

**DIYABETİK RATLARDA TOPIKAL VASKÜLER ENDOTELYAL
BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) UYGULAMASININ YARA
DOKUSUNDAKİ OKSİDATİF OLAYLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ebru UZUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2013

ANKARA

Ebru UZUN tarafından hazırlanan “DİYABETİK RATLARDA TOPİKAL VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) UYGULAMASININ YARA DOKUSUNDAKİ OKSİDATİF OLAYLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Nursel GÜL

Biyoloji Anabilim Dalı, A. Ü.

Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

Biyoloji Anabilim Dalı, G. Ü.

Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI

Biyoloji Anabilim Dalı, G. Ü.

Tez Savunma Tarih: 19 / 07 / 2013

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

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Ebru UZUN

**DİYABETİK RATLARDA TOPIKAL VASKÜLER ENDOTELYAL
BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) UYGULAMASININ YARA DOKUSUNDAKİ
OKSİDATİF OLAYLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Ebru UZUN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2013**

ÖZET

Diyabetlilerdeki geciken yara iyileşmesinin önemli nedenlerinden biri büyüme faktörlerinin yeterince üretilmemesi veya yıkımındaki artıştır. Önemli büyüme faktörlerinden biri olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nin, damar oluşumunu uyararak yara iyileşmesinde rol oynadığı görülmüştür. Çalışmamızda, VEGF'nin diyabetik ratlara topikal olarak uygulanmasının yara dokusu oksidatif olaylar üzerine etkilerinin zamana bağlı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 200-250 g ağırlığında 36 adet Wistar-Albino diyabetik dişi rat kullanıldı. Ratlar, streptozotosin ile diyabetik hale getirildi. Dorsolateral eksizyonel yara yapılan diyabetik ratlar, tedavisiz grup (n=12), kitosan uygulanan grup (n=12) ve kitosan+VEGF uygulanan grup (n=12) olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. VEGF uygulanan gruplardaki ratların yaralarına her gün birer kez topikal yolla kitosan jel içerisinde VEGF-A (7 ng/ml) uygulandı. Kitosan grubunda ise aynı miktarda boş kitosan jel uygulandı. Uygulamalardan sonra iyileşmenin 3 ve 7. günlerinde ratlar feda edildi. Çıkarılan yara dokularında NOx, TBARS, GSH, AA düzeyleri ve SOD aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi ve Anova varyans analizi ile karşılaştırıldı (p<0,05).

Topikal VEGF'nin, özellikle iyileşmenin erken evrelerinde yara dokusu NOx düzeyini azalttığı, TBARS düzeyini ise her iki günde de arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, GSH ve AA seviyelerini arttırarak yara dokusu antioksidan kapasitesinin artmasına da katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında, VEGF uygulama dozunun yara dokusundaki oksidatif olaylar üzerine etkisinin günlere bağlı değiştiği söylenebilir.

Bilim Kodu : 203.1.057

Anahtar Kelimeler : VEGF, Diyabetes Mellitus, Yara İyileşmesi, Oksidatif Stres, Antioksidan, AA, NOx, GSH

Sayfa Adedi : 93

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TOPICAL VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) ADMINISTRATION ON
OXIDATIVE STATUS OF WOUND TISSUE IN DIABETIC RATS
(M.Sc. Thesis)**

Ebru UZUN

**GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
July 2013**

ABSTRACT

Growth factors' not to be produced enough and catabolism's increase are main factors of the late wound healing in diabetics. Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays role in the wound healing by inducing vessel development. In this study we aim to investigate the topical VEGF administration on oxidative status of wound tissue in diabetic rats.

In our study 36 female Wistar albino rats (weight: 200-250g) were used. Rats get diabetic with streptozotocin. Dorsolateral excisional wounds were made on rats and they were randomly divided into 3 groups: Untreated group (n=12), Chitosan treated group (n=12), Chitosan+ VEGF treated group (n=12). In VEGF groups, wounds were treated topically with single daily dose VEGF-A (7ng/ml). In chitosan treated groups, wounds treated topically with equal amount blank chitosan gel. After these administrations, on the 3th and 7th days of wound healing, animals were sacrificed. NO_x, TBARS, AA, GSH levels and SOD activity were measured spectrophotometrically in wound tissues. Results were expressed as mean ± standard deviation. Mean differences were compared by Anova variance analysis (P<0, 05).

Topical VEGF especially decreased NO_x level in early level. It increased TBARS levels in both days. Also it increases GSH and AA levels contributed to increase of wound tissue antioxidant capacity. In the light of this information VEGF administration may have altering effects on oxidative events depending on days in wound healing process.

Science Code : 203.1.057

**Key Words : VEGF, Diyabetes Mellitus, Wound Healing, Oxidative Stress,
Antioxidant, AA, NO_x, GSH**

Page Number: 93

Adviser : Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışmanım Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER'e, kıymetli tecrübeleriyle bana yol gösteren Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI'ya, ayrıca manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve dostlarıma teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Yara ve yara iyileşmesi	5
2.1.1. Yara	5
2.1.2. Yara cinsleri	6
2.1.3. Yara iyileşmesi tipleri	7
2.1.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler	8
2.1.5. Yara iyileşme fazları	10
2.2. Diyabet	28
2.2.1. Diabetes Mellitus'un sınıflandırılması	28
2.2.2. Kronik hiperglisemi	33
2.2.3. Diyabet ve yara iyileşmesi	34
2.3. Büyüme Faktörleri	35
2.3.1. Büyüme faktörleri ve yara iyileşmesi	36

	Sayfa
2.4. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	38
2.4.1. VEGF'nin üyeleri ve yapısı	38
2.4.2. VEGF'nin reseptörleri	41
2.4.3. VEGF'nin sentezi ve yara iyileşmesindeki etkisi	42
2.5. Serbest Radikaller	44
2.5.1. Serbest radikal tanımı ve organizmaya etkisi	44
2.5.2. Serbest radikal türleri	45
2.5.3. Serbest radikallerin oluşumu	47
2.5.4. Hücrede serbest radikallerin oluşum yerleri	48
2.5.5. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri	48
2.5.6. Serbest radikallerin kaynakları	50
2.5.7. Serbest radikallerin biyolojik etkileri	51
2.5.8. Antioksidan savunma sistemleri	56
3. MATERYAL VE METOT	66
3.1. Deney Protokolü	66
3.2. VEGF Preparatının Hazırlanması	66
3.3. Diyabet Modelinin Oluşturulması	67
3.4. Yara Modelinin Oluşturulması	67
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması	68
3.6. Yöntemler	69
3.6.1. Dokuda NOx tayin yöntemi	69
3.6.2. Dokuda TBARS tayin yöntemi	69

	Sayfa
3.5.3. Dokuda GSH tayin yöntemi	70
3.5.4. Dokuda AA tayin yöntemi	70
3.5.5. Dokuda SOD tayin yöntemi	70
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	71
4. BULGULAR	72
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	78
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	93

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinin fazları	10
Çizelge 2.2. Yara iyileşmesi ile ilgili hemostatik ve trombosit kökenli faktörler	12
Çizelge 2.3. Makrofajların yara iyileşmesindeki rolü	15
Çizelge 2.4. Ekstraselüler matriks maddeleri ve özellikleri	22
Çizelge 2.5. Diabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflaması	29
Çizelge 2.6. Kronik hiperglisemi sonucunda oluşan değişiklikler	33
Çizelge 2.7. Yara iyileşmesinde etkili büyüme faktörleri	37
Çizelge 2.8. Serbest radikal türleri	46
Çizelge 2.9. Nitrik oksitin organizmada etkileri	50
Çizelge 2.10. Hücrel serbest radikallerin etkilediği moleküller	52
Çizelge 2.11. Önemli antioksidanlar ve doku lokalizasyonları	64
Çizelge 4.1. Yara dokusunda NO _x , TBARs, GSH, AA seviyeleri ve SOD aktivitesi	72

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Hücrelerin yara iyileşmesinin fazları sırasında yara alanındaki dağılımları	14
Şekil 2.2 Kollajen biyosentezi	19
Şekil2.3. Eksizyonel yarada kontraksiyon:	25
Şekil 2. 4. İntraselüler sinyal tipleri	36
Şekil 2.5. VEGF-A izoformları	39
Şekil 2.6. VEGF ailesinin reseptörler ile etkileşimi	42
Şekil 2.7. Çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyonu	55
Şekil 2.8. Antioksidanların etki şekilleri	57
Şekil 2.9. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu	61
Şekil 4.1. Gruplara ait NOx seviyelerinin günlere göre değişimi	73
Şekil 4.2. Gruplara ait TBARS seviyelerinin günlere göre değişimi.....	74
Şekil 4.3. Gruplara ait GSH seviyelerinin günlere göre değişimi.....	74
Şekil 4.4. Gruplara ait AA seviyelerinin günlere göre değişimi	75
Şekil 4.5. Gruplara ait SOD aktivitelerinin günlere göre değişimi	76

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. (a) Omurganın her iki yanında yaklaşık 5 cm uzunluğunda yapılan kesi yarası (b) Yapılan kesi yarasının süturla adapte edilmesi.....	69
Resim 4.1. Deney gruplarının tümüne ait kesi yaralarının morfolojik görüntüler.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simge	Açıklama
cm	Santimetre
CuCl₂	Bakır (II) klorür
g	Gram
H₂O₂	Hidrojen peroksit
H₂SO₄	Sülfürik asit
HOCl	Hipokloröz asit
Fe	Demir
IP₃	İnositol trifosfat
kDa	Kilo dalton
kg	Kilogram
LOO[·]	Lipit peroksil radikali
LOOH	Lipit hidroperoksit
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	Disodyum fosfat
NaNO₂	Sodyum nitrit
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NO	Nitrik oksit
O₂^{·-}	Süperoksit radikali
O₃	Ozon
OH[·]	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit

Simge	Açıklama
ROO[·]	Peroksi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
U	Ünite
VCl₃	Vanadyum III klorür
µmol	Mikromol
Kısaltmalar	Açıklama
4-HNE	4-hidroksi-2-nonenal
AA	Askorbik asit
ATP	Adenozin trifosfat
BHT	Bütil hidroksi toluen
BSA	Sığır serum albumin
CAT	Katalaz
C/IGF-1	Somatomedin
cGMP	Halkasal guanozin monofosfat
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1	İnterlökin-1
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAG	Glikozaminoglikan
Gap	GTPaz aktive eden protein
GC	Guanilat siklaz
GDP	Guanozin difosfat
GR	Glutasyon redükteaz

Kısaltmalar	Açıklama
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S transferaz
GTP	Guanozin trifosfat
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
MAPK	Mitojen ile aktifleşen protein kinaz
MDA	Malondialdehit
MMP	Matriks mettalloproteinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	Nitro blue tetrazolyum
NOS	Nitrik oksit sentaz
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PCA	Perklorik asit
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PIGF	Plasenta büyüme faktörü
PKC	Protein kinaz C
RGH	Retina ganglion hücreleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SPARC	Sisteinden zengin sekrete edilmiş asidik protein
STZ	Streptozotosin
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri
TCA	Trikloroasetik asit
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü- β
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α

Kısaltmalar**Açıklama****TNF- α** Tümör nekroz faktör- α **TS**

Yara gerilim kuvveti

VEGF

Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGF -R

Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

1. GİRİŞ

Vücudun herhangi bir yerindeki dokunun travma, ameliyat veya başka nedenlerle devamlılığının bozulmasına yara denir [1]. Yara iyileşmesi, yaralanmış dokunun anatomik ve fonksiyonel özelliklerini, normal sürekliliğine geri kazandırmak üzere, yaralanma anından itibaren başlayarak iç içe geçmiş evrelerden oluşan bir onarım sürecidir [2,3]. Olgun dokularda yara iyileşmesi, inflamasyon sürecinin başlangıcı (hemostaz, inflamasyon), proliferasyonun yenilenen hücrelerde sürekliliği ve kalıcı yaranın şekillenmesi (remodeling, maturasyon) gibi genel olarak 3 aşamadan oluşur [4-8]. Söz konusu evreler temel olmasına rağmen, kimi zaman bu aşamaların bazı kısımları atlanabilir. Bu da kronik ya da kalıcı yara izlerine sebep olabilir [7].

Yaranın oluşumunu takip eden birkaç dakika içerisindeki süreye hemostaz denir [7]. İnflamasyon safhası, yaranın oluşmasını takiben, 1- 6 gün kadar devam eden bir süreçtir [9,10]. Bu süreç, nötrofillerin makrofajların ve lenfositlerin yaraya göç etmesiyle başlar. İnflamasyon süreci sonuna kadar makrofajlar yara bölgesinde kalırlar. Makrofajlar uzun zamandan beri yara iyileşim sürecinin anahtar hücresi olarak düşünülmektedirler [7,11]. Proliferasyon safhası, granülasyon safhası olarak da adlandırılır. Yapılan hayvan çalışmaları sonucunda, bu evrenin yaklaşık olarak 3-4 hafta arası sürdüğü görülmüştür [12-14]. Yara boşluğunda meydana gelen kırmızı granüler dokunun varlığında bu safha fark edilebilir [15]. Bu evre reepitelizasyonun başlangıcıdır. Bu aşamada yaradan tüm yabancı cisimler çıkarıldıktan sonra kılcal damarlar ve extraselüler matriks (ECM) yapımına başlanır [7]. Anjiyogenez yani yeni damar oluşumu proliferatif evrenin en önemli aşamasıdır [8]. Sitokinleri model olarak hücrelerin çoğalması ve salgılanması bu aşamada olur [7]. Yara iyileşmesinin son aşaması olarak da adlandırılan remodeling, yeniden biçimlendirme aşamasıdır [7]. Bu evre yaranın oluşumundan 2-3 hafta sonra başlar ve 12 hafta kadar sürer [15]. ECM hücrelerinin oluşumu ve tip III kollajenlerinin yerine tip I kollajenlerinin geçmesi bu safhada meydana gelir [7].

Diyabetlilerde birçok açıdan zayıf bir yara iyileşmesi görülür. Düşük bağışıklık fonksiyonları, anormal şekilde iyileşmeyi de beraberinde getirir. Ayrıca yavaş

kollajen sentezi ve birikimi, düşük anjiyogenez; yaranın daha düşük gerilim kuvvetine ve yaranın daha çok açılmasına zemin hazırlar [7].

Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olmasının yanı sıra artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette aşırı serbest radikal üretimi lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, genetik mutasyonlara ve proteinlerde yapısal veya işlevsel değişikliklere neden olmaktadır. Bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için organizma bazı enzimatik ve non enzimatik antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Bunun yanı sıra, diyabette ekzojen antioksidanlar verilerek de serbest radikallerin zararlı etkileri önlenmeye çalışılabilir. Oksidatif stres serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller yönüne bozulmasıdır. Bunun da diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonlarına neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır [16,17].

Yara iyileşmesi, büyük ölçüde proanjiyogenik faktör olan vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) tarafından kontrol edilir. VEGF 40-45 kDa homodimerik glikoprotein yapıda, kan damarlarının geçirgenliğini düzenleyen bir faktördür [8,18]. Yapılan çalışmalar gösteriyor ki, vasküler endotelial hücreleri, *invivo* anjiyogenezleri meydana getirir [19,20]. VEGF yüksek affiniteli iki tirozin kinaz reseptörünü birbirine bağlayarak etkisini vasküler endotelial hücreler üzerinde ortaya çıkarır. Bu hücreler VEGFR-1 ve VEGFR-2 olarak belirtilir. Bu reseptörler vasıtasıyla sinyal yollayarak proliferasyonu, migrasyonu ve endotelial hücrelerin ihtiyaç duyduğu yeni kan damarlarını düzenler [21]. Keratonositler VEGF'nin ana kaynağıdır fakat, dermal fibroblastlar ve makrofajlar yaraya yanıt olarak üretilir [22,23]. VEGF sentezi yapmayan endotel hücreleri üzerlerinde VEGF için reseptör taşırlar. İnflamatuvar sitokinler, hipoksi, nitrik oksit, reaktif oksijen radikalleri ve hormonlar VEGF salınımına etkili faktörlerdir [24].

Diyabetik deri ülserlerinde spontan yara iyileşmesi çok zordur. Çünkü diyabetik deri ülserlerinde endojen büyüme faktörü aktivitesi düşüktür. Rekombinant insan VEGF ve bFGF hücre proliferasyonu ve yara iyileşmesini hızlandırmada uyarıcı faktör olarak

bilinir. Losi ve arkadaşları (2013), genetik olarak diyabetik hale getirilmiş farelerde, doku temelli nanopartiküllere VEGF ve bFGF yükleyerek yara iyileşmesinin uyarılmasını sağlamayı amaçlamışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda VEGF ve bFGF yüklü nanopartikül grubunda yüklü olmayan kontrol grubuna göre 15 gün içinde önemli derecede yara dokusunda ilerlemeler kaydedilmiş, ancak her iki grupta da reepitelizasyon, granülasyon dokusu, kollajen birikimi meydana geldiği gözlemlenmiştir [25]. Elçin ve arkadaşları (2001) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada *in vivo* anjiyogenezi incelediler. VEGF'nin sistemik yönetiminin ters etkilerini engellemek için yavaş salınım modeli geliştirdiler. Yaptıkları çalışma sonucunda, yavaş salınımlı VEGF kullanımı VEGF olmayan grupla karşılaştırıldığında belirli derecede anjiyogenez artışının olduğunu gözlemlədiler [26]. Zhang ve arkadaşları (2008), ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada nakledilen derinin canlılığını korumasında VEGF'nin etkisini araştırmışlar. Ratlar üzerinde biri kas diğeri periosteum olmak üzere iki farklı model oluşturdular. Kas modelinde topikal, sistemik ve intrafacial olmak üzere VEGF uygulanmıştır. Çalışma sonucunda kas modelinde intrafacial ve sistemik kas gruplarında topikal ve VEGF ekli olmayan kontrol grubuna göre nakledilen derinin canlılığında VEGF'nin etkisi önemli ölçüde yüksek çıkmıştır. Diğər modelde ise, 5. gün sonucunda VEGF'nin derinin canlılığında etkisi intraperiostonal uygulanan grupta diğər gruplara göre yüksek çıkmıştır. VEGF'li parçalardan alınan alanların histolojik çalışması, intraperiostonal ve intrafacial tedavinin anjiyogenezi tetiklediğini göstermiştir. Bu bilgiler ışığında VEGF'nin muskular ve periostonal alanlara uygulanmasının derinin hayatta kalma olasılığını arttırdığı anlaşılmıştır [27]. Bitto ve arkadaşları (2008) yaptığı çalışmada Simvastatin VEGF üretimini ve deneysel diyabetle bozulmuş yara üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Deneyin sonucunda diyabetik farelerde bozulmuş yara iyileşme süreci Simvastatin ile düzenlenmiştir. Benzer şekilde diyabetik olmayan farelerde de yara iyileşmesi hızına olumlu etkisi varken, anti-VEGF antikoru (10mg/fare) ile pasif bağışıklama Simvastatinin diyabetik farelerdeki iyileşme üzerine olumlu etkilerini ortadan kaldırmıştır [28]. Bu çalışma sonucunda görüldüğü gibi VEGF üretimi artırılarak yara iyileşmesi hızlanmış, anti-VEGF verildiğinde ise yara iyileşmesi azalmıştır. İnfanger ve arkadaşları (2005), rat modelleri üzerinde VEGF'nin damar yapılandırma sürecindeki etkisini araştırmışlar. Yaptıkları çalışma sonucunda; intraluminal VEGF'nin tedavide uygulanması vasküler mikrocerrahide faydalı olduğunu gözlemlemişlerdir [29].

Bozulmuş yara iyileşmesi diyabetik hastaların karakteristik bir özelliğidir. Kırchner ve arkadaşları (2003) genetik olarak diyabetik fare modelinde yara kapatma oranlarında VEGF'nin etkisini araştırmışlar; genetik olarak diyabetik hale getirilmiş farelere, yaralanma sonrası 0 ve 4. günler arasında topikal olarak VEGF-165 uygulanmış, daha sonra yara alanı 0, 5, 10, 15 ve 21. günlerde ölçülmüştür. Bulgular topikal VEGF'nin genetik diyabetik farelerde yara kapama oranını önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir [30].

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda, diyabetik hale getirilmiş ratların deri dokusunda oluşturulmuş dorsolateral kesi yaralarına topikal olarak uygulanan VEGF'nin, oksidatif olaylar üzerindeki zamana bağlı etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara ve Yara iyileşmesi

2.1.1. Yara

Yara, cilt ve mukozayı oluşturan yapıların farklı nedenlerle bütünlüğünün geçici ya da tamamen bozulmasıdır [31,32]. Yara iyileşmesi ise yaralanmış dokunun anatomik ve işlevsel özelliklerini yeniden oluşturmak amacı ile farklı hücre gruplarının bir araya gelerek birlikte yürüttükleri fonksiyonlardan oluşan bir onarım sürecidir [33,34].

Deri ve doku bütünlüğünün bozulması, kanama, şekil bozukluğu, organda vazife bozukluğu ve ağrı belirtilerine göre yaraların teşhisi yapılır, yerleri belli olur. Yaralar ağırlık derecesine göre, basit yüzeysel yaralar, hafif yaralar ve ağır yaralar olarak üçe ayrılır. Dış görüntüsüne göre sıyrık, bere, ezik, yırtılma, yarıma, kesikler, delinme, yanık, haşlanma ve nekroz diye isimlendirilir. Yaralanma ve yaralar adli tıbbın da en geniş konularındandır [35]. Bıçak, kurşun, ve benzeri delici aletlerin oluşturdukları yaralara “laserasyon” denir. Darbeyi yapan aletin özelliğine göre yara vücut dokularının derinliğine iner; bazen keskin kenarlı basit kesik halinde, bazen kenarları parçalanmış, nekrotik dokular gelişmiş ve doku harabiyeti oluşmuş karmaşık bir yaralanma şeklinde meydana çıkar. Kunt darbe ve güçlü ezilmelerin oluşturduğu yaralara “yumuşak doku travmaları” denir. Geniş veya dar bir alanda cilt, cilt altı, adale dokusunun ezildiği, nekroze olduğu ve büyük doku kayıpları geliştiği izlenir. Cerrahi girişim esnasında yapılan, planlı ve doku tabakalarına saygılı kesilere “insizyon” denir. Doku kaybı yoktur ve yara kolayca tabakalar halinde karşılaştırılarak dikilip eski haline getirilebilir [36].

Yaralar, akut ve kronik olmak üzere 2'ye ayrılabilir. Akut yaralar, anatomik ve fonksiyonel bütünlüğü sağlamak üzere, onarım sürecinin düzenli ve zamanında geliştiği yaralardır. Aksine onarımın düzenli ve zamanında olmadığı, dolayısıyla arzulanamayan anatomik ve fonksiyonel sonuçlara ulaşılamayan yaralar da kronik

yaralardır [37]. Akut yaralar çok kısa sürede iyileşirken, kronik yaralar 3 aydan daha uzun sürede bile iyileşmeyen yaralardır. Kronik yaraların %70'i; bası (dekübit) yaralar, venöz ülserler, diyabetik yaralardır [38]. Kronik yaralardan alınan biyopsilerde ve yara salgı örneklerinde doku protez ve kollajenaz miktarının arttığı gözlenmiştir. Büyüme faktörlerinin azalması ise iyileşme sürecinde proliferasyon ve kemotaksisi geciktirmektedir. Kronik yaraların etiolojisinde sıklıkla ileri yaş, iskemi, bakteri kontaminasyonu, ödem, malnütrisyon, bağışıklık sisteminde baskılanma vardır [39].

2.1.2. Yara cinsleri

Yaraların oluş mekanizmalarına göre sınıflandırılması [40];

A) Mekanik etki ile oluşanlar:

1. Künt travmatik yaralar
2. Kesici alet yaraları
3. Kesici-Delici (kesici-batıcı) alet yaraları
4. Delici (batıcı) alet yaraları
5. Kesici-Ezici alet yaraları
6. Ateşli silah yaralar

B) Fiziksel etki ile oluşanlar:

1. Termal yaralar
2. Donma kaynaklı yaralar
3. Elektrik çarpması yaraları
4. Işınların oluşturduğu yaralar

C) Kimyasal madde yaraları:

1. Asit ve baz yaraları
2. Diğer kimyasal madde kaynaklı yaralar

D) Biyolojik kökenli yaralar:

1. Yılan, akrep, böcek vb. sokmalarına bağlı yaralar
2. Hayvan ısırıklarına bağlı yaralar

2.1.3. Yara iyileşmesi tipleri

Üç tip yara iyileşmesi vardır;

Primer İyileşme:

Belirgin bakteriyel kontaminasyon ve doku kaybının olmadığı durumlarda yara kenarlarının direkt yaklaştırılarak kapanması sonucu meydana gelen iyileşmedir. Yara kapaması suturasyon, stapler, strip tape gibi materyaller ile yapılır. Bu iyileşme tipinin geç primer kapanan formda vardır. Burada hasara uğramış doku; yabancı cisim, bakteriyel kontaminasyona bağlı enfeksiyondan korunmak için bir süre kapatılır. Yara, bu dönemde steril şartlarda günde 2 kez nemli izotonik pansumanla kapatılmalıdır. Peroksit ve iyot bileşikleri kullanılmaktan kaçınılmalıdır. Çünkü canlı dokuda en az bakteri kadar hasar yaparlar. Açık bırakılan yarada anjiyogenez ile doku kanlanması ve oksijenizasyonu artar. Olay yerine gelen lökositler, bakterileri kendilerine çekerler ve tahrip ederek uzaklaştırırlar. Daha sonra yara dudakları yaklaştırılarak kapatılır.

Sekonder İyileşme:

Yara alanında granülasyon dokusunun gelişmesi, yara alanını doldurması beklenerek, spontan rejenerasyon ve reepitelizasyonun gelişmesi ile meydana gelen iyileşmedir. Cerrahın katkısı yara bakımı ile sınırlıdır.

Sekonder iyileşme ile primer iyileşme arasındaki farklar:

Sekonder iyileşmede çok fazla debris, eksuda ve fibrin doku vardır. Sonuçta iltihabi

reaksiyon daha yoğundur. Bunların ortadan kaldırılması daha uzun sürer, dolayısıyla inflamatuvar evre süresi uzamıştır. Sekonder iyileşmede daha fazla granülasyon dokusu meydana gelir. Sekonder iyileşmede daha fazla kontraksiyon olur ve belki de bu primeri sekonder iyileşmeden açıkça farkettilen en iyi niteliktir. Bu duruma özellikle eklem üzerindeki defektlerde dikkat edilmelidir.

Tersiyer iyileşme (Gecikmiş primer iyileşme):

Sekonder iyileşmeye bırakılan yaranın şartlar uygun hale geldiğinde suture edilerek kapatılmasıdır. Bu tip iyileşme sonunda primer kapanmada ulaşılan gerilme kuvvetine eşit değerler elde edilir [39].

