



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***LYSIMACHIA VERTICILLARIS* VE *LYSIMACHIA*
VULGARIS BİTKİLERİNİN YARA İYİLEŞTİRME
POTANSİYELLERİNİN VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Şeyda KANBOLAT

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

19/01/2023

Şeyda KANBOLAT

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, değerli danışman hocam Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU'na,

Tez çalışmamda desteklerini benden esirgemeyen ve bitkilerimin temin ve teşhisinde yardımcı olan Prof. Dr. Ufuk ÖZGEN'e,

Bitkilerin teşhisinde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Handan Gökben SEVİNDİK'e,

Histopatolojik çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Engin YENİLMEZ ve Arş. Gör. Ali KULABER'e,

Antimikrobiyal çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na,

Eğitim sürecim boyunca emeği geçen öncelikle KTÜ Eczacılık Fakültesi Hocalarım olmak üzere tüm hocalarıma ve KTÜ Eczacılık Fakültesi tüm personeline,

Hem eğitim sürecimde hem tez aşamalarımda bana kıymetli zamanlarını ayıran, desteklerini esirgemeyen canım dostlarım Dr. Öğr. Üyesi Sıla Özlem ŞENER, Dr. Öğr. Üyesi Merve BADEM, Arş. Gör. Nevin ULAŞ ÇOLAK, Uzman Ecz. Nuriye KORKMAZ ve Ecz. Bürde Suheyra BAYRAKTAR'a,

Doktora tez çalışmamı TDK-2019-7986 proje koduyla destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi'ne,

Beni bu günlere en güzel şekilde getiren ve yetiştiren, hayatımın her anında bana destek olan, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiren çok kıymetli canım aileme; evlilik hayatım boyunca manevi olarak destek, ilgi ve sevgilerini gösteren eşimin çok değerli ailesine,

Hayatıma anlam katan, her koşulda bana desteğini, sevgisini gösteren biricik eşim Galip Erşad KANBOLAT'a ve yuvamızın en kıymetlisi canım kızımız Ayca'ya, yoluma ışık oldukları için,

Teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Şeyda KANBOLAT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bitkiler ile ilgili Genel Bilgiler	4
2.1.1. <i>Lysimachia verticillaris</i> ve <i>Lysimachia vulgaris</i> L. ile İlgili Genel Bilgiler	4
2.1.2. <i>Lysimachia</i> Türleri ile Yapılmış Çalışmalar	6
2.2. Deri ile ilgili Genel Bilgiler	11
2.2.1. Deri Katmanları	12
2.2.1.1. Epidermis	12
2.2.1.2. Dermis	13
2.2.1.3. Hipodermis	13
2.3. Yara ve Yara İyileşmesi	14
2.3.1. Yara İyileşmesi Süreçleri	15
2.3.1.1. Hemostaz	15
2.3.1.2. İnflamasyon	15
2.3.1.3. Proliferasyon	16
2.3.1.4. Yeniden Şekillenme	17
2.3.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	18
2.3.2.1. Lokal Faktörler	19
2.3.2.2. Sistemik Faktörler	21
2.3.3. Yara İyileşmesinin Ölçülmesi	25

2.3.3.1. <i>İn vitro</i> Yöntemler	25
2.3.3.2. <i>İn vivo</i> Yöntemler	26
2.3.3.3. Histopatolojik Yöntemler	26
2.3.3.4. Biyokimyasal Yöntemler	26
2.3.4. Antioksidan Aktivite	26
2.3.4.1. Serbest Radikaller	26
2.3.4.2. Antioksidanlar	27
2.3.5. Antiinflamatuvar Aktivite	30
2.3.5.1. İnflamasyonda Kimyasal Aracılar	31
2.3.6. Antimikrobiyal Aktivite	37
2.3.7. Enzim Aktivitesi	39
2.3.7.1. Kolajenaz Enzim Aktivitesi	40
2.3.7.2. Tirozianaz Enzim Aktivitesi	41
2.3.3.5. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT PCR)	43
2.3.3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	45
3. GEREÇ ve YÖNTEM	48
3.1. Gereç	48
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	48
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
3.2. Yöntem	49
3.2.1. Bitki Temini, Kurutulması ve Ekstraksiyonu	49
3.2.2. Hayvan Deneyi Protokolü	50
3.2.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	50
3.2.2.2. Test Numunelerinin Hazırlanması	51
3.3. <i>İn vivo</i> Aktivite Deneyleri	52
3.3.1. Dairesel Eksizyon Yara Modeli Deneyi	52
3.3.2. Histopatolojik İncelemeler	54
3.4. Biyolojik Aktivite Deneyleri	54
3.4.1. Antioksidan Aktivite	55
3.4.2. Antiinflamatuvar Aktivite	56
3.4.3. Kolajen Bağ Dokunun Saptanması Deneyi	56
3.4.3.1. Hidroksiprolin Deneyi	56
3.4.4. Antimikrobiyal Aktivite	57

3.4.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Deneyi	57
3.4.4.2. Minimal İnhibisyon Deneyi	58
3.4.5. Enzim Aktiviteleri	58
3.4.5.1. Kolajenaz Enzim İnhibisyonu	58
3.4.5.2. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu	59
3.5. Real Time PCR	59
3.5.1. RT RCR Protokolü	60
3.6. YPSK ile Bitki Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	60
3.7. Mekanizma Aydınlatma Çalışmaları	61
3.7.1. Hem Oksijenaz Aktivite Deneyi	61
3.7.2. COX-2 İnhibitör Etki Deneyi	62
3.7.3. Nitrik Oksit İçeriği Deneyi	62
3.8. İstatistiksel Analiz	62
4. BULGULAR	63
4.1. <i>İn vivo</i> Çalışmalar	63
4.1.1. Dairesel Eksizyon Yara Modeli Deney Bulguları	63
4.1.2. Yara Dokularının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi	64
4.2. Biyolojik Aktivite Deney Bulguları	67
4.2.1. Antioksidan Aktivite Deney Bulguları	67
4.2.2. Antiinflamatuvar Aktivite Deney Bulguları	71
4.2.3. Kolajen Bağ Dokunun Saptanması Deney Bulguları	73
4.2.3.1. Hidroksiprolin Deney Bulguları	73
4.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Deney Bulguları	75
4.2.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Deneyi Bulguları	75
4.2.4.2. Minimal İnhibisyon Deneyinin Bulguları	75
4.2.5. Enzim Aktivitesi Deney Bulguları	76
4.2.5.1. Kolajenaz Enzim İnhibisyonu Deney Bulguları	76
4.2.5.2. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Deney Bulguları	78
4.3. Real Time PCR Deney Bulguları	80
4.4. YPSK ile Bitki Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi Deney Bulguları	81
4.5. Mekanizma Aydınlatma Çalışmaları Deney Bulguları	83
4.5.1 Hem Oksijenaz Aktivite Deney Bulguları	83
4.5.2. COX-2 İnhibitör Etki Deney Bulguları	84

4.5.3. Nitrik Oksit İçeriği Deney Bulguları	85
5. TARTIŖMA ve SONUÇ	86
6. KAYNAKLAR	98
EKLER	123
Ek 1. Etik Kurul Onayı	124
ÖZGEMİŖ	126



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler	19
Tablo 2. Yaşa bağlı olarak yara iyileşme fazlarında görülen değişimler	22
Tablo 3. İnflamasyondaki kimyasal araçlar	32
Tablo 4. Yara iyileşmesi boyunca önemli olan interlökinlerin rolleri	35
Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan cihazlar	48
Tablo 6. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	49
Tablo 7. <i>In vivo</i> dairesel eksizyon yara modeli sıçan grupları	51
Tablo 8. Yara iyileşmesi değerlendirme skorlaması	54
Tablo 9. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan test mikroorganizmaları	57
Tablo 10. Real Time-PCR genlerin primer dizileri	60
Tablo 11. Bitkilerin fenolik içeriğinin belirlenmesi için uygulanan YPSK şartları	61
Tablo 12. Dairesel eksizyon yara modelinde yara alanı ölçüm sonuçları	63
Tablo 13. Dairesel eksizyon yara modelinde yaranın kapanma yüzdesi sonuçları (%)	63
Tablo 14. 1., 4., 7. ve 14. günlerde iyileşmiş eksizyon yaraları görüntüleri	64
Tablo 15. Yara dokularının yara iyileşme skorları	65
Tablo 16. Mikroorganizma inhibisyon zon çapları bulguları	75
Tablo 17. Minimal inhibisyon konsantrasyonu bulguları	75
Tablo 18. <i>L. verticillaris</i> ve <i>L. vulgaris</i> 'in içerdiği fenolik bileşikler	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Deri katmanları	11
Şekil 2. Stresin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri	23
Şekil 3. Başlıca serbest radikal kaynakları ve serbest radikal hasarının sonuçları	27
Şekil 4. Yara dokusunda lökosit infiltrasyon modeli	31
Şekil 5. Eikosanoidlerin biyosentezi	33
Şekil 6. PCR basamakları	44
Şekil 7. RT PCR basamakları	45
Şekil 8. Bir YPSK cihazının gösterimi	46
Şekil 9. Deri dokusunda SOD değerleri	68
Şekil 10. Serumda SOD değerleri	68
Şekil 11. Deri dokusunda CAT değerleri	69
Şekil 12. Serumda CAT değerleri	69
Şekil 13. 1,1,3,3-Tetraetoksi propan konsantrasyonuna karşı absorbands grafiği	70
Şekil 14. Deri dokusunda MDA değerleri	70
Şekil 15. Serumda MDA değerleri	71
Şekil 16. Deri dokusunda TNF- α değerleri	71
Şekil 17. Serumda TNF- α değerleri	72
Şekil 18. Deri dokusunda IL-1 değerleri	72
Şekil 19. Serumda IL-1 değerleri	73
Şekil 20. Hidroksiprolin konsantrasyonuna karşı absorbands grafiği	74
Şekil 21. Deri dokusunda hidroksiprolin değerleri	74
Şekil 22. <i>L. verticillaris</i> su ekstresi kolajenaz inhibitör aktivite grafiği	76
Şekil 23. <i>L. vulgaris</i> su ekstresi kolajenaz inhibitör aktivite grafiği	77
Şekil 24. Kateşin'in kolajenaz inhibitör aktivite grafiği	77
Şekil 25. Kolajenaz enzim inhibisyonu IC ₅₀ değerleri	78
Şekil 26. <i>L. verticillaris</i> su ekstresi tirozinaz inhibitör aktivite grafiği	79
Şekil 27. <i>L. vulgaris</i> su ekstresi tirozinaz inhibitör aktivite grafiği	79
Şekil 28. Kojik asit'in tirozinaz inhibitör aktivite grafiği	80
Şekil 29. Tirozinaz enzim inhibisyonu IC ₅₀ değerleri	80
Şekil 30. mRNA gen ekspresyon oranları	81
Şekil 31. Standartların YPSK kromatogramı	82

Şekil 32. <i>L. verticillaris</i> su ekstresinde bulunan fenolik bileşiklerin YPSK kromatogramı	82
Şekil 33. <i>L. vulgaris</i> su ekstresinde bulunan fenolik bileşiklerin YPSK kromatogramı	83
Şekil 34. <i>L. verticillaris</i> ve <i>L. vulgaris</i> su ekstreleri uygulanan hücrelerde HO-1 içeriği	84
Şekil 35. <i>L. verticillaris</i> ve <i>L. vulgaris</i> su ekstreleri uygulanan hücrelerde COX-2 % inhibisyonu	84
Şekil 36. İndometasin, <i>L. verticillaris</i> su ekstresi ve <i>L. vulgaris</i> su ekstresi uygulanan hücrelerde NO içeriği	85

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. <i>L. verticillaris</i> bitkisinin genel görünümü	4
Resim 2. <i>L. verticillaris</i> 'in Türkiye'de yetiştiği yerlerin haritası	5
Resim 3. <i>L. vulgaris</i> L. bitkisinin genel görünümü	5
Resim 4. <i>L. vulgaris</i> 'in Türkiye'de yetiştiği yerlerin haritası	6
Resim 5. Sıçanların barındırıldığı kafesler	51
Resim 6. Bitki ekstrelerinden hazırlanan merhemler	52
Resim 7. Referans madde, Madecassol® merhem	52
Resim 8. Sıçanların traş yapılmış hali, derilerinde biyopsi punch ile oluşturulmuş yara ve yaralarına merhem uygulanan hali	53
Resim 9. K: Kontrol grubu hematoksil-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başları; anjiogenez (x10). B) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başları; anjiyogenez, ok başı; fibroblast (x40)	65
Resim 10. PK: Pozitif grubu hematoksil-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başı; kıl kökü folikülü (x10). B) çentikli ok başı; kıl kökü folikülü, ok başı; anjiogenez, çentikli ok; fibroblast (x40)	65
Resim 11. LVESE-1 hematoksil-eozin boyama. A) ok olgun epitel tabakası, çentikli ok başı; anjiogenez (x10). B) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başı; anjiogenez, ok başı; fibroblast (x40)	66
Resim 12. LVESE-2 hematoksil-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, ok başı; kıl kökü folikülü, çentikli ok başı; anjiogenez (x10). B) ok; olgun epitel tabakası, ok başı; fibroblast (x40)	66
Resim 13. LVUSE-1 hematoksil-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başı; kıl kökü folikülü (x10). B) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok; fibroblast (x40)	67
Resim 14. LVUSE-2 hematoksil-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok; kıl kökü folikülü, çentikli ok başı; anjiogenez (x10). B) çentikli ok; fibroblast (x40)	67

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

A549	İnsan akciğer karsinomu hücre hattı
A549/DDP	İnsan akciğer karsinomu/sisplatine dirençli hücre hattı
AA	Araşidonik asit
ABTS	2,2-Azino-bis(3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit)
ALT	Alanin aminotransferaz
AR	Aldolaz redüktaz
AST	Aspartat aminotransferaz testi
ATP	Adenozin trifosfat
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
BSA	Sığır serum albümini
Ca	<i>Candida albicans</i>
CAT	Katalaz
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
COX	Siklooksijenaz
DAD	Diyot dizi dedektörü
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	2,2 -Difenil-1-pikrilhidrazil
DU-145	İnsan prostat hücre hattı
EA	<i>Elaeagnus angustifolia</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Ekstraselüler matriks
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>
EGCG	Epigallokateşin gallat
EGF	Epidermal büyüme faktörü
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
FALGPA	N-[3- (2-Furil) akrilolil]-Leu-Gly-Pro-Ala
FBS	Fetal bovin serum
FSB	Foenumosıt B
GAG	Glikozaminoglikan
GC	Glukokortikoit

GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
HBOT	Hiperbarik oksijen tedavisi
HETE	Hidroksieikozatetraenoik asit
HO-1	Hem oksijenaz 1
IC₅₀	Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan konsantrasyon
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
IL-1Ra	İnterlökin-1 reseptör antagonistinin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
K562	Kronik miyeloid lösemi
L9N29	Fibroblast hücre hattı
L-DOPA	3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
LT	Lökotrien
LVESE-1	%1'lik <i>L. verticillaris</i> su ekstresi
LVESE-2	% 5'lik <i>L. verticillaris</i> su ekstresi
LVUSE-1	% 1'lik <i>L. vulgaris</i> su ekstresi
LVUSE-2	% 5'lik <i>L. vulgaris</i> su ekstresi
Lx	Lipoksin
MDA	Malondialdehit
MHA	Mueller hinton agar
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyonu
MMP	Matriks metalloproteaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NCCLS	National committee for clinical laboratory standard
NF-κB	Nükleer faktörü kappa B
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz

Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2
PC3	İnsan prostat hücre hattı
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	Potato dextrose agar
PDGF	Trombosit türevli büyüme faktörü
PF-4	Trombosit faktör 4
PG	Prostaglandin
PGD2	Prostaglandin D2
PGE2	Prostaglandin E2
PGF2a	Prostaglandin F2a
PGI2	Prostosiklin I2
PLA2	Fosfolipaz A2
RAW 264.7	Makrofaj hücreleri
RNA	Ribonükleik asit
RNT	Reaktif azot türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
RST	Reaktif kükürt türleri
RT PCR	Real time polimeraz zincir reaksiyonu
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
SOD	Süperoksit dismutaz
TAF	Trombosit aktive eden faktör
TBA	Tiyobarbitürik asit
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TNF-α	Tümör nekroz faktör-alfa
Tx	Tromboksan
TxA2	Tromboksan A2
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
YEG	Maya ekstreli sıvı besiyeri
YNBB	Yeast nitrogen base
Yp	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
5-LO	5-Lipoksijenaz
12-LO	12-Lipoksijenaz

15-LO

15-Lipoksijenaz

Semboller

$\cdot\text{OH}$	Hidroksil radikali
CCl_4	Karbon tetraklorür
CO_2	Karbon dioksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen
Mg^{2+}	Magnezyum iyonu
N_2O_3	Diazot trioksit
N_2O_4	Diazot tetroksit
NaOH	Sodyum hidroksit
$\text{NO}_2\cdot$	Azot dioksit radikali
O_2	Oksijen
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Süperoksit radikali
ONOO^-	Peroksinitrit iyonu

ÖZET

***Lysimachia verticillaris* ve *Lysimachia vulgaris* Bitkilerinin Yara İyileştirme Potansiyellerinin ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi**

Lysimachia cinsi (Primulaceae) Türkiye bitki örtüsünde 8 tür ile temsil edilmektedir. Zengin fenolik ve flavonoit içeriği ile *Lysimachia* türleri halk arasında yara iyi edici, ateş düşürücü, ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında; *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* bitkilerinin *in vivo* ve *in vitro* olarak yara iyileştirme potansiyellerinin değerlendirilmesi ile terapötik kullanımının araştırılması amaçlanmaktadır. Tez kapsamında, “Dairesel Yara Modeli” ile *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* su ekstrelerinin yara iyileştirme potansiyelleri *in vivo* olarak araştırılmıştır. Biyolojik aktivite çalışmaları ve histopatolojik çalışmalar ile yara iyileşmesindeki değişiklikler gözlenmiştir. Gen ekspresyonunun belirlenmesi için RT-PCR çalışmaları yapılmıştır. Bitkilerin su ekstrelerinin yara iyileştirme potansiyeli mekanizmasının aydınlatması için hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu tez çalışmasında enzim inhibisyonları, antimikrobiyal aktivite ve YPSK çalışmaları yapılmıştır. Yara alanı küçülmeleri incelendiğinde, merhemlerin yara kapanma etkisinin pozitif kontrol olarak kullanılan Madecassol® grubuna göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Yara kapanması sonuçları ile histopatolojik, antioksidan ve antiinflamatuvar sonuçlar birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Bitkilerin TNF- α , IL-1 β ve MMP-9 gen seviyelerini azaltarak, IL-10 seviyesini ise artırarak yara iyileşmesine katkı sağladığı görülmüştür. Mekanizma aydınlatma çalışmaları ile bitkilerin hücrelerde H₂O₂ konsantrasyonunu artırarak, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini ve nitrik oksiti inhibe ederek yara iyileştirme potansiyellerini gerçekleştirdikleri saptanmıştır. Bitkilerin kolajenaz enzim inhibisyon değerleri birbirine yakın ve kateşin kadar etkili bulunmuştur. Bitkilerin en belirgin antimikrobiyal aktiviteyi gram pozitif bakterilerden biri olan *S. aureus*’a karşı gösterdiği belirlenmiştir. YPSK çalışmaları ile bitkilerin fenolik içeriği incelendiğinde ana bileşenin sinapik asit olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, bu bitkilerin su ekstrelerinin yara iyileştirme potansiyellerinin oldukça etkili olduğu ve doğal ilaç kaynağı olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Enzim inhibisyonu, *Lysimachia*, Primulaceae, RT-PCR, Yara iyileştirme potansiyeli

ABSTRACT

Investigation of Wound Healing Potentials and Biological Activities of *Lysimachia verticillaris* and *Lysimachia vulgaris* Plants

The genus *Lysimachia* (Primulaceae) is represented by 8 species in the flora of Turkey. *Lysimachia* species with their rich phenolic and flavonoid content are used among the public as wound healing, antipyretic and pain reliever. In this thesis study; it is aimed to evaluate the wound healing potential of *L. verticillaris* and *L. vulgaris* plants as *in vivo* and *in vitro* and to investigate their therapeutic use. Within the scope of the thesis, the wound healing potentials of *L. verticillaris* and *L. vulgaris* aqueous extracts were investigated *in vivo* with the “Circular Excision Wound Model”. Changes in wound healing have been observed with biological activity and histopathological studies. RT-PCR studies were performed to determine gene expression. Cell culture studies were carried out to elucidate the mechanism of the wound healing potential of aqueous extracts of plants. Moreover, enzyme inhibitions, antimicrobial activity and HPLC studies were carried out in this thesis. When the wound area reductions were examined, it was determined that the wound closure effect of the ointments was better than the Madecassol® group used as a positive control. Wound closure results and histopathological, antioxidant and anti-inflammatory results were found to be compatible with each other. It was observed that the plants contributed to wound healing by decreasing TNF- α , IL-1 β and MMP-9 gene levels and increasing IL-10 levels. By mechanism elucidation studies, it has been determined that the plants realize their wound healing potential by increasing HO concentration in cells, inhibiting cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme and nitric oxide. The collagenase enzyme inhibition values of the plants were found to be close to each other and as effective as catechin. It was determined that the plants showed the most pronounced antimicrobial activity against *S. aureus*, one of the gram-positive bacteria. When the phenolic content of the plants was examined by YPSK studies, it was determined that the main component was sinapic acid. In the light of this information, it is predicted that the wound healing potential of aqueous extracts of the plants are quite effective and can be used as a natural drug source.

Key Words: Enzyme inhibition, *Lysimachia*, Primulaceae, RT-PCR, Wound healing potential

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tıbbi bitkiler, temel birincil metabolitlere (karbohidratlar, lipitler, aminoasitler gibi) ek olarak, sekonder metabolitler sentezlerler ve bu bileşenler insan sağlığı için oldukça önemli doğal kaynaklardır (1, 2). Alkaloidler, antosiyaninler, flavonoidler, kinonlar, lignanlar, steroidler ve terpenoidler gibi çok sayıda sekonder metabolitler, ