

Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)'nın Tükürük Bezi Oksidan Olaylarına Zaman Bağımlı Etkisi

[Effect of transforming growth factor beta (TGF- β) on oxidative events of salivary gland: a time course study]

Emel Çınar¹,
Emre Avcı²,
Emine Gülçeri Güleç Peker³,
Şule Coşkun Cevher³

¹Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Ankara

²Hitit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Çorum

³Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Emre Avcı, Öğretim Görevlisi

Hitit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Çorum

Tel: + 90 364 227 70 00/ 1647

Faks: + 90 364 227 70 05

E-mail: emreavci@hitit.edu.tr

Kayıt Tarihi : 7 Nisan 2010; Kabul Tarihi : 29 Kasım 2010

[Registered: 7 April 2010; Accepted: 29 November 2010]

ÖZET

Amaç: Ağız yaralarına uygulanan dönüştürücü büyüme faktörü beta'nın tükürük bezi oksidan olaylarına etkilerinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda, ağız mukozasında cerrahi kesi yarasına dönüştürücü büyüme faktörü beta uygulamasının, tükürük bezi oksidan olayları üzerine etkilerini, zaman bağımlı olarak araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntemler:** Deneylerde Yeni Zelanda albino tavşanlar (erkek, n= 36, 2,5 ± 0,4 kg) kullanılmıştır. Submukozal kesi yapıldıktan sonra tavşanlar iki eşit gruba ayrılmıştır; 1- Tedavi edilmeyen yaralar, 2- dönüştürücü büyüme faktörü beta ile tedavi edilmiş yaralar. Yaralanmadan sonraki 1., 3. ve 5. günlerde tavşanların tükürük bezleri hemen çıkarılmıştır. Tükürük bezlerinde lipid peroksidasyonunun son ürünleri olan tiyobarbiturik asit ile reaksiyona giren maddeler, nitrik oksit metabolit düzeyleri, nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan miyeloperoksidaz aktivitesi ve önemli antioksidanlar olan glutatyon ve askorbik asit spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Sonuçlar ANOVA ve Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Ekzojen dönüştürücü büyüme faktörü beta uygulaması ile tükürük bezi dokusunda tüm günlerde tiyobarbiturik asit ile reaksiyona giren maddelerin, glutatyon ve nitrik oksit metabolitlerinin düzeyleri anlamlı derecede artmış bulunmuştur. Askorbik asit düzeyi ve miyeloperoksidaz enzim aktivitesi bakımından ise yaralanmanın 3. gününde bir artış tespit edilmiştir.

Sonuç: Yara iyileşmesine olumlu katkılarının olduğu bilinen dönüştürücü büyüme faktörü betanın bu çalışmadaki uygulama dozunun prooksidan etki göstererek inflamatuvar yanıtları arttırdığı ve buna bağlı olarak oksidan ve antioksidan olayları etkilediği gözlenmiştir. Bu çalışma, gelecekte farklı dönüştürücü büyüme faktörü beta uygulama dozları ile yeni çalışmalar yapılmasına ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Dönüştürücü büyüme faktörü beta, tiyobarbiturik asit reaktif maddeler, glutatyon, askorbik asit, miyeloperoksidaz, nitrik oksit

ABSTRACT

Objective: There are limited numbers of studies on the effect of exogenous transforming growth factor beta implantation on oxidative events of salivary gland. That is why we aim to investigate the effects of oral submucosal implanted transforming growth factor beta on the oxidative stress of salivary gland.

Methods: We used New Zealand albino rabbits (male, n= 36, 2.5 ± 0.4 kg) in this study. The rabbits were divided into two equal groups after submucosal incisions: 1- Untreated wounds, 2- transforming growth factor beta implanted wounds. Submandibular glands of the rabbits were excised immediately on the 1st, 3th and 5th days of post-wounding. The levels of thiobarbituric acid reactive substances which are the last products of lipid peroxidation, glutathione and ascorbic acid levels which are important antioxidants, nitric oxide metabolite levels and myeloperoxidase activity which is the indicator of neutrophil infiltration were measured spectrophotometrically in submandibular glands. Results were compared by ANOVA and Mann Whitney U test.