2.1.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Lokal faktörler

1. İskemi
2. Gerilim
3. Ölü boşluklar
4. Yabancı cisimler ve kontaminasyon
5. Çevre ısısı
6. Hematom
7. Lokal travma
8. Doku tipi
9. Kronik doku faktörleri
10. Radyasyon

11. Sigara

12. Mekanik stres

Genel (Sistemik) faktörler

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

1. Büyüme faktörleri

2. Anemi/ Kan kaybı

3. Beslenme

4. Yaş

5. Anestezi şekli

6. Obezite

7. Sarılık

8. Malign hastalıklar

9. Genetik ve immünolojik sorunlar

10. Eser element eksiklikleri

11. Sitotoksik ilaçlar

12. Diyabet; yara iyileşmesinin erken inflamasyon aşamasında bozukluk olmaktadır. İnsülin eksikliğine bağlı inflamatuvar cevapta meydana gelen bozukluklar sonucu gerilim kuvvetinde ve kollajen birikimindeki azalma insülin tedavisi veya A vitamini ile düzenlenebilir [37, 41-43].

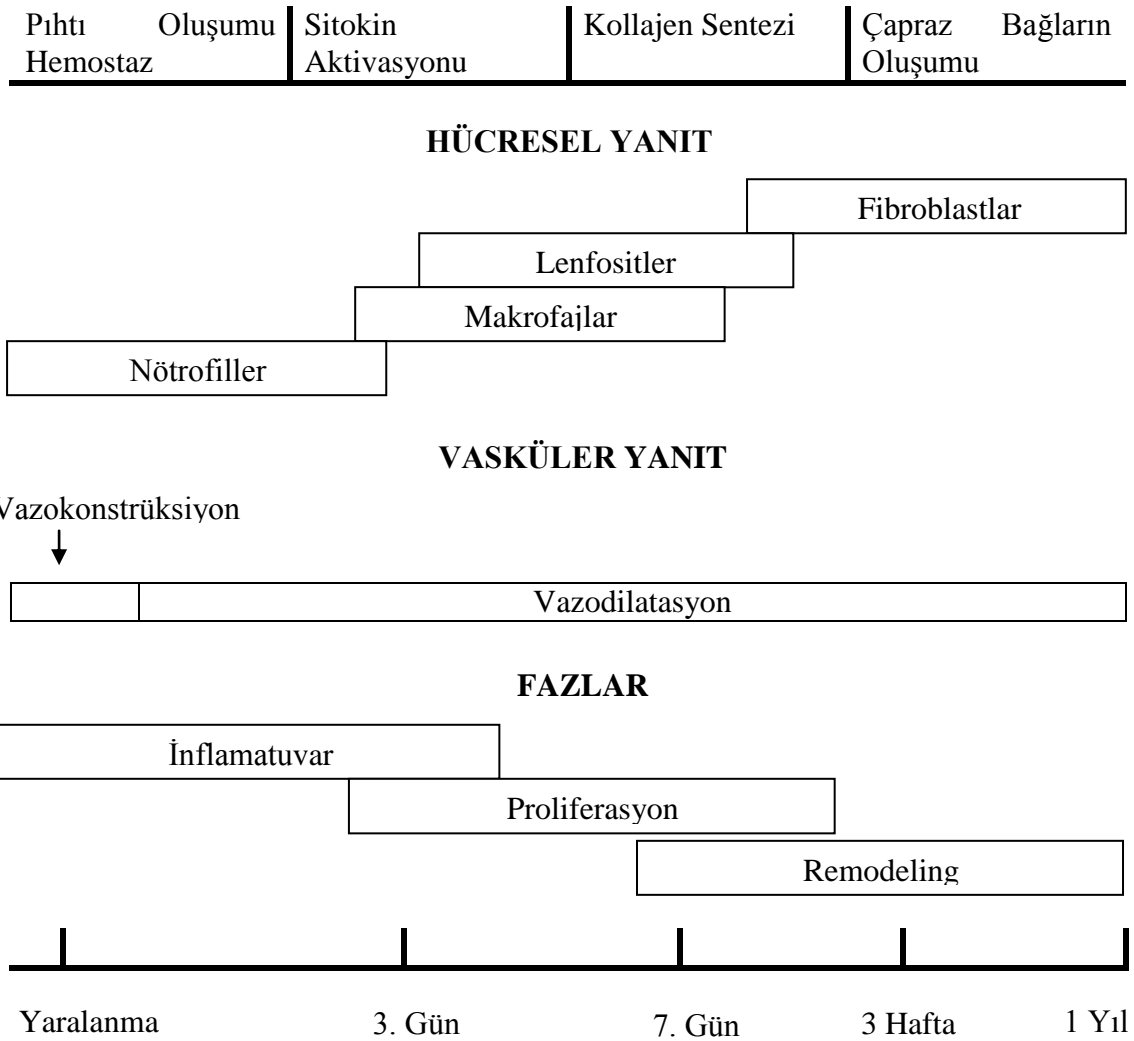
2.1.5. Yara iyileşme fazları

Yara iyileşmesi, travma ile başlatılan sıralı hücresel ve biyokimyasal olayların yeni doku teşekkülü ile sonuçlanmasıdır [37].

Yara iyileşmesi klasik olarak birbiri içine geçmiş 3 fazda incelenebilir [44]:

1. Hemostaz-koagülasyon ve inflamasyon
2. Proliferasyon
3. Maturasyon ve remodeling

Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinin fazları [44].



Koagülasyon

Yaralanma damar ve lenfatiklerden kanamaya yol açar. Ortaya çıkan katekolaminlerin etkisiyle vazokonstriksiyon oluşur. Kanama alanındaki trombositler hemostatik tıkaç oluşturur ve pıhtılaşma sistemini aktive eder, diğer inflamatuvar hücrelerin aktive olmasını ve onarımında rol almasını sağlar. Mast hücrelerinde açığa çıkan serotonin, histamin gibi vazoaktif hücreler hücre göçünü başlatır, intravasküler hücreler yara alanına geçerler [44].

1- İnflamasyon fazı: Travma veya yabancı cisimlerle doku harabiyetine karşı bağışıklık yanıtı ile meydana gelen bir cevaptır. İnflamasyon, harap olmuş dokunun yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün tamir ve yeniden kurulması için esastır [45]. Bu dönem lökositlerin yara içine migrasyonu ile karakterizedir. 24 saat içinde polimorfonükleer lökositler yara da hakim olurlar. Bunlar yara bölgesindeki doku artıklarını sindirirler. Daha sonra makrofaj hakimiyeti başlar. Makrofajların yara bölgesinde bulunması iyileşme olayı için esastır. Makrofajlardaki artış başlangıçta ortamdaki hücre artıklarının fagositozuna yöneliktir. Sonrasında makrofajlar, fibroblastik proliferasyonu uyaran bazı mitojen maddelerde salgılamaktadırlar [37]. İnflamatuvar faz iyileşmenin esas fazıdır. Vasküler permeabilitenin artışı dolaşımdaki hücrelerin kemotaksisi, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin lokal salınımı, migratuvar hücrelerin aktivasyonu ile karakterizedir. Hemostaz inflamasyondan bir adım önce oluşur. Damar yaralanması subendotelyal kollajen ile trombositlerin temasına ve intrinsek koagülasyon kaskadını başlatacak olan trombosit agregasyonuna sebep olur. Kollajen ve trombositlerin teması trombin, fibronektin ve fragmanlarının varlığında sitokinler ve trombositlerin alfa granüllerinden Trombosit kaynaklı büyüme faktörü. (PDGF) Transform edici büyüme faktörü beta (TGF- β), trombosit aktive edici faktör (PAF), fibronektin ve serotonin gibi büyüme faktörlerinin salınmasına sebep olur. Fibrin stabilizan faktör (F-XIII) eksikliğinde görüldüğü gibi yetersiz pıhtı yapımın yara iyileşmesinin bozulduğu gözlenmiştir. Hemostaz basamağının dolaşımdaki hücreler için kemotaktik bir olay olduğu bilinmektedir ve pıhtılaşma bozukluğunda oluşan bozulmuş yara iyileşmesinin bu

kemotaksisin ve hücre adezyonlarının olumsuz etkilenmesiyle olduğu düşünülmektedir [44].

Çizelge 2.2. Yara iyileşmesi ile ilgili hemostatik ve trombosit kökenli faktörler [44].

HEMOSTATİK FAKTÖRLERİN ETKİLERİ

Fibrin, plazma fibronektini	Koagülasyon, kemoatraksiyon, adezyon, hücre migrasyonu
F XIII (fibrin stabilizan factor)	Kemoatraksiyon ve adezyon
Dolaşımdaki büyüme faktörleri	Kemoatraksiyonun regülasyonu, mitogenez, fibroplazi
Komplemanlar	Antimikrobiyal etki, kemoatraksiyon

TROMBOSİT KÖKENLİ FAKTÖRLER

Sitokinler, büyüme faktörleri	Kemoatraksiyonun regülasyonu, mitogenez, fibroplazi
Fibronektin	Trombosit agregasyonu için erken matriks bağlanması
Trombosit-aktive edici faktör (PAF)	Trombosit agregasyonu
Tromboksan A2	Vazokontraksiyon, trombosit agregasyonu, kemotaksis
Trombosit FIV	Fibroblastlar ve monositler için kemotaksis, heparinin nötralizasyonu, kollejenaz inhibisyonu
Serotonin	Vasküler permabilitenin artışı, nötrofillerin kemotaksisi
Adenozin dinükleotit	Hücre poliferasyonun stimülasyonu, migrasyon, trombosit agregasyonunun arttırılması

Kemotaksis

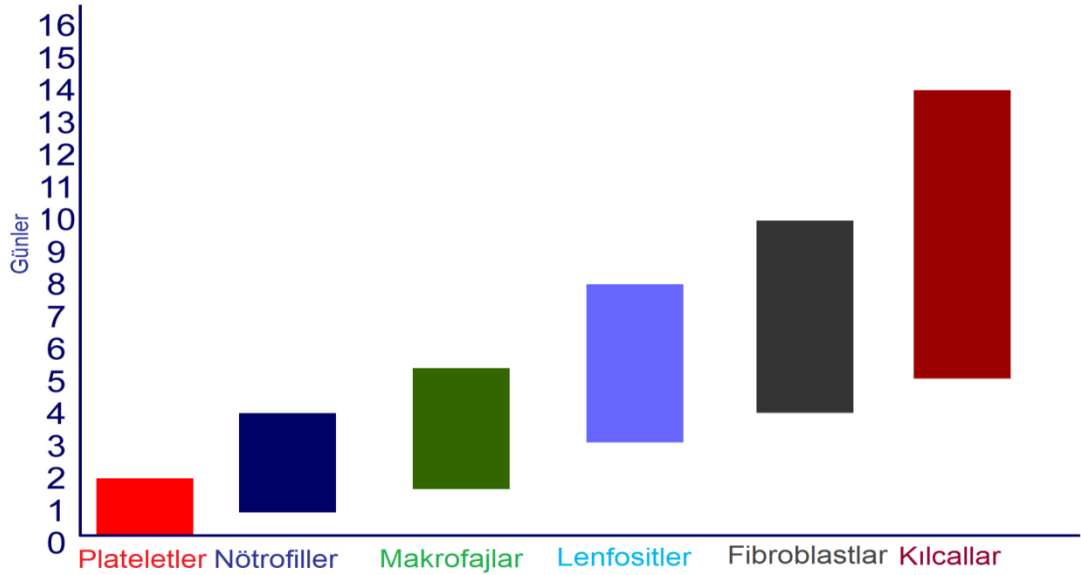
Nötrofiller yaraya göçeden ilk hücrelerdir. İnflamasyon sonucu oluşan vasküler permeabilite artışı prostoglandinler ve diğer kemotaktik bileşiklerin serbestleşmesine sebep olur. Bu komplemanlar, interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz edici faktör alfa (TNF- α), TGF- β , trombosit faktör-4 ve bakteriyel ürünlerdir. Bunların serbestleşmesiyle nötrofil migrasyonunun stimülasyonu oluşur. Selektinler (endotelyal hücre yüzeyindeki reseptörler) nötrofillerin endotelyuma yapışmasına yardım ederler. Nötrofillerin yüzeyindeki integrin reseptörleri ekstraselüler matrikse yapışmalarını kolaylaştırır. Bu iki reseptörün fonksiyonları hücrelerin migrasyonunda anahtar rol oynar. Hücrelerin kemotaktik sinyallere yanıtı hücre yüzey reseptörleriyle de düzenlenir. Böylece stimulus ve cevap arasında spesifik bir ilişki oluşur. Örneğin; PDGF, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için güçlü bir kemotaktik moleküldür. Buna karşın endotelyal hücreler, epitelyal hücreler ve lökositler PDGF'ye yanıtızsızdır [44].

Hücre aktivasyonu

Yara bölgesine hücrelerin kemotaksisi fonksiyonel aktivasyonu izler. Hücresel aktivasyon lokal mediyatörlerle indüklenen fenotipik değişikliklerdir. Aktivasyon hücre yüzey antijenlerinin fonksiyonları ile arttırılabilir. Sitokinlerin üretilip salınması, sitotoksitenin arttırılması da hücre aktivasyonunu arttırır [44].

Bütün hücreler iyi bir yara iyileşmesi için aktivasyon sürecine başarıyla katılmalıdırlar. Nötrofiller, makrofajlar ve lenfositler inflamasyonda görev alan dominant hücrelerdir (Şekil 2.1.) [44].

Özellikle, makrofaj ve lenfositler kritik öneme sahiptir. Eğer bakteriyel kontaminasyon yok ise nötrofiller esansiyel bir rol oynamaz. Çünkü nötrofillerin esas görevi fagositoz ve antimikrobiyal defanstır. Makrofajların aktivasyonu yara iyileşmesinde temel mekanizmalardan biridir (Çizelge 2.3) [44].

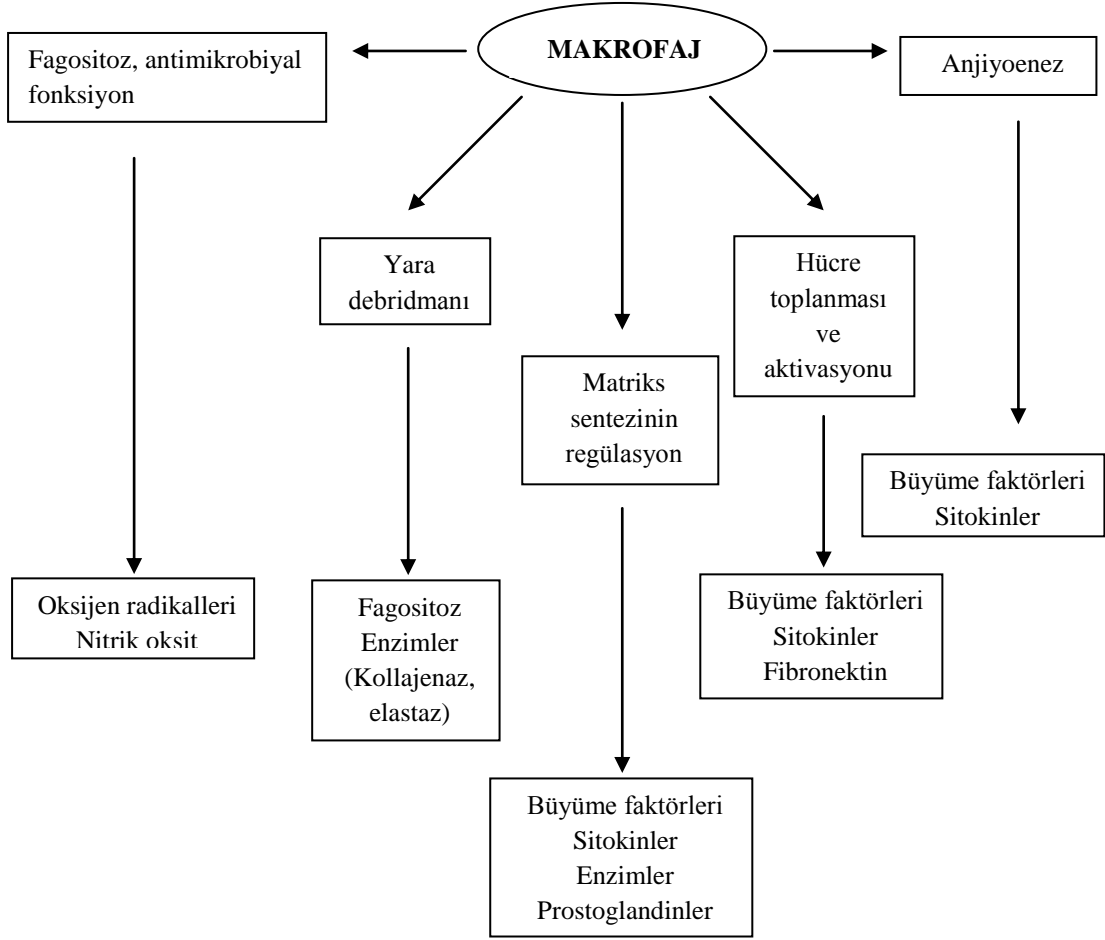


Şekil 2.1. Hücrelerin yara iyileşmesinin fazları sırasında yara alanındaki dağılımları [46].

Makrofaj aktivasyonunun ilk ve en güçlü stimulusu trombositlerden salınan faktörlerce oluşturulur. Fetal iyileşmede minimal inflamasyon ve daha az skar gelişimi söz konusudur. Bunun sebebi olarak fetal trombositlerden erişkinlere kıyasla daha az sitokin serbestleşmesi bunun sonucunda daha az makrofaj aktivasyonu ve daha az inflamasyon oluşumu gösterilmektedir [44].

Yarada makrofajların aktivasyonu nitrik oksit sentezi ile de sonuçlanmaktadır. Nitrik oksitin yara iyileşmesinde başta antimikrobiyal etki olmak üzere bir çok fonksiyonu olduğu gösterilmiştir. İn vivo ve in vitro birçok çalışmada nitrik oksitin üretiminin engellenmesiyle yara iyileşme sürecinin aksadığı gözlenmiştir. Aktive makrofajlar, lenfositler gibi diğer hücrelerin de aktivasyonuna öncülük teşkil ederek lenfositlerde interferon (IFN) ve interlökin (IL)'ler gibi bir takım lenfokinlerin salınımından sorumludurlar. İlginç olarak lenfositlerden salınan IFN gama da TNF- α ve IL gibi sitokinlerin salınımını arttırmak suretiyle makrofaj ve monosit aktivasyonunu tetiklerler [44].

Çizelge 2.3. Makrofajların yara iyileşmesindeki rolü [44].



Yara iyileşme sürecinde hücrelerin aktivasyonu hücre popülasyonlarında bir takım fenotipik değişikliklere sebep olur. Fibroblastlar ve epidermal hücreler bu fenotipik değişikliklere iyi birer örnektirler. Yara kaynaklı fibroblastların fonksiyonu artmış kollajen sentezi ve kontraksiyon gücü ile karakterizedir. Proliferasyonları ise diğer normal dermal fibroblastlara göre azalmıştır. Bu sebepten yara fibroblastları olarak nitelendirilirler. Fibroblastlardaki bu değişikliği de makrofaj kökenli sitokinler tetikler. Azalmış inflamatuvar yanıtla iyileşme arasındaki ilişki klinik ve deneysel olarak diyabet ve steroid kullanımı modellerinde oldukça iyi gösterilmiştir. Diyabette inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunun azalması kemotaksisin bozulmasıyla sonuçlanmakta. Bu da bakteri öldürülmesindeki azalma ile enfeksiyona daha fazla eğilim oluşturmaktadır. Steroid kullanımıyla azalan inflamasyon, hücre migrasyonu,

proliferasyon ve anjiyogenezin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu da yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir [44].

2- Proliferasyon-fibroplazi fazı: Fibroblastlar ve endotelial hücreler bu faz sırasında proliferasyon yapan temel hücrelerdir. Fibroblastlar yara çevre dokulardan göç ederler. Endotelial hücreler ise intakt venüllerden proliferasyon olarak yaradaki yeni kapiller oluşumu ve anjiyogenez başlatırlar. Bu iki hücre tipinin proliferasyondan da yine trombosit ve aktive makrofajlardan salınan büyüme faktörleri ve sitokinler sorumludur. Çevre dokulardaki fibroblastların fonksiyonel hale geçebilmesi için aktivasyonuna gereksinimleri vardır. Büyüme faktörlerinden bazıları örneğin; PDGF ve EGF fibroblastların kemotaksisini tetiklerler [44].

Epitelial hücreler proliferasyona yaralanmadan birkaç gün sonra yara dudaklarında ya da yaradaki zarar görmemiş epitel adalarında başlarlar. Klinik olarak defektif epidermal yaradaki sağlıklı epitelial adalara mesh greft uygulamak reepitelizasyonu ve yara kapanmasını hızlandırmıştır. Proliferasyon fazının başlaması ve sürmesinden çok sonlanmasında ki mekanizmalar ilgi çekmektedir; in vitro koşullarda sürekliliği olan hücre aktivasyonu ve fenotipik değişiklikler tam anlaşılmayan olası feedback mekanizmasıyla in vivo koşullarda sonlandırılmaktadır. Yara iyileşme sürecindeki fonksiyonunu tamamlamış hücrelerin sonu net değildir. Nötrofiller apoptoza uğrarlar, yara metabolizması sırasında oluşan arginaz makrofajların yıkımına neden olur [44].

Anjiyogenez

Yeni damar oluşumu onarım dokusunun gelişmesinde önemlidir ve inflamatuvar dönemde başlar [44]. Mevcut venüllerin anjiyogenetik uyarıya maruz kalması ile, bu damarlardaki endotelial hücreler vasküler bazal membranı parçalayıcı enzimler sekrete eder. Bu olaydan 24 saat sonra endotel hücreleri anjiyogenik uyarı doğrultusunda göç ederler. Bunlar bölünüp farklılaşarak tübüler bir lümen oluşturur ve böylece vasküler ağın dalları meydana gelir. Yeni meydana gelen bu damarların bir bölümü sonradan geriler ve kaybolur. Doku travmasında en erken olaylardan biri vasküler yaralanmanın bulunduğu yerde aktif plaketlerden TGF- β ve PDGF açığa

çıkmasıdır. PDGF, anjiyogenik bir madde olup vasküler düz kas gelişimini uyarır. Ortamda hücrenin davranışı ekstraselüler matriksin kompozisyonundan etkilenmektedir. Bundaki değişiklikler selüler organizasyonda da önemli değişikliklere sebep olur. Yara iyileşmesi esnasında matriks kompozisyonunda dramatik değişiklikler olduğundan, bu kavram; anjiyogenez olayına yeni bir görüş getirmiştir. Başlangıçta matriksi oluşturan fibrin, normal tek tabaka endotel dizilişinde bir organizasyon bozukluğuna sebep olur. Matriks yapısında bu aşamada bulunan hiyalüronik asit 5-10 gün arasında yerini kondroitin sülfata ve dermatan sülfata bırakır. Erken yara ekstraselüler matriksinin, major komponenti olan fibronektin yüksek molekül ağırlıklı bir glikoproteindir. Fibronektin, hücreler, kollajen ve heparin için bağlanma yerleri ihtiva ederler. Heparinin anjiyogeneze etkisi [45];

- ♣ Endotelyal hücre hareketini uyarır
- ♣ Anjiyogenik faktörün aktivitesini artırır
- ♣ Potent anjiyogenik faktöre bağlanır
- ♣ Heparin bağlayan büyüme faktörü, heparin ve heparan sülfat parçalayan enzimlerle serbestleştirilir
- ♣ Heparin bağlayan büyüme faktörünün asidik formunun aktivitesini artırır
- ♣ Heparin bağlayan büyüme faktörünün insan epitelyal hücrelerindeki reseptörlerini aktive eder
- ♣ Heparin antogonistleri anjiyogenezisi bloke eder

Travmatize olan endotel hücreleri ve makrofajlar tarafından sentezlenir. Matriks ana maddelerinden kollajenin birikimi çapraz yara gerim kuvvetinin sağlanmasında önemi iyi bilinmekle birlikte, hücre hareketi ve hücre farklılaşmasındaki önemi pek dikkat çekmemiştir. Aslında, kollajen sentez ve yıkımı, endotelyal bazal membran kompozisyonunu ve selüler matriks bağlantılarını değiştirerek anjiyogenezi kontrol eder. Diğer bir deyimle, anjiyogenez vasküler ekstraselüler matriks birikimini ve modulasyonu ile kontrol edilir [45].

Yara bölgesi, normal koşullarda hipoksik olup düşük oksijen basıncı, anjiyogenez için bir uyarıdır. Neovaskülarizasyon ilerledikçe yara bölgesi hipoksisi ortadan kalkar, bu da anjiyogenik uyarıyı azaltır ve ortadan kaldırır [45].

Anjiyogenez yaraya komşu dermada mevcut damarların tomurcuklanmasıyla olur. Anjiyogenezi uyaran büyüme faktörleri, FGF-1,2, VEGF, EGF, TGF- α , β 1, β 2 ve β 3, PDGF'dir. Bu büyüme faktörleri proteaz ve proteaz aktivatörlerini sağlayarak endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve vasküler geçirgenliğini arttırlar. Çoğu anjiyogenik büyüme faktörleri heparin tarafından güçlendirilir. İyileşme için yeterli neovaskülarizasyon esastır. Yetersiz anjiyogenez ise kötü yara iyileşmesi ile sonuçlanır. Matriks oluşu sonucunda iyileşen yara içinde kan damarlarının sayısı apoptoz nedeniyle azalır [44].

