagositler, MPO ihtiva eden granülleri ekstraselüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. MPO, hidrojen peroksit varlığında, florür dışında halidlerin (klorür, iyodür ve bromür) oksidasyonunu katalizler. Bu reaksiyonda MPO, halidden hidrojen peroksit'e iki e⁻ transferi yapar, okside halid meydana gelir.



Hipohalöz asitler olan hipoklorit (HOCl), hipoiyodür (HOI) ve hipobromit (HOBr) ile bunların tuzları güçlü oksidanlardır ve biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerler. H_2O_2 ile reaksiyona girerek singlet oksijeni, glukozamin ve taurin gibi aminlerle reaksiyona girerek kuvvetli oksidanlar olan klorlanmış aminleri oluştururlar [34].

Över ve arkadaşları, hızlı ilerleyen periodontitisli, erişkin periodontitisli ve sağlıklı bireylerin periferik kan nötrofilleri ile tükürük MPO aktivitesini tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmalarda MPO aktivitesi ile, periodontal yıkım arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Periodontal yönden hastalıklı bireylerdeki artan MPO aktivitelerinin, nötrofillerin sayılarındaki artışa, degranülasyonlarına ve kronik antijenik stimuluslar varlığına bağlı hiperaktif durumla ilişkili olabileceğini vurgulamışlardır [117].

Enzim yapısında olmayan antioksidanlar

Glutasyon (GSH)

Önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiş bir tripeptittir. GSH' a antioksidan özelliğini, sisteinin tiyol grubu kazandırır. Karaciğerde, genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilir. GSH, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi ROT' ların temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek, hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Bazı moleküllerin hücre içi taşınmasına aracılık eder. Birçok enzimin kofaktörüdür. Tiroid hormon sentezinde rol oynar [104-106].

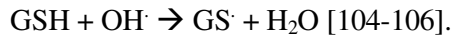
Glutasyon, eritrositleri, lökositleri ve göz lenslerini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. Eritrosit zarını H_2O_2 ' den, lökositleri fagositozda kullanılan oksidan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasardan korur [34].

Glutasyonun insan metabolizmasında birçok işlevi vardır. Transplantasyon amacıyla organların korunmasında ve siklofosamid gibi sitotoksik ilaçların organ hasarını

oluşturmasını engellemede yararlı katkıları vardır. Ayrıca kistik fibrosis gibi hastalıklarda aktive fagositlerden kaynaklanan ROT'ların yaptıkları akciğer hasarını da azaltırlar [118].

Dokudaki ya da koroner dolaşımdaki glutatyon miktarının artması, hücrelerin oksidatif stresden korunduğunun bir göstergesidir [36].

Glutatyonun diğer biyokimyasal özelliği bazı problemlere rol açar. Glutatyonun hidroksil radikaliyle verdiği hızlı reaksiyon tiyil (GS⁻) radikali oluşmasına neden olur.



Askorbik asit (C vitamini, AA)

C vitamini (askorbik asit), kapalı formülü C₆H₈O₆ olan bir ketolaktondur [106]. Isıtılmaya dayanıksız, dondurulmaya ise dayanıklıdır. Plazma konsantrasyonu 0,5–1,5 mg/dl kadardır [34].

Suda eriyen bir vitamindir [105]. Özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turuncgillerde bol miktarda bulunur. Çok güçlü bir indirgeyici ajandır. Bu indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikaliyle kolayca reaksiyona girerek kolayca onları temizler [106].

Askorbik asitin (C vitamini) efektif bir suda erir antioksidan olduğu öne sürülmektedir [36].

C vitamini insan vücudunda birçok hidroksilaz enzim sisteminde kofaktör olarak görev yaptığından diyetle bulunmalıdır. Sigara içimi, C vitamini tüketimini arttırdığından ve C vitamini akciğerlerin antioksidan savunmasında önemli olduğundan sigara içenlerin, içmeyenlere göre daha fazla C vitaminine ihtiyaçları vardır. Demir ve bakır gibi metal-iyonların yokluğunda C vitamini güçlü bir antioksidandır. Fakat metal-iyonların varlığında tehlikeli olabilirler. Benzer şekilde sağlıklı bireylerde 20 grama kadar ulaşan mega dozlarda bile C vitamininin zararlı

etkileri gösterilememesine karşın ileri dönem kanserli hasta grubunda, letal hemorajik tümör nekrozu gelişebileceği rapor edilmiştir [118].

Yıllardan beri yapılan pek çok araştırma, C vitamininin etkili bir anti-kanser ajanı olduğunu rapor etmiştir. Çalışmalar C vitamininin antioksidan özelliğinin kanseri yenmede birkaç yolla olduğunu savunmaktadır. Lipitlerin peroksidasyonunu önleyerek dejenerasyon ve yaşlanma olaylarında etkilidir. Vitamin C aynı zamanda DNA'ya verilebilecek serbest radikal hasarlarını da engellemektedir. C vitamininin vücuttaki en önemli görevi protein kollajen sentezidir. Aynı zamanda bu, diş, kemik, kırık, deri deki fiberlerin oluşumunu sağlar. Ayrıca immün sistemde de önemli görevleri vardır. Eksikliği ikincil infeksiyonlar, deri kuruması, diş dökülmesi, kanama, foliküler hiperkeratozis, kramplar, kas yorgunluğu gibi pek çok soruna neden olur [34].

Serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu hasarı önlemek için ekzojen radikal temizleyicisi üzerinde çalışılmıştır. Bunlardan biri de endojen bir antioksidan olan askorbik asittir. Askorbik asit (Vitamin C), membran içindeki ve ekstrasellüler sıvılardaki lipit peroksidasyonunu önler, geniş dozaj limiti içerisinde toksik etkiye sahip değildir. Operasyon gibi fiziksel stresler plazma askorbik asit seviyesinde düşüşe neden olur. Literatürde E vitamini ile birlikte verilen askorbik asidin serbest oksijen radikallerini temizleyici etki gösterdiğini bildiren yayınlar vardır. Askorbik asidin tek başına nasıl bir etki gösterdiğini saptamak için hem biyokimyasal hem de hemodinamik komponenti olan çalışmalar gerçekleştirilmiştir [36].

C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Bağışıklık ve yara iyileşmesinde etkilidir [34].

C vitaminin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir. Oksidatif patlama sırasında nötrofiller C vitamini alırlar ve aktivasyonu takiben C vitamini konsantrasyonları azalır. C vitamini eksikliği olan kobayların lökositlerinde, kemotaksis ve bakterisidal aktivitenin depresse olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı kişilerde C vitamini verilmesi kemotaktik cevabı artırır.

Oksidatif patlama sırasında, reaktif moleküller çevreye yayılarak mutasyonlara, hücre hasarına, inflamasyona, koruyucu enzimlerin inaktivasyonuna ve lenfosit proliferasyonunun inhibisyonuna neden olurlar. C vitamini, reaktif bakterisidal moleküllerin intraselüler konsantrasyonlarında azalmaya sebep olmadan oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini engellerler.

Askorbik asit düzeyinin düşük olması, tüm kronik inflamatuvar hastalıklarda ve lipit peroksidasyonunun artmış olduğu durumlarda önemli rol oynar. Kronik inflamasyonlarda vitaminin katabolizması artar. Çünkü bu sırada normal metabolizma sürekli oksidatif stres altındadır. İn vivo olarak glutatyon, askorbatın indirgenmiş durumunu sürdürmek için gereklidir. Askorbik asitin bu koruyucu mekanizmasının etkinliği, glutatyon redüktazının etkinliğine bağlıdır. Kronik inflamatuvar durumlarda intrasellüler glutatyonun da azaldığına dair bulgular vardır [34].