Results: It has been found that exogenous transforming growth factor beta treatment caused increase in thiobarbituric acid reactive substances, glutathione and nitric oxide metabolite levels of salivary gland. On the third day of wound healing, increased myeloperoxidase activity and ascorbic acid levels of salivary gland were determined by transforming growth factor beta treatment.

Conclusion: It is observed that transforming growth factor beta which was known to have positive affect on wound healing increased the inflammatory response and consequently affected the oxidant and antioxidant events with a prooxidant effect within the doses used in this study. This study will shed light to new studies with different transforming growth factor beta application doses in the future.

Key words: Transforming growth factor beta, thiobarbituric acid reactive substances, glutathione, ascorbic acid, myeloperoxidase, nitric oxide

Giriş

Tükürük bezleri, hem ağız hem de sistemik organ homeostazında ve yara iyileşmesinde önemli rol oynayan birçok faktörün ana kaynağıdır. Tükürük bezleri, ağız yaralarının iyileşmesinde etkin olan insülin benzeri büyüme faktörü I ve II (IGF-I, IGF-II), sinir büyüme faktörü (NGF), dönüştürücü büyüme faktörü alfa ve beta (TGF- α , TGF- β) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi çok sayıda büyüme faktörünü sentezlemektedir [1]. Bu peptit büyüme faktörleri doku tamirinin başlatılmasında ve tamir sonrası doku bütünlüğünün sağlanmasında önemli rol oynarlar [2]. Büyüme faktörlerinden TGF- β hemen hemen bütün hücrelerde sentez edilen önemli bir polipeptit olup, hücresel olayların çoğunu düzenlemektedir. Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur ve hasarlı bölgeye degranülasyonla salınmaktadır. Üretimi otokrin yolla düzenlemektedir [3]. Bununla birlikte, TGF- β 'nın yara iyileşmesi bağlamında en önemli etkisi inflamatuvar hücre kemotaksisini uyarması ve ekstraselüler matriks sentezini arttırmasıdır [4]. Kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak bilinen TGF- β , yara kontraksiyonu ve matriksi organize edebilme özelliği nedeni ile de doku tamiri sonrası yeniden şekillenme fazında görev almaktadır [3, 5]. Tükürük bezleri; büyüme, farklılaşma ve yara iyileşmesinde etkili olan, doku sağlığının korunmasında önemli rol oynayan, biyolojik olarak aktif peptidlerin zengin bir kaynağıdır [6, 7].

Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan, membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır [8]. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit radikalleri bir araya gelerek konjuge dienleri yaparlar. Devam eden oksidasyonla bu dienler de parçalanır [9]. Doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) oluşur [9, 10]. MDA düzeyi, oksidatif poliansatüre yağ asitleri hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmekte olup, MDA miktarının artması hasarı göstermektedir [9]. Ayrıca diğer bir önemli faktör de nitrik oksittir. Nitrik oksit kısa ömürlü bir radikal olup, biyolojik bir mediatördür. Yaralanmanın erken döneminde makrofajlar nitrik oksit sentezler. Nitrik oksit mekanik kuvveti ve kollajen oluşumunu artırarak yara iyileşmesini hızlandırır. Nitrik oksit sentezinin engellenmesi yara iyileşmesini de geciktirmektedir [11–13]. Tükürük bezinde yaygın nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) yerleşimi, nitrik oksitin tükürük bezinin kan akımı ve sekresyonunun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir [14].

Organizmada, reaktif oksijen türlerinin hasar oluşturucu etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Normal koşullarda bu toksik ürünlerin hasar oluşturucu etkileri antioksidanlarla sınırlanmaktadır. Böylece oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir. Antioksidanlar doğrudan

etkiyle oksidanları inaktif hale getirebilirler [15, 16]. Enzimatik olmayan antioksidanlardan biri olan glutatyon (GSH) da, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır [10]. Dokuda glutatyon miktarının artması hücrelerin oksidatif stresten korunduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [9]. Askorbik asit (vitamin C, AA) ise organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici bir ajan olarak görev yapar. Kuvvetli indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler [10]. Ayrıca, AA'nın tükürük bezlerinden salgılanan granüllerin bileşenlerini oluşturduğu ve salgı oluşumunda önemli role sahip olduğu belirtilmiştir [17]. AA eksikliğinin insanlarda majör tükürük bezlerinin şişmesiyle lâkrimal sekresyona ve tükürükte azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [18]. Bu anlamda organizmada değişen durumlarda bu iki antioksidanın birbirleri ile etkileşimde buldukları da bilinmektedir. Yara iyileşmesinin inflamasyon fazında rol alan nötrofillerin, fagositoz sırasında büyük miktarda oksijen kullanmaları nedeniyle solunum patlaması gerçekleşmektedir [19]. Solunumsal patlamanın amacı, fagositler tarafından mikroorganizmaların yok edilmesinde kullanılacak oksidan ajanlar sağlamaktır. Bu oksidan ajanları kullanan mikrobisidal sistemlerden biri de miyeloperoksidaz (MPO) sistemidir [19, 20]. Tüm bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda oral mukozadaki yaraya ekzojen olarak uygulanan TGF- β 'nin, tükürük bezlerinde gerçekleşen oksidan olaylara ne gibi etkilerde bulunduğunu belirlemek amacıyla, MDA (tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler: TBARS), NOx ve MPO aktivitesi ve enzimatik olmayan antioksidanlar olan GSH ve AA düzeyleri zaman bağımlı olarak araştırılmıştır.

Gereç ve yöntemler

Çalışma Grubu

Çalışmamız daha önce yapmış olduğumuz TGF- β çalışmasının devamı şeklinde tasarlanmıştır [21]. Deneylerde 5 aylık 2,5–3,0 kg ağırlıkta 36 adet Yeni Zelanda tipi erkek tavşan kullanılmıştır. Deney öncesi ve deney süresince standart yem ve su ile beslenen deney hayvanlarından iki grup oluşturulmuştur. I. Gruptaki tavşanlara sadece kesi yarası yapılmış, II. Gruptaki tavşanlar ise yaradan sonra TGF- β ile tedavi edilmişlerdir. Yapılan çalışma için gerekli olan etik kurul onayı Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 21/10/2008 tarih ve 92-15912 sayılı kurul kararı ile alınmıştır.

TGF- β Preparatının Hazırlanması ve Yara Modelinin Oluşturulması

TGF- β preparatının hazırlanmasında Coşkun ve arkadaşlarının metodu uygulanmıştır [21]. TGF- β içeren boncukların hazırlanması için şu işlemler gerçekleştirilmiştir: Önce 2 μ g TGF- β (Sigma, T- 7039 2 UG) içeren flakona, 400 μ L distile su ilave edilerek TGF- β çözümü. Daha sonra polietilen glikol 6000 (PEG 6000)

eritilmiş ve erimiş kütlelerin içine mikropipetle TGF- β çözeltisi ilave edilip süratle karıştırılmıştır. Sıvı haldeki karışım, insülin enjektörüne çekilerek boncuk şekli vermek için plastik kalıplara dökülmüştür. Hazırlanan her bir boncuk ağırlığı 0.0795 ± 0.0117 mg'dır, Her boncuk ortalama 20 ng TGF- β içermektedir. Hazırlanan preparatlar ayrı ayrı flakonlara yerleştirilip ağzı kapatılarak, çalışma yapılıncaya kadar buzdolabında saklanmıştır. Preparatlar aseptik koşullarda hazırlanmıştır.

Deneklere ketamin (Ketalar 50 mg/kg) ve ksilazin (Rhompun 5 mg/kg) intramüsküler olarak enjekte edilerek genel anestezi sağlanmıştır. Hayvanın ağzı açılıp, yanak ve dil ekarte edildikten sonra kesici dişler ile azı dişler arasındaki diastema bölgesinin en derin iç bükey yeri, merkez olacak şekilde sağ ve sol çenede kretin tepesine 1,5 cm uzunluğunda postero-anterior yönde insizyon (kesi), perioste kadar inecek şekilde tek işlemde gerçekleştirilmiştir. İnsizyondan sonra yara dudakları vestibul ve lingual yönde perioste elevatörü ile mukoza üzerinde formülasyonlar yerleşecek kadar cerrahi teknikler kullanılarak ekarte edilmiştir. Tüm tavşanların ağız mukozasında insizyon yarası yapılmıştır. Daha sonra yara dudakları adapte edilip kanama kontrolü yapılarak iki adet sütür atılmıştır. Kesi yarası yapılan ve PEG+TGF-b kombinasyonlu boncuk uygulanan tavşanlar; kronobiyolojik sıraya uygun olacak şekilde operasyonu izleyen 1., 3. ve 5. günlerde aynı saatlerde tartılarak, aşırı doz sodyum barbital, kulak veninden verilerek feda edilmiştir. Ağızdaki tükürük bezleri sağlı-sollu hemen çıkarılarak, bulaşmayı önleyecek materyale sarıldıktan sonra sıvı azot içerisine konularak dondurulmuştur.