Fibroblast proliferasyonu

Travmayı takiben aktif trombosit ve makrofajların salgıladıkları medyatörlerin etkisi ile çevre dokudan fibroblastların yara bölgesine gelmesi ve proliferasyonu sağlanır. Aktif fibroblastlar beta-interferon sekrete eder. Bu medyatör, bir otokrin inhibitördür. Fibroblastlar her 18-20 saatte bir bölünür. Plazma, fibroblastlar için mitojen ve gelişme faktörleri ihtiva eder. Plazma fibroblast mitojen ve gelişme faktörleri;

Mitojen faktörler,

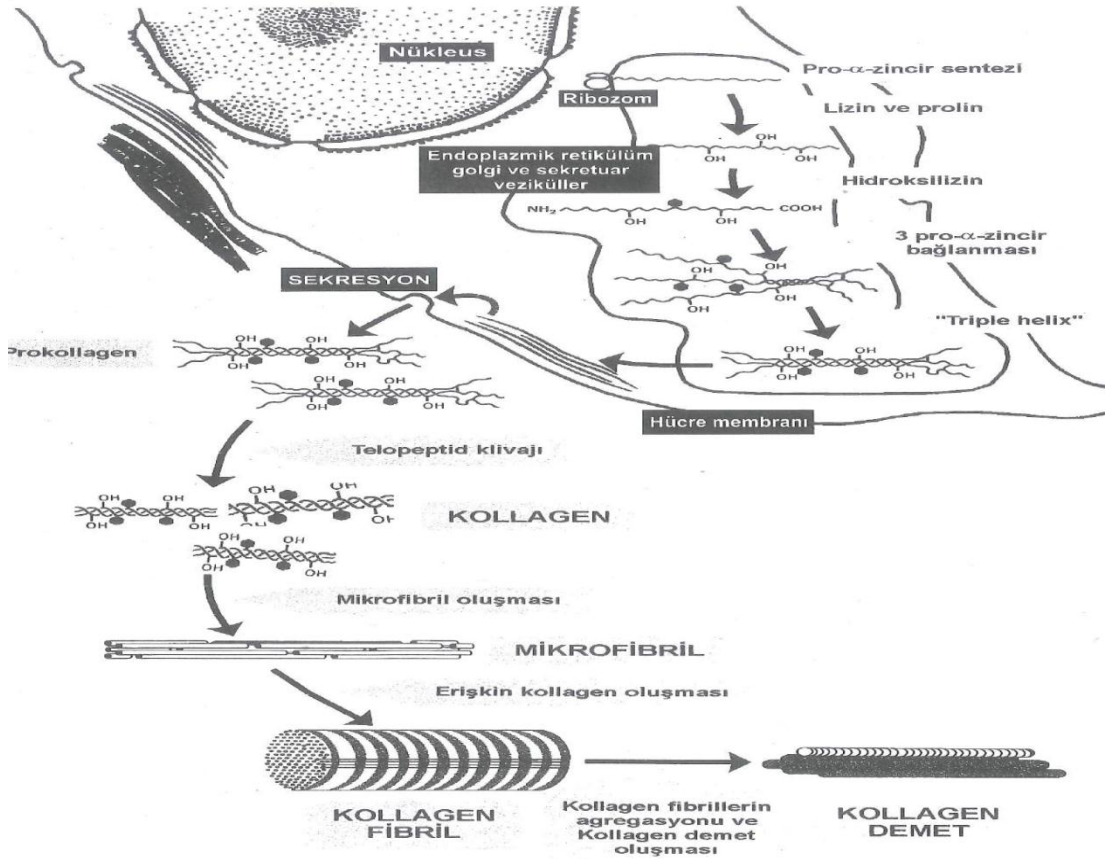
- ♣ Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)
- ♣ Fibroblast büyüme faktörü (FGF)
- ♣ Kalsiyum fosfat

Gelişme faktörleri,

- ♣ Somatomedin (C/IGF-1)
- ♣ Epidermal gelişme faktörü (EGF)
- ♣ Diğer plazma faktörleri [45].

Kollajen yapı ve fonksiyonu

Bilinen 19 farklı kollajen vardır. Kollajen molekülü basit yapısal ünitesi sağa dönen üçlü heliksli polipeptit zincirlerden oluşmuştur [44]. Kollajen biyosentezi farklı kromozomlardaki genlerin koordine transkripsiyonuna ve ekstraselüler olarak posttranslasyonel modifikasyonlara gereksinim gösterir (Şekil 2.2.). Bu modifikasyonlar, prolin ve lizin hidroksilasyonu, hidroksilizin glikozilasyonu, proalfa kollajen zincirlerinin triple heliks içine girmesi ve fibril şeklinde agregasyonudur [45]. Kollajen molekülünün her bir zincirinde aminoasitler birbirini izleyen glisin XY parçasının tekrarıyla oluşmuştur. X yerine sıklıkla prolin ve Y yerine hidroksiprolin geçer. Sekresyonundan önceki basamakta prokollajen hale gelir. Bu hale gelene kadar çeşitli basamaklardan geçer.



Şekil 2.2. Kollajen biyosentezi [45].

Bu basamakların hepsine posttranssisyonel modifikasyon denir. Ehler-Danlos sendromları grubu posttranssisyonel modifikasyondaki defektleriyle yara iyileşmesi sürecindeki olumsuz gelişmelere iyi bir örnektir. Diğer yandan spesifik posttranssisyonel enzim veya lizil oksidaz enzim inhibisyonu da hiper trofik skar ve kelloidler gibi fibrotik hastalıkların tedavisinde bir seçenek oluşturmaktadır. İyileşme sırasında kollajen maturasyonu erken olmaktadır ve inflamasyon sırasında oldukça aktiftir. Yaradaki kollajenazın kaynağı fibroblastlar ve keratonositlerle beraber inflamatuvar ve endotelyal hücrelerdir. Kollajenler genellikle ekstraselüler olarak spesifik kollajenazlar tarafından sindirilirler [44].

Genetik olarak farklı kollajenleri, farklı enzimler parçalayabilir. Kollajenin başlangıç transkripsiyonundan, sonuçta fibril teşekkülüne kadar bütün biyosentez basamakları kollajen sentezini kontrol eder [44]. Kollajenaz aktivitesi sitokinler tarafından oldukça sıkı kontrol altında tutulur [45]. Özellikle askorbik asit hem prolin ve lizil hidroksilazlar için mecburi kofaktördür, hem de kollajen biyosentezini uyarır ve prokollajen mRNA'ların düzeyini artırır. Aynı şekilde TGF- β , IGF ve IL-1 kollajen sentezini artırır. TNF- α , interferon- γ ve steroidler kollajen gen transkripsiyonunu inhibe eder. Kollajenin sentez ve birikimi yanında skarın yapısal ve fonksiyonel olarak uygun şekli almasında rol oynayan önemli bir faktör de spesifik kollajenazlardır. Cerrahi insizyondan sonra kollajen sentez ve birikimine rağmen skar kollajen miktarının sabit olması, aynı anda süratli bir kollajen yıkımının bulunduğunu göstermektedir. İnsan doku kollajenazları dermisin üst tabakalarında bulunur. Açık yaralarda ise yer değiştiren epitelyum hücrelerinde ve granülasyon dokusu içinde yer alır. En az kovalent bağlanmalarda mekanik gerilim kuvvetlerinin etkisi göz önüne alındığında; gerim kuvveti doğrultusunda bulunan kollajenin kollajenaz aktivitesine daha dayanıklı olduğu söylenebilir [45].

Matriks metabolizması

Fibroblast içinde kollajen, kollajenöz ve nonkollajenaz retikülin, elastin gibi intrastoplazmik filamentler halinde sentezlenerek interselüler bölgeye sekrete edilen diğer maddeleri hiyalunorik asit, kondroitin, heparan dermatan ve keratan sulfatan

meydana gelen mukopolisakkaritler, protein polisakkaritler ve glikoproteinlerdir [45]. Yara matriks kompozisyonunda değişiklik hemostazdaki makrofaj kökenli fibrin ve fibronektinin organize olması yara bölgesindeki hücrelerin aktivasyonunu destekleyen trombospondin-1 isimli proteindir ki, yara çevresindeki hücreler iyileşmeyi daima destekler. Glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve sisteinden zengin sekrete edilmiş asidik proteinler (SPARC), matriks depolanması ve remodelingi sağlamak amacıyla sentezlenirler (Çizelge 2.4.). Bunu takiben kollajen predominant skar proteini haline gelir [44].

Sağlam dermis %80-90 kollajen-1, %10-20 kollajen-3'ten oluşur. Granülasyon dokusunda tip 3 kollajen %30 civarındadır. Matur skarda ise tip 3 kollajen oranı %10'un altındadır. Kollajen tip-6'nın varlığı da gösterilmiştir. Kollajen tip-3'ün erken görünümü fibronektin görünümüyle birlikte olmaktadır, denatüre kollajen fibronektin ile sarılmaktadır. Buna rağmen kollajen tip-3'ün erken depolanmasının rolü yaranın gücüne anlamlı katkı sağlamamaktadır. Kesintisiz kollajen sentezi yaralanmada 4-5 hafta sonra artmaktadır, çünkü fibroblastlar temel kollajen sentezleyen hücrelerdir [44].

İyileşme esnasında kollajen sentezinin önemli derecede artması yalnızca hücre sayısının artmasıyla ortaya çıkmamakta aynı zamanda her hücre tarafından kollajen sentezinin artırılmasıyla oluşturulmaktadır. Matriksin yapısı zamanla değişir. Normal dermiste kollajen liflerinin yerleşimi file benzeri iken, skar dokusunda bu yerleşim cilde paralel olmaktadır. Bu ince kollajen lifleri yaralanmadan sonra anlamlı olarak yaralanma hattı boyunca kalınlaşırlar. Bu değişiklik skar gerlim kuvvetinin artmasına neden olur biyokimyalsal olarak granülasyon dokusundan sağlanan kollajen yaralanmış deriden sağlanan kollajenden farklılıklar göstermektedir. Remodeling fazı boyunca ne kadar mature olsalar da iyileşmiş skar dokusunda ki kollajen lifleri hiçbir zaman sağlam dermisteki gibi organize olamazlar. Yaranın gücü (yara ayrılma kuvveti) bir hafta sonra sağlam derinin %3'üne, üç hafta sonra %20'sine, üç ay sonra da %80'ine çıkmaktadır [44].

Çizelge 2.4. Ekstraselüler matriks maddeleri ve özellikleri [44].

Madde	Moleküler yapı	Görevi
kollajen	Prolin, hidroksiprolin ve glisinden zengin üçlü heliks şeklinde glikolprotein	Dokulara ve organlara destek gerilme direncini sağlamak
Elastin	Glikosil mikrofibrilleri gerilebilir hidrofobik protein	Dokuların esneme ve kasılmasını sağlamak
fibronektin	Yapışkan glikoprotein	Hücre matriksinde yapışmayı sağlamak
Laminin	Yapışkan glikoprotein	Hücreleri kollajen tip IV ve heparin sülfat ile bağlamak
preteoglikan	Heterojen uzun glukoz aminoglikan	Sitokin parçalanması, kullanılan artıkların depolanması, güç emici
Hyaluronik asit	Sülfatlanmış glukoz aminoglikan	Hücre hareketini, gelişimini sağlamak

Epitelizasyon

Epidermis, derinin sıvıları geçirgen olmayan, travmaya ve radyasyona dirençli bölümünü oluşturur. Bazal membran zonu, epidermis için yapısal bir destek olup epiderminin dermise hemidesmozomlar aracılığı ile yapışmasını sağlar. Hemidesmozomlardan bazal membrandaki lamina densaya ve lamina lusidaya moleküler bağlantılar mevcuttur. Lamina densadaki tip-4 kollajen, nonkollajenaz

proteinler proteoglikanlar ile birlikte bir destek yapı oluşturur. Başlangıçta, yaranın kapanmasında birbiri ile ilişkili iki basamak vardır; ilk dakikalarda meydana gelen koagülasyon olayı geçici bir engel oluşturur. Saatler ve günler içinde pıhtının altında, dermisin üstünde rezidüel epitelin hareketi sonucu reepitelizasyon gelişir. Erken yara kapanmasında en önemli olay, hücre hareketidir. Yirmidört-yetmişiki saatte yara tabanı ince bir tabaka epitelium ile örtülür, dördüncü günde keratin asitlerle kaplanır. Bütün yara tiplerinde, yaralanmaya cevap olarak bazal membran zonu üzerindeki bazal hücrelerde hareket başlar. Bu marjinal hücreler, destek tabaka ve kendi aralarındaki hemidesmozomal ilişkilerini koparırlar. Bu epidermal hücrelerin fibronektin ile uyarılan aktif bir fagositoz fonksiyonları vardır. Epitelizasyon tamamlanınca interselüler ve bazal membran ilişkileri yeniden meydana gelir. Travmaya cevap veren bölgesel epitelium hücreleri, farklılaşmasını tamamlamamış, interselüler adezyonları az, metabolik aktiviteleri yüksek ve hareketli hücrelerdir. Bu hücrelerin aktin düzeyi yüksektir [45].

Hareket, bir veya iki hücre kalınlığındaki tabakanın epitelial boşluk örtülünceye ve yara çevresindeki komşu hücrelerle temas sağlanıncaya kadar tüm hareketidir. Bazal membran zonu intakt ise yara kapanması hızlıdır. Fakat bazal membran tahrip olmuşsa; hareketli reperatif epitelin kendi bazal membranını yeniden sentezlemesi gerektiğinden yara kapanması çok yavaş olur. Hareketli hücreler, göç ederlerken membranlarını fibronektin, tip-4 kollajen ve laminin gibi membran komponentleri salgılayarak meydana getirirler (intakt bazal membranda fibronektin yoktur). Bu hücrelerde fibronektin reseptörleri bulunduğu gösterilmiştir. Kendilerini reperatif konnektif dokudan hareket esnasında ayıran, kollajenaz pilazminojen aktivatörleri sekrete ederler. Hareketli hücre sekrete ettiği fibronektini geçici bazal membran olarak kullanır [45].

Yara bölgesindeki epidermal hücre, kan ve kan ürünleriyle bazal membran komponentleri ve dermisin etkisi altındadır. Kanda fibronektin ve vitronektin olmak üzere iki substrat aktif glikoprotein vardır. Her ikisi de epidermal hücre hareketinde destek olarak rol oynar. Her iki molekülünde moleküler yapısı ve özgün hücre reseptörleri, bu moleküllerin hücre adezyonunda önemli rol oynar. Fibronektin, bir

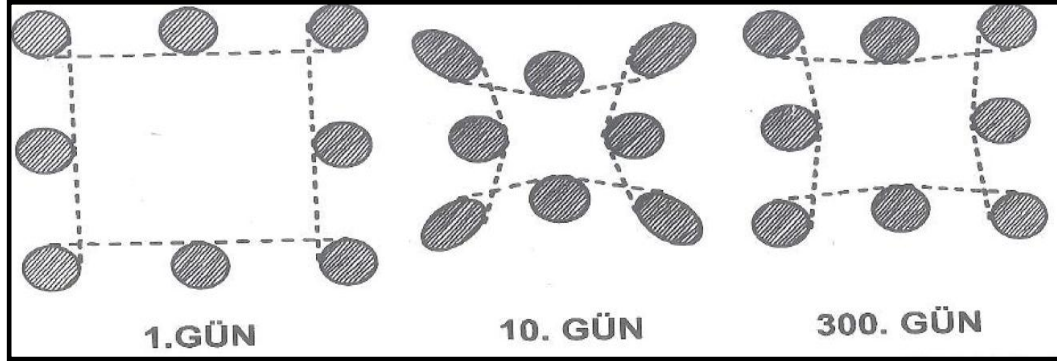
bazal membran komponenti olan laminine nazaran hücre hareketinde daha etkindir. Yara bölgesinde, epidermal yara iyileşmesinde etkili 9 ayrı sitokin belirlenmiştir. Bunlardan IL-1 ve TGF epitelyum hücreleri tarafından sekrete edilmektedir. Epitelizasyon için spesifik uyarının ne olduğu bilinmemektedir, ancak epitelin serbest kenarının yani kontakt inhibisyonunun olmadığı yüzeyinin bulunması hareketi başlatmaktadır. Hareket kuvveti, hücredeki aktomiyosin sisteminin kontraksiyonu ile yönlendirilmektedir. Aktin ve miyozin sitoplazmik çıkıntının bulunduğu tarafa akar ve bazal membrana yapışan bu protrüzyon yönünde hücre, stoplazmik kontraksiyonla yer değiştirir [45].

Cerrahi biyoloji açısından yara iyileşmesinde meydana gelen bütün morfolojik ve kimyasal olayların en önemli sonucu, yara gerim kuvvetinin normal doku düzeyine gelmesidir. İlk birkaç gün içinde epitelyum hücreleri, fibroblastlar ve endotel hücreleri arasındaki kohezyon kuvveti yara gerim kuvvetine katkıda bulunan en önemli faktördür. Bu dönemde yara kolaylıkla açılabilir. Üçüncü günden itibaren kollajen fibrillerin ortaya çıkmasıyla yara gerim kuvvetinin kazanılma oranı hızlanır. Yara alanını santimetre karesi başına kilogram cinsinden ifade edilen yara gerim kuvveti (TS), genelde sabit olmasına karşın yaranın açılmaya karşı gösterdiği dayanıklılık, aynı uzunlukta deri yaralarında vücudun muhtelif bölgelerinde farklıdır. Ödemli deride TS, normal derinin TS'nin yarısı kadardır. Postoperatif ilk haftada TS gittikçe artarak ikinci haftada en yüksek değere erişir. Fasiada ise orijinal TS'in yarısı 50 günde, %80'i postoperatif birinci yılda kazanılır. TS'nin artmasında en önemli faktör, yaranın içerdiği kollajen miktarından ziyade kollajenin intra ve intermoleküler kovalent bağlarının artmasıdır [45].

Yara kontraksiyonu

Yeterli doku mobilitesinin bulunduğu yerlerdeki kontraksiyonu, yaranın kapanmasında en etkin mekanizmadır. Doku kaybı olan yaralarda, yara bölgesinin büyüklüğü, çevre dokunun bütün kalınlığına sentripedal olarak defektin geometrik merkezine doğru hareket etmesi ile küçültülmeye çalışılır (Şekil 2.3.). Yaranın meydana gelmesinden 5-7 gün içinde başlayan bu reaksiyon hareketi, doku kaybının

az olduğu ve bu eksikliğin kritik önemi olmadığı bölgelerde, mobil dokularla çevrili yara alanlarında yeterli bir mekanizmadır. Aksi halde, daha çok deforme ve fonksiyon bozukluğuna yol açar. Yara kontraksiyonu dinamik bir olaydır. Hücre ve matriksin karşılıklı etkileşimi sonucudur.



Şekil 2.3. Eksizyonel yara da kontraksiyon: Yara kenarları, yaranın geometrik merkezine doğru yer değiştirerek orijinal yara alanı küçültülür [45].

Fibroblast hareketi, yara kontraksiyonunun kontraktil kuvvetinin kaynağıdır. Bağ dokusu matriksi, bu kuvvetin kontrolünü sağlar. İlk 2-8 hafta arasında kontraksiyon oranı en fazladır. Kontraksiyonun durması; yara kenarlarının karşılaşması ile hareket eden hücrelerin kontakt inhibisyonunun meydana gelmesi veya yara kenarlarının karşılaşmasından önce çevre dokulardaki gerim kuvvetinin kontraksiyon kuvvetine eşit olması ya da onu aşması ile gerçekleşir. Patolojik yara kontraksiyonunun önlenmesi [45];

- ♣ Tam tabaka deri grefti
- ♣ Cerrahi girişimin uygun planlanması
- ♣ Eksternal fiksator kullanılması

Kontraksiyon tamamlandığında, bir yöne doğru mobilitenin diğer yönden az olmasına bağlı distorsiyon meydana gelebildiği gibi yara gerilim kuvvetine direncin artmasına bağlı hipertrofik skar da oluşabilir. Bu sonuçlar iyileşme bölgesinde yapı ve fonksiyon bozukluğuna yol açar. Cerrahi ve kimyasal debridman, uygun antibiyoterapi enfeksiyona bağlı kontraksiyon inhibisyonunu azaltır [45].

Yara iyileşmesinde sitokinler

Yara iyileşmesi daha önce de belirtildiği gibi üç fazda incelenmektedir (inflamasyon, fibroplazi, maturasyon). Bu fazlardan her biri biyolojik aktif substratlar olarak bilinen büyüme faktörlerince regüle edilir. Büyüme faktörleri büyümeyi düzenleyen ve hücre metabolizmasını kontrol eden peptitlerdir. Doku tamir sürecinde hormon benzeri moleküller olarak fonksiyon görürler. Bunu hücre yüzeyindeki spesifik reseptörler yoluyla sağlarlar. Otokrin veya parakrin olarak görev yaparlar. Yara bölgesine diğer hücrelerin kemotaksisini de sağlarlar. Yara iyileşmesindeki birçok sitokin gibi TGF- β 'nın da inflamasyon fazında ve matriks oluşumunda etkileri vardır. TGF- β 'nın topikal olarak eklenmesiyle yara iyileşmesinin hızlandığı gözlenmiştir. İnvitro olarak hücre transformasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Trombositlerden ve makrofajlardan, ek olarak fibroblastlardan salgılanır. Fibroblastlardan salınan TGF- β kendi etkisini ve sentezini stimüle edici bir otokrin olarak da görev yapar. Birçok hücre TGF- β 'yı ve bunu inaktive eden proteini de sentez eder. Otokrin ve parakrin mekanizmalara bağlı olarak TGF- β kollajen depolanmasını stimüle eder, fibroblastların matriks sentezini artırır, kollajenazı inhibe eder, plazminojen inhibitörünü bloke eder. Böylece fibroblast, monosit ve makrofajlar için kemotaktik rol oynayarak anjiyogenezi sağlar. Bu mekanizmalara bağlı olarak TGF- β yara bölgesindeki fibrozisi destekler. PDGF travmadan sonra trombosit K granüllerinden salınır. Nötrofil, fibroblast ve makrofajlara etki ederek güçlü bir mitojen olarak görev yapar. Makrofajlar, endotelial hücreler ve fibroblastlar da PDGF sentez ve sekrete edebilirler. PDGF fibroblastların stimülasyonunu sağlayarak ekstraselüler matriks sentezini artırır, fibroblastların sekrete ettiği kollajenaz miktarı da arttırarak remodeling fazında da görev yapar.

Anjiyogenez direkt endotelial hücre migrasyonu ve büyümesiyle karakterize yeni kan damarları oluşumudur. Bu süreç büyümede, kanserde, yara iyileşmesinde görülür. Anjiyogenez asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörleri tarafından stimüle edilir (aFGF-bFGF). Endotelial hücreler ve makrofajlar aFGF ve bFGF üretebilirler. Her ne kadar bFGF, aFGF'den 10 kat daha potent olsa da aynı reseptör üzerinden etki ederler. Bu büyüme faktörleri ekstra selüler matrikste heparin ve

glikozaminoglikan (GAG) heparin sülfat tarafından bağlanır. Bazal membran bFGF deposu olarak depo yapar. Kollajenazlar ve diğer hidrolitik enzimler tarafından travmadan sonra bazal membranın bozulmasıyla bFGF salınır. FGF'lerin diğer bir depolama yeri de endotelial hücrelerdeki intraselüler alanlardır. FGF, hücrelerin iskemisi ve yaralanmasıyla kas hücreleri ve fibroblastlarca da salınabilir. FGF'ler endotelial hücreleri stimüle ederek bölünmelerini ve yeni kapiller oluşmasını sağlarlar. Bunlar ayrıca endotelial hücre ve fibroblastların kemotaksisini sağlar. Epitelizasyon direkt olarak epidermal büyüme faktörü (EGF) ve keratinosit büyüme faktörü (KGF) adlı iki büyüme faktörü tarafından stimüle edilir. EGF keratinositler tarafından salınır ve otokrin olarak görev yapar. KGF ise fibroblastlardan salınır ve keratinosit bölünmesini ve gelişimini sağlayarak görev yapar. EGF'nin major etkisi hücre siklusunun devamını sağlamaktadır. Yara bölgesinde, epitelial hücrelerde, endotelial hücrelerde ve fibroblastlarda etkileri görülmektedir. EGF ayrıca epitelial hücreler için kemotaktik bir faktördür. Doku remodelizasyonunda önemli bir basamak olan fibroblastların kollajen sekresyonunu arttırmak gibi bir görevi de vardır. Bunların dışında birçok büyüme faktörü yara iyileşmesinde rol alır. Örneğin; IGF-1 (insülin like growth factor-1) kollajen sentezini fibroblastlar üzerinden stimüle eder, PDGF ve bFGF'nin fibroblast proliferasyon etkisine sinerjistik etki gösterir. Gama interferon da kollajen sentezini inhibe eder. Birçok interlökin de yara bölgesindeki inflamatuvar hücre fonksiyonlarını regüle etme yeteneğine sahiptir. Büyüme faktörleri yara bölgesine eklenerek ya da inhibe edilerek yara iyileşmesinin yönlendirilebileceği düşünülebilir. Rekombinant DNA teknolojisi ile birçok deneysel iyileşme modeline büyüme faktörlerinin etkisi gösterilmiştir. Araştırmalarda ekzojen EGF, TGF- β , PDGF ve bFGF'nin yara iyileşmesini arttırıcı etkileri gösterilmiştir. Normal yaralarda olduğu gibi deneysel diyabet, kronik steroid kullanımı, kemoterapi alanlarda ve duodenal ülserli hayvan modellerinde bu faktörlerin olumlu etkileri gösterilmiştir. Spesifik yara tipleri için büyüme faktörlerinin subtiplerinin bulunmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir [44].

3- Remodeling (yeniden yapılanma): Bu fazda temel olay kollajen depolanmasıdır. İyileşmenin en önemli fazıdır. Çünkü matriks depolanmasının miktarı ve kalitesi oluşacak skar dokusunun gücünü belirler. Kollajenin sentezi, yıkımı ve olgunlaşması

arasında bir denge oluşur. Lizil oksidaz büyük moleküller arası çapraz bağ enzimidir. Bu bağlar yaranın gerim gücünü sağlar. Kollajenaz, jeletinaz ve stromelizinler ekstraselüler matriks moleküllerini düzenleyebilen matriks metalloproteinazlardır. Bu proteinazların lokal karsinoma invazyonunda da aktif olmaları dikkat çekmiştir. Kollajenin yapım ve yıkımı arasındaki dengeyi matriks metalloproteinazlar (MMP) sağlar. MMP'ı özellikle inhibe eden molekül matriks metalloproteinaz doku inhibitördür (TIMP). Son araştırmalar yaranın remodeling sırasında MMP ve TIMP arasındaki dengeyi incelemektedir. Birçok iyileşme bozukluğu kollajen depolanmasının zayıflığıyla ilişkilidir. Diyabette matriks depolanmasının zayıflığı azalmış inflamasyonun bir parçası olup, iyileşmedeki yetersizlikle sonuçlanırken hipertrofik skar veya keloidde olduğu gibi artmış kollajen sentezinde birtakım klinik problemler oluşturmaktadır [44].

2.2. Diyabet

Diabetes Mellitus (DM), değişik etiyojilere bağlı ve değişik komplikasyonlara yol açan, heterojen, bir grup karmaşık metabolik bozukluktur. Hiperglisemi yaygın bir özelliğidir ve bu yüzden şeker hastalığı olarak tanımlamak alışkanlık haline gelmiştir [17]. DM'nin birçok farklı tipi vardır, bu tiplerin oluşmasında genetik zemin, çevresel faktörler ve hayat tarzı etkilidir. DM etiyojisine bağlı olarak, insülin sekresyonunda azalma, plazma glukoz kullanımında azalma ve glukoz yapımında artma gibi faktörler hiperglisemiye katkıda bulunur [48].

Diyabet, yara iyileşmesini farklı yollarla etkileyebilir. Bazı faktörler hastanın nöropati ve infeksiyon gelişimine daha eğilimli olmaları ve infeksiyonların zor tedavi olması ile ilişkili iken, diyabette doku onarımının bozulmasına neden olan hücresel, metabolik ve biyokimyasal faktörler de söz konusudur [49].