Vitamin E (Tokoferol)

Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma elemanıdır [34]. Lipit peroksidasyonunu inhibe eder [106].

Karotenoidler

A vitamininin metabolik ön maddesidir. Son derece güçlü singlet oksijen temizleyicisidir. Ayrıca hidroksil, peroksi ve alkoksi radikalleriyle doğrudan reaksiyon vererek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebilir.

Ürik asit

Japon araştırmacılar lipit peroksidasyonunun ürik asitle önlendiğini bildirmişlerdir. Ürik asidin hidroksil radikaliyle reaksiyonunda karbon merkezli radikaller ve bunların da oksijenle reaksiyonuyla ürat peroksil radikalleri meydana gelmektedir.

Melatonin

Süperoksit radikalini temizleyen güçlü bir antioksidandır. Günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir.

Transferin ve laktoferrin

Normal insan plazmasında bulunan bir proteindir. Transferine bağlı olan demir hidroksil radikalının oluşumunda rol oynamaz ve böylece lipid peroksidasyonu önlenmiş olur.

Bilirubin

İn vivo sentezlenen antioksidandır. “Hem” katabolizması sonucu oluşan bir safra pigmenti olan bilirubin albümine bağlı olarak bulunur ve taşınır. Yağ asitlerini peroksidasyona karşı korur.

Alfa-ketoasetat

Hidrojen peroksidi ortadan kaldırır.

Cinsiyet hormonları

Kadın cinsiyet hormonları lipid peroksidasyon üzerinde etkilidir.

Koenzim Q

Lipid peroksidasyonunu engeller ve peroksil radikallerini ortadan kaldırır.

Melatonin

Süperoksit radikalini temizleyen güçlü bir antioksidandır. Günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir.

Ferritin

Dokulardaki demiri bağlayarak serbest radikal reaksiyonlarında rol almasını engeller [34,106].

3. MATERYAL-METOT

3.1.Deney Protokolü

Deneylerde 5 aylık $2,5 \pm 0,4$ kg ağırlıkta 43 adet Yeni Zelanda tipi erkek tavşan kullanıldı. Tavşanlar Lemali deney hayvanları yetiştirme çiftliğinden alındı ve G.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fizyoloji laboratuvarında bakıldı. Deney öncesi ve deney süresince pelet yem ve su ile beslenen hayvanlar, deney süresince tek tek kafeslerde, gün ışığı döngüsü paralelinde aydınlanan ortamda bakıldılar.

3.2. EGF Preparatının Hazırlanması

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

EGF (Sigma, E-4127 0,1 mg.) 1 flakon suda çözülüp polietilen glikol (PEG 4000, ort 0,02 gr.) içinde 40 ng. olacak şekilde doze edilerek hazırlandı. Uygulamalarda, EGF 400 µl. distile suda çözünmüştür. Su hacmi vakum altında yeterli miktara kadar 30 °C de steril şartlarda uçurulmuştur. Daha sonra PEG' den bir damla sonra EGF çözeltisinden 40 ng eşdeğer EGF çözeltisi hesaplanarak bu miktar damlatılmış ve karıştırılmıştır. Bu şekilde UV lamba altında steril şartlarda hazırlanan PEG+EGF şeklinde formülasyonlar ayrı ayrı flakonlara yerleştirilip ağzı kapatılarak deneylerimizin yapıldığı Fizyoloji Laboratuvarına getirilmiştir [119].

3.3. Yara Modelinin Oluşturulması

Sabah saat 10:00' da hayvanların önce standart terazide ağırlıkları saptanmıştır. Daha sonra ketamin (Ketalar 50 mg./kg.) ve ksilazin (Rhompun 5 mg./kg.), Resim 3.1'de görüldüğü gibi intramüsküler olarak enjekte edilerek genel anestezi sağlanmıştır. Resim 3.2 'de görüldüğü gibi hayvanın ağzı açılıp, yanak ve dil ekarte edildikten sonra

kesici dişler ile azı dişler arasındaki diastema bölgesinin en derin iç bükey yeri, merkez olacak şekilde sağ ve sol çenede kretin tepesine 1.5 cm uzunluğunda postero-anterior yönde insizyon (kesi), perioste kadar inecek şekilde tek işlemde gerçekleştirilmiştir (Resim 3.3) İnsizyondan sonra yara dudakları vestibul ve lingual yönde periost elevatörü ile mukoza üzerinde formülasyonlar yerleşecek kadar cerrahi teknikler kullanılarak ekarte edilmiştir (Resim 3.4). Tüm tavşanların ağız mukozasında insizyon yarası yapılmıştır [119].

I. Gruptaki tavşanlara sadece kesi yarası yapılmıştır.

II. Gruptaki tavşanlara PEG+EGF' li kombinasyonları taşıyan boncuk yerleştirilmiştir.

Kontrol grubundaki tavşanlara hiçbir uygulama yapılmamıştır.

Daha sonra yara dudakları adapte edilip kanama kontrolü yapılarak iki adet sütür atılmıştır. Tavşanlar deney süresince pelet, yem ve su ile beslenmişlerdir.

Kesi yarası yapılan ve EGF+PEG kombinasyonlu boncuk uygulanan tavşanlar; kronobiyolojik sıraya uygun olacak şekilde operasyonu izleyen 1., 3. ve 5. günlerde sabah saat 10:00' da ağırlıkları tartılarak, aşırı doz Na barbital, kulak veninden verilerek feda edilmiştir. Ağızdaki tükürük bezleri sağlı-sollu hemen çıkarılarak, bulaşmayı önleyecek materyale sarıldıktan sonra sıvı azot içerisine konularak dondurulmuştur.



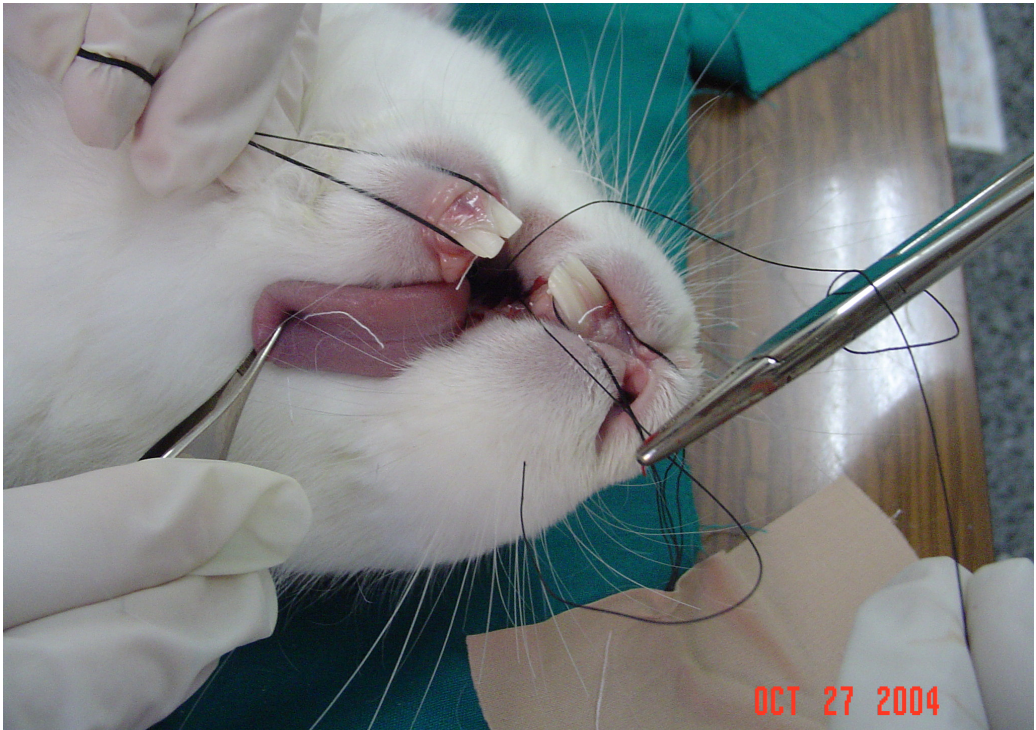
Resim 3.1. İntramüsküler enjeksiyon [120]



Resim 3.2. Ağızın açılıp, dilin ekarte edilmesi [120]



Resim 3.3. 1.5 cm uzunluğunda posterio-anterior yönde insizyon [120]



Resim 3.4. Yara Dudaklarına Sütür Uygulanması [120]

3.4. Yöntemler

3.4.1. Dokuda TBARS tayin yöntemi

Dokuda TBARS düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemiyle çalışıldı [121]. Doku örnekleri tartıldı. Homojenizatör ile soğuk TCA içinde homojenize edildi. Daha sonra süpernatant alınarak üzerine TBA ve BHT eklendi. Numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 535 nm’de, köre karşı okundu.

3.4.2. Dokuda GSH tayin yöntemi

Dokuda glutatyon tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı [122]. Doku örnekleri TBARS yöntemindeki gibi homojenize edilip santrifüj edildikten sonra süpernatant, NaH_2PO_4 ve DTNB çözeltisi ile karıştırıldı. Oda ısısında 5- 10 dk bekletildikten sonra karışımın absorbansı spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.4.3. Dokuda AA tayin yöntemi

Roe ve Kuether’in Berger tarafından modifiye edilmiş metodu kullanıldı [123]. Doku PCA/EDTA karışımı içinde buz soğukluğunda homojenize edildi. Homojenat 15000 g (RCF) devirde 3 dk. 4 derecede 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 derecede inkübe edildi. Numunelerin ısı 0 dereceye getirilip her bir tüpe H_2SO_4 eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk. bekletildi. Numuneler 515 dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.4.4. Dokuda MPO tayin yöntemi

Glowick ve Kaplan’ ın yöntemi kullanıldı [124]. Doku sodyum fosfat tamponunda buz soğukluğunda homojenize edildi. Homojenat 3500 rpm devirde 10 dk. 4 derecede santrifüj edildi. Süpernatant, sodyum fosfat tamponu, H_2O_2 , ortodianizidin ve su tüplere

konularak karıştırıldı. Numuneler 37 °C de 30 dk. inkübe edildikten sonra üzerlerine HCl eklenerek, 410 nm. dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Bütün değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Sonuçlar dağılımın homojen olup olmamasına göre Anova Varyans Analizi ve Mann Whitney U test ile değerlendirildi. $P<0,05$ önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

Herhangi bir uygulama yapılmamış tükürük bezlerine ait TBARS düzeyi, $53,33 \pm 7,77$; GSH düzeyi, $12,74 \pm 5,85$; AA düzeyi, $0,51 \pm 0,10$ ve MPO aktivitesi $11,82 \pm 1,07$ olarak tespit edilmiştir.

4.1. Tükürük Bezi TBARS Düzeyleri

Tedavisiz grupta, tükürük bezi TBARS düzeyleri, kendi aralarında kıyas edildiğinde günlere bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalma göstermiştir.

EGF uygulanan tüm gruplarda ise, hem kontrolle hem de tedavisiz gruplarla karşılaştırıldığında EGF uygulamasının TBARS düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir. Gruplar kendi kontrolleriyle karşılaştırıldığında, ekzojen EGF uygulamasının, tükürük bezi dokusu lipid peroksidasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

4.2. Tükürük Bezi GSH Düzeyleri

Kesi yarasını takiben tükürük bezi GSH düzeyleri değerlendirildiğinde, herhangi bir uygulama yapılmamış tükürük bezleriyle tüm gruplar kıyas edildiğinde, GSH düzeylerinin azaldığı fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. EGF uygulamasını takibinde tükürük bezi dokusu GSH düzeylerinin değişmediği ölçülmüştür (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).

4.3 Tükürük Bezi MPO Düzeyleri

MPO aktivitesinin, yaralanmanın 1. gününde yani inflamasyon fazında, istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu tespit edilmiştir. Yaralanmayı takiben 3. ve 5. günlerde, 1. güne kıyasla olan artış giderek azalmıştır. EGF uygulanan gruplarda, kendi aralarında kıyas edildiğinde günlere bağlı olarak giderek azalan bir MPO aktivitesi tespit edilmiştir. Bu azalma, EGF uygulanan grupta 1. ve 5. günler için istatistiksel anlamda önemlidir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3).

4.4 Tükürük Bezi AA (Vitamin C) Düzeyleri

Tedavisiz gruplarda tükürük bezi AA düzeyleri, kontrol grubuyla kıyas edildiğinde önemli ölçüde azalmıştır. Bu azalma, tedavisiz grubun 3. gününde maksimum bir cevap göstermiştir.

EGF uygulanan grubun AA düzeyleri, kontrolle kıyas edildiğinde azalmış olarak bulunmuştur. EGF uygulanan grubun AA düzeyleri, 3. ve 5. günlerde, 1. güne kıyasla istatistiksel anlamda artmıştır (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.1. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi TBARS, GSH, A.A. düzeyleri ve MPO aktivitesine etkilerini gösteren çizelge

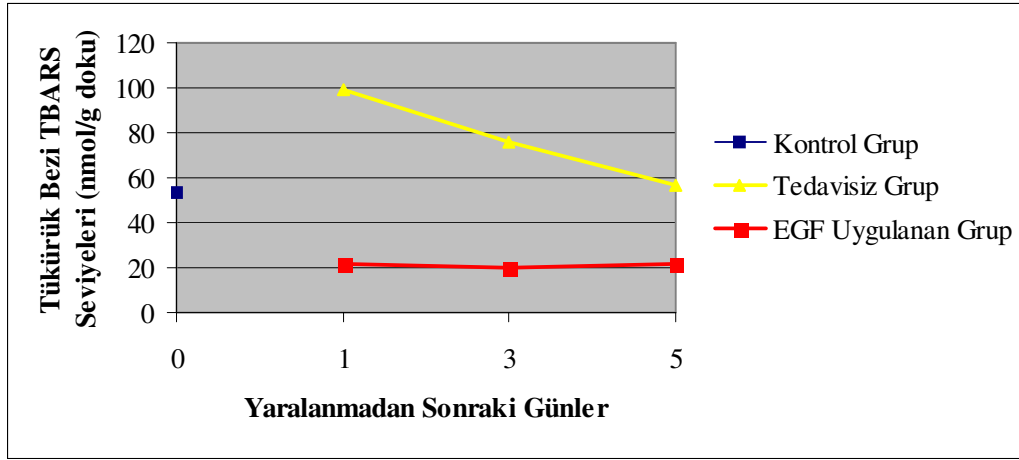
GRUPLAR	TBARS (nmol/g doku)	GSH (nmol/g doku)	MPO (U/ g doku)	A.A. (mg/g doku)
Kontrol grup n=6	53,33±7,77 ^a	12,74±5,85 ^a	11,82±1,07 ^a	0,51±0,10 ^a
Tedavisiz grup 1. Gün n=6	98,81±2,65 ^b	7,09±1,18 ^b	32,40±4,49 ^b	0,09±0,01 ^b
Tedavisiz grup 3. Gün n=6	76,00±9,89 ^c	10,14±1,93 ^c	24,78±2,90 ^c	0,02±0,01 ^c
Tedavisiz grup 5. Gün n=6	56,83±10,25 ^d	9,61±3,08 ^d	22,22±5,32 ^d	0,09±0,01 ^d
EGF uygulanan grup 1.Gün n= 6	21,86±1,41 ^e	8,60±1,12 ^e	35,42±3,00 ^e	0,04±0,03 ^e
EGF uygulanan grup 3. Gün n= 7	20,35±2,76 ^f	11,08±1,45 ^f	26,67±5,83 ^f	0,08±0,01 ^f
EGF uygulanan grup 5. Gün n= 6	22,08±4,18 ^g	8,71±2,46 ^g	24,07±5,20 ^g	0,08±0,01 ^g

TBARS p<0,05: a-b, a-c, a-e, a-f, a-g, b-c, b-d, c-d, b-e, c-f, d-g

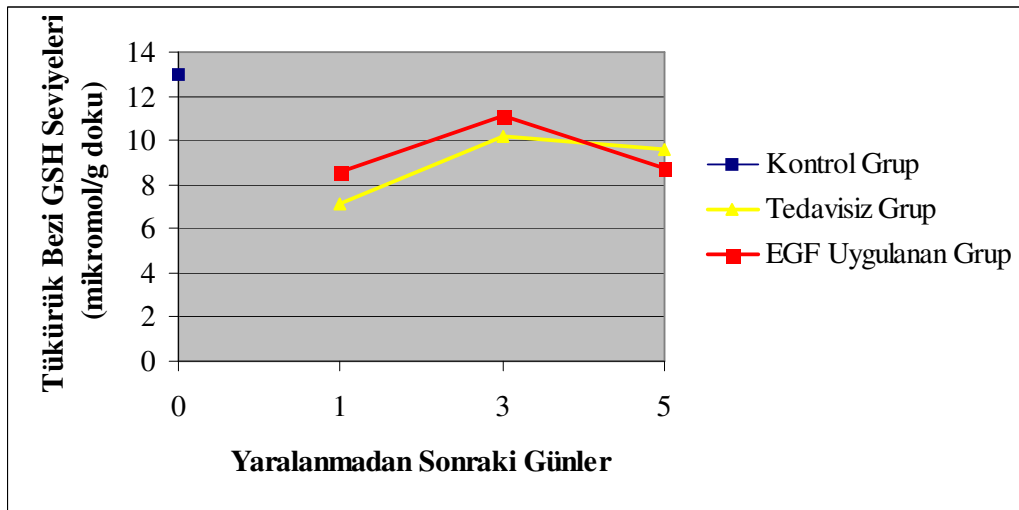
GSH p>0,05

MPO p<0,05: a-b, a-c, a-d, a-e, a-f, a-g, b-d, e-g

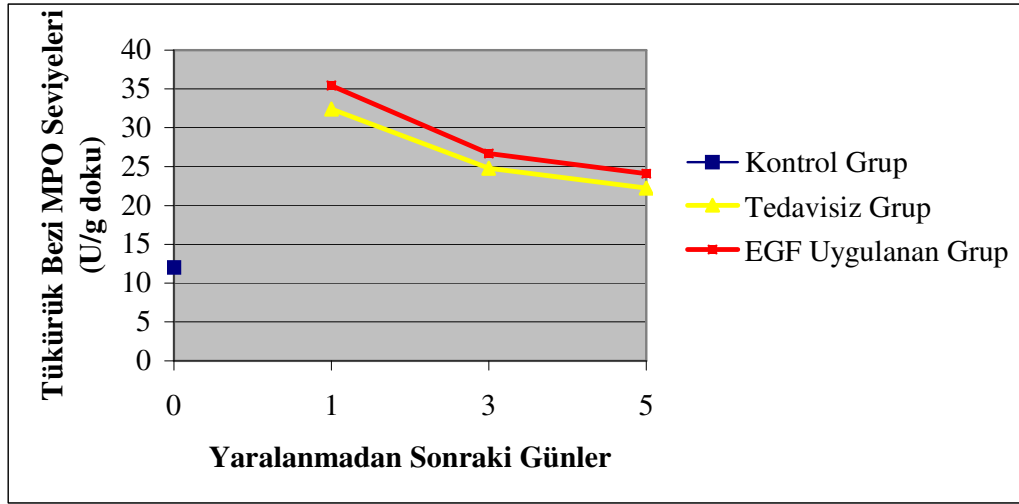
A.A. p<0,05: a-b, a-c, a-d, a-e, a-f, a-g, b-c, e-f, e-g, b-e, c-f



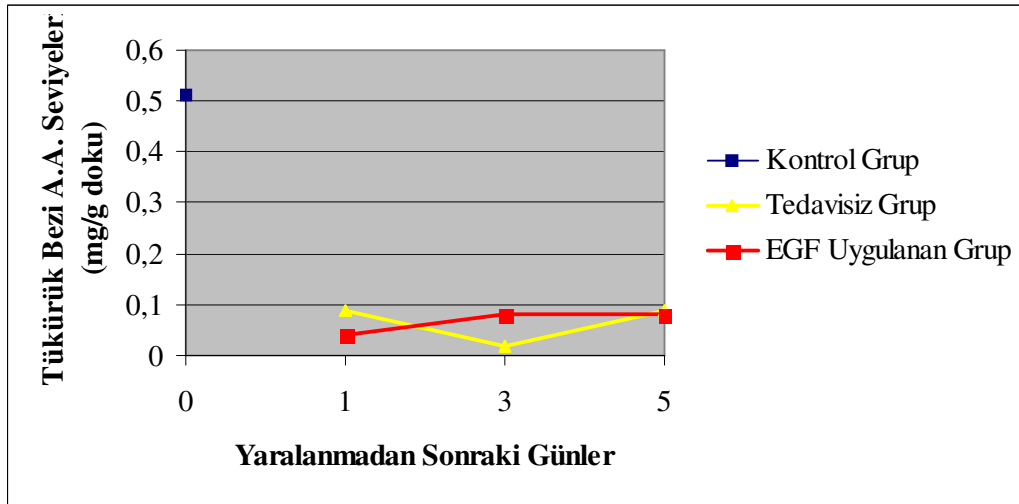
Şekil 4.1. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi TBARS düzeylerine etkileri



Şekil 4.2. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi GSH düzeylerine etkileri



Şekil 4.3. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi MPO aktivitesine etkileri



Şekil 4.4. Ekzojen EGF uygulamasının tükürük bezi AA düzeylerine etkileri

5. SONUÇ

EGF, ağız epitelyal bariyerinin devamlılığı sağlamada ve ağız mukozal yara iyileşmesinde çok önemli bir role sahiptir [13]. EGF, çenealtı tükürük bezinde ve tükürükte yüksek konsantrasyonda bulunur [8]. Oral cerrahiden sonra tükürük bezi büyüme faktörünün seviyesinde bir artış olduğu ve cerrahi işlemlerin büyüme faktörü sentez ve salgısını da arttırdığı gösterilmiştir [100].

Oral kavitedeki infeksiyonlar tükürükte lipid peroksidasyon düzeylerini yükseltmekte ve antioksidan aktivitenin düşmesine yol açmaktadır [42].

Bu çalışmada; yara tamirini hızlandırmak üzere dışardan uygulanan EGF' nin tükürük bezi oksidan olaylarına etkilerini göstermek amacıyla, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan TBARS düzeyleri, önemli antioksidanlar olan GSH ve AA seviyeleri ile oksijene bağlı, savunma mekanizmalarında rol alan bir enzim olan MPO' nun aktivitesi, günlere bağımlı olarak, yara iyileşmesi de dikkate alınarak tespit edilmiştir.