Yöntemler

Dokuda TBARS seviyelerinin belirlenmesi

Dokuda TBARS düzeyleri tiyobarbitürik asit ile belirlenmiştir [22]. Öncelikle doku örnekleri tartılıp (Ohaus Adventurer Pro, USA), homojenizatör (Heidolph Silent-Crusher M, Germany) ile soğuk triklorasetik asit içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra süpernatant alınarak üzerine tiyobarbitürik asit ve bütildihidroksi toluen eklenip absorbansı spektrofotometrede (Labomed Uv -Vis 23, USA) 535 nm'de, köre karşı okunmuştur. Standart olarak 0.5 nmol/mL tetraetoksi propan kullanılmıştır.

Dokuda Glutasyon (GSH) tayin yöntemi

Dokuda GSH (total tiyol) tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanılmıştır [23]. Doku örnekleri TBARS yöntemindeki gibi homojenize edilip santrifüj (Hettich Universal 32, Germany) edildikten sonra süpernatant, NaH_2PO_4 ve DTNB çözeltisi ile karıştırılıp, oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildikten sonra numunelerin absorbansı spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda ölçülmüştür. GSH düzeyleri $13,600 \text{ litre} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ molar absorbtivite katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

Dokuda Askorbik Asit (AA) tayin yöntemi

Dokuda AA tayini için Roe ve Kuether'in Berger tarafından modifiye edilmiş metodu kullanılmıştır [24]. Doku PCA/EDTA (Perklorik asit/Etilen diamin tetraasetik asit) karışımı homojenize edildikten sonra homojenizat 15 000 x g devirde 3 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Bir tüpe standart AA çözeltisi, diğer tüpe kör için PCA çözeltisi ve örneklerin hazırlanacağı tüplere de süpernatant konularak her bir tüpe renk reaktifi eklenip vortekslenmiş ve 3 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Numunelerin sıcaklığı 0 °C'ye getirilip her bir tüpe H_2SO_4 eklenerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 515 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı numunelerin absorbansı okunmuştur. 100 ml'sinde 1 mg AA bulunan stok çözeltisi sulandırılarak standart çözelti hazırlanmıştır.

Dokuda Miyeloperoksidaz (MPO) tayin yöntemi

Dokudan MPO tayini için Glowick ve Kaplan'ın yöntemi kullanılmıştır [25]. Doku, sodyum fosfat tamponunda buz soğukluğunda homojenize edilip 3500 x g devirde 10 dakika 4 °C' de santrifüj edilmiştir. Süpernatant, sodyum fosfat tamponu, H_2O_2 ortodiazinidin ve su tüplere konularak karıştırılıp, 37 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra üzerlerine HCl eklenerek, 410 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı numunelerin absorbansı okunmuştur. MPO ünitesi U/g doku olarak verilmiştir. 37 °C'de 1 dakikada oluşan 1 optik dansite değişimi veren enzim miktarı 1 ünite olarak kabul edilmiştir.

Dokuda Nitrik oksit (NOx) metabolit seviyelerinin belirlenmesi

Dokulardaki nitrik oksit (NOx) metabolitlerinin konsantrasyonu Griess yöntemi ile çalışılmıştır [26]. Dokular, sodyum fosfat tamponu ile homojenize edildikten sonra, 3500 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve 200 μL süpernatanta, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda VCl_3 eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklenerek 37 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra numunelerin absorbansı spektrofotometrede köre karşı 540 nm'de okunmuştur. Sodyum nitrit ve nitrat solüsyonları (1, 10, 50 ,100 μM) olarak kullanıldı.

İstatistiksel Analizler

Bütün değerler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, ANOVA ve Scheffe test ile değerlendirilmiş ve $p < 0,05$ önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Tükürük Bezi TBARS Düzeyleri

Tedavisiz grupta ve TGF-b uygulanan gruplarda, tükürük bezi TBARS düzeyleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, günlere bağlı olarak yaralanmanın 3. gününde

diğer günlere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). TGF- β uygulanan gruplarda farklı olarak 5. günde tükürük bezi TBARS düzeyi diğer günlere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.05$). TGF- β uygulanan gruplar ve tedavisiz gruplarla (kendi kontrolleri) karşılaştırıldığında TGF- β uygulanan gruplarda TBARS düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) ölçüde artırdığı ve bu artışın 3. günde daha fazla olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Tükürük Bezi Glutatyon (GSH) Düzeyleri

Tedavisiz grupta tükürük bezi GSH düzeyleri kendi aralarında mukayese edildiğinde, yaralanmanın 3. gününde 1. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). TGF- β uygulanan gruplarda uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında yaralanmayı takiben 3. ve 5. günlerde tükürük bezi GSH düzeyleri 1. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gözlenmiştir ($p<0.05$). TGF- β uygulanan gruplar kendi tedavisiz kontrolleri ile karşılaştırıldığında, TGF- β uygulanan gruplarda tükürük bezi GSH düzeylerinin bütün günlerde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p<0.05$) artmış olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tükürük Bezi Miyeloperoksidaz (MPO) Enzim Aktivitesi

Kesi yarasını takiben tükürük bezi MPO aktivitesi değerlendirildiğinde, tedavisiz gruplar kıyaslandığında

yaralanmanın 3. ve 5. günlerinde 1. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0.05$). TGF- β uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında yaralanmanın 3. gününde MPO aktivitesi diğer günlere oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. 5. günde 1. ve 3. günlere oranla MPO aktivitesinde tespit edilen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). TGF- β uygulanan gruplar kendi tedavisiz kontrolleriyle karşılaştırıldığında 1. ve 5. günlerde TGF- β uygulanan grupların MPO aktivitesi istatistiksel olarak azalmıştır. Yaralanmanın 3. gününde ise TGF- β uygulanan grupların MPO aktivitesinde meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 1).

Tükürük Bezi Askorbik Asit (Vitamin C, AA) Düzeyleri

Tedavisiz gruplarda tükürük bezi AA düzeyleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, yaralanmayı takiben 3. günde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). TGF- β uygulanan gruplar kendi aralarında incelendiğinde yaralanmanın 3. gününde 1. ve 5. günlere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artma meydana gelmiştir. 5. günde ise, 1. ve 3. günlere kıyasla meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). TGF- β uygulanan gruplar kendi tedavisiz kontrolleriyle mukayese edildiğinde ise 3. günde TGF- β

Tablo 1. Ekzojen TGF- β uygulamasının tükürük bezi, GSH, AA ve NOx seviyelerine ve MPO aktivitesine etkileri

GRUP	TBARS ¹ (nmol/g doku)	GSH ² (μ mol/g doku)	MPO ³ (U/g doku)	AA ⁴ (mg/g doku)	NOx ⁵ (μ mol/g doku)
Tedavisiz grup1.Gün n=6	18,81 \pm 2,66 ^a	7,10 \pm 1,19 ^a	0,32 \pm 0,04 ^a	0,09 \pm 0,02 ^a	20,88 \pm 1,62 ^a
Tedavisiz grup 3.Gün n=6	50 \pm 9,89 ^b	10,14 \pm 1,63 ^b	0,25 \pm 0,03 ^b	0,03 \pm 0,01 ^b	19,64 \pm 1,81 ^b
Tedavisiz grup 5.Gün n=6	23,83 \pm 10,25 ^c	9,62 \pm 3,08 ^c	0,22 \pm 0,05 ^c	0,10 \pm 0,02 ^c	17,68 \pm 2,55 ^c
TGF- β uygulanan grup 1.Gün n=6	117,68 \pm 12,43 ^d	19,62 \pm 1,06 ^d	0,21 \pm 0,01 ^d	0,10 \pm 0,01 ^d	208,45 \pm 11,73 ^d
TGF- β uygulanan grup 3.Gün n=6	171,32 \pm 9,94 ^e	22,69 \pm 0,99 ^e	0,42 \pm 0,03 ^e	0,15 \pm 0,03 ^e	374,31 \pm 14,77 ^e
TGF- β uygulanan grup 5.Gün n=6	82,36 \pm 5,64 ^f	22,78 \pm 1,93 ^f	0,14 \pm 0,01 ^f	0,07 \pm 0,01 ^f	173,36 \pm 7,41 ^f