2.2.1. Diabetes Mellitus'un sınıflandırılması

Diyabetin etiyojisi ve patogenezinin giderek daha iyi anlaşılmasıyla, hastalığın sınıflanması giderek yenilenmektedir. Gerçi Diabetes Mellitus'un tüm tiplerinde temel özellik hiperglisemi olmakla birlikte, hiperglisemiye neden olan fizyopatolojik

mekanizma farklıdır. DM'nin bazı formlarında mutlak insülin eksikliği veya bozuk insülin salgılanmasına neden olan genetik bir kusur varken, diğer bazı tiplerinde temel özellik insüline karşı direnç olmasıdır. Son yıllarda DM'yi hiperglisemiye neden olan patogeneze göre sınıflama çalışmaları vardır (Çizelge 2.6.) [48].

Eskiden yapılan klinik klasfikasyonda hastalığın başlama yaşı değerlendirilmiş ve gençlerde görülene “genç tipi= juvenil tip” erişkinlerde görülene “erişkin tip =adult tip” DM adı verilmiştir. Daha sonra terapötik sınıflandırma geliştirilmiştir ve insülin bağımlı = İnsülin Dependent DM (IDDM) ve insülin bağımsız = Noninsülin Dependent DM (NIDDM), terminolojisi kullanılmıştır. Halbuki Tip II DM' de de bir süre sonra insülin ile tedavi gerekmektedir. Bu nedenle bu tanımlama artık onaylanmamaktadır. Son yıllarda hastalığın etiyopatogenezi ile ilgili bilgiler arttıkça DM'de etiyolojik sınıflandırmaya geçilmiştir [50].

Çizelge 2.5. Diabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflaması [51].

<p>1. Tip I Diabetes Mellitus:</p> <p>A. İmmün nedenli B. İdyopatik</p>
<p>2. Tip II Diabetes Mellitus:</p> <p>A. Periferik insülin direnci ön planda B. İnsülin sekresyonu yetmezliği ön planda</p>
<p>3. Diğer spesifik tipler:</p> <p>A. β hücre fonksiyonunda genetik defektler</p> <p>1- Kromozom 12, HNF-1 a (MODY3) 2- Kromozom 7, glukokinaz (MODY2) 3- Kromozom 20, HNF-4 a (MODY1) 4- Mitokondrial DNA 5- Diğerleri</p> <p>B. İnsülin fonksiyonunda genetik defektler</p>

Çizelge 2.5. (Devam) Diabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflaması [51].

1- Tip A insülin direnci
2- Lepprechaunism
3- Rabson-Mandenhall sendromu
4- Lipoatrofik diyabet
5- Diğerleri
C. Ekzokrin pankreas hastalıkları
1- Pankreatitler
2- Travma/pankreatektomi
3- Neoplazi
4- Kistik fibrozis
5- Hemokromatozis
6- Fibro-kalkülöz pankreatopati
7- Diğerleri
D. Endokrinopatiler
1- Akromegali
2- Cushing Sendromu
3- Glukanoma
4- Feokromasitoma
5- Hipertiroidi
6- Somatostatinoma
7- Diğerleri
E. İlaç ve kimyasal maddeler
1- Vakor
2- pentamidin
3- Nikotik Asit
4- Glukortikoidler
5- Troid hormonları
6- Diazoksit
7- β adrenerjik agonistler
8- Tiazidler
9- Dilantin
10- Diğerleri
F. İnfeksiyonlar
1- Konjenial kızamıkcık
2- Sitomegalovirüs
3- Diğerleri
G. Nadir görülen immün formlar
1- Stiff-mann sendromu
2- Antiinsülin reseptör antikoları

Çizelge 2.5. (Devam) Diabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflaması [51].

<p>3-Diğerleri</p> <p>H. Bazen diyabetle birlikte olabilen genetik sendromlar</p> <p>1- Down sendromu 2- Klinifelter sendromu 3- Turner sendromu 4- Wolfram sendromu 5- Friedreich ataksisi 6- Funtington koresi 7- Prader –Willisendromu 8- Laurence - Moon- Biedl Sendromu 9- Miyotonik distrofi 10- Porfiri</p> <p>I. Diğerleri</p>
<p>4. Gestasyonel Diabetes Mellitus</p>

1. Tip I Diabetes Mellitus

Pankreasın beta hücrelerinin hasarı veya insülin yapımını bozan hastalıklar Tip I diyabete neden olabilirler. Tip I diyabetli hastaların birçoğunda viral enfeksiyonlar ya da otoimmün bozukluklar beta hücrelerinde hasar oluşturabilir, ancak kalıtım da bu hücrelerin hasara karşı yatkınlıklarını belirler. Bu durumlarda, viral enfeksiyon veya otoimmün bozukluk olmaksızın beta hücrelerinde kalıtsal olarak dejenerasyona bir yatkınlık mevcuttur [52].

Tip I diyabet sıklıkla 14 yaş civarında ortaya çıkar ve bu nedenle sıklıkla *juvenil diabetes mellitus* adını alır. Birkaç gün veya hafta içinde aniden başlayabilir ve üç önemli bulgu mevcuttur:

- 1- Kan glikozunun artması
- 2- Enerji ve karaciğer kolestrol yapımı için yağ kullanımının artması
- 3- Vücut proteinlerinin azalması

Diyabette kan glikoz düzeyi uzun bir süre kontrol altında tutulmadığında, birçok dokuda kan damarlarının işlevi bozulur ve yapısal değişiklikler ortaya çıkar. Bu değişiklikler dokulara giden kan miktarlarında yetersizliğe yol açabilir. Buna bağlı olarak, kalp krizi, inme ve son dönem böbrek hastalığı, retinopati ve körlük ve ekstremitelerde istemi ve gangren gelişme riski artar. Kan glikoz düzeyinin kronik olarak yüksek kalması aynı zamanda diğer birçok dokuda hasara yol açar [52].

Diyabette doku hasarı oluşturan mekanizmalar kesin olarak anlaşılmamıştır. Ancak, olasılıkla yüksek glikoz düzeyinin çok sayıda etkileri ile endotel ve vasküler düz kas hücreleri ve diğer dokuların proteinlerindeki diğer metabolik bozukluklar bunda rol oynamaktadır. Ayrıca, diyabetli hastalarda renal hasara sekonder gelişen *hipertansiyon* ve lipit metabolizmasındaki bozukluğu sekonder olarak gelişen *ateroskleroz* sık görülür ve yüksek glikoza bağlı doku hasarını daha da arttırırlar [52].

2. Tip II Diabetes Mellitus

Tip II diyabet, tip I diyabetten daha yaygın olup diabetes mellitus vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadırlar [52]. Tip II diyabet karaciğer, kas ve adipöz dokuda duyarlılığın azalması ve beta hücre fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. Tip II diyabet, genellikle 30 yaşından sonra görülmekteyse de, her yaşta ortaya çıkabilmektedir [50]. Genellikle 50-60 yaşlarında ortaya çıktığından dolayı bu sendroma *erişkin tipi diyabet* adı verilir. Son yıllarda tip II diyabetli 20 yaşından daha küçük, daha genç kişilerde artış olmuştur. Bu eğilim erişkinlerde olduğu kadar çocuklarda da tip II için en önemli faktörü olan obezitenin görülmesindeki artışla ilişkili gözükmemektedir [52]. Hastalığın kuvvetli genetik ve çevresel bileşenleri bulunmaktadır ve aynı anda birkaç anormal gen ya da polimorfizmin varlığının hastalık oluşumu için gerekli olduğu düşünülmektedir. Pek çok hasta obezdir ve genetik kontrol altında olan obezide insülin direncine neden olabilmektedir. Son yıllardaki tip II DM patogenezi için yapılan çalışmaların yoğunlaştığı noktalar, insülin direnci ve bozulmuş insülin sekresyonunun patogenezdaki rolü, genetik faktörlerin rolleri, insülin direncine neden olan dokuların rolleridir.

Tip II diyabetin ilerlemiş evrelerinde pankreasın beta hücreleri “tükenir” ve hiperglisemiye önlemek için gereken miktarda insülin yapamazlar. Bu durum, kişi karbonhidrattan zengin yemek yedikten sonra özellikle belirgindir [52].

Pek çok koşulda tip II diyabet, kalori kısıtlaması ve kilo azaltılması ile etkin bir şekilde tedavi edilmektedir ve dışarıdan insüline gerek kalmamaktadır [52].

2.2.2. Kronik hiperglisemi

Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda, uzun süreli hipergliseminin tek başına kronik komplikasyonların nedeni olabileceği ortaya çıkmıştır. İn vivo ve in vitro çalışmalar hipergliseminin genetik ve çevresel faktörler eşliğinde biyokimyasal değişiklikleri başlattığını, oluşan metabolik yollar ve yıkım son ürünlerinin organ ve dokularda fonksiyon kusuru ve hasar oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Kronik hiperglisemi ile bir diyabetik hastada; biyokimyasal, fonksiyonel, organlara ilişkin değişiklikler oluşmakta ve bunlar klinik yakınmalarla kendini belli etmektedir [51].

Çizelge 2.6. Kronik hiperglisemi sonucunda oluşan değişiklikler [51].

<p>A. Biyokimyasal değişiklikler</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Polyol yolunun işletilmesi 2- Glikasyon/oksidasyon 3- Protein kinaz C aktivasyonu 4- Gen ekspresyonunun değişmesi
<p>B. Fonksiyonel değişiklikler</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Sinir iletiminin bozulması 2- Glomerüler filtrasyonun değişmesi 3- Kapiller sızma 4- Büyüme faktörlerinin artması 5- Lipoprotein mekanizmasında değişiklik

Çizelge 2.6. (Devam) Kronik hiperglisemi sonucunda oluşan değişiklikler [51].

<p>C. Organ değişiklikleri</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Akson yapısında bozulma 2- Glomerüler yapıda bozulma 3- Matriks değişimi 4- Endotelde değişiklikler
<p>D. Kliniksel yansıma</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Anjiyopati, retinopati, nefropati, nöropati 2- Deri değişiklikleri ve enfeksiyona eğilim artması 3- Aterosklerozis

2.2.3. Diyabet ve yara iyileşmesi

Diyabetlilerde yara iyileşmesinde metabolik defektler ve mekanik bozukluklar vardır. Diyabetlinin yarasında hem anjiyopati, hem de hızlı gelişen aterosklerozise bağlı olarak büyük arter oklüzyonları görülür. Üstelik diyabetik nöropatiye bağlı duyu bozuklukları dolayısıyla, yaraya sürekli olarak mekanik bir travma söz konusudur. İnsülin, yara iyileşmesinin erken fazlarında daha önemlidir. Diyabetik yaraları tedavi ederken nöropati ve mikroanjiyopati etkileri değiştirilemez. Büyük damar hastalığı düzeltilebilir, duyu bozukluğu olan yerler de mekanik travmalarda korunabilir. Hipergliseminin, gerekirse sürekli insülin infüzyonuyla yeterli derece kontrolü, özellikle preoperatif devrede çok önemlidir. Arteriyel oksijen basıncı optimal olmalı, lokal perfüzyon basıncıda iyi olmalıdır. Yaranın kontaminasyonu önlenmelidir. Kısaca “diyabetlilerin yarası geç iyileşir” sözü çoğu kez doğru bir cümledir [53].

Hayvan modellerinde diyabetik hayvan grubu çeşitli büyüme faktörlerinin (IGF-I; IGF-II, KGF gibi) ekspresyonu kontrol hayvan grubu ile karşılaştırıldığında azalma olduğu gözlenmiştir [54, 55]. Diğer bir hipotez ise diyabette büyüme faktörlerinin

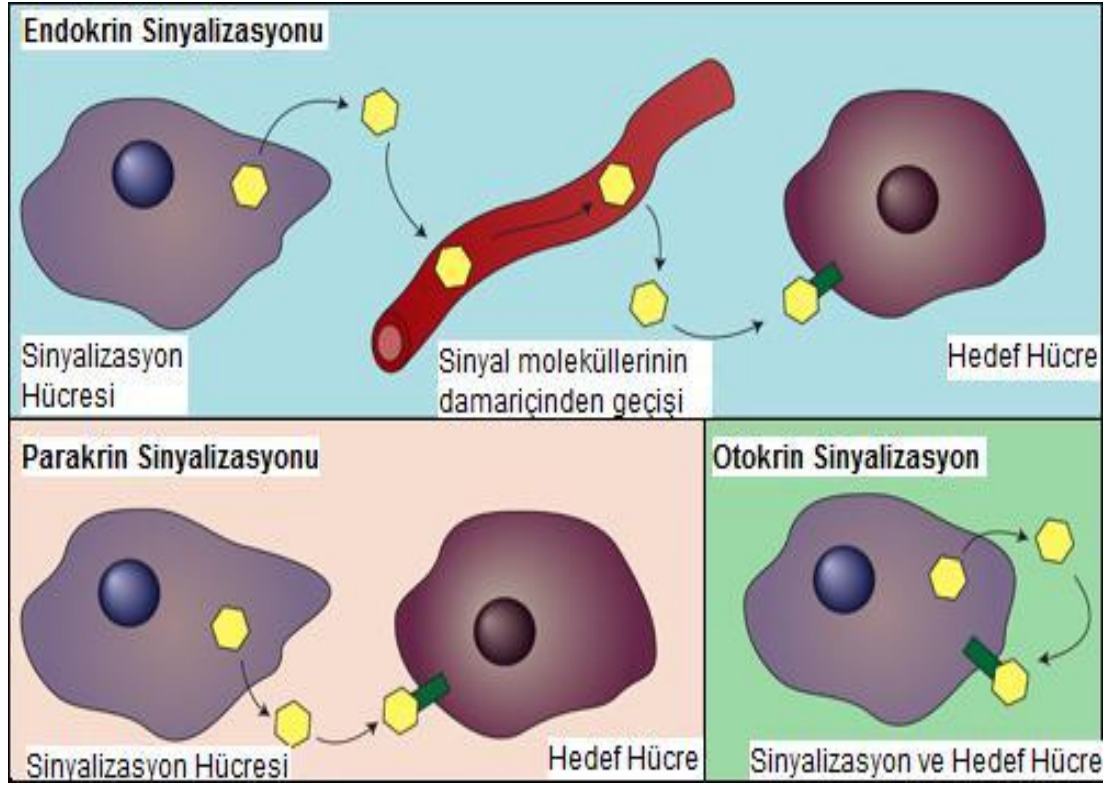
yıkımında artış olmasıdır. Bu hipotez çeşitli matriks metaloproteinaz düzeylerinin diyabetik hayvan grupları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bilgisiyle desteklenmiştir [56].

2.3. Büyüme Faktörleri

Ağırlıkları 4000-60 000 dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücrel aktiviteyi etkileyebilen [57], spesifik bir hedef doku ya da hedef hücreye sahip, bunlar üzerinde büyüme ve proliferasyonu regüle edici etki gösteren protein yapıda endokrin sistem molekülleri genel olarak büyüme faktörleri olarak isimlendirilir [58]. Büyüme faktörlerinin, kemotaktik ve yara bölgesine hücrelerin göçünü artırıcı etkileri de vardır [37].

Büyüme faktörleri, tıpkı hormonlar gibi vücudun herhangi bir yerinde sentezlenip hedef hücrelerine ulaşmak için dolaşıma verilmeleri yönünden *endokrin* türde etki yapabilir. Uygun amaçların bulunmaması nedeniyle, sentez yapan hücrelerin bizzat kendilerinin etkilenmemesine karşın komşu hücreleri etkilemek üzere salınmaları yönünden *parakrin* etki de gösterebilirler. Ve bazı büyüme faktörleri, kendilerini sentezleyen hücreleri etkileyebilmekte olup bu etki biçimi *otokrin* olarak karakterize edilir. Örneğin, bir faktör, hücrede uygun amaçların bulunması halinde, salgılandıktan sonra, kaynaklandıkları o hücrelere bağlanabilir. Bir seçenek olarak, bir faktör, yeterli miktarda salgılanmayacak olursa, bunun hücre içinde varlığı bazı olayları doğrudan uyarabilir [59]. Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin, o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucu hücre içinde özgün bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki, çoğunlukla tirozin kinaz uyarılarak sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörü bulunur. Büyüme faktörlerinin o bölgedeki konsantrasyonu ve reseptöre bağlanan miktarı, elde edilecek sonucu belirler. Matriks de, büyüme faktörlerinin çözünürlüğünü değiştirerek, hücrel aktiviteyi düzenleyecek faktör konsantrasyonunun değişmesini sağlayabilir. Ayrıca matriks, büyüme faktörlerinin bağlanıp çözülmesini ayarlayarak, ortamdaki faktörler için rezervuar görevi görür. Yine

matriks, herhangi bir hücrenin, herhangi bir büyüme faktörüne vereceği yanıtı belirleyebilir [57].



Şekil 2. 4. İntraselüler sinyal tipleri [60]

2.3.1. Büyüme faktörleri ve yara iyileşmesi

Büyüme faktörleri, hücreler arası iletişimi sağlayan gerçek yara hormonlarıdır [37]. Yaraya lokal olarak uygulanabilen büyüme faktörleri granülasyon dokusunun formasyonunu uyararak ve epitelizasyonu hızlandırarak yara iyileşmesini her fazda olumlu yönde etkilerler. Esasında yara iyileşmesinin tüm fazları büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Büyüme faktörleri yara iyileşmesinin inflamasyon fazında yaraya gelen ve yara iyileşmesi için hayati önem taşıyan makrofajların uyarısı ile üretilirler [61]. Büyüme faktörleri yara iyileşme sürecinde lokal yara çevresinde inhibitör ve stimülatör etki gösterirler [62].

Çizelge 2.7. Yara iyileşmesinde etkili büyüme faktörleri [44].

BÜYÜME FAKTÖRÜ	KAYNAK HÜCRE/HÜCRELER	FONKSİYONU
TGF- α	Trombositler, makrofajlar, keratinositler	Nötrofil aktivasyonu, fibroblastlara mitojenik etki, anjiyogenezin sitümlasyonu
TGF- β	Trombositler, makrofajlar, lenfositler	Fibroplazi ve anjiyogenezin sitümlasyonu, çeşitli hücrelerin proliferasyonun artırılması
PDGF	Trombositler, makrofajlar, keratinositler, endotel hücreler	Nötrofillerin ve fibroblastların kemoatraksiyonu, düz kas hücreleri ve fibroblast için mitojenik etki
FGF-1,2,4,7	Makrofajlar, nöral doku	Endotel hücre büyümesinin stimülasyonu, mezodermal ve nöroektodermal kökenli hücrelere mitojenik etki
EGF	Trombositler, keratinositler, tükrük bezleri	Keratinositler, makrofajlar ve fibroblastlar için mitojenik etki,
IGF-1/Sm-c	Karaciğer hücreleri	Fibroblastlara mitojenik etki, düz kas hücrelerine, lenfositlere ve kondrositlere stimulan etki,
IL-1 α,β	Makrofaj nötrofil	Kollajen sentezi, hemostaz, proliferasyon
CTGF	Fibroblast endotel Hücreleri	TGF- β 1 uyarısı
VEGF	Makrofaj, keratinosit	Anjiyogenez

Yapılan çalışmalarda; PDGF, FGF, VEGF gibi büyüme faktörlerinin yara sıvısında varlığı tespit edilmiştir [61]. VEGF; anjiyogenezde rol oynayan temel faktörlerden biridir. VEGF postnatal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retina da yeni damarlanma ve kalp damar hastalıkları dahil olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumda önemlidir. VEGF, başlangıçta damar geçirgenliğini artıran bir faktör olarak tanımlanmıştır. Endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik

fonksiyonunu, sitokin sentezi ve salınımı, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ekspresyonu ve düz kas hücre hiperplazisini düzenler [63, 64, 65].

2.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süper ailesinin üyesi olan vasküler endotel büyüme faktörü ailesi, endotel hücreleri için özgül olup, önemli etkileri vardır. İlk kez 1983'te Senger ve arkadaşları tarafından kobay tümörlerinden elde edilerek tanımlanmıştır [66]. Kobay derisinde vasküler sızıntı oluşturduğu için de vasküler permeabilite faktörü olarak isimlendirilmiştir [66, 67]. 1980'lerin sonunda ise, sığır hipofizinden elde edilmiş, kuvvetli endotelial mitojen olduğu ortaya çıkmıştır, bu aileden ilk özel anjiyogenik büyüme faktörü ayrıştırılıp, buna vaskülotropin veya vasküler endotelial büyüme faktörü adı verilmişti [66, 68, 69].

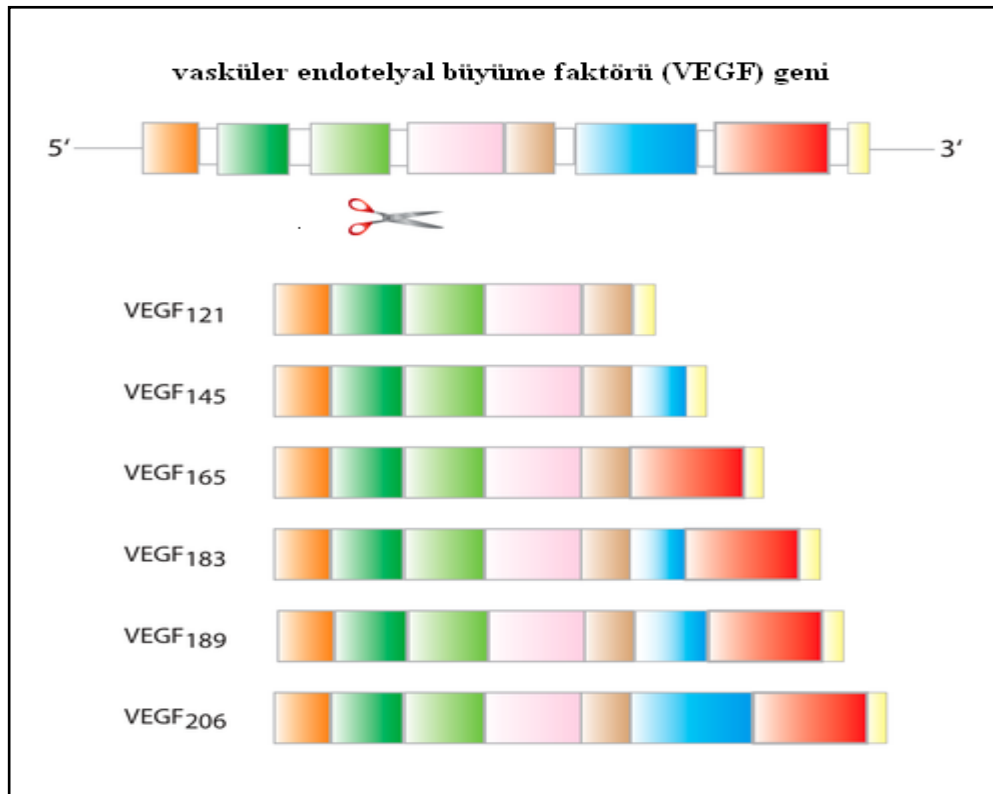
2.4.1. VEGF'nin üyeleri ve yapısı

VEGF damar endotel hücrelerine özgü homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörüdür. VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yer alır. 45 kDa büyüklüğündedir [70,71]. VEGF histaminden ellibin kez daha fazla damar geçirgenliğine sahiptir [67]. Yarılanma ömrü 10 dakika ile 6 saat arası değişir [72].

VEGF'nin altı üyesi vardır: VEGF-A (Human-VEGF) , VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PlGF) [66].

VEGF-A geni, kromozom 6p21.3'teki lokalizasyonda kodlanmıştır. Aynı zamanda Human-VEGF olarakta bilinmektedir. VEGF-A bazı makalelerde sadece VEGF olarak isimlendirilmektedir. VEGF-A'nın şu ana kadar bilinen altı adet izoformu vardır. Bunlar $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{183}$, $VEGF_{189}$ ve $VEGF_{206}$ adlandırılmış olup adlandırmada ki sayılar içerdikleri amino asit sayılarını göstermektedir (şekil 2.5.). Bu izoformlardan $VEGF_{121}$ hariç, hepsi heparine bağlanma özelliği göstermektedir. $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$ ve $VEGF_{165}$ salgılandığında

kolayca diffüze olur ve erimiş formları sıvılarda saptanabilir. $VEGF_{189}$ ve $VEGF_{206}$ ise salgılandığı halde hücre aracılı olarak kalır ve varlıkları testlerle kolayca saptanamaz. $VEGF_{206}$, VEGF'nin orijinal karakteristik formu olup, yaklaşık 34-46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir. $VEGF_{165}$, $VEGF_{121}$ 'in aksine hücre yüzeyindeki veya ekstrasellüler matriksteki proteoglikanlara ve heparine bağlanan formudur. $VEGF_{189}$ heparin ve heparan sülfat proteoglikanına bağlanmayı tetikler ve artırır [66].



Şekil 2.5. VEGF-A izoformları [73]

VEGF-B, 167 amino asitli bir proteindir ve vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1'e bağlanarak monositlerin aktivasyonunda ve farklılaşmasında rol alır. *VEGF-C*, 388 amino asitten oluşan bir protein olup, lenfanjiyogenezde rol oynar. *VEGF-D*, 334 amino asitten oluşup, *VEGF-C* gibi lenfanjiyogenezde rol alır [66]. *VEGF-E*'nin amino asit dizilimi ise *VEGF-A* ile %25 oranında benzerlik göstermekle birlikte, güçlü mitojen ve permeabilite artırıcı faktör olarak görev yapar [74]. *PlGF*,

VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir, sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 amino asite sahip, sonrasında ise yeni amino asitlerin eklenmesiyle birlikte VEGF-A ile %37 oranında benzeyen ve 152 amino asit içeren şekli alır [75].

Heparine bağlanan VEGF-A izoformları plazmin gibi proteolitik enzimlerle hızla parçalandığından, hücre dışı proteolizin, VEGF biyoyararlanımını düzenlemede önemli derecede rol oynadığı düşünülmektedir [76].

Genellikle VEGF diye kısaca ifade edilen büyüme faktörü VEGF-A'dır. VEGFR1 ve VEGFR2 yoluyla etki eder ve hipoksi ile aktive olduğu gösterilen tek VEGF üyesi olduğu bilinmektedir [71].

VEGF-A fonksiyonları

Çok sayıda yapılan çalışma ile VEGF-A'nın çeşitli fonksiyonları gösterilmiştir [71].

- ♣ Endotel hücrelerinin büyüme ve farklılaşması için gereklidir. Ayrıca monositler için kemotaktiktir.
- ♣ Endotel hücrelerinde apoptozisi engelleyerek hücre devamlılığını sağlar.
- ♣ Vaskülojenez, anjiyojenez, lenfanjiyojenez düzenler.
- ♣ Damar geçirgenliğinde artış, retinal lökostaza neden olur.
- ♣ Nöron koruyucu etkileri vardır. VEGF'in inaktive edildiği farelerde, nörodejeneratif hastalık gelişmesi, hipoksi ile indüklenen VEGF'ün nöron koruyucu etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Retina ganglion hücrelerinde aksotomi yapılan farelerde VEGF'in RGH ölümünü yavaşlattığı saptanmıştır.
- ♣ Pro-inflamatuvar etkilidir. VEGF lökositlere bağlanabilir. VEGF reseptörleri, inflamatuvar hücrelerde ve trombositlerde gösterilmiştir.