Bunun için oral mukozalarında kesi yarası yapılan ve kesi yarası yapıldıktan sonra ekzojen olarak EGF uygulanan iki deney grubu seçilmiş; her iki grupta da yaralanmadan sonraki 1., 3. ve 5. günlerde tükürük bezi oksidan olayları araştırılmıştır.

Oral mukozalarında kesi yaraları yapıp tedavi edilmeyen tavşanların, yaralanmadan sonraki 1. ve 3. günlerdeki tükürük bezi TBARS düzeyleri, kontrolle kıyaslandığında anlamlı ($P<0,05$) olarak artmış bulunmuştur. Bu bulgu, tükürük bezinin ağızdaki yaraya karşı duyarlılığını göstermesi açısından anlamlıdır. Tedavi edilmeyen grup kendi içinde kıyaslandığında, günlere bağımlı olarak TBARS düzeyleri anlamlı olarak azalmışken, ekzojen olarak EGF uygulanan tavşanların, tedaviden sonraki 1., 3. ve 5. günlerdeki tükürük bezi TBARS düzeyleri ile kıyaslandığında ise günlerle orantılı olarak anlamlı ($P<0,05$) bir azalma kaydetmiştir.

EGF uygulanan grupta TBARS düzeylerinin, tedavisiz gruba oranla azalma göstermesi, EGF' nin antioksidan etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir.

EGF uygulanmasının, gastrik mukoza MDA seviyesini düşürdüğünü ve ülser içeriğini azalttığı ve ağız içerisinde değişen durumlarda antioksidan özellik gösterdiği rapor edilmiştir [73,125].

GSH düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol, tedavisiz gruplar ve EGF uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Bu sonuçlara göre, gerek tedavisiz grupta gerekse de EGF uygulanan grupta yaralanmadan sonraki günlerde azalan TBARS düzeylerine karşın, GSH düzeylerinin bir değişiklik göstermemesi, GSH antioksidanı yerine, EGF'nin yanısıra başka antioksidan savunma sistemlerinin devreye girdiğini düşündürmektedir. Bu nedenle bu deneye paralel olarak yapılacak başka bir çalışmada, enzimatik antioksidanlar olan SOD ve CAT aktivitelerinin çalışılması yerinde olacaktır. Pereslegina ve arkadaşlarının, tükürüğün antioksidan özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, tükürüğün önemli ölçüde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz gibi enzimatik antioksidanları içerdiğini rapor etmişlerdir [126]. GSH düzeylerinde tüm gruplarda herhangi bir değişikliğin ortaya çıkmaması, oksidatif hasarın ortadan kaldırılmaya çalışılmasında, güçlü bir antioksidan olan C vitamininin kullanılmış olduğunu düşündürülebilir.

Bir diğer antioksidan olan AA seviyelerinde, tedavisiz grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında, tedavisiz grupta anlamlı olarak ($P<0,05$) azalma tespit edilmişken, bu bulgu bize yaralanma esnasında askorbik asidin antioksidan olarak kullanıldığını ve solunumsal patlama sırasında nötrofillerin C vitaminini kullandıklarını düşündürülebilir [34]. EGF uygulanan grubun AA düzeyleri ise 3. ve 5. günlerde 1. güne kıyasla anlamlı olarak artmıştır. EGF'nin kullanılmış olması doku C vitamini düzeylerinin azalmasına sebep olacak bir etkiye meydan vermemiştir. C vitamininin, EGF uygulanan gruplarda kontrolle kıyas edildiğinde artmış olması, ilk etapta EGF'nin antioksidan rolünün ortaya çıkmış olduğunu gösterebilir.

Operasyon gibi fiziksel stresler plazma askorbik asit seviyesinde düşüşe neden olur [118]. Askorbik asit düzeyinin düşük olması tüm kronik inflamatuvar hastalıklarda ve lipid peroksidasyonunun arttığı durumlarda önemli rol oynar. İnflamasyon ve

peroksidasyon sırasında vitamin katabolizması artmıştır. Çünkü normal metabolizma sürekli oksidatif stres altındadır [34]

MPO aktivitesini gösteren seviyeler, tedavisiz grupta, kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak ($P<0,05$) artma tespit edilmiş, tedavisiz grup kendi içinde kıyaslandığında ise 1., 3. ve 5. günlerde sırayla anlamlı ($P<0,05$) olarak azalma tespit edilmiştir. Tedavisiz grup, EGF tedavisi uygulanan grupla kıyaslandığında ise günlerle orantılı olarak MPO aktivitesinde artmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($P<0,05$). Yine EGF tedavisi uygulanan grup kendi içinde kıyaslandığında, günlerle orantılı olarak anlamlı bir şekilde azalma tespit edilmiştir. Tedavisiz grupta enzim aktivitesi, inflamasyon fazının gerçekleştiği 1. günde, diğer günlerden daha yüksek bulunmuştur. EGF uygulanan grup ve tedavisiz grup karşılaştırıldığında ise EGF uygulanan grupta MPO aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. MPO aktivitesinin EGF uygulanan grupta tedavisiz gruba göre artmış bulunması, EGF' nin nötrofil akümüülasyonunu stimüle edebileceğini düşündürmektedir.

Ağız dokusundaki inflamatuvar hastalıklarda MPO enzim aktivitesinin arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur [73,117,127]. Bizim çalışmamızın sonuçları da bu bulguyla paralellik göstermektedir.

Gerek tedavisiz gerekse EGF tedavisi uygulanan grupta yaralanmadan sonraki 1. günde tükürük bezi TBARS düzeylerinin ve MPO aktivitesinin, diğer günlere kıyasla yüksek bulunması, inflamasyon fazında gerçekleşen olayların lipit peroksidasyonunu ve solunumsal patlamayı tetiklediğinin göstergesi olabilir.

Ağız yarası oluşturulan hayvanlarda yaraya EGF uygulanmasının, tükürük bezinde lipit peroksidasyonunu azaltması, EGF' nin ağız cerrahisi sırasında ağız mukozasında oluşan oksidatif hasarı, yara iyileşmesini de uyarak azaltması olaylarında, tükürük bezlerindeki savunma mekanizmalarının da katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, ağız içerisine yapılan herhangi bir uygulamadan, tükürük bezlerinin oksidan ve antioksidan sistemlerinin etkilendiğı tespit edilmiştir. Bu bulgular bize, tükürük bezlerinin ağız içerisindeki değışimlerden haberdar olduğunu ve buna uygun cevaplar geliştirdiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Akbulut, K. G., Gönül, B., Türkyılmaz, A., Çelebi, N., “The role of epidermal growth factor formulation on stress ulcer healing of the gastric mucosa”, *Surg. Today*, 32(10): 880- 883 (2002).
2. Gönül, B., Akbulut, K.G., Özer, Ç., Yetkin, G., Çelebi N., “The role of transforming growth factor alpha formulation on aspirin-induced ulcer healing and oxidant stress in the gastric mucosa”, *Surg. Today*, 34 (12): 1035–1040 (2004).
3. Gope. R., “The effect of epidermal growth factor & platelet derived growth factors on wound healing process”, *Indian J. Med. Res.*, 116:201-206 (2002).
4. Çelebi, N., Türkyılmaz, A., Gönül, B., Özoğul, C., “Effects of EGF microemulsion formulation on the healing of stress-induced gastric ulcers in rats”, *J. Controlled Release*, 83 :197–210 (2002).
5. Gönül, B., Söylemezoğlu, T., Babül, A., Çelebi, N., “Effects of epidermal growth factor dosage forms on mice full-thickness skin wound zinc levels and relation to wound strength”, *J. Pharm. Pharmacol*, 50 (6):641–644 (1998).
6. Gönül, B., Erdoğan, D., Özoğul, C., Koz, M., Babül, A., Çelebi, N., “Effect of EGF dosage forms on alkali burned corneal wound healing of mice”, *Burns*, 21 (1): 7-10 (1995).
7. Sayan, H., Gönül, B., Akbulut, K.G., Türkyılmaz, A., Çelebi, N., “Effects of epidermal growth factor formulations on liver malondialdehyde and reduced glutathione levels in stress ulcer model”, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 26 :61–6 (2001).
8. Zelles, T., Purushotham, K. R., Macauley, S. P., Oxford, G. E., Humphreys-Beher, M. G., “Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all” *J. Dent. Res.*, 74 (12): 1826-32 (1995).
9. Nanney, L. B., “Epidermal and Dermal Effects of Epidermal Growth Factor During Wound Repair, *The Journal of Investigative Dermatology*, 94(5):624-629 (1990).
10. Das, M., “Epidermal growth factor: mechanism of action”, *Int. Rev. Cytol.*, 78: 233-236 (1982).
11. Marquardt, H., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., Todaro, G. J., “Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor”, *Science*, 223 (4640): 1079-1082 (1984).