TBARS:Tiyobarbiturik asit reaktif maddeler, Malondialdehit, GSH: Glutatyon, MPO: mieloperoksidaz, AA: Askorbik asit, NOx: Nitrik oksit metabolitleri

Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

¹TGF- β uygulamasının TBARS düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırdığı ve bu artışın 3. günde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. ($p<0.05$: a-b, a-d, b-c, b-e, c-f, d-e, d-f, e-f)

²TGF- β uygulanan gruplar karşılaştırıldığında 3. ve 5. günlerde tükürük bezi GSH düzeyleri 1. güne oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış bulunmuştur. (GSH $p<0.05$: a-b, b-e, a-d, c-f, d-e, d-f)

³TGF- β uygulanan gruplar karşılaştırıldığında yaralanmanın 3. gününde MPO aktivitesi diğer günlere oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. (MPO $p<0.05$: a-b, a-c, a-d, b-e, c-f, d-e, d-f, e-f)

⁴TGF- β uygulanan gruplar karşılaştırıldığında yaralanmanın 3. gününde 1. ve 5. günlere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artma meydana gelmiştir. (AA $p<0.05$: a-b, b-c, b-e, c-f, d-e, d-f, e-f)

⁵TGF- β uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, yaralanmanın 3. gününde NOx seviyesinde 1. ve 5. günlere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. (NOx $p<0.05$: a-d, b-e, c-f, d-e, d-f, e-f)

uygulanan grupta AA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır. Yaralanmanın 5. gününde TGF- β uygulanan grupta meydana gelen azalma da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 1).

Tükürük Bezi Nitrik Oksit (NOx) Metabolit Düzeyleri

Kesi yarasını takiben tedavisiz gruplarda NO metabolitlerinin düzeyleri karşılaştırıldığında günlere bağlı istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir ($p > 0.05$). TGF- β uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, yaralanmanın 3. gününde NOx seviyesinde 1. ve 5. günlere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. 5. günde ise diğer günlere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p < 0.05$). TGF- β uygulanan gruplarda, NOx düzeyleri kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) artış göstermiştir (Tablo 1).

TARTIŞMA

Büyüme faktörleri yaralanmanın sonrasında normal tamir sürecindeki esas önemli mediatörlerdendir [1]. Büyüme faktörlerinden TGF- β , memelilerdeki yara iyileşmesi sürecinde ekstrasellüler matrisin yeniden düzenlenmesinin, epitelyum oluşumunun, inflamasyonun ve kan pıhtı oluşumunun bir anahtar düzenleyicisidir. Ekzojen TGF- β yara iyileşmesi sürecinde yeniden oluşuma katkıda bulunur [27]. Yara iyileşmesinde büyüme faktörlerinin olumlu etkisi bilinmekle birlikte, özellikle ağız mukozalarındaki yara iyileşmesinin oksidatif durumu ve büyüme faktörlerinin etkileşimi hakkında çok az bilgi mevcuttur. Yapılan bu çalışmada; yara iyileşmesini hızlandırmak üzere dışarıdan uygulanan TGF- β 'nin tükürük bezi oksidan olaylarına zaman bağımlı etkileri gösterilmiştir.

Daha önce yaptığımız bir çalışmada TGF- β 'nin ekzojen olarak ağız içi yaralara uygulanmasının lipit peroksidasyonunu artırmış olduğu, özellikle yaralanmanın 3. gününde en yüksek TBARS seviyesine ulaşıldığı gösterilmiştir [21]. Bu çalışmada da, bir önceki çalışmamıza paralel olarak iyileşme esnasında tükürük bezi TBARS düzeylerinin artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular TGF- β 'nin uygulama dozunun; kemotaksisi, hücre proliferasyonunu ve inflamatuvar yanıtı artırarak lipit peroksidasyonunu tetiklemiş olabileceğini akla getirmektedir. Özellikle inflamatuvar fazın etkin olduğu yaralanmanın 3. gününde tükürük bezi TBARS düzeylerindeki artış 20 ng TGF- β uygulamasının inflamatuvar fazı uzatma yönünde değiştirmiş olduğunu ve tükürük bezinin de bundan etkilenebileceğini göstermektedir. TGF- β uygulanan gruplarda tükürük bezi GSH düzeylerinin artmış olması, TGF- β uygulamasıyla submandibular tükürük bezinde artan lipit peroksidasyonuna karşı antioksidan savunma sistemlerinin harekete geçtiğinin bir göstergesidir. Özellikle inflamatuvar fazın etkin olduğu yaralanmanın 3. gününde MPO enzim aktivitesinin artmış bulunması ekzojen TGF- β uygulamasının, tükürük be-