VEGF-A anjiyojenezle en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan bir büyüme faktörüdür [77].

2.4.2. VEGF'nin reseptörleri

VEGF, ilk olarak endotel hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro* saptanmıştır [68]. VEGF hücre dışına salgılanarak 3 tirozinkinaz, 2 nörofilin reseptörüne bağlanır [71]. Bilinen reseptörler VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR, flk-1), VEGFR-3 (flt-4), nörofilin-1 ve nötrofilin-2'dir [78].

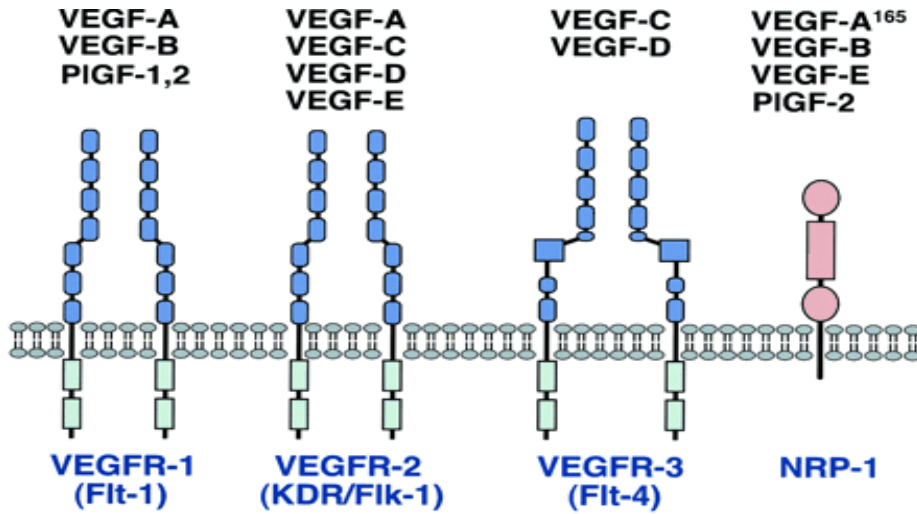
VEGF reseptör 1'in (VEGFR1) (Flt-1) pozitif ve negatif anjiyojenik etkisi vardır. Endotel hücreleri dışında monositler, osteoblastlar, makrofajlar, perisitler, hemopoetik kök hücreleri, damar düz kas hücreleri ve kolorektal tümör hücrelerinde bulunur [71].

VEGFR2 (Flk-1/KDR) VEGF-A'nın mitojenik, anjiyojenik ve vasküler geçirgenlik artışı etkilerinden sorumludur. Endotel hücre büyümesi, farklılaşması, göçü ve tübül oluşumunu düzenler. Endotel hücrelerine ek olarak hemopoetik kök hücrelerde, megakaryositlerde retina öncü hücrelerinde, damar düz kas hücrelerinde ve bazı tümör hücrelerinde (küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri, nöroblastoma, meme ve mide kanserleri) bulunur [71].

VEGFR-3, Lenfatik damarlarda anjiyojenik etkiden sorumludur.

Nörofilin-1, VEGF165'in VEGFR-2'ye ilgisini ve bu faktöre bağlı kemotaksisi artırır. Endotel, nöron ve tümör hücrelerinde bulunur.

Nörofilin-2 VEGF165 ile birlikte nörofilin-1'den farklı olarak VEGF145'i ve plasental büyüme faktörünü de bağlar [71]. Şekil 2.6.'da VEGF üyeleri ve VEGF reseptörleri arasındaki ilişki görülmektedir [78].



Şekil 2.6. VEGF ailesinin reseptörler ile etkileşimi [79]

2.4.3. VEGF'nin sentezi ve yara iyileşmesindeki etkisi

VEGF etki edeceği dokuya yani endotelial doku hücrelerine karşı son derece spesifiktir [80]. Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır. Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde VEGF yapımına ait mRNA'ların sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'ün demonstrasyonu için yapılan immunositokimyasal çalışmalarda aktive makrofajlarda, arterioller çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir [66].

Oksijen basıncı VEGF gen ekspresyonunda anahtar rol oynar. Büyüme faktörlerinden epidermal büyüme faktörü (EGF), transforming büyüme faktörü- α , β (TGF- α , TGF- β), keratinosit büyüme faktörü (FGF-7), insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2), FGF ve PDGF gibi büyüme faktörleri VEGF mRNA ekspresyonunu artırır. İnflamatuvar sitokinlerden interlökin-1 α (IL-1 α), interlökin-6 (IL-6) inflamatuvar hastalıkla da VEGF gen ekspresyonuna neden olabilirler [68].

Böylece bu maddelerin mitojenik olmadığı, VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir [69].

Protein büyüme faktörlerinin haricinde, forbol esterleri ve prostaglandin E₂ (PGE₂) gibi araçlarla da VEGF ekspresyonunun düzenlendiği görülmüştür [81].

Hipoksi, belki de, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiyogenezi başlatan en etkili uyaranlardan biridir. Buna örnek olarak büyüyen tümörlerin hipoksik merkezleri oluşması ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu ve yeni damar yapımı gösterilebilir. Yine tıkanmış kalp damarlarına bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF'ü artırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmıştır. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken, CO tarafından da inhibe edilmektedir. Hipoksinin yanında azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır [66]. Kısaca, VEGF ekspresyonu hipoksi, pH, büyüme faktörleri, hücrel transformasyon, hormonlar ve onkojenler dahil çeşitli faktörlerce düzenlenmektedir [68, 82].

Yara iyileşmesinde en işlevsel anjiyogenetik faktörü VEGF'dir [83, 84]. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) anjiyogenezin fazla uyaran büyüme faktörleridir. Yaralanmayla birlikte FGF seviyeleri artmaya başlar ve 48. saatte normal değerlerine düşer. VEGF değerleri ise yaralanmadan birkaç gün sonra pik yapar [85, 86].

Anjiyogenezin erken döneminde endotelial hücre migrasyonu ve poliferasyonunu VEGF-A düzenler [87]. VEGF-A üretimini akut yaralanmada tetikleyen ana etken yara ortamındaki metabolik düzensizliğe bağlı hipoksittir [88]. VEGF-C'nin üretimi de yaralanma sırasında aynı zamanda artar. Bu büyüme faktörü ilk olarak makrofajlardan salınır ve yaralanmanın inflamatuvar evresinde önemlidir [89].

Kirchner ve arkadaşlarının (2003) genetik olarak diyabetik hale getirilmiş farelerle yaptıkları çalışmada topikal olarak 1 µg uygulanan VEGF'nin yara kapanma zamanını düşürdüğünü savunmaktadırlar [90]. Galeano ve arkadaşlarının (2003)

diyabetli dişi farelerde yaptıkları çalışmada VEGF165 gen transferinin anjiyogenez, reepitelizasyon ekstraselüler matriks oluşumu ve olgunlaşmasını uyararak yara iyileşmesinin geliştirdiği düşünölmektedir [91]. Jacobi ve arkadaşlarının (2004), yara iyileşmesi ve anjiyogenez üzerine çözünebilir VEGF reseptörünün etkilerini araştırmak üzere yaptıkları bir çalışmada, VEGF fonksiyonunun optimal yara anjiyogenezi için gerekliyken yara kapanması için gerekli olmadığını belirtmişlerdir [92]. Galiano ve arkadaşlarının (2004), genetik olarak diyabetik hale getirilmiş farelerde topikal olarak uygulanan rekombinant VEGF-165 insan proteiniyle yapmış oldukları çalışmada diyabetin neden olduğu komplikasyonların tedavisinde yararlı olabileceğini düşünmektedirler [93]. Wilgus ve arkadaşlarının (2008), bir fare modelinde VEGF'nin skar formölasyonunun düzenlenmesiyle ilgili yaptıkları çalışmada, yara anjiyogenezinde aracı olarak işlev yapmadığı fakat yara onarım sürecinde farklı bir rol oynayabileceğini düşünmektedirler [94].

VEGF'nin anjiyogenik etkilere sahip olmasının yanı sıra, NO ve serbest oksijen radikalleri gibi diğer potansiyel endojen faktörlerle de kompleks ilişkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur [95].

2.5. Serbest Radikaller

2.5.1. Serbest radikal tanımı ve organizmaya etkisi

Serbest radikal terimi bağımsız olarak bir veya daha fazla odaklanmamış elektronu bulunan atom veya moleküller için kullanılır. Serbest radikaller organizmada normal metabolik olayların işleyişi sırasında oluştuğu gibi çeşitli diş etkenlerin etkisi ile de oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeni ile çok aktif yapılı olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir. Eşlenmemiş elektron bu molekülleri oldukça reaktif hale getirir. Etkileşime girdikleri molekülden bir elektron alarak veya ona bir elektron vererek molekülün yapısını bozarlar. Böylece radikal olmayan bir yapı, radikale dönüşmüş olur [96].

Hidrojen atomu eşleşmiş elektronu ile bir radikaldir. Halojen atomlar, oksijen türleri, klor ve brom gibi tek atomlu yapılar, sodyum potasyum gibi alkali metal atomları ile nitrik oksit ve nitrojen dioksit gibi atom kombinasyonları radikal olarak tanımlanmaktadır. Geçiş metalleri (Cu, Fe, Mn, Mo) ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Ancak reaksiyonları katalizledikleri için serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Biyolojik moleküller genellikle kovalent bağlı olup non-radikallerdir [96].

2.5.2. Serbest radikal türleri

Aeorbik metabolizması olan memelilerde başlıca serbest radikal kaynağının moleküler oksijenden türeyen serbest radikaller olduğu kabul edilmektedir. Aerobik organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için organik moleküllerden enerji açığa çıkarmada moleküler oksijeni kullanma mecburiyetinde olmaları, bu canlıları, oksijenin toksik metabolik ürünleri ile birlikte yaşamak zorunda bırakmıştır.

Moleküler oksijenin eşlenmemiş elektron içerdiği, atomik oksijen molekülünün ise eşlenmemiş iki elektrona sahip olduğu bilinmektedir. Bunun için oksijen bazen bir *diradikal* olarak da değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Çünkü oksijenin son yörüngesindeki elektronların paralel spinlerde olması, oksijen molekülünün iki elektronu birden almasını ve kimyasal bağ oluşturabilmesini engeller. Bu nedenle oksijen molekülü tek elektron almaya yatkındır [96].

Oksijen tam olarak indirgenmediği metabolik reaksiyonlarda son ürün olarak suya indirgenir. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında, kısmi redüksiyonla ya da redüksiyonun ara basamaklarında metabolit olarak çok sayıda yüksek derecede reaktif ara ürünler açığa çıkar. Bu ara ürünlerinin hepsi radikal olmadığı için *reaktif oksijen türleri* terimi kullanılmaktadır [96].

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Bununla birlikte organizmada oksijen türevi serbest radikaller dışında daha az olarak karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır [96].

Reaktif oksijen türleri (ROS): Oksijen radikallerini ve oksitleyici ajanları kolayca radikal haline dönüştüren, radikal ve radikal olmayan oksijen bileşikleri içeren kompleks bir tanımdır.

Reaktif nitrojen türleri (RNS): Bunlar ise nitrik oksit, azot dioksit ve radikal olmayan azot bileşikleri içeren kompleks bir tanımdır.

Çizelge 2.8. Serbest radikal türleri [96].

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)			
Radikaller		Radikal olmayanlar	
Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojenperoksit	H_2O_2
Hidroksit	$\cdot HO$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Hidroperoksit	HO_2^{\cdot}	Ozon	O_3
Peroksit	ROO^{\cdot}	Singlek oksijen	
Alkoksil	RO^{\cdot}		
Reaktif azot türleri (RNS)			
Radikaller		Radikal olmayanlar	
Nitrik oksit	NO^{\cdot}	Nitrosil	NO^{\cdot}
		Nitröz asit	HNO_2
		Nitroksit	NO
		Dinitrojen tetroksit	N_2O_4
		Dinitrojen trioksit	N_2O_3
Nitrojen dioksit	NO_2^{\cdot}	Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot}$
		Alkil peroksinitrit	$ROONO$
		Nitril	NO_2^{\cdot}
		peroksinitröz asit	$ONOOH$

2.5.3. Serbest radikallerin oluşumu

ROS, hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedir. Hücrede zara bağlı veya serbest olarak bulunan değişik enzimlerin etkisi ile serbest radikal oluşmaktadır. Bu radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen, tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşmaktadır. Serbest radikaller, başlıca 3 yolla meydana gelirler;

1. Kovalent bağlı normal bir molekülünün elektron kaybetmesi veya bir molekülün homolitik bölünmesi sonucu, ortak elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması ile,
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya bir molekülün heterolitik bölünmesi sonucunda, heterolitik bölünmede kovalent bağlı oluşturulan her iki elektron, atomların birinde kalır ve çoğunlukla serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir
3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile elde edilmektedir [96].

Aerobik canlılarda oksijenin suya indirgenmesi esnasında oluşan ROS sağlıklı durumlarda belirli oranlarda canlılığı devamı için gereklidir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu peroksit oluşur ve peroksit molekülü de 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti meydana getirir. Ancak biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler oluştuğu için dismutasyon reaksiyonu olarak da bilinir (Eş. 2.1) [96].



H_2O_2 bir radikal değildir, ancak membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü kuvvetli bir oksidandır. İki elektron alabilir ve oldukça sitotoksik olan ürünlere dönüşür. Ferro demir hidrojen peroksitine 3. elektronunu transfer ederse O-O Bağı kırılarak su ve hidroksil radikali oluşur [96].

2.5.4. Hücrede serbest radikallerin oluşum yerleri

Serbest radikaller hücrenin tüm fonksiyonlarında oluşabilme özelliğindedir. Bunlar;

- Mitokondrideki elektron transport zincir reaksiyonları,
- Endoplazmik retikulumdaki karma fonksiyonlu oksidaz sistemi,
- Ksantin oksidaz, dopamin, β - hidroksilaz, urat oksidaz, D - amino oksidaz gibi enzimlerin etkinliği,
- Hücre zarına bağlı NADPH oksidaz, prostaglandin sentetaz ve lipoksijenazların faaliyeti,
- Peroksizomlarda ve lizozomlardaki metabolik olaylardır [96].

Serbest radikallerin katıldıkları reaksiyonlar enzimatik ve enzimatik olmayan kaynaklara bağlı olabilir. Enzimatik serbest radikal reaksiyonları arasında solunum zinciri, fagositoz, prostoglandin sentezi ve stokrom P₄₅₀ sisteminin çalışması sırasında oluşan reaksiyonlar sayılabilir. Oksijen türlerinin organik bileşiklerle bakır veya demir katalizörlüğünde girdiği reaksiyonlar ise enzimatik olmayan serbest radikal reaksiyonlarıdır [96].

2.5.5. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri

Süperoksit radikali

Aerobik hücrelerde oksijen bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşan ilk ürün süperoksit radikalidir. Oksijenin potansiyel olarak toksik madde sayılmasının asıl nedeninin bu dönüşüm olduğu ileri sürülmektedir. Endojen oksijen radikallerinin en büyük kaynağı olan süperoksit radikali hem oksitleyici, hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Süperoksit radikali, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarını indirgemesi nedeniyle çok önemlidir [96].

Hidroksil radikali

Geçiş metallere varlığında hidrojen peroksitin indirgenmesiyle meydana gelen çok reaktif bir radikaldir. Bu reaksiyon ilk kez *Fenton* tarafından tanımlandığı için *Fenton reaksiyonu* olarak isimlendirilmektedir. Tioller ve yağ asitleri gibi birçok molekülden hidrojen atomları koparak yeni radikallerin şekillenmesine neden olan hidroksil radikali, DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girerek DNA baz modifikasyonlarına da yol açabilir [96].

Hidrojen peroksit

Moleküler oksijenin çevre moleküllerden 2 elektron alması ve ya süperoksitin bir elektron almasıyla *peroksit* oluşur. Peroksit molekülünün 2 hidrojen atomu ile birleşmesi sonucunda *hidrojen peroksit* meydana gelir. Hidrojen peroksitin organizmada asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. Bu reaksiyon spontan olarak gelişebildiği gibi SOD enzimleri tarafından da katalizlenebilir. Enzimatik dismutasyon geniş bir pH aralığında geçerlidir. Hidrojen peroksit mitokondriyal membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranında difüzyon ile kolayca geçip birçok bileşiği yavaş yavaş okside edebilir. Uzun ömürlü bir oksidan olarak mutajen ve karsinojen etki gösterir. Hidrojen peroksit serbest radikallerin neden olduğu hücresel değişikliklerde kritik bir öneme sahiptir [96].

Singlet oksijen

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için bir radikal değildir. Ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlatabilir. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alması sonucunda, kendi yörüngesinin tersi yönde başka bir orbitale geçmesiyle singlet oksijen meydana gelir. Membran lipid peroksidasyonunda etkili bulunan singlet oksijen aynı zamanda mutajeniktir [96].

Nitrik oksit (NO)

Nitrik oksitin hücresele düzeyde koruyucu etkileri vardır. Ancak oksidatif stres altında süperoksit radikali ile reaksiyona girerek oluşturduğu peroksinitrit çok güçlü bir oksidandır. Peroksinitrit birçok biyolojik materyali direkt olarak etkilenmesinin yanı sıra proteinlerdeki tirozini nitrataştırarak bazı hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Nitrik oksit vazomotor tonusun sağlanmasının yanı sıra inflamasyon yanıtlarında, homeostazda, vasküler büyümesinde de önemli rollere sahiptir.

Çizelge 2.9. Nitrik oksitin organizmada etkileri [96]

Koruyucu etki	Zararlı etki	Düzenleyici etki
Antioksidan Lökosit adhezyonunu engelleme	Enzim inhibisyonu Antioksidanları tüketme	Damar tonusu Hücresele adhezyon Nörotransmisyon Brokondilatasyon Trombosit antiagregasyonu

Nitrik oksitin fizyolojik şartlarda süperoksit radikaliyle birleşmesi oldukça sınırlıdır. Çünkü oluşan süperoksit radikali, hücrede yüksek konsantrasyonda bulunan SOD tarafından kolaylıkla kaldırılabilir. Patolojik olaylarda nitrik oksit hem de süperoksit sentezi artmakta, oluşan süperoksit, süperoksit dismutaz enzimi tarafından yeterli şekilde yok edilmediğinden peroksinitrik radikali oluşmaktadır [96].

2.5.6. Serbest radikallerin kaynakları

Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok reaktif olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir ve

yararlı biyomoleküllerin fonksiyonlarını yitirmesine neden olmaktadır. Başlıca serbest radikal kaynaklarını şu şekilde sınıflandırabiliriz [97]:

Endojen kaynaklar:

- Mitokondrial elektron transport zinciri
- Endoplazmik retikulum
- Redoks döngüsü
- Araşidonik asit metabolizması
- Fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar vs.) ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar
- Ksantin Oksidaz, NADPH enzimler Oksidaz vs.
- Otoksidasyon reaksiyonları

Ekzojen Kaynaklar:

- Diyet faktörleri
- Çevresel faktörler (hava kirliliği)
- İlaçlar, ksenobiyotikler
- Zararlı ışınlar (x-ray, U.V.)

2.5.7. Serbest radikallerin biyolojik etkileri

Biyolojik ortamlarda meydana gelen radikallerin ortalama difüzyon yarı çapları çok küçük olanlar son derece aktiftir. Ayrıca $Cl_3C\cdot$ ve $HO\cdot$ gibi radikallerin biyolojik ortamlardaki yarı ömürlerinin bir kaç mikrosaniye olduğu tesbit edilmiştir. Düşük aktiviteli radikallerin, difüzyon hızlarının yüksek olmasına karşılık, bunlar anlamlı hücrel tahribatlara yol açamazlar [98].

Radikalik reaksiyonlar, zincir reaksiyonlar olup, genel olarak üç basamakta incelenirler. Başlama safhası, radikalın oluşumunu kapsar. Sonra ilerleme basamağı gelir. İlerleme basamağı, ara ürün olarak ortaya çıkan serbest radikaller üzerinden yürür. Bu arada hücrel tahribatlar meydana gelir (Çizelge 2.10). İlerleme reaksiyonları, ya sonsuz devam eder veya radikal yakalayıcı maddeler yardımı ile sonlanır. Radikal yakalayıcı maddeler, hücrenin sağlıklı gelişimi için gereklidirler. Eğer, serbest radikaller, radikal yok ediciler tarafından yakalanamazlar ise, sitotoksikite ortaya çıkar [98].

Çizelge 2.10. Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller [98].

Etkilenen bileşik	Sonuçlar
1. Doymamış amino asitler ve kükürt içeren amino asitler	a) Protein denatürasyonu b) Çapraz bağlanma c) Enzim inhibasyonu d) Organ ve hücre geçirgenliğinde değişimler
2. Nükleik asit bazları	a) Hücre gelişiminde değişimler b) Mutasyon
3. Karbohidratlar	a) Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
4. Doymamış lipitler	a) Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
5. Kofaktörler	a) Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma b) Askorbat ve porfirin oksidasyon
6. Antioksidanlar	a) a-tokoferol ve γ -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
7. Proteinler	a) Denatürasyon b) Peptid zincirinde kırılmalar
8. DNA	a) Baz modifikasyonları b) Zincirde kırılmalar
9. Hyaluronik asit	a) Synovial sıvı viskozitesinde değişim

Serbest radikallerin, hücrel moleküller üzerine olan etkileri aşağıda kısaca özetlenmiştir [98].

Proteinler

Kükürt içeren aminoasitler ve doymamış aminoasitlerin (triptofan, tyrozin, fenilalanin, metiyonin, sistein, histidin) serbest radikallerle reaksiyonları sonucu kimyasal değişiklikler ortaya çıkar. Aktifliği, yukarıdaki aminoasitlere bağlı olan papain ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz gibi enzimler, radikallere maruz kaldıkları zaman inhibe olurlar. Stoplazmik ve membran proteinleri, çapraz bağlanma sonucu dimerleşirler. Çok aktif olan HO[•] radikalleri, peptit ve aminoasitlerde hidrosilasyona neden olarak onların yapı ve fonksiyonlarını bozarlar [98].

Nükleik asitler ve DNA

Her türlü radyasyon (uv, X ışınları v.b.) hücrelerde iyonların, serbest radikallerin ve enerji kazanmış moleküllerin oluşmasına neden olur. Hidroksil radikalleri, DNA' daki heterosiklik bazlarla ve deoksiriboz-fosfatlarla reaksiyon verirler. Reaksiyon sonucu, DNA bazlarını modifiye eder ve riboz-fosfat zincirinin kırılmasına yol açar. İnvitro olarak sulu çözeltilerde yapılan çalışmalarda, HO[•] radikalinin, deoksiriboz ve tetrasiklikbazlarla kolaylıkla reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Fakat, çift zincirli DNA molekülünde, heterosiklik bazlar HO[•] radikallerine karşı sterikolarak çok iyi korunmuşlardır. Ayrıca, enzimatik radikal yakalayıcılar, öncü HO[•] radikallerinin konsantrasyonunu düşürerek DNA'yı korurlar [98].

Zar yapısındaki lipidler (lipid peroksidasyonu)

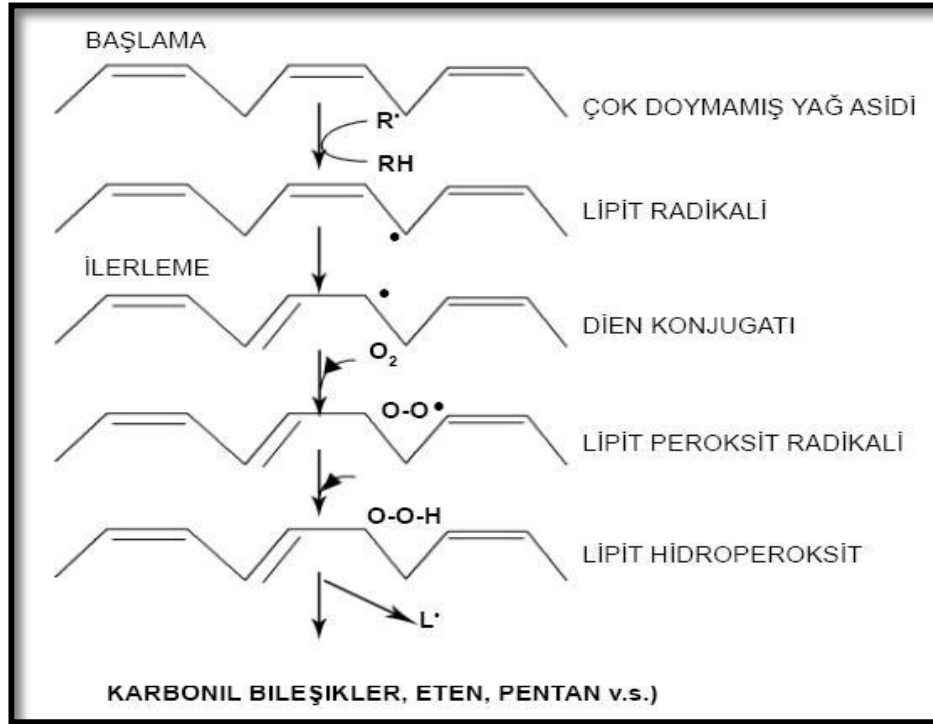
Bütün biyolojik moleküller içerisinde serbest radikallere karşı en hassas olan ve onlardan en çok etkilenen lipitlerdir. Yağ asitlerinin doymuş bağları serbest radikallere reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Ayrıca reaktif oksijen türleri karakteristik etkileriyle diğer bileşiklerden olduğu gibi lipidlerden de

elektron kopararak lipid radikalleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımına “lipid peroksidasyonu” denilmektedir. Bu durum yeni radikaller üreterek zincir reaksiyonlara neden olduğu için çok zararlıdır ve meydana gelen hasar geri dönüşümsüzdür [96].

Karbon merkezli radikaller hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluştururlar. Bu peroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup, çok uzun ömürlüdür [97].

Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum,vs.) membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidatif ataklara duyarlıdırlar. ROS’leri ile hücre hasarı meydana gelirken lipid-serbest radikaller ve lipid peroksitler de oluşmaktadır. Bu tip reaksiyonlar “Serbest Radikal Otooksidasyonu” olarak isimlendirilir ve zincirleme reaksiyonun başlatılması için bir tetikleyici (başlatıcı) faktör gereklidir. Sözü edilen bu faktörün OH• radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar arasında en önemlilerinden olan lipit peroksidasyonu, membran yapısında yer alan çok doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksijen radikallerine maruz kalması sonucunda ve dört aşamada oluşur [97].