12. Schlessinger, J., Ulrich, A., Honnegger, A. M., Moolenean, W. H., "Signal transduction by EGF receptor", *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Laboratory, NY LIII:515-519 (1988).
13. Royce, L. S., Baum, B. J., "Physiologic levels of salivary epidermal growth factor stimulate migration of an oral epithelial cell line", *Biochim. Biophys. Acta.*, 17 (3): 401-403 (1991).
14. Mathison, R., "The submandibular glands: A role in homeostasis and allostasis", *Biomed. Rev.*, 4: 61-69 (1995).
15. Karagami, H., Hiramatsu, Y., Hishida, S., Okazaki, Y., Horie, K., Oda, Y., Ueda, M., "Salivary growth factors in health and disease", *Adv. Dent. Res.*, 14: 99-102 (2000).
16. Bodner, L., Dayan, D., Rotehchild, D., Hamel, I., "Healing of experimental wounds in sialodenectomized rat", *J. Clin. Periodontol*, 19: 345-347 (1992).
17. Erbaş, D., Oygür, T., Anıl, A., "Submandibular bez ekstreminin yara iyileşmesine olan etkisi", *G.Ü. Dişhek. Fak. Der.*, 5 (2):139-147 (1988).
18. Mandel, I. D., "A Contemporary view of salivary research", *Oral biology and medicine*, 4(3/4):599-604 (1993)
19. Brigagão, M.R.P.L., Colepicolo, P., "Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by saliva", *Biol Rhythm Res.*, 27: 261-268 (1996).
20. Slomiany, B.L., Piotrowski J., Slomiany, A., "Chronic alcohol ingestion enhances tumor necrosis factor- α expression and salivary gland apoptosis", *Alcohol Clin Exp Res.*, 21: 1530-1533 (1997).
21. Brigagão, M.R.P.L., Colepicolo, P., "Activation of neutrophils is daily inhibited by saliva", *Biol Rhythm Res.*, 29: 598-605 (1998).
22. Fernando, N. N., Adriana, M. C., Paula, M. Y., Yamaguti, J. N., "Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin- induced diabetic rats", *Clinica Chimica Acta*, 353: 133-139 (2005).
23. Laato, M., Niinikoski, J., Gerdin, B., Lebel, L., "Stimulation of wound healing by epidermal growth factor", *Ann. Surg.*, 203 (4): 379-381 (1986).
24. Lawman, M. J., Boyle, M. P. P., Gee, A. P., Young, M., "Nerve growth factor accelerates early cellular events in wound healing", *Exp. Mol. Pathol.*, 43: 274-281 (1985).

25. Schultz, G. S., White, M., Mitchell, R., Brown, G., Lynch, J., Tuvardak, D. R., Todaro G. J., "Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor and vaccinia growth factor", *Science*, 16 (235): 350 (1987).
26. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Shull, J. H., "Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo", *Science*, 219:1319-1333 (1982).
27. Coşkun, Ş., "Epidermal büyüme faktörü'nün oral submukozal implantla uygulanmasının tükürük bezi çinko, bakır düzeyleri ve epidermal büyüme faktörü reseptörüne etkisi", Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 7-32 (2001).
28. Nagy, G., "Role of saliva, salivary glands and epidermal growth factor (EGF) on oral wound healing", *Fogorv Sz.*, 96 (1): 17-20 (2003).
29. Campos, S. C. G., Moreira, D. A. C., Nunes, T. D. S., Colepicolo, P., Brigagao, M. R. P. L., "Oxidative stress in alcohol rat sialadenosis", *Archives of oral biology*, 50:661-668 (2005).
30. Lieber, C. S., Decarli, L. M., "Animal models of chronic ethanol toxicity", *Meth Enzymol*, 233: 585-594 (1994).
31. Avula, C. P. R., Fernandes, G., "Modulation of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in murine salivary gland by dietary fatty acid ethyl esters" *Life Sciences*, 65(22): 2373-2383 (1999).
32. Mashayekhi, F., Agha-hosseini, F., Rezaie, A., Zamani, M. J., Khorasani, R., Abdollahi, M., "Alteration of Cyclic Nucleotides Levels and Oxidative Stress in Saliva of Human Subjects with Periodontitis", *J Contemp Dent Pract*, 6(4):46-53 (2005).
33. Takahashi, Y., Hasegawa, J., Kameyama, Y., "Dissolution of Metallic Mercury in Artificial Saliva and Eleven Other Solution", *Dent. Mater.*, 5:256-259 (1989).
34. Akkuş, İ., "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri", *Mimoza Yayınevi*, Konya, 1-77 (1995).
35. Mercan, U., "Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi", *YYU Vet. Fak. Derg.*, 15(1-2):91-96 (2004).
36. Salman, E., Bayraktaroğlu, M., Doğan, O. V., Yörükoğlu, Y., Yüce, E., Kösebalaban, Ş., Özer, N., "Askorbik Asit'in Serbest Oksijen Radikal Temizleyici Olarak Açık Kalp Cerrahisinde Kullanımı", *GKD Cer. Derg.*, 2:216-220 (1994).
37. Bassaga, H.S., "Biochemical aspects of free radicals", *Biochem. Cell. Biol.*, 68: 989-998 (1989).