zinin bu inflamatuvar yanıtı duyarlılık gösterdiğini ve burada nötrofil infiltrasyonunu arttırmış olabileceğini akla getirmektedir. Bu bulguyla uyumlu olarak; MPO aktivitesi sonucu oluşan HOCl'nin lipit peroksidasyonunu artırmış olabileceğini düşündürmektedir, 3. gündeki TBARS düzeyindeki artışın da buna paralellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Ağız dokusundaki inflamatuvar hastalıklarda MPO enzim aktivitesinin arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur [28, 29]. Sol molar diş çevresinde ligatürle periodontitis yapılan ratlarda, deneyin 8. gününde dişeti dokusunda MPO enzim aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [28]. Bizim çalışmamızın sonuçları da bu bulgularla paralellik göstermektedir. Tükürük bezi AA seviyelerinde, ağız yaralarına ekzojen olarak TGF- β uygulanan gruplarda, iyileşmenin 3. gününde diğer günlere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Ekzojen TGF- β uygulanan grupların AA düzeyleri kendi tedavisiz gruplarıyla karşılaştırıldığında 3. günde meydana gelen anlamlı artış bugünde tespit edilen en yüksek TBARS düzeyleriyle bir uygunluk göstermektedir. Artmış lipit peroksidasyonu, 3. günde GSH ile birlikte bir diğer antioksidan olan AA'nın seviyesindeki artışı tetiklemiştir; bizim çalışmamızda da bu korele antioksidan aktivite tespit edilmiştir. Ancak bugüne kadar yapılan araştırmalarda, ağız içinde AA seviyelerinin gösterildiği bir çalışma mevcut değildir. Ağız yarası oluşturulan hayvanlarda yaraya TGF- β uygulanmasıyla tükürük bezi NOx düzeyleri anlamlı olarak artmış olduğu dikkat çekmektedir. Özellikle yaralanmanın 3. günündeki NOx seviyesindeki artış TBARS seviyesindeki artışla paralellik göstermektedir. Burada ekzojen olarak uygulanan TGF- β 'nin uygulama dozunun; prooksidan etki göstererek TBARS ve NOx seviyelerini artırmış olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; TGF- β 'nin ağız içi yaralara ekzojen olarak uygulanması, tükürük bezine de yansıyan reaksiyonlar oluşturmuştur. Yara iyileşmesine olumlu katkılarının olduğu bilinen TGF- β 'nin bu çalışmadaki uygulama dozunun prooksidan etki göstererek inflamatuvar yanıtları arttırdığı ve buna bağlı olarak oksidan ve antioksidan olayları farklı etkilediği gözlemlenmiştir. Gelecekte farklı TGF- β uygulama dozları ile yeni çalışmalar yapılması, yara iyileşmesi esnasında tükürük bezinin yanıtı ve TGF- β 'nin bunun üzerindeki etkilerinin aydınlatılmasına yararlı olacaktır.

Kaynaklar

- [1] Coşkun Ş, Gönül B, Acartürk F, Take G, Erdoğan D. (2005) The effect of EGF-PEG bead implantation in oral mucosal wound on the rabbit salivary gland trace element levels and EGF receptor immunoreactivity. *Fabad J Pharm Sci.* 30: 56-63.
- [2] Bennett NT, Schultz GS. (1993) Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.* 165: 728-37.
- [3] Lawrence WT, Diagemann DF. (1994) Growth factor on wound healing. *Clin Dermatol.* 12: 157-169.