Aşağıdaki reaksiyon akışına dikkatli bakıldığında, lipid peroksidasyonunun kendisini tetikleyerek yeniden lipid radikalleri ve peroksitleri oluşturduğu görülmektedir. Lipid peroksitlerinin konsantrasyonları arttıkça, membranların akışkanlıkları azalır ve kalsiyum gibi iyonların hücre içine geçişi kolaylaşır ve nihayet hücre fonksiyonlarında bozukluklar ortaya çıkar Bu radikal hasar oluşturma mekanizması sinir hücrelerinin lipid zengin membranlarından dolayı, birçok psikolojik hastalıkta önemli olduğu için detaylandırılmıştır [97].



Şekil 2.7. Çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyonu [97]

Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bileşiklerden aldehitler en toksik olanlarıdır ve diğer hücre bölümlerine de yayılarak hasara neden olurlar. Nonenzimatik oksidatif lipid peroksit dekompozisyonu sonucu malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) oluşur. MDA'nın asıl kaynağı ikiden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda ve eikozanoid sentezinde serbestleşen endoperoksitlerdir. MDA, protein amino gruplarına, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. Membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olur. Membranlardan kolaylıkla difüze olarak, DNA yapısında yer alan nitrojen bazlarla reaksiyona girer ve mutajen, karsinojen, genotoksik etkiler gösterir. Lipid peroksidasyonunun ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi kabul edildiğinden; peroksidasyon sırasında oluşan konjüge dienlerin ölçümü, *in vivo* lipid peroksit düzeyini yansıtabilecek önemli bir yöntemdir. MDA miktarının tiyo-barbitürik asit testi ile ölçümü bu amaçla kullanılmaktadır [97].

Sitosolik moleküller

Çözünür karakterli birçok hücre bileşeni, serbest radikalleri yokediciler görev yaparlar. Örneğin, oksihemoglobin gibi hemoproteinleri, O_2^- , ve H_2O_2 ile reaksiyona girerek methamoglobin oluştururlar. Bu reaksiyon, hemoproteinlerin, oksijen radikalleri tarafından kolaylıkla tahrip edilebileceğini göstermektedir. Diğer önemli bir sitoplazmik hemoprotein, katalaz enzimidir. Katalaz O_2^- radikali tarafından aynı şekilde tahrip edilebilmektedir. Bu tür bir reaksiyon katalaz aktivitesinin düşmesine ve hücrenin, daha çok radikal ve hidrojen peroksit tahribatına maruz kalmasına yol açmaktadır [98].

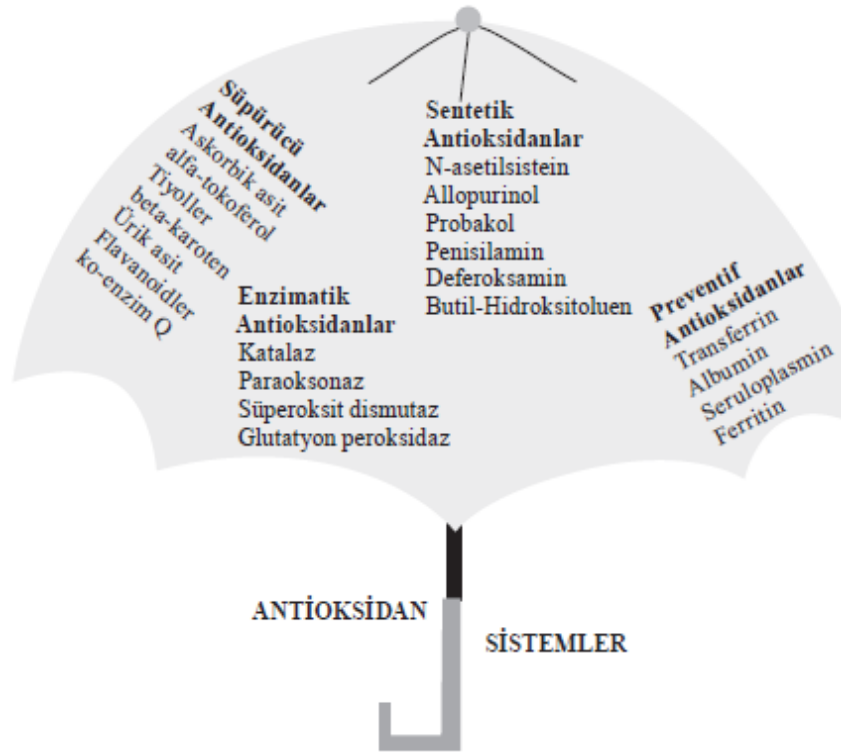
Hücre dışı etkiler

Osteoartritlerde, serbest radikallerin, kollajen ve hyaluranik asit üzerine etkileri sonucu, dejenerasyon ve buna bağlı olarak iltihabi bir durum olduğu gözlenmiştir. Sinoviyal sıvıya vizkosite sağlayan hyaluranik asit, O_2^- , radikal ile etkileşince depolimerizasyona uğrar. Süper oksit dismutaz ve katalaz, hücre dışı sıvılarda çok düşük aktiviteli olduklarından az miktardaki oksijen radikalleri bile büyük hasarlara yol açabilmektedir [98].

2.5.8. Antioksidan savunma sistemleri

ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bunlar '*antioksidan savunma sistemleri*' olarak bilinirler [99].

Hücrelerin hem sıvı kısımlarında hem de membranlarında bulunan antioksidanlar primer korumayla önleyici olarak, sekonder korumayla da oluşan lezyonların sınıflandırma ve tamirini gerçekleştirerek dört ayrı şekilde etkisi şekil 2.7.'de gösterilmiştir [96].



Şekil 2.8. Antioksidanların etki şekilleri [99]

Antioksidan moleküller endojen ve ekzojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Endojen antioksidanlar kendi içerisinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde ayrılmıştır [99].

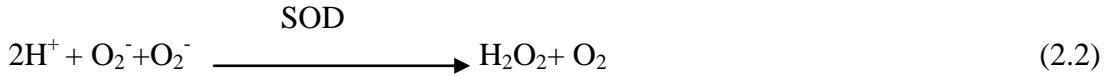
Enzimatik antioksidanlar:

Süperoksit dismutaz (SOD)

İlk kez 1969 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmış olan süperoksit dismutaz enzimi; aerobik metabolik reaksiyonlar esnasında oluşan süperoksit anyonunun, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücresel bölmelerde süperoksit düzeylerini kontrol etmede, direkt oksidatif hasara karşı hücreleri korumada anahtar role sahip bir enzimdir [96]. 3 tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve

üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir [100].

Metalloprotein olan SOD bir süperoksit molekülünü O_2^- molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit molekülünü H_2O_2 'e indirger (Eş. 2.2) [100].



Reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan savunma enzimatik bir yol oluşturmuştur. Bu yolun ilk savunmasını SOD oluşturur. SOD aktivitesiyle açığa çıkan hidrojen peroksiti suya indirgeyen glutatyon peroksidaz ve katalaz ikinci savunmayı kurarlar. Bu nedenle SOD aktivitesindeki herhangi bir artış, ikinci kademe enzimlerinin aktivitesinde artış gerektirir. Yüksek süperoksit üretimine adaptasyonu gösteren SOD artışı ile GSH- Px arasındaki dengesizlik hücrelerdeki oksidatif strese işaret eder. SOD enziminin fizyolojik önemi; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumak ve böylece lipid peroksidasyonunun başlamasını engellemektir [96].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, diyabette SOD düzeylerinin arttığı, değişmediği veya azaldığı şeklinde birbiriyle çelişen sonuçlar ortaya konulmuştur [100].

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px enzimi ilk kez 1967 yılında milis tarafından sığır eritrositlerinden izole edildi. Sonraki çalışmalarda yapısının selenoprotein olduğu gösterildi [96]. Her birinde selenosistein içeren 4 alt birimden oluşur. Redükte glutatyonu yükseltgerken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (Eş. 2.3) [100].



GSH-Px enziminin başlıca dört tipi vardır. Bunlar;

Sitolizik glutatyon peroksidaz (CGSH-Px)

Plazma glutatyon peroksidaz (PGSH-Px)

Gastro-intestinal glutatyon peroksidaz (GI-GSH-Px)

Fosfolipit glutatyon peroksidaz (PL-GSH-Px) [66].

E vitamini yetersiz olursa membranı peroksidasyona karşı korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır. Glutatyon peroksidaz yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır. Yapılan çalışmalarda diyabetli hastalarda serum glutatyon peroksidaz aktivitesinin azalmış olduğu rapor edilmektedir [100].

Glutatyon redüktaz

Yükseltgenmiş glutatyonu indirgenmiş hale çeviren 2 subünitten oluşmuş bir dimerdir. Her bir subünit 3 tane yapısal alan içerir: NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve ara yüz alan olmak üzere. Okside glutatyon bir subünitin FAD alanı ve diğer subünitin arayüz alanından oluşan bir bağlanma bölgesi vardır. Glutatyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra subünitlerdeki iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyon aktarılmış olur. Yapılan çalışmalarda diyabette glutatyon redüktaz aktivitesinin azalmış olduğu belirtilmektedir [100].

Glutatyon S- transferaz (GST)

Glutatyon S- transferazlar üç sitozolik, bir de mikrozomal gruba ayrılırlar. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rol oynarlar. Yabancı maddeleri glutatyondaki –SH grubu ile bağlayarak nötralize ederler. Bu şekilde ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlayarak organizmadan atılımını kolaylaştırırlar. GSH-Px ve PLGSH-Px enzimlerinden sonra lipit hidro peroksidlerinin detoksifikasyonunda üçüncü önemli enzimdir [96].

Katalaz

Yapısında 4 adet hem grubu bulunan katalaz enzimi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalar. (Eş. 2.4).



Peroksidaz aktivitesi gösteren katalaz enzimi peroksizomlarda lokalize olmuştur. Bu enzim büyük moleküllü lipit peroksitlerine etki etmez. Bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici substrat, diğerini de elektron alıcı olarak kullanabilir. İnsan karaciğer ve böbreklerinde yüksek konsantrasyonda katalaz mevcuttur. Katalaz enziminin yaşla birlikte aktivitesi azalmaktadır [96].

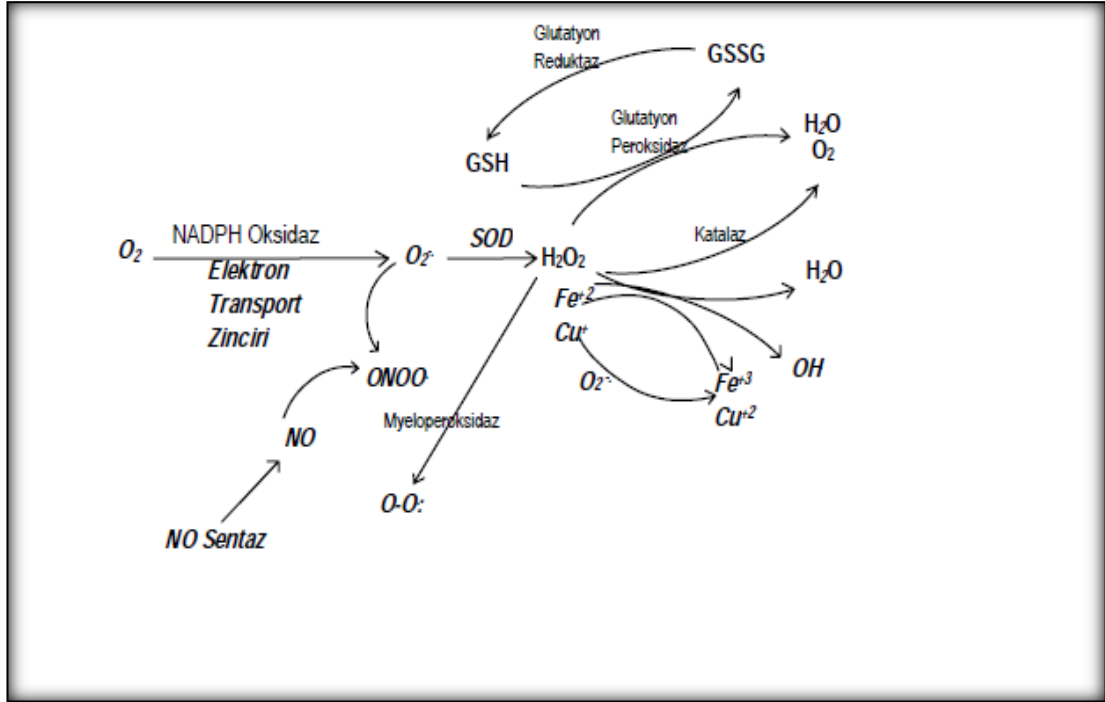
Mitokondriyal sitokrom oksidaz

Sitokrom oksidaz; elektron taşıma sisteminin son komponenti olan, bakır içeren bir hemoproteindir. Oksidasyon reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan elektronların, son akseptörleri olan oksijene transferi sırasında oksijenin kısmi indirgenmesiyle açığa çıkan süperoksit radikali, detoksifiye edilir. Ancak süperoksit oluşumu çoğu kez enzimin kapasitesini aşar ve diğer enzimlerin devreye girmesiyle zararlı etkileri engellenir [96].

Glutasyon (GSH)

Hücre içerisinde indirgen formda (GSH) bulunur. Endojen üretilen peroksidlere karşı okside olarak onları indirger. Glutasyon peroksidaz bu reaksiyonu katalizler. Glutasyon etkin olarak hücreyi koruyabilmesi için büyük kısmı redükte halde tutulmalıdır. Bu reaksiyonu da Glutasyon Redüktaz katalizler. Glutasyonun Glutasyon redüktazla indirgenmesi reaksiyonu NADPH'a ihtiyaç duyduğu için heksoz monofosfat yoluyla bağlantılıdır. Yapılan çalışmalarda diyabette GSH

düzeylerinin sağlıklı kişilerden anlamlı şekilde düşük olduğu rapor edilmektedir [100].



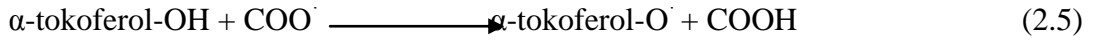
Şekil 2.9. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu [100]

Enzimatik olmayan antioksidanlar:

E vitamini (α - tokoferol)

İlk olarak Evans tarafından 1938 yılında bulunmuştur. Yağda çözünen vitamin olduğu için hem sellüler hem de subsellüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur. Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir [100]. Bileşiminde alfa, beta, gama ve delta tokoferolleri bulunduran E vitamini yağda çözünür özelliktedir. Karaciğerde depolanır ve bağışıklık sisteminde pek çok fonksiyonu vardır. Hücre zarlarında ve lipoproteinlerin yapısında bulunur. Başlıca antioksidan fonksiyonu lipit peroksidasyonunun engellenmesidir. Lipit peroksidasyonu zarlarda, eritrositlerde, lipoproteinlerde, beyinde ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) bol olduğu diğer dokularda yaygındır [101].

En aktif formu α -tokoferoldür. Zincir kırıcı antioksidan olarak fonksiyon görür. Hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen $-OH$ grubu bağlıdır. Bu yüzden lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine α -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur (Eş. 2.5) [100].



Böylece α -tokoferol yeni bir radikal olan α -tokoferol- O^\cdot e dönüştürülmüş olur [100].

C vitamini (askorbik asit)

Askorbik asit; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde olan suda eriyen bir vitamin olduğundan diğer antioksidanvitaminlerden ayrılır. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan defansı oluşturur. LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek ateroskleroza karşı korunmada yardımcı olur. Kollojen sentezinde, tirozin yıkımında, epinefrin sentezinde, safra oluşumunda ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak rol alır. Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar. Bu esnada kendisi de dehidroaskorbata okside olur. C vitamini yetersizliği durumlarında oluşan tokoferoksil radikalleri tokoferole dönüşmesi için GSH ile reaksiyona girecek ve böylece hücredeki GSH miktarını azaltacaktır. Yine plazma C vitamini düşük (0.2 mmol/L'den düşük) olduğu zaman oksidan etki de gösterebilir. Süperoksit dışında Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen başka bir ajandır. Bu şekilde demiri Fenton reaksiyonuna girmeye uygun hale getirir. Böylece plazma düzeyleri düşük olduğu zaman süperoksit üretimine katkıda bulunur [100].

Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, kemik ve dişlerin gelişimi gibi pek çok fonksiyonda görev alır. Yaraları iyileştirir ve dokuları yeniler. Kanser ve kalp

hastalıklarına karşı koruyucudur. E vitamininin rejenerasyonunda glutatyonla birlikte görev alır [101].

A vitamini (β - karoten)

A Vitaminleri görme, üreme, büyüme ve epitel dokusunun sağlamlığı için gerekli olan bir grup bileşiklerdir. Diyetteki retinolün oksidasyonu sonucu oluşan retinoik asit, retinoidlerin görme dışında diğer etkilerinin çoğuna aracılık eder. α -tokoferolle karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır. İnsan LDL'sinde α -tokoferol'ün 1/20'si oranında bulunur ve α -tokoferol bittikten sonra kullanılır [100]. Sağlıklı bir kemik yapısı için de gereklidir. Ayrıca, hücreleri kansere ve diğer hastalıklara karşı korur, yaşlanma sürecini yavaşlatır ve yağ depolanmasına yardımcı olur [101].

Enzimatik olmayan diğer antioksidanlar:

Ürik asit: İnsan kanındaki konsantrasyonu diğer memlilerden yüksek olan ürik asit, güçlü bir antioksidandır. Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir. Reaktif oksijen türlerini temizler. Kandaki miktarı, diyet pürinleri tarafından arttırılabilir. C vitamininin oksidasyonunu engelleyen ürik asidin lipid radikalleri üzerinde etkisi yoktur [96].

Albümin: Kanda serbest yağ asitlerinin ve bilirubinin taşıyıcısıdır. Albümin, yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu ile bakır iyonlarını bağlar ve lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. LOOH ve HOCl toplayıcısı olan albüminin, fizyopatolojik şartlarda nötrofillerin ürettiği reaktif oksijen türlerini tutarak, doku ve molekülleri oksidatif strese karşı koruduğu belirtilmiştir [96].

Transferin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlayıp temizleyen proteindir. Transferrinin kompleksleştirdiği ferik demir, reaktif oksijen türlerinin oluşmasında inaktiftir. Laktoferrin de dolaşımdaki bir diğer demir bağlayıcısıdır [96].

Serüloplazmin: Plazmada bulunan bakırın %90'ını taşıyan serüloplazmin, bakırı bağlayarak Fenton reaksiyonunu engeller [96].

Bilirubin ve sistein: Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır [96].

Melatonin (MLT): Lipofilik bir antioksidandır. Aynı zamanda pineal bezden salgılanan ve tümör oluşumunun sınırlandırılması, immun sistemin düzenlenmesi, reproduktif fonksiyonların kontrolü gibi fonksiyonlara sahip bir hormondur. Lipofilik olduğu için hücrenin bütün organellerine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyerini de geçerek geniş bir alanda etki gösterir. Yapılan çalışmalarda diyabette artmış oksidatif stresi azalttığı belirtilmektedir. Bilinen en reaktif radikal olan hidroksil radikali ile reaksiyonu sonucu indolil katyon radikali oluşturur. Bu radikal de ortamdaki süperoksit radikalini tutarak etkisizleştirir [100].

Çizelge 2. 11. Önemli antioksidanlar ve doku lokalizasyonları [96].

I-Enzimatik	Doku Lokalizasyonu
- SOD - GSH redoks sistemi GSH-peroksidaz GSH-redüktaz -Katalaz	Mitokondri ve sitozol Sitozol ve mitokondri Sitozol ve mitokondri Peroksizomlar
II- Non-Enzimatik	
a) Yağda Çözünenler	
- E Vitamini - A Vitamini - Ubiquinol	Membranlar ve ekstraselüler sıvı Membranlar Mitokondri
b) Suda Çözünenler	
-C Vitamini - Glutasyon - Ürik asit - Albümine bağlı bilirubin	İntraselüler ve ekstraselüler sıvıda yaygın İntraselüler Genel dağılımlı Plazma

Çizelge 2. 11. (Devam) Önemli antioksidanlar ve doku lokalizasyonları [96].

c) Demir ve Bakır Bağlayan Proteinler	
- Albumin	Plazma
- Transferrin	Plazma
- Serüloplazmin	Plazma

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Protokolü

Çalışmalara, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan (G. Ü. ET-10.118) izin alınarak başlandı. Deneylerde Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM) 'nden sağlanan 200-250 g ağırlıkta 36 adet Wistar albino dişi rat kullanıldı. Doku örneklerinin alınmasına kadar olan tüm aşamalar GÜDAM laboratuvarında yapıldı. Deney öncesi ve deney sırasında ad libitum olarak beslenen hayvanlar, deney süresince gruplar tek tek kafeslerde olmak üzere gün ışığı döngüsü paralelinde aydınlanan ortamda bakıldı. Alınan doku örnekleri Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Fizyoloji-Biyokimya araştırma laboratuvarında analiz edildi.

3.2. VEGF Preparatının Hazırlanması

Deneylerde kullanılan VEGF preparatı (VEGF içeren kitosan jel) Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında hazırlandı.

Kitin, eklem bacaklı kabuklarının, mantar ve maya hücre duvarlarının büyük bir yapısal bileşenidir. Kitinin ana kaynakları yengeç ve karides kabuklarıdır [103]. Kitosan ise, kitin'in deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir. Biyoparçalanabilir ve biyogeçimli olan kitosan, farklı viskozite, molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecelerine sahiptir. Popülaritesi gittikçe artan, farmasötik ve medikal alanda ilgi çeken bir biyomateryaldir [104].

Çalışmamızda kullanılan kitosan jel formülasyonunun, deri pH' sına uygun değerde olması için çeşitli laktik asit oranları; kullanıma uygun viskozitede olması için de çeşitli kitosan oranları denendi. İlk olarak % 1' lik ve % 1,5' luk laktik asit oranları ile çalışıldı. Kitosanın (Sigma, C-3646) % 1' lik, % 2' lik ve % 3' lük jelleri farklı laktik asit derişiminde hazırlandı. Kullanılacak olan distile suyun yarısına laktik asit, eklendi ve gereken miktarda kitosan ilave edilip manyetik karıştırıcıda yavaşça

karıştırıldı. Kitosan şıştikten sonra distile suyun geri kalan kısmı eklendi ve karıştırıldı. Oluşan hava kabarcıklarının çıkması için oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Jellerin pH' ları ölçüldü. Kitosan jellerin pH' sının deri pH' sına (yani pH 4-5) yakın olması gerektiği için bu değere en yakın pH'ya sahip jelin kullanılmasına karar verildi. Sonuç formülasyonun bileşenleri % 3 kitosan ve % 1 laktik asit olarak belirlendi. Formülasyonun pH' sı 4,7 olarak ölçüldü. Kitosan jel hazırlandıktan sonra VEGF 'nin (Sigma V3638) son konsantrasyonu 7 ng/ml olacak şekilde jel üzerine disperse edilmesiyle VEGF içeren kitosan jel hazırlandı.

3.3. Diyabet Modelinin Oluşturulması

Diyabet oluşturmak için ratlara (toplamda 36 adet) 12 saatlik açlık sonrası tek doz 55 mg/kg Streptozotosin (STZ) intraperitoneal (i.p.) yolla enjekte edildi. 3 gün sonra kan glukoz seviyeleri ölçüldü ve 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabet olarak kabul edildi. Diyabet oluşturulduktan 7 gün sonra, yara modelleri oluşturuldu.

3.3. Yara Modelinin Oluşturulması

Deney hayvanları bir gün aç bırakılarak sabah saat 10:00' da standart terazide ağırlıklarına göre tartıldı. İntramüsküler olarak ketamin (Ketalar 50 mg/kg) ve ksilazin (Rompun 5 mg/kg) enjekte edilerek genel anestezi sağlandı. Hayvanların dorsalinde, omurganın her iki yanında 5 cm uzunluğunda olacak şekilde dorsolateral eksizyonel kesi yaraları yapıldı. Daha sonra yara dudakları sütur ile adapte edildi. Operasyon sonrası analjezinin sağlanması için farmakolojik ajan olan parasetamol içme suyuna 2 mg/ml olacak şekilde kullanıldı.

VEGF uygulanan gruptaki ratların yaralarına her gün birer kez topikal yolla kitosan jel içerisinde VEGF (7 ng/ml) yaklaşık olarak aynı saatte uygulandı. Kitosan grubunda ise aynı miktarda boş kitosan jel uygulandı.

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Her grupta 6 adet olmak üzere 6 ayrı rat grubu oluşturuldu ve gruplara aşağıdaki işlemler uygulandı.

Diyabetli Tedavisiz Gruplar

1.Grup: Diyabet oluşturulduktan sonra sadece yara yapılan grup (iyileşmenin 3. günü feda edildi) (n=6)

2.Grup: Diyabet oluşturulduktan sonra sadece yara yapılan grup (iyileşmenin 7. günü feda edildi) (n=6)

Diyabetli Kitosan jel Kontrol Grupları

3.Grup: Diyabet oluşturulduktan sonra yara yapılarak, kitosan jel uygulanan grup (iyileşmenin 3. günü feda edildi) (n=6)

4.Grup: Diyabet oluşturulduktan sonra yara yapılarak, kitosan jel uygulanan grup (iyileşmenin 7. günü feda edildi) (n=6)

Diyabetli VEGF Uygulanan Gruplar (Kitosan+VEGF)

5.Grup: Diyabet oluşturulduktan sonra yara yapılarak, kitosan jel içerisinde VEGF uygulanan grup (iyileşmenin 3. günü feda edildi) (n=6)

6.Grup: Diyabet oluşturulduktan sonra yara yapılarak, kitosan jel içerisinde VEGF uygulanan grup (iyileşmenin 7. günü feda edildi) (n=6)

Denekler kronobiyolojik sıraya uygun olacak şekilde operasyonu izleyen 3 ve 7. günlerde anestezi altındayken kalplerinden kan çekilmek suretiyle feda edildi ve yara dokusu hemen çıkarılıp bulaşmayı önleyici materyale sarıldıktan sonra sıvı azot içerisine konularak donduruldu ve -30 °C'de muhafaza edildi.



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

3.6. Yöntemler

3.6.1. Dokuda NO_x tayin yöntemi

Dokulardaki NO_x konsantrasyonu Griess yöntemi ile çalışıldı [102]. Dokular, 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH:7) ile (1:9) homojenize edildikten sonra, 3500 rpm' de 15 dk santrifüj edildi ve NaOH eklenerek inkübe edildi. 200 µL süpernatanta, ortamdaki nitrati nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda VCl₃ eklendi ve 37 °C' de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklendi. 37 °C' de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm' de okundu. 6,4 mM'lık stok sodyum nitrit (NaNO₂) standartı günlük olarak dilüe edilerek, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 µM konsantrasyonlarda standartlar elde edildi. Hazırlanan standart eğriden dokulardaki NO_x konsantrasyonu µmol/g doku olarak hesaplandı.