38. Ginsberg, M.D., Watson, B.D., Busto, R., Yashida, S., Prado, R., Nakayama, H., Ikeda, M., Dietrich, W.D. "Peroxidative damage to cell membranes following cerebral ischemia", *Neurochem. Pathol.*, 9: 171-193 (1998).
39. Gupta, A., Singh, R.L., Raghubir, R., "Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats", *Mol Cell Biochem.*, 241 (1-2): 1-7 (2002).
40. Rasik, A.M., Shukla, A., "Antioxidant status in delayed healing type of wounds", *Int. J. Exp. Pathol.*, 81 (4): 257-63 (2000).
41. Chapple, I. L., Mason, G. I., Garner, I., Matthews, J. B., Thorpe, G. H., Maxwell, S.R., Whitehead, T. P., "Enhanced Chemiluminescent Assay for Measuring the Total Antioxidant Capacity of Serum, Saliva and Crevicular Fluid", *Ann. Clin. Biochem.*, 34 (4): 412-421 (1997).
42. Turgeneva, L. B., Novikov, V.E., Tsenov, L. M., "A clinico pharmacological study of olifen in periodontal inflammation", *Exp. Clin. Pharmacol.*, 60(2): 777 (1997).
43. Winkler, B. S., Orselli, S. M., Rex, T. S., "The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective", *Free Radic. Biol. Med.*, 17: 333-349 (1994).
44. Som, S., Raha, C., Chattarjee, I. B., "Ascorbic acid: A scavenger of superoxide radical", *Acta.Vitaminol. Enzimol.*, 5: 243-250 (1983).
45. Sawiris, P. G., Enwonwu, C. O., "Ascorbate Deficiency Impairs the Muscarinic-Cholinergic and β -Adrenergic Receptor Signaling Systems in the Guinea Pig Submandibular Salivary Gland", *Journal of Nutrition*, 130: 2876-2882 (2000).
46. Von Zastrow, M., Triton, T. R., Castle, J. D., "Identification of L-ascorbic acid in secretion granules of the rat parotid gland", *J. Biol. Chem.*, 259:11746-11750 (1984).
47. Ginter, E., "Disorders of cholesterol metabolism in marginal vitamin C deficiency and the problem of optimum ascorbic acid intake", *Bibl. Nutr. Dieta*, 44:85-93 (1989).
48. Carlsson, J., "Salivary peroxidase: an important part of our defenses against oxygen toxicity", *J. Oral Pathol.*, 16:412-416 (1987).
49. Hodges, R. E., "What's new about scurvy?", *Am. J. Clin. Nutr.*, 24:383-384 (1971).
50. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., "Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma", *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4:92-95 (1997).

51. Hohn, D. C., Mackay, R. D., Halliday, B., Hunt, T. K., "Effect of O₂ tension on microbicidal function of leucocytes in wounds and in vitro", *Surg. Forum*, 27: 18-20 (1976).
52. Babior, B.M., "Phagocytes and oxidative stres", *Am J Med.*, 109: 33-44 (2000).
53. Thomas, E. L., Jefferson, M. M., Joyner, R. E., Cook, G. S., King. C. C., "Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: identification and quantitation in human mixed saliva", *Journal of Dental Research*, 73: 544-555 (1994).
54. İnternet: Tükürük bezlerinin anatomi ve fizyolojisi, <http://www.ankaranumune4kbb.com/download/downloadkat.asp?kid=4&islem=indir&id=1> (2002).
55. İnternet: Tükürük bezleri anatomi ve fizyolojisi, <http://www.utmb.edu/otoref/grnds/Salivary-Gland-2001-01/Salivary-gland-2001-01.pdf> (2001).
56. Solomon, E. P., "İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş, 3. Baskı", Süzen, L. B., *Biröl Basın Yayın Dağ.*, İstanbul, 214-215 (2000).
57. İnternet: Tükürük bezi hastalıkları, <http://tip.erciyes.edu.tr/Anabilim/Cerrahi/Web/Kbb/EGITIM/DERS/yyu/TBH.htm> (2005).
58. İnternet: Tükürük bezleri embriyolojisi, <http://www.ankaranumune4kbb.com/download/dosyalar/T%FCkr%FCk%20bezleri%20anatomi%20ve%20fizyolojisi.pdf> (2002).
59. Ganong, W. F., "Tıbbi Fizyoloji, 17. Baskı", *Barış Kitapevi*, İstanbul, 599-600 (1996)
60. Kumar, R., Thompson, E.B., "The structure of the nuclear hormone receptors", *Steroids*, 64:310-319 (1999).
61. Young, J. A., Cook, D. I., "The major salivary glands", *Comprehensive Human Physiology*, 2nd ed., Gregor, R., Windhorst, U., *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg, 1309-1326 (1996).
62. Gartner, L. P., Hiatt, J. L., "Color Textbook of Histology", *W. B. Saunders Company*, USA, 338-341 (1997).
63. Pimentel, E., "Handbook of Growth Factors, ISBN: 0849325056, 1st Ed.", *CRC Press*, USA, 1-4 (1994).
64. Lawrence, W. T., Diegelmann, R. F., "Growth factors on wound healing", *Clinics in Dermatology*, 12:157-169 (1994).

65. İnternet: Büyüme faktörleri ve yara iyileşmesi, <http://www.bu.edu/woundbio/tech/growthfactors/gfdevtest.html> (2005).
66. İnternet: Yara iyileşmesi, <http://www.woundscience.com/Scientific%20Basis%20of%20Wound%20Healing%20-%203.htm> (2005).
68. Rice, A., Chard, T., “Cytokines in Implantation”, *Cytokine & Growth Factor Rev.*, 9(3): 287-296 (1998).
69. Steenfos, H. H., “Growth factors and wound healing”, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.*, 28: 95-105 (1994).
70. Fabish, W., “What is dermatitis artefacta”, *Int. J Derm*, 20:427-428 (1981).
71. İnternet: Yara iyileşmesi ve büyüme faktörleri, <http://www.emedicine.com/plastic/topic457.htm> (2006).
72. İnternet: Yara iyileşme mekanizmaları, http://woundhealer.com/wound_healing_at_its_best.htm (2006).
73. Güleç, E. G., “Epidermal büyüme faktörünün oral submukozal implantla uygulanmasının yara dokusu oksidan olaylarına etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 10 (2006).
74. MacKay, D., Miller, A.L., “Nutritional support for wound healing”, *Altern med Rev.*, 8(4):359-377 (2003).
75. Arnold, H.L., Odom, R.B., James, W.D., “Andews disease of the skin”, Clinical Dermatology, 8th Ed., *WB Saunders Company*, Philadelphia, 15 (1990).
76. Marks, R., Dykes, P., Motley, R., “Clinical sings and procedures in dermatology 1st ed.”, *Martin Dunitz Ltd.*, London, 35 (1993).
77. Beanes, S. R., Dang, C., Soo, C., Ting, K., “Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β ”, *Exp. Rev. Mol. Med.*, 5(10):1-14 (2003).
78. Cohen, S., “The Epidermal Growth Factor (EGF)”, *Cancer*, 51:1787-1791 (1983).
79. Cohen, S., “Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animals”, *J. Biochem.*, 207 (5): 1555-1562 (1962).
80. Cohen, S., “The Stimulation of Epidermal Proliferation by a Spesific Protein (EGF)”, *Dev. Biol.*, 12:394-407 (1965).
81. Carpenter, G., Cohen, S., “Epidermal growth factor”, *Ann. Rev. Biochem.*, 48:193-216 (1979).

82. Dunitz, M., "Cutaneous Wound Healing, ISBN: 1853172049, 1st Ed.", Falanga, V., *The Livery House*, London, 41 (2001).
83. Carpenter G., Cohen S., "Epidermal growth factor", *J. Biol Chem.*, 265:7709 (1990).
84. İnternet: EGF' nin yapısı, <http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/photogallery/structures/html/page3.html> (2005).
85. Citri, A., Yarden, Y., "EGF-ERBB signalling: towards the systems level", *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7(7):505-516 (2006).
86. Martı, U., Burwen, S. J., Janes, A. L., "Biological effects of epidermal growth factor with emphasis on the gastrointestinal tract on liver", *Ann. Update Hepatol.*, 9 (1):126-138 (1989).
87. Hirata, Y., Orth, D. N., "Epidermal growth factor (urogasterone) in human tissues", *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 48: 667-72 (1979).
88. Savage, A.P., Chataterjee, V.K., Gregory, I., "Epidermal growth factor in blood", *Regul. Pep.*, 16 :199-200 (1986).
89. Chen, J. D., Kim, J. P., Zhang, K., Sarret, Y., Wynn, K. C., Kramer, R. H., Woodley, D. T., "EGF Promotes Human Keratinocyte Locomotion on Collagen by Increasing the Alpha 2 İntegrin Subunit", *Exp. Celi. Res.*, 209 (2):216-223 (1993).
90. Cohen, S., "Epidermal Growth Factor", *Biosci. Rep.*, 6:1017-1028 (1986).
91. Rizzino, A., Roff, E., Kazokoff, P., "İsolation and characterization of A-431 cells that retain high EGF binding capacity and respond to EGF by growth stimulation", *Can. Res.*, 48:2277-2281 (1988).
92. Fisher, D. A., Lakshmanan J., "Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals", *Endoc. Rev.*, 11 (3): 418-422 (1990).
93. İnternet: EGF' nin yapısı, http://www.ust.hk/roundtable/hi-tech.series/1_b1.jpg (2004).
94. İnternet: Büyüme faktörleri, <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/growth-factors.html> (2005).
95. Pratt R. M., "Role of epidermal growth factor in embriyonic development", Current Topics in Developmental Biology, ISBN: c-12-153122-8, Vol. 22, Moscona, A. A., Monroy, A., *Academic Press* , New York, 175 (1987).

96. Fujisawa, K., Youji, M., Masaru, N., “Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa”, *J. Oral Pathol. Med.*, 32:358-66 (2003).
97. Arıcıoğlu, A., Aral, I. L., Öztürk, M., Erbaş, D., Yılmaz, D., “EGF ve lazerin farelerde oluşturulan insizyon yaralarının iyileşmesinde lipit peroksidasyon üzerine etkilerinin incelenmesi”, *Diş Hek. Bilimleri Dergisi*, 1(1):25-28 (1995).
98. Steed, D.L., “Modifying the wound healing response with exogenous growth factors”, *Clinics in Plastic Surgery*, 25: 397-405 (1998).
99. Taylor, J. M., Mitchell, W. M., Cohen, S., “Characterization of the binding protein for EGF”, *J. Biol. Chem.*, 249(10):3198-3203 (1974)
100. Oxford, G. E., Jonsson, R., Olafsson, J., Zelles, T., Humphreys – Beher, M. G., “Elevated levels of human salivary EGF after oral and juxtaoral surgery”, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 57(2):154-158 (1999).
101. Lakshmanan, J., Carlisle, P. C., “Neonatal hyperthyroidi impairs epinephrine-provoked secretion of nerve growth factor and EGF in mouse saliva”, *Pediatr. Res.*, 20(7):587-592 (1986).
102. Kılınç, K., Kılınç A., “Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri”, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2):110-118 (2002).
103. İnternet: Oksijenin Aktivasyonu, <http://cropsoil.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm> (1996).
104. İnternet: Oksidatif stres, <http://www.cosmos-club.org/journals/2002/bulkley.htm> (2002).
105. Nordberg, J., Arner, E. S. J., “Reactive Oxygen Species, Antioxidants and the Mammalian Thioredoxin System”, *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11):1287-1312 (2001).
106. İnternet: Oksidatif stres, <http://www.gata.edu.tr/temelbilimler/biyokimya/seminer/OKS%C4%B0DAT%C4%BOF%20STRES.doc> (2004).
107. İnternet: Serbest oksijen radikalleri ve Antioksidanlar, <http://www.mustafaltinisik.org.uk/21-adsem-01.ppt> (2000).
108. İnternet: Serbest radikallerin oluşturduğu hücre zedelenmesi, <http://med.ege.edu.tr/~saitsen/2005cellinjury.pdf..html> (2004).
109. Hunt, T. K., Pai, P .M., “Basic principles of wound healing”, *The Journal of Trauma*, 30 (12): 122-128 (1990).

110. Viheraari, T., Kivisaari, J., Niinikoski, J., "Effect of changes in inspired oxygen tension on wound metabolism", *Ann. Surg.*, 179: 889-895 (1975).
111. Hunt, T. K., Linseyi M., Sonei M., Jawetz E., "Oxygen tension and wound infection", *Surg. Forum*, 23: 47-49 (1972).
112. Barrette, W. C., Hannum, D. M., Wheeler, W. D., Hurst, J. K., "General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: Abolition of ATP production", *Biochemistry*, 28: 9172-9178 (1989).
113. Ceylan, E., Dülger, H., Uzun, K., "Tüberküloz Plörezilerde Plevra Sıvısı Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Tanısal Değeri", *Toraks Dergisi*, 4(1):33-37 (2003).
114. Shou, J., Lappin, J., Daly, J. M., "Impairment of pulmonary macrophage function with total parenteral nutrition", *Annals of Surgery*, 219: 291-297 (1994).
115. İnternet: Fagositoz, <http://www-micro.msb.le.ac.uk/MBChB/bloodmap/Phagocytosis.html> (2004).
116. Babior, D. M., "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes", *N. Engl. J. Med.*, 298: 659-668 (1978).
117. Develioğlu, A. H., Taner, İ. L., "Miyeloperoksidaz' ın özellikleri ve periodontal hastalıktaki önemi", *C.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 1(1):24-27 (1998).
118. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., "Hastalıkların Patogenez ve Tedavisinde Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidanlar", *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4: 96-101 (1997).
119. Kamiya, Y., Ohta, Y., Imai, Y., Arisawa, T., Nakano,T., "A critical role of mucosal ascorbic acid in the progression of acute gastric mucosal lesion induced by 48/80 in rats" *World Gastroenterol.*, 11(9): 1324-1332 (2005).
120. Seda YILMAZ' ın arşivinden (2004).
121. Casini, A., Ferrali, M., Pompella, A., "Lipit peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice", *Am. J. Pathol.*, 123: 520-531 (1986).
122. Aykaç, A.G., Uysal, M., Yalçın, A. S., Koçak-Toker, N., Sivas, A., Öz, H., "The effect of cronic ethanol ingestion on hepatic lipit peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione tranferase in rats", *Toxicology*, 36: 71-76 (1985).
123. Berger, J., Shepart, D., Morrow, F., Taylor, A., "Relationship between dietary intake and tissue levels reduced and total vitamin C in nonscorbutic guinea pig", *J. Nutr.*, 119: 734-740 (1989).

124. Glowick, S. P., Kaplan, S.D., “Methods in enzymology”, *Academic Press.*, New York, 769 (1955).
125. Erkasap, S., Erkasap, N., Aral, E., Köken, T., Kahraman, A., Aydın, Y., Yılmaz, S., Ateş, E., “Mast cell stabilizator and antioxidant effects of epidermal growth factor (EGF) on gastric mucosal injury induced by ethanol in rats”, *Chin J Physiol.*, 48(1):1-6 (2005).
126. Pereslegina, I. A., “The activity of antioxidant enzymes in the saliva of normal children”, *Lab. Delo.*, 11: 20-23 (1989).
127. Çağlayan, F., Yamalık, N., Kılınç, K.,Giray, B., “Erişkin periodontisli hastalara diyeti örneklerinde myeloperoksidaz düzeylerinin incelenmesi”, *H.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, İS: 24-27 (1994).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TAŞIR YILMAZ, Seda
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 11.02.1980 Almanya
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 476 65 55
 e-Mail : sedatasir@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2003
Lise	50. Yıl Süper Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2004 – Devam	A. Ü. Biyoteknoloji Enst. Merkez Lab.	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Tekin, M., Öztürk Hismi, B., Fitoz, S., Özdağ, H., Cengiz, F. B., Sırmacı, A., Aslan, İ., İnceoğlu, B., Yüksel Konuk, E. B., Taşır Yılmaz, S., Yasun, Ö., Akar, N., “Homozygous Mutations in Fibroblast Growth Factor 3 are Associated with a New Form of Syndromic Deafness Characterized by Inner Ear Agenesis, Microtia, and Microdontia”, *The American Journal of Human Genetics*, 80(2):338-344 (2007).