- [4] Miyazone K, Oloffson A, Colosetti P, Helling CH. (1991) A role of the latent TGF- β 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF- β 1. *EMBO J.* 10: 1091–1110.
- [5] Sprugel KH, Mc Pherson JM, Clowes AW, Ross R. (1987) Effect of growth factors *in vivo*. *Am J Pathol.* 129: 601–613.
- [6] Mathison R. (1995) Submandibular glands: A role in homeostasis and allostasis. *Biomed Rev.* 4: 61-69.
- [7] Karagami H, Hiramatsu Y, Hishida S, Okazaki Y, Horie K, Oda Y, Ueda M. (2000) Salivary growth factors in health and disease. *Anv Dent Res.* 14: 99-102.
- [8] Halliwell B, Gutteridge JMC. (2001) *Free Radicals in Biology and Medicine*, s. 121-179 Oxford University Press, USA.
- [9] Salman E, Bayraktaroğlu M, Doğan OV, Yörükoğlu Y, Yüce E, Kösebalaban S, Özer N. (1994) Askorbik Asit'in Serbest Oksijen Radikal Temizleyici Olarak Açık Kalp Cerrahisinde Kullanımı. *GKD Cer Derg.* 2: 200-216.
- [10] Akkuş İ. (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, s. 1: 3-5, Mimoza Yayınları, Konya.
- [11] Sayek İ. (2004) *Temel Cerrahi*, s. 975-989, Güneş Kitapevi, İstanbul.
- [12] Kalaycı G. (2004) *Genel Cerrahi*, s. 273-281, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
- [13] Seymour I, Schwartz Editor-in-Chief, (1999) *Principles of Surgery I-II*, 7th Edition, s. 687-692, International Edition, McGraw-Hill Companies, Australia.
- [14] Parıldar Z, Türk T, Özmen D, Keser G, Kabasakal Y, Bayındır O. (2003) Salivary nitric oxide levels in Sjögren's syndrome. *T Klin J Med Sci.* 23: 295- 299.
- [15] Mathers J, Fraser JA, McMahon M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI. (2004) Antioxidant and cytoprotective responses to redox stres. *Biochem Soc Symp.* 71: 157- 176.
- [16] Aslan R. (1999) Homeostatik mekanizmanın korunması ve sağaltımda antioksidanlar. *İlaç ve Tedavisi Dergisi.* 12 (8): 475-480.
- [17] Von Zastrow M, Triton TR, Castle JD. (1984) Identification of L-ascorbic acid in secretion granules of the rat parotid gland. *J Biol Chem.* 259: 11746-11750.
- [18] Hodges RE. (1971) What's new about scurvy?. *Am J Clin Nutr.* 24: 383-384.
- [19] Hohn DC, Mackay RD, Halliday B, Hunt TK. (1976) Effect of O₂ tension on microbicidal function of leucocytes in wounds and *in vitro*. *Surg Forum.* 27: 18- 20.
- [20] Babior BM. (2000) Phagocytes and oxidative stres. *Am J Med.* 109: 33-44.
- [21] Coşkun S, Peker Güleç EG, Balabanlı B, Ahıska S and Acarturk F. (2010) Effect of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) on nitric oxide production and lipid peroxidation in oral mucosal wound healing. *Med. Chem. Res.* DOI: 10.1007/s00044-009-9276-7.
- [22] Casini A, Ferrali M, Pompella A. (1986) Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol.* 123: 520-531.
- [23] Aykaç AG, Uysal M, Yalçın AS, Koçak- Toker N, Sivas A, Öz H. (1985) The effect of cronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology.* 36: 71- 76.
- [24] Berger J, Shepart D, Morrow F, Taylor A. (1989) Relationship between dietary intake and tissue levels reduced and total vitamin C in nonscorbutic guinea pig. *J Nutr.* 119: 734-740.
- [25] Glowick SP, Kaplan SD. (1955) Myeloperoxidase activity. *Methods Enzymol*, Academic Press, New York. 2: 769-770.
- [26] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982) Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126: 131–138.
- [27] Bodner L, Dayan D, Rotehchild D, Hamel I. (1992) Healing of experimental wounds in sialodectomized rat. *J Clin Periodontol.* 19: 345–347.
- [28] Güleç EG. (2006) Epidermal büyüme faktörünün oral submukozal implantla uygulanmasının yara dokusu oksidan olaylarına etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [29] Çağlayan F, Yamalık N, Kılınç K, Giray B. (1994) Erişkin periodontisli hastalarda dişeti örneklerinde miyeloperoksidaz düzeylerinin incelenmesi. *H.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.* 18: 24-27.