3.6.2. Dokuda TBARS tayin yöntemi

Dokudaki TBARS düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemiyle çalışıldı [103]. Doku örnekleri tartıldı. Homojenizatör ile KCl içinde homojenize edildi ve homojenata soğuk TCA eklenerek 2000 g' de 10 dk santrifüj edildi. Daha

sonra süpernatant alınarak üzerine TBA ve BHT eklendi. Numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 535 nm'de, köre karşı okundu. Dokulardaki TBARS konsantrasyonu nmol/g doku olarak hesaplandı.

3.6.3. Dokuda GSH tayin yöntemi

Dokuda glutasyon tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı [104]. Doku örnekleri TBARS yöntemindeki gibi homojenize edilip, reaktif karışımı (NaCl+ meta fosforik asit +EDTA/ d. su) eklenir, 4000 rpm de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant, Na₂HPO₄ ve DTNB çözeltisi ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5-10 dk inkübe edildikten sonra karışımın absorbansı spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Dokulardaki GSH konsantrasyonu µmol/g doku olarak hesaplandı.

3.6.4. Dokuda AA tayin yöntemi

Roe ve Kuether' in Berger tarafından modifiye edilmiş metodu kullanıldı [105]. Doku PCA/EDTA karışımı içinde buz soğukluğunda homojenize edildi. Homojenat 15000 x g devirde 3 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Bir tüpe standart AA çözeltisi, başka bir tüpe kör için PCA çözeltisi ve örneklerin hazırlanacağı tüplere süpernatant konuldu. Her bir tüpe renk reaktifi eklenip vortekslenerek 3 saat 37 °C' de inkübe edildi. Numunelerin ısısı 0 °C' ye getirilip her bir tüpe H₂SO₄ eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 45 dk bekletildi. Numuneler 515 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu. Dokulardaki AA konsantrasyonu mg/g doku olarak hesaplandı.

3.6.5 Dokuda SOD tayin yöntemi

Dokulardaki SOD aktivitesi, Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre çalışıldı [106]. 10 kat serum fizyolojik ile homojenize edilen dokular, 7000 rpm' de 4 °C' de 30 dk santrifüj edildikten sonra, 1 ml süpernatanta etanol-kloroform (3:5,v/v) karışımından 1 ml eklendi. Süpernatantlar tekrar 7000 rpm' de 60 dk santrifüj edildikten sonra 0,5

ml süpernatana 2,45 ml reaktif karşımı (3 mM ksantin, 0,6 mM EDTA, 150 µM NBT, 400 mM Na₂CO₃, 1g/L BSA) ve 50 µl ksantin oksidaz eklendi. 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra CuCl₂ ilavesi ile reaksiyon sonlandırılıp numuneler spektrofotometrede 560 nm' de köre karşı okundu. 1 ünite SOD' un NBT 'nin indirgenmesini %50 oranında inhibe ettiği kabul edilerek dokulardaki SOD aktivitesi U/g doku olarak hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Bütün değerler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi ve Anova varyans analizi testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Diyabetli tedavisiz guruplar, diyabetli kitosan jel kontrol gurupları, diyabetli VEGF uygulanan guruplar (Kitosan+VEGF) ‘daki yara dokusuna ait NOx, TBARs, GSH, AA seviyeleri ve SOD aktivitesi Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yara dokusunda NOx, TBARs, GSH, AA seviyeleri ve SOD aktivitesi

		NOx ($\mu\text{mol/g doku}$)	TBARs (nmol/g doku)	GSH ($\mu\text{mol/g doku}$)	AA (mg/g doku)	SOD (U/g doku)
Diyabetli Tedavisiz Guruplar (n=12)	3.gün (n=6)	383,61 \pm 30,06	22,12 \pm 5,37	0,84 \pm 0,32	0,10 \pm 0,01	286,75 \pm 11,07
	7.gün (n=6)	233,85 \pm 33,09 ^a	22,15 \pm 6,72	1,18 \pm 0,79	0,10 \pm 0,01	295,46 \pm 7,36
Diyabetli Kitosan jel Uygulanan kontrol Grupları (n=12)	3.gün (n=6)	252,86 \pm 55,93 ^a	20,96 \pm 5,63	1,33 \pm 0,65	0,13 \pm 0,03	293,42 \pm 13,37
	7.gün (n=6)	303,54 \pm 83,77	26,50 \pm 5,41	1,57 \pm 0,96	0,16 \pm 0,01 ^b	285,86 \pm 9,24
Diyabetli VEGF Uygulanan Gruplar (n=12)	3.gün (n=6)	134,54 \pm 75,99 ^{a,c}	33,02 \pm 5,28 ^{a,c}	2,55 \pm 1,16 ^{a,c}	0,15 \pm 0,01 ^a	293,69 \pm 3,84
	7.gün (n=6)	233,69 \pm 78,17 ^e	33,43 \pm 8,88 ^b	1,13 \pm 0,40 ^e	0,14 \pm 0,01 ^b	289,03 \pm 4,26

a p< 0,05 diyabetli tedavisiz grubun 3. günü ile karşılaştırıldığında

b p< 0,05 diyabetli tedavisiz grubun 7. günü ile karşılaştırıldığında

c p< 0,05 diyabetli kitosan jel uygulanan grubun 3. günü ile karşılaştırıldığında

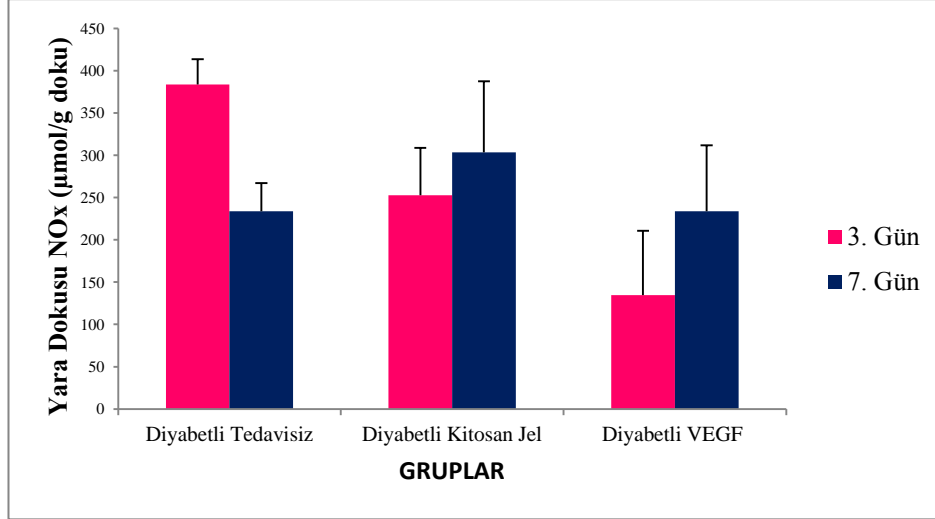
d p< 0,05 diyabetli kitosan jel uygulanan grubun 7. günü ile karşılaştırıldığında

e p< 0,05 diyabetli VEGF uygulanan grubun 3. günü ile karşılaştırıldığında

NOx Seviyeleri

Diyabetli tedavisiz guruplar kendi içinde değerlendirildiğinde NOx seviyelerinin 7. günde 3. güne göre anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (p<0,05). Diyabetli kitosan jel uygulanan grubun 3. günü, diyabetli tedavisiz grubun 3. günü ile karşılaştırıldığında NOx seviyesinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (p<0,05). Diyabetli VEGF uygulanan grubun 3. günü, diyabetli tedavisiz grubun ve diyabetli kitosan jel uygulanan grubun 3. günleri ile karşılaştırıldığında NOx seviyelerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (p<0,05). Diyabetli VEGF uygulanan grubun 7. gününde 3. gününe göre anlamlı artış tespit edilmiştir (p<0,05). Diyabetli kitosan jel

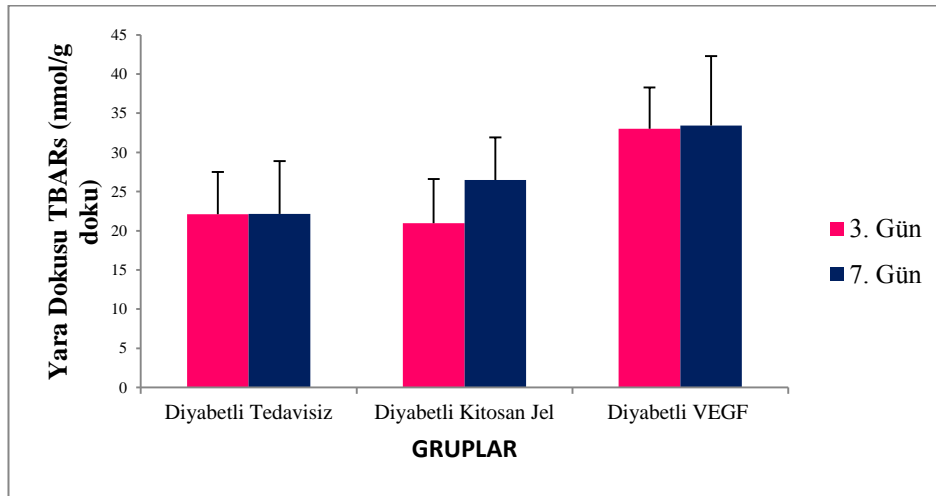
uygulanan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde NOx seviyelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.1) ($p>0,05$).



Şekil 4.1. Gruplara ait NOx seviyelerinin günlere göre değişimi

TBARs Seviyeleri

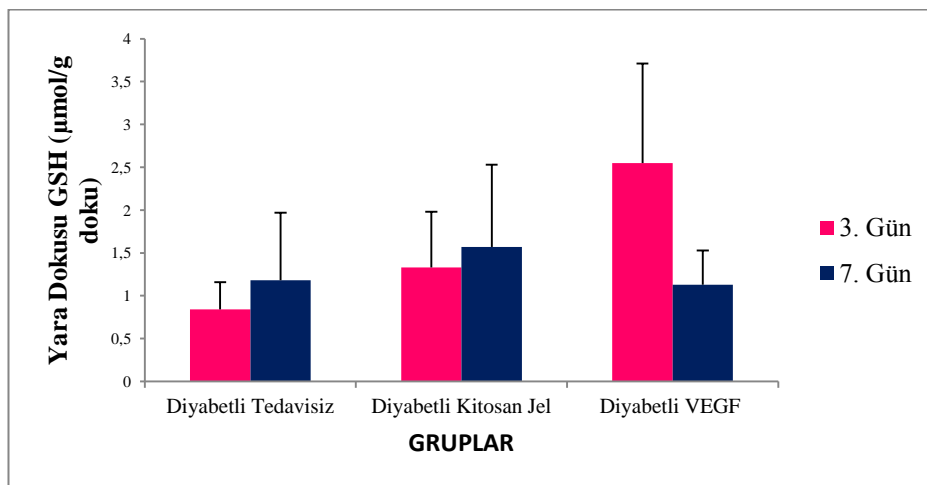
Diyabetli tedavisiz, diyabetli kitosan jel uygulanan ve diyabetli VEGF uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde TBARs seviyelerinde 3. ve 7. günler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Diyabetli VEGF uygulanan grubun 3. günü diyabetli tedavisiz grubun ve diyabetli kitosan grubunun aynı günleri ile karşılaştırıldığında her iki gruba göre de TBARs seviyesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Diyabetli VEGF uygulanan grubun 7. günü, diyabetli tedavisiz grubun aynı günü ile karşılaştırıldığında TBARs seviyesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Şekil 4.2) ($p<0,05$).



Şekil 4.2. Gruplara ait TBARS seviyelerinin günlere göre değişimi

GSH Seviyeleri

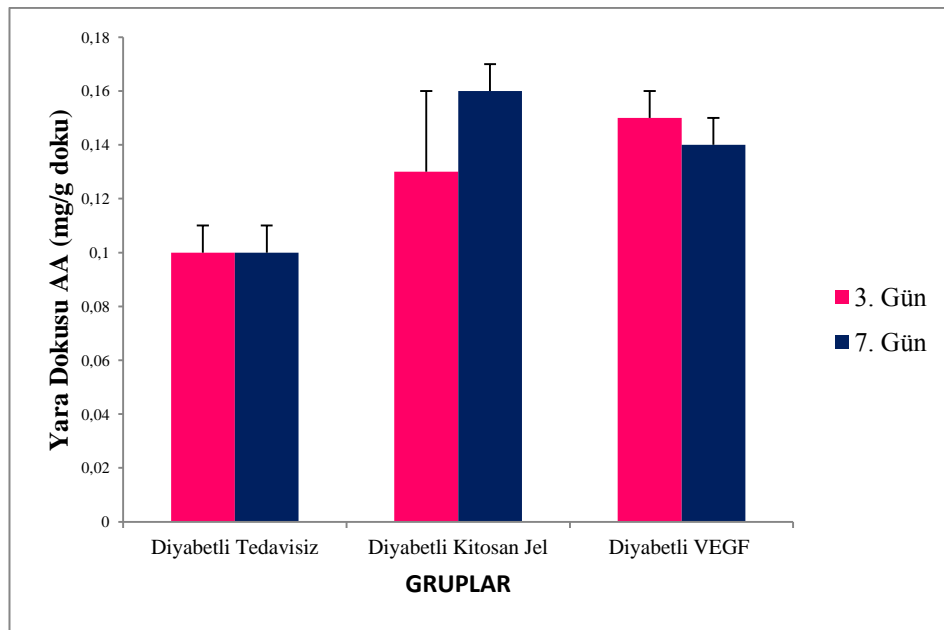
Diyabetli VEGF uygulanan grubun 3. günü diyabetli tedavisiz grubun ve diyabetli kitosan jel uygulanan grubunun aynı günleri ile karşılaştırıldığında her iki gruba göre de GSH seviyesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Diyabetli VEGF uygulanan grup kendi içerisinde değerlendirildiğinde GSH seviyesinin 7. günde 3. güne göre anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Diyabetli tedavisiz ve diyabetli kitosan jel uygulanan gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde 3. ve 7. günler arasında GSH seviyelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.3) ($p > 0,05$).



Şekil 4.3. Gruplara ait GSH seviyelerinin günlere göre değişimi

AA Seviyeleri

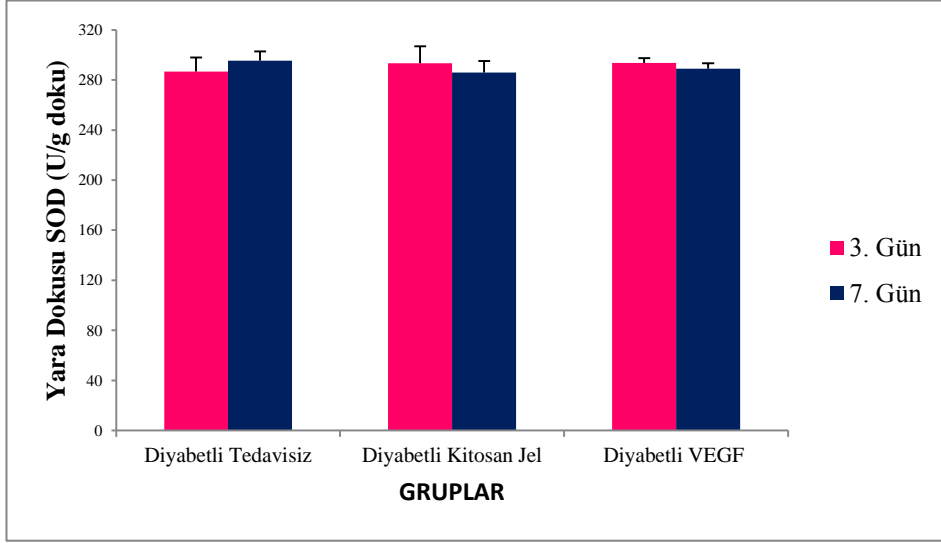
Diyabetli kitosan jel uygulanan grubun 7. günü diyabetli tedavisiz grubun aynı günü ile karşılaştırıldığında AA seviyesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Diyabetli VEGF uygulanan grubun 3. günü diyabetli tedavisiz grubun aynı günü ile karşılaştırıldığında AA seviyesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Diyabetli VEGF uygulanan grubun 7. günü diyabetli tedavisiz grubun aynı günü ile karşılaştırıldığında AA seviyesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bütün gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde 3. ve 7. günler arasında AA seviyelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.4) ($p>0,05$).



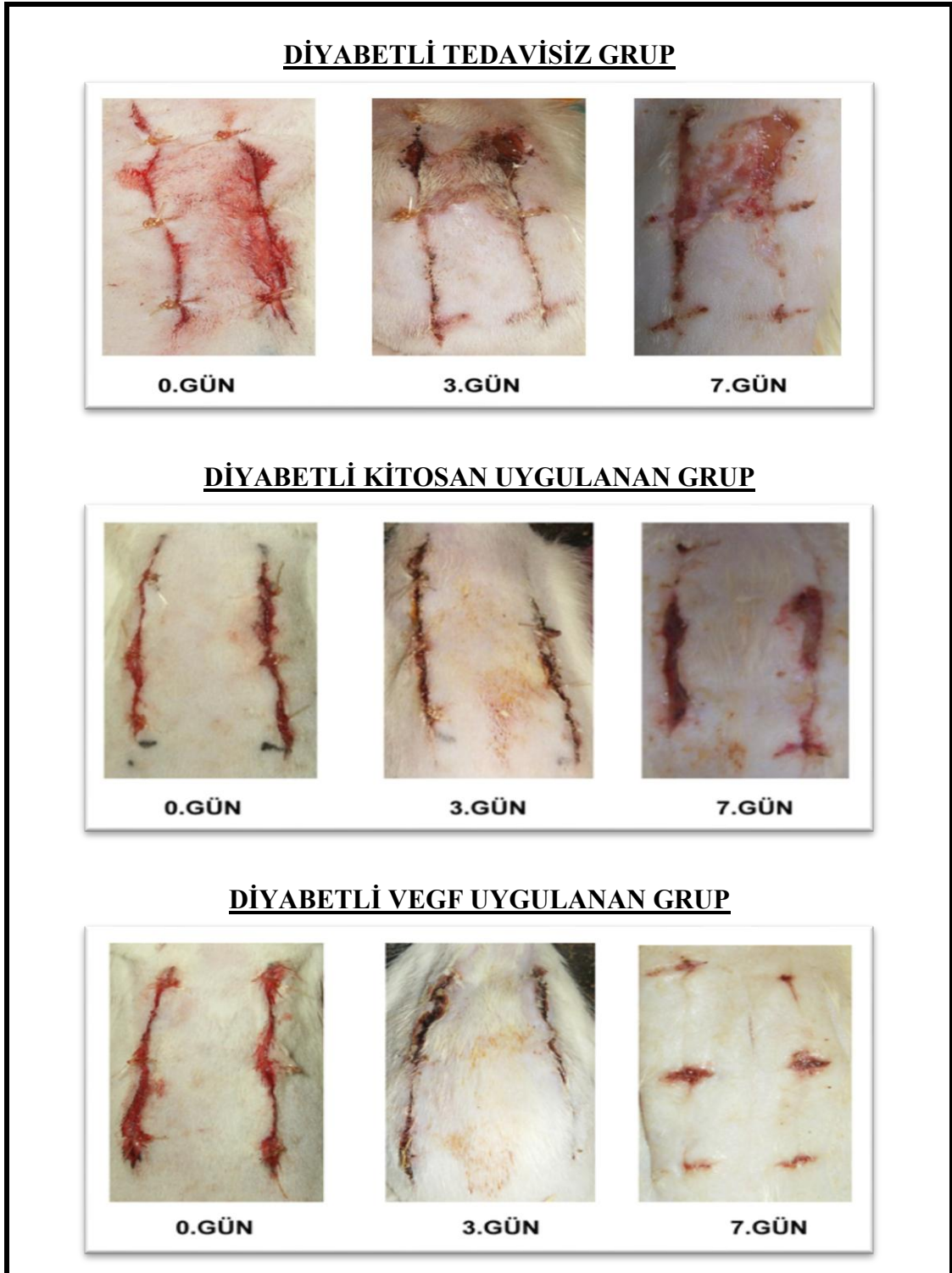
Şekil 4.4. Gruplara ait AA seviyelerinin günlere göre değişimi

SOD Aktiviteleri

SOD aktivitesi bakımından hem gruplar arası hem gruplar içinde 3. ve 7. günlere ait değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.5) ($p>0,05$).



Şekil 4.5. Gruplara ait SOD aktivitelerinin günlere göre değişimi



Resim 4.1. Deney gruplarının tümüne ait kesi yaralarının morfolojik görüntüleri

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Yara, cilt ve mukozayı oluşturan yapıların çeşitli nedenlerle anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün geçici ya da tamamen bozulması olayıdır [31,32,34]. Yaranın oluşmasını takiben iyileşme süreci başlar. Yara iyileşmesi travma ile başlayan ve yeni doku oluşumu ile sonuçlanan hücresel ve biyokimyasal olaylar sürecidir [107].

Yara iyileşmesinin tüm fazları büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır [61]. Yara iyileşmesi için büyüme faktörleri gerekli düzenleyicilerdir ve iyileşme sürecine etkileri kapsamlı olarak araştırılmaktadır [108–112]. Önemli büyüme faktörlerinden biri olan Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için spesifik etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. Endotel hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve diffarensiyasyonunu sağlar. VEGF'nin damar oluşumunda ve endotel hücrelerinin yaptığı birçok fonksiyonda gerekli olduğu; özellikle yara iyileşmesi, tümör büyümesi ve birçok hastalığı kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylarda rol oynadığı görülmüştür [66]. Diyabet değişik etiyolojilere bağlı ve değişik komplikasyonlara yol açan, heterojen bir metabolik bozukluktur [113]. Diyabetli hastalarda anjiyogenezin ve reepitelizasyonun geciktiği, kollajen birikiminin ve endotelial hücre proliferasyonunun azaldığı görülmüştür. Büyüme faktörlerinin yeteri kadar sentezlenememesi veya yıkımındaki artışın bunun en önemli nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir [114]. Oksidatif stres serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller yönüne bozulmasıdır. Bunun da diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonlarına neden olduğu pek çok araştırıcı tarafından vurgulanmaktadır [16,17]. Yara iyileşmesi sırasında etki gösteren VEGF, diyabetik mikrovasküler komplikasyonların patogenezinde rol oynayan çok fonksiyonlu bir sitokindir [114]. Topikal VEGF uygulanmasının yara iyileşme oranının artırılması ve yara alanının kapanması üzerine olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [115,30].

Çalışmamızda, diyabetli tedavisiz grupların NOx seviyeleri kendi içinde değerlendirildiğinde, 7. günde 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma

tespit edilmiştir ($p<0,05$). NO_x seviyesinin 3. günde yüksek bulunmasının sebebi özellikle inflamasyon fazında yara bölgesine lökositlerin göç etmesi ve NO_x'in vazodilatasyonda rol oynaması olduğu düşünülebilir.

Diyabetli kitosan jel uygulanan gruplarda NO_x seviyesi tedavisiz gruplara göre 3. günde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hwang ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada, kitin ve kitosanın aktif makrofaj hücre kültüründe NO üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir [116]. Hücre kültürü çalışması da göz önüne alındığında, kitosanın bu dozda diyabetik yara iyileşmesinin özellikle erken evrelerinde nitrik oksit sentezini baskıladığı düşünülebilir.

Diyabeti takiben VEGF uygulanan grubun 3. gününde NO_x seviyesi hem diyabetli tedavisiz gruba göre hem de diyabetli kitosan gruba göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). Diyabetli VEGF uygulanan grubun 7. gününde ise diyabetli kitosan grubuna göre bir azalma görülmüş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Nitrik oksit makrofajların da rol oynadığı sitotoksik ve antimikrobiyal aktivite içinde rol alır. Aynı zamanda yüksek nitrik oksitin düzeyi sağlıklı dokuyu da harap edici etkiye sahip olabilir. Nitrik oksitin hücre harabiyetini birçok mekanizmalarla yaptığı saptanmıştır, NO'nun hem vazodilatasyon oluşturucu hem de antiproliferatif etkilerinin önlenmesi diyabetin komplikasyonlarının gelişiminde önemli bir rol alır [117]. Nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin 3 izoformu aracılığıyla NO üretildiği bilinmektedir. İmmünolojik uyaranlarla indüklenen ve hemen hemen tüm çekirdekli hücrelerde bulunan indüklenebilir iNOS da bunlardan biridir [118]. İnflamatuvar sitokinler, inflamasyona erken cevabın düzenlenmesine katılırlar ve süperoksit üretimi ile iNOS iyi bilinen indükleyicileridir [119]. Nitrik oksitin yara iyileşmesinde olumlu etkisi koruyucu olarak etki göstermesinin beklenmesine rağmen Bouloumie ve ark. (1997) ratlarda yaptıkları bir çalışmada, iNOS' daki artışın aort endotel fonksiyonlarında gelişmeden ziyade gerileme ile korele olduğunu gözlemişlerdir [120].

Diyabeti takiben VEGF uygulanan grubun 3. gününde lipid peroksidasyonunun son ürünü olan TBARs seviyesi, hem diyabetli tedavisiz gruba göre hem de diyabetli kitosan grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Diyabetli VEGF uygulanan grubun 7. gününde de diyabetli tedavisiz gruba göre anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$).

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehitin belirlenmesi için kullanılan TBARs seviyesinin diğer iki gruba göre anlamlı olarak artmış olması nedeniyle VEGF' nin özellikle iyileşmenin erken evrelerinde bu dozda ROS üretimini arttırmış olabileceği söylenebilir. Büyüme faktörlerinin, kemotaktik ve yara bölgesine hücrelerin göçünü arttırıcı etkileri vardır [37]. Yara iyileşmesinin inflamasyon evresinde hakim olan bu fagositik hücreler bakteri kontaminasyonunu kaldırırken NADPH oksidaz enzimi aracılığıyla ROS üretimi yapmaktadır [121].

Diyabetli VEGF uygulanan grupta TBARs seviyesinin diğer gruplara göre anlamlı olarak artması, VEGF uygulamasının NO'nun yanı sıra diğer radikallerin de artışına sebep olduğunu ve bu sebeple de lipid peroksidasyonu artarken oluşan radikallerin NO ile etkileşimi sonucu NO'yu ortamdan uzaklaştırmış olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla büyüme faktörünün yara dokusunda serbest radikal oluşumunu arttırdığını ve radikal radikal ilişkisi kurarak NO miktarını azalttığı düşünülebilir. Diyabetli VEGF uygulanan grubun TBARs seviyesinin 7. gününde 3. gününe göre anlamlı artış olması etkinin uzun süreli olduğunun belirteci olabilir.

GSH, glutamik asit, glisin ve sistein'den oluşan bir tripeptittir. Organizmada serbest radikallerin ve çeşitli toksik maddelerin zararsız hale getirilmesinde görev alır [122]. VEGF uygulanan gruplarda GSH seviyesi 3. günde hem tedavisiz gruba hem de kitosan jel uygulanan gruba göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,05$).

Çalışmamızda, diyabetli VEGF uygulanan gruplarda GSH seviyesinde ki bu artışın, VEGF'nin radikalik etkisini ortadan kaldırmak amacıyla meydana geldiği düşünülebilir. Diyabetli VEGF uygulanan grup kendi içinde değerlendirildiğinde ise 7. günde görülen azalmanın, 3. günde miktarı artan GSH'ın büyüme faktörünün radikalik etkisini ortadan kaldırmak amacıyla kullanılıp zamana bağlı olarak normal

değerler seviyesine inmesi olarak yorumlanabilir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, VEGF'nin GSH miktarını arttırarak yara dokusu antioksidan kapasitesinin artmasına katkıda bulunmuş olabileceği söylenebilir.

Diyabeti takiben VEGF uygulanan grup ile diyabetli tedavisiz grubun 3 ve 7. günleri ile karşılaştırıldığında, VEGF uygulanan grubun AA düzeylerinde anlamlı bir artış görülmüştür. ($p<0,05$). Kitosan uygulanan grup ile tedavisiz grubun 7. günü ile karşılaştırıldığında da, kitosan uygulanan grubun AA düzeyinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. ($p<0,05$).

AA plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan savunmayı oluşturur. E vitaminin geri dönüşümünde görev alır, tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar [123].

Sonuç olarak, AA güçlü bir antioksidan olmasının yanı sıra kollajen yapımı için de gereklidir. VEGF'nin radikalik etkisini ortadan kaldırmak amacıyla askorbik asit seviyesini arttırarak yara dokusundaki enzimatik olmayan antioksidan kapasitenin artmasına katkı sağlamış olabilir.

Diyabeti takiben VEGF uygulanan grup ile diyabetli diğer grupların SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Çalışmamızın SOD sonuçları bize yara dokusunda diğer antioksidanların devreye girdiğini düşündürmektedir.

Bulgular sonucunda; yara iyileşmesi tedavisinde aracı olarak kullandığımız kitosanın bu dozda kullanıldığında, yara iyileşmesindeki oksidatif olaylar üzerine etkili olduğu görülmüştür. VEGF içeren kitosan jelin ise genel olarak bu dozda toksik etki gösterdiği, radikal radikal etkileşimine neden olduğu söylenebilir.

Bu bilgiler ışığında, diyabetik ratlarda yara dokusuna topikal olarak uygulanan VEGF içeren kitosan jelin kullanılan dozda inflamatuvar yanıtları arttırdığı ve buna bağlı olarak oksidan ve antioksidan seviyelerini günlere göre değiştirdiği çalışmamız

sonucunda görülmüştür. Gelecek çalışmalarda yara iyileşmesinde olumlu etkileri olan VEGF'nin farklı dozları ve farklı tedavi süreleri kullanılarak oksidatif olaylar üzerine etkileri daha detaylı olarak incelenmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Arab, A., Orakçı, V., Erbilien, M., Şahin, M., “Yara iyileşmesi”, *J Turgut ozal med cent* , 1(2): 160- 166 (1994).
2. Schilling, J. A., “Wound healing”,*Surg Clin North Am.*, 56(4): 859- 874 (1976).
3. İnternet: Cumhuriyet Tıp Fakültesi “yara iyileşmesi”,
<http://www.ctf.edu.tr/kbb/.../Yara%20iyileşmesi-Dr.Levent.ppt> (2012)
4. Martin, P., “Wound healing - aiming for perfect skin regeneration”, *Science*, 276: 75-81 (1997).
5. Singer, A. J., Clark, R. A., “Cutaneous wound healing”, *N Engl J Med*, 341: 741-786 (1999).
6. Hom, D. B., “Wound healing in relation to scarring” *Facial Plast Surg Clin North Am*, 6:11 (1998).
7. Gantwerker, E. A., Hom, D. B., “Skin: histology and physiology of wound healing”, *Facial Plast Surg Clin North Am*, 19:441-453 (2011).
8. Wilgus, T. A., Ahalia, M. F., et al., “Regulation of scar formartion by vascular endothelial growth factor”, *Lab Invest.*,88: 579-590 (2008).
9. Gurtner, G., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M. T., “Wound repair and regeneration”, *Nature*, 453: 314- 321 (2008).
10. Schremi,S., Szeimies R. M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M., Babilas, P., “Oxygen in acute and chronic wound healing”, *Br J Dermatol.*, 163: 257-268 (2010)
11. Rodero, M., Khosrotehrani K., “Skin wound healing modulation by macrophages”, *Int J Clin Exp Pathol*, 3(7): 643-653 (2010).
12. Przybylski, M.,” A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis”, *J Wound Care.*, 18(12): 516-519 (2009).
13. Calvin, M., “Cutaneous wound healing”, *Wounds*, 10(1): 12-32 (1998).
14. Krishnamoorthy, L., Morris, H, L., Harding, K, G., “A dynamic regulator: the role of growth factors in tissue repair”, *J Wound Care.*, 10(4): 99-101 (2001).
15. Casey, G., “Wound healing--repair at the expense of function”, *Nurs N Z.*,17(6):22-7 (2011).

16. Memişoğulları, R., “Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi”, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:30-39 (2005).
17. Vincent, A. M., Russell, J.W., Low, P., Feldman, E. L., “ Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy”, *Endocrine Reviews*, 25: 612–628 (2004).
18. Senger, D. R., Galli, S. J., Drovak A. M., et al., “Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid”, *Science*, 219: 983-985 (1983).
19. Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., et al., “Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen”,*Science*, 246: 1306-1309 (1989).
20. Connolly, D. T., Heuvelman D. M., Nelson, R., et al.,“Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis”, *J Clin Invest*, 84: 1470-1478 (1989).
21. Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter J., “The biology of VEGF and its receptors”, *Nat Med*, 9: 669- 676 (2003).
22. Nissen, N. N., Polverini, P. J., Koch, A. E., et al., “Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing”, *Am J Pathol*, 152: 1445-1452 (1998).
23. Brown, L. F., Yeo, K. T., Berse, B.,et al., “Expression of vascular permeability factor by epidermal keratinocytes during wound healing”, *J Exp Med*, 176: 1375-1379 (1992).
24. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., “Free radicals in biology and medicine”, *Oxford Uni Pres*,USA, 121-179 (2001).
25. Losi, P., Briganti, E., Errico, C., Lisella, A., Sanguinetti, E., Chiellini, F., Soldani, G., “Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice”. *Actbio.*,13:1742-61 (2013).
26. Elçin, Y. M., Dixit, V., Gitnick, G., “Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing”, *Artif Organs.*, 25(7):558-65 (2001).
27. Zhang, F., Oswald, T., M., Lin, L., Wang, S., Lin, S., Lineaweaver, W.,C., “Improvement of full-thickness skin graft survival by application of vascular endothelial growth factor in rats”,*Ann Plast Surg*, 60(5):589-93 (2008).

28. Bitto, A., Minutoli, L., Altavilla, D., Polito, F., Fiumara, T., Marini, H., Galeano, M., Cal`o M., Cascio, P. L., Bonaiuto, M., Migliorato, A., Caputi, A.P., Squadrito, F., “Simvastatin enhances VEGF production and ameliorates impaired wound healing in experimental diabetes”, *Pharmacol Res.*,57(2):159-69 (2008).
29. Infanger, M., Shakibaei, M., Kossmehl, P., Hollenberg, S.M., Grosse, J., Faramarzi, S., Schulze-Tanzil, G., Paul, M., Grimm, D., “Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model”, *J Vasc Res.*, 42(3):202-13 (2005).
30. Kirchner, L. M.,Meerbaum, S. O.,Gruber, B. S., Knoll A. K., Bulgrın J., Taylor R. A. J., Schmidt, S. P., “Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model”, *Wound Rep Reg*, 11:127–131,(2003).
31. Marks, R., Dykes, P., Motley, R., “Clinicalingsandprocedures in dermatology, 1 st ed.”, *Martin Dunitz*, London, 199;35 (1993).
32. Arnold, H. L., Odom, R. B., James, W. D., “Andews Disease of the skin, Clinical Dermatology, 8th ed”, *WB sounders company*, Philadelphia, (1990).
33. Peacock, E. E., Winkle, W. V., “Wound healing. Wound repair,(eds)”, *W.B. Saunders Co.*, 3:1-271(1984).
34. Turgut, M., Vargel, I., Özcan, G., Kaynaroğlu, V., Benli, K., Özcan, O. E., Sağlam, S., “Yara iyileşmesi sürecinin özellikleri ve değişik faktörlerin bu süreç üzerine olan etkileri”, *Yeni Tıp Dergisi*, 12(2): 142-149 (1995).
35. İnternet : nedir? com, “Yara”
<http://yara.nedir.com/#ixzz26TUQn66S> (2012).
36. İnternet: Sağlık Bilgileri, “ Yara”
<http://zehirlenme.blogspot.com/2009/11/yara-nedir-yara-iyilesmesi.html> (2013).
37. Hamaloğlu, E., Mersin, H., “Cerrahi Sınava Hazırlık 2. Baskı.”*Atlas yayıncılık*, Ankara, 69-77 (2003).
38. İnternet: Cumhuriyet Tıp Fakültesi,“Yara iyileşmesi”
http://www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/194/Yara_Iyilesmesi.pdf (2011).
39. İnternet: Mersin Üniversitesi, “yara iyileşmesi”
[http://sem.mersin.edu.tr/uploads/304/files/Yara_iyile%C5%9Fmesi_ve_yara_bak%C4%B1m%C4%B1\(D4-K%C3%96\).pdf](http://sem.mersin.edu.tr/uploads/304/files/Yara_iyile%C5%9Fmesi_ve_yara_bak%C4%B1m%C4%B1(D4-K%C3%96).pdf) (2012).
40. İnternet: Çukurova Tıp Fakültesi, “Yaralar”,
http://cukurovatip.cu.edu.tr/7adlitip7index_dosyalar/Page1851.html (2012)

41. İnternet: Belgeler.com, “Yara”,
[http:// www.orthoteers.org/galleryframe.aspx](http://www.orthoteers.org/galleryframe.aspx) (2011).
42. İnternet: Estetik Cerrahi, “yara iyileşmesi”,
<http://www.estetiks.com/yara+iyilesmesi.html> (2011).
43. Sirko, S., Von Holst, A., Weber, A., Wizenmann, A., Theocharidis, U., Götz, M., Falssner, A., “Chondroitin sulfates are required for fibroblast growth factor-2-dependent proliferation and maintenance in neural stem cells and for Epidermal Growth Factor- depend migration of their progeny”, *Stem Cells*, 28(4): 775-87 (2010).
44. Çevikel, M. H., Özgün, H., Bolu, Ş., “Yara iyileşmesi”, Temel ve Sistemantik Cerrahi, 1. Cilt, Gülay, H., *İzmir Güven Kitabevi*, İzmir, 227-238 (2005).
45. Engin, A., “Yara iyileşmesi”, Genel Cerrahi Tanı ve Tedavi İlkeleri, 1. Cilt, *Atlas Yayıncılık*, Ankara, 132, (2000).
46. İnternet: Medscape Reference , “Yara iyileşmesi fazları”
http://www.google.com.tr/search?um=1&hl=tr&biw=1024&bih=667&tbm=isch&q=wound+healing+phase&spell=1&sa=X&ei=NZLtUeHYJYaC4gTC5YHAAw&ved=0CEoQvwUoAA&bav=on.2.or.r_cp.r_qf.&bvm=bv.49478099%2Cd.bGE%2Cpv.xjs.s.en_US.c75bKy5EQ0A.O&emsg=NCSR&noj=1&ei=OJLtUYFAqpp4gSOyIHQBA#facrc=&imgdii=&imgrc=KGzyAzMFmh1ydM%3A%3BVrmBZt0dIKsraM%3Bhttp%253A%252F%252Fimg.medscape.com%252Fpi%252Femed%252Fckb%252Fclinical_procedures%252F12710891298196780tn.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fmedicine.medscape.com%252Farticle%252F1298196-overview%3B200%3B156 (2012).
47. Shaw, J. E., Zimmet, P., “Diyabet hastalığına nasıl tanı koyacağımızı biliyor muyuz ve hastalığı taramamız gerekiyor mu?”, Diyabet ve Zorlukları, 1. baskı, Gill, G., Pickup, J., Williams, G., *Blackwell Science* , 3(2002).
48. Yöner, A., “Diabetes Mellitus fizyoloji, tanımlama, sınıflama, etiyopatogenez, klinik özellikler”, Metabolizma ve Diyabet, 2. baskı, Özata, M., *İstanbul Tıp Kitabevi*, 548, 550, 551(2011).
49. Greenhalgh, D.G., “Wound healing and diabetes mellitus” *Clin Plastic Surg*, 30: 37-45 (2003).
50. Başkal, N., “Diyabetes mellitus’un sınıflandırılması ”, Endokrinoloji Temel ve Klinik, 2. Baskı, Erdoğan, G., *MN Medikal & Nobel*, 342, 343 (2005).
51. Akalın, S., Aslan, M., Başkal, N., Çorakçı, A., “Diabetes Mellitus, 1. baskı”, Yılmaz, C., Yılmaz, M. T., İmamoğlu, Ş., *Gri Tasarım*, İstanbul, 25,26,38, 137, (2000).

52. Doğan, A., “böbreküstü bezi korteks hormonları ”, Tıbbi Fizyoloji, 11. baskı, Çavuşoğlu, H., ÇağlayanYeğen B., *Nobel tıp kitabevleri*, Ankara, 972-975 (2006).
53. Aydın, S., Akça, T., Çolak, T., “Cerrahi Hastalarda Tamı ve Fizik Muayene ” Aydın, S., Akça, T., Çolak, T.,*Nobel kitabevi*, adana, 456 (2008) .
54. Brown D. L., Kane C. D., Chernausek S., Greenhalgh D. G., “Differentialexpression and localization of IGF-I and IGF-II in cutaneous wounds ofdiabetic versus nondiabetic mice “, *Am J Pathol*, 151: 715-724, (1997).
55. Frank, S., Hübner, G., Breier, G., Longaker, M. T., Greenhalgh, D. G.,Werner S., “Regulation of vascular endothelial growth factor expressionin cultured keratinocytes”, *J Biol Chem*, 270: 12607-12613, (1995).
56. Neely, A. N., Clendening, C. E., Gardner, J., Greenhalgh, D. G.,”Gelatinaseactivities in wounds of healing impaired mice ersus non-healing-impaired mice” *J Burn Care Rehabil*, 21: 395-402, (2000).
57. Ciğer, S.,“Yara iyileşmesi ve büyüme faktörleri”, Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi, Erdem, C., Çelebi, R. C., *TDD Yayınları*, Ankara, 20-26 (1996).
58. Burçak, G. C., Abbas, A. K., “Hormonların genel özellikleri”, İnsan Biyokimyası, 2. Baskı, Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y., *Palme Yayıncılık*, Ankara , 437 (2002).
59. Murray, R. K., Özgürtaş, T., “Kanser, kanser genleri ve büyüme faktörleri”, Harper Biyokimya, 25. Baskı, Dikmen, N., Özgünen, T.,*Nobel tıp kitabevleri*, Ankara, 796-799 (2004).
60. İnternet: Hartnell College, “ İntraselüler sinyal yolları [“http://www.hartnell.edu/tutorials/biology/signaltransduction.html](http://www.hartnell.edu/tutorials/biology/signaltransduction.html) (2012).
61. Kaya, E., “Yara İyileşmesi, Travma 1.baskı” Ertekin, C., Taviloğlu, K., Güloğlu, R., Kurtoğlu. M., *İstanbul Medikal Yayıncılık*, İstanbul, 488- 501 (2005) .
62. Cooper, D. .M., Yu, E. Z., Hennessey, P., Ko,F., Robson,M. C., “Determination of endogenous cytokines in chronic wounds”, *Ann. Surg.*, 219(6): 688-691 (1994).
63. Konukoğlu, D., Turhan, S. M. “Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis”, *Cerrahpaşa J Med.*, 36: 42-48 (2005).
64. Prondomi, P., Piccioli, A., Girolamı, A.,“Cancer and venous thromboembolism: an Overview”, *Hematologica*, 84: 437-445 (1999).

65. Karakuş, N., “İleri evre kanser hastalarında düşük molekül ağırlıklı heparinlerin anjiyogenetik faktörler üzerindeki etkileri”, uzmanlık tezi , **Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı**, Isparta, 6 (2006).
66. Yazır, Y., Gonca, S., Filiz, S., Dalçık H., “Endotel Hücreleri İçin Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi”, **Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, 26 (4):181 – 184 (2004).
67. Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., et al., “Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid”, **Science**, 219: 983-985 (1983).
68. Ferrara, N., “Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress”, **Endocrine Reviews**, 25: 581-611 (2004).
69. Thomas, K. A., “Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent”, **The Journal of Biological Chemistry**, 271: 603-606 (1996).
70. Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., et al., “ Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3.”, **Circulation**, 93:1493-1495 (1996).
71. Erol, N., “vasküler endotelial büyüme faktörü ve anti-vegf ajanlar”, **Ret-Vit.**, 15:35-40 (2007).
72. Ferrara, N., Davis-Smyth, T., “The biology of vascular endothelial growth factor”, **Endocr Rev**, 18: 4–25 (1997).
73. İnternet: Wikipedia, “ VEGF izoformları”
http://en.wikipedia.org/wiki/File:VEGF_isoforms.png (2012)
74. Clauss, M., “Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family”, **Semin Thromb Hemost**, 26:561-9 (2000).
75. Ortega, N., L’faqihi, F.E., Plouet, J., “Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix”, **Biol Cell**, 90:381-390 (1998).
76. Kaiser, P. K., “Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease “, **Am J Ophthalmol**, 142:660-668 (2006).
77. Bhisitkul, R. B., “ Vascular endothelial growth factor biology: clinic alimplications for ocular treatments” , **Br J Ophthalmol**, 90:1542-1547 (2006).

78. Gerwins, P., Sköldenberg, E., Claesson-Welsh, L., “ Function of fibroblast factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 34: 185-194 (2000).
79. Dvorak, H. F., “Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy”, *J Clin Oncol*, 20: 4368-4380 (2002).
80. Seiji, Y., Yasuhiko, N., Hisatsugu, G., Saburo, S., “Molecular mechanisms of angiogenesis in non-small cell lung cancer and therapeutics targeting related molecules”, *Cancer sci june.*, vol. 94 no. 6 479-485 (2003).
81. Harada, S., Nagy, J. A., Sullivan, K. A., Thomas K. A., Endo, N., Rodan G. A., et al. “Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts”, *J Clin Invest*, 93:2490-6 (1994).
82. Ferrara, N., “Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis” *Kidney Int*, 56: 794-814 (1999).
83. Nissen, N. N., Polverini, P. J., Koch, AE., Volin, M. V., Gamelli, RL., DiPietro, L. A., “Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing”, *Am J Pathol*, 152:1445–1452 (1998).
84. Hopf, H.W., Gibson, J. J., Angeles, A. P., Constant, J. S., Feng, J. J., Rollins, M. D., Hussain, M. Z., Hunt, T. K., “Hyperoxia and Angiogenesis”, *Wound Rep Reg*, 13:558–564 (2005).
85. Brown, N. J., Smyth, E. A. E., Cross, S. S., Reed, M. W. R., “Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds”, *Wound Rep Reg*, 10: 245–251 (2002).
86. Nissen, N. N., Polverini, P. J., Gamelli, RL., DiPietro, L. A., “Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds”, *Surgery*, 119:457–465 (1996).
87. Senger, D. R., Ledbetter, S. R., Claffey, K. P, Papadopoulos-Sergiou, A., Peruzzi C. A., Detmar, M., “Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin”, *Am J Pathol*, 149: 293–305 (1996).
88. Silver, I. A., “The measurement of oxygen tension in healing tissue”, *Prog Repair Res* 3: 124–135 (1969).

89. Schoppmann, S.F., Birner, P., Stockl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., Kerjaschki, D., “Tumor- associated macrophages Express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis”, *Am J Pathol*, 161: 947–956 (2002).
90. Kirchner, L. M., Meerbaum, S. O., Gruber, B. S., Knoll, A. K., Bulgrin, J., Taylor, R. A., Schmidt, S. P., “Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model”, *Wound Rep Reg.*,11(2):127-31 (2003).
91. Galeano, M., Deodato, B., Altavilla, D., Cucinotta, D., Arsic, N., Marini, H., Torre, V., Giacca, M., Squadrito, F., “Adeno-associated viral vector-mediated human vascular endothelial growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse”, *Diabetologia.*, 46(4):546-55 (2003).
92. Jacobi, J., Tam B. Y. Y ., Sundram U., Degenfeld, G., Blau, H. M., Kuo C. J., Cooke, J. P., “Discordant effects of a soluble VEGF receptor on wound healing and angiogenesis”, *Gene Therapy*, 11: 302–309 (2004).
93. Galiano, R., D., Tepper, O. M., Pelo, C. R., Bhatt, K. A., Callaghan, M., Bastidas, N., Bunting, S., Steinmetz, H. G., Gurtner, G. C., “Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells”, *AJP June*, 164(6):1935-1947 (2004).
94. Wilgus, T. A., Ferreira, A. M., Oberyszyn, T. M., Bergdall, V. K., DiPietro, L. A., “Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor”, *Laboratory Investigation*, 88: 579–590 (2008).
95. Wink, D. A., Vodovotz, Y., Laval, J., et al. “The multifaceted roles of nitric oxide in cancer”, *Carcinogenesis*, 19: 711-721 (1998).
96. Yöntem, M., Ünalı, M., “Biyokimya”, *Aybil Dijital Sistemleri ve Matbaa*, Konya, 597-628 (2011).
97. Gümüştaş, K., Atukeren, P., “Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklarla ilişkisi”, *Türkiye de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi*, İstanbul, 62:329-340 (2008).
98. Akpoyraz, M., Durak, İ., “Serbest radikallerin biyolojik etkileri”, *Ankara Tıp Mecmuası (The Journal Of The Faculty Of Medicine)*, Ankara, 48:253-262 (1995).
99. Altan, N., Dinçel, Sepici, A., Koca, C., “Diabetes mellitus ve oksidatif stres”, *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal Of Biochemistry - Turk J Biochem)*, 31 (2):51–56 (2006).

100. Memişoğulları, R., "Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi", *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:30-39 (2005).
101. İnternet: Oksante Ar-Ge Laboratuvarı, "oksidatif stres ve antioksidanlar" <http://www.oksante.com.tr/Oksantest.pdf> (2013).
102. Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A., "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite", *Nitric oxide-Biol. Ch.*, 5(1): 62-71 (2001).
103. Casini, A. F., Ferrali, M., Pompella, A., Maellaro, E., Comporti, M., "Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice", *Am. J. Pathol.*, 123(3): 520-531 (1986).
104. Aykaç, G., Uysal, M., Yalçın, A. S., Koçak-Toker, N., Sivas, A., Öz, H., "The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats", *Toxicology*, 36(1): 71-76 (1985).
105. Berger, J., Shepard, D., Morrow, F., Taylor, A., "Relationship between dietary intake and tissue levels of reduced and total vitamin C in the nonscorbutic guinea pig", *J. Nutr.*, 119(5): 734-740 (1989).
106. Sun, Y., Oberley, L. W., Li, Y., "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase", *Clin. Chem.*, 34(3): 497-500 (1988).
107. Engin, A., "Yara iyileşmesi In: Temel Cerrahi", Sayek, İ., (ed), *Güneş Kitabevi*, Ankara, 266-277 (2004).
108. Cox, D. A., Kunz, S., Cerletti, N., McMaster, G. K., Burk, R. R., "Wound healing in aged animals--effects of locally applied transforming growth factor beta 2 in different model systems", *Exs*, 61:287-295 (1992).
109. Gope, R., "The effect of epidermal growth factor & platelet-derived growth factors on wound healing process", *Indian J. Med. Res.*, 116:201-206 (2002).
110. Muangman, P., Muffley, L. A., Anthony, J. P., Spenny, M. L., Underwood, R. A., Olerud, J. E., Gibran, N. S., "Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice", *Wound Repair Regen*, 12(1): 44-52 (2004).
111. Lynch, S. E., Colvin, R. B., Antoniades, H. N., "Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds", *J. Clin. Invest.*, 84(2): 640-646 (1989).

112. Dogan, S., Demirer, S., Kepenekci, I., Erkek, B., Kiziltay, A., Hasirci, N., Müftüoğlu, S., Nazikoglu, A., Renda, N., Dincer, U., D., Elhan, A., Kuterdem, E., "Epidermal growth factor-containing wound closure enhances wound healing in non-diabetic and diabetic rats", *Int Wound J*, 6(2): 107-115 (2009).
113. Gill, G., Pickup, J., Williams, G., "Difficult diabetes 1 ed.", *Blackwell Science Company*, London, 3-22 (2001).
114. Li, H., Fu, X., Zhang, L., Huang, Q., Wu, Z., Sun, T., "Research of PDGF-BB Gel on the Wound Healing of Diabetic Rats and Its Pharmacodynamics", *J Surg Res.*, 145, 41-48 (2008).
115. Losi, P., Briganti, E., Errico, C., Lisella, A., Sanguinetti, E., Chiellini, F., Soldani, G., "Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice", *actbio.*, 13:1742-61 (2013).
116. Hwang, S. M., Chen, C. Y., Chen, S. S., Chen, J. C., "Chitinous materials inhibit nitric oxide production by activated RAW 264.7 macrophages", *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 271(1): 229-233 (2000).
117. Kocatürk, P., A., "Nitrik oksitin diabet patogenezi ve komplikasyonlarındaki rolü", *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 49 (4): 237-242 (1996).
118. İnternet : "Nitrik oksit"
http://www.tfd.org.tr/eski/mersin_kansu1.pdf (2013).
119. Cheng, X., S., Shimokawa, H., Momii, H., Oyama, J., "Role of superoxide anion in the pathogenesis of cytokine-induced myocardial dysfunction in dogs in vivo", *Cardiovascular. Res.*, 42: 651-659 (1999).
120. Bouloumie, A., Bauersachs, J., Linz, W., Schölkens, B.A., Wiemer, G., Fleming, I., Busse, R. "Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production". *Hypertension*, 30: 934-941 (1997).
121. Dröge, W., "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiol. Rev.*, 82(1): 47-95 (2002).
122. İnternet : Sağlık.web "Glutatyon"
<http://www.saglikweb.com/tip.sozlugu/glutatyon.asp> (2013),
123. Tuma, D.J., "Role of Malondialdehit-Asetaldehit Adducts in Liver Injury", *Free Radical Biology & Medicine*, 32: 303-308. (2002).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : UZUN, Ebru
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1989 Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (555) 501 76 42
e-mail : ebruuzun06@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Aydınlıkevler Lisesi	2005

Yabancı Dil

İngilizce

Sahip Olunan Belgeler

Bilgisayar İşletmenliği Sertifikası (MEB onaylı), 2012

Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, 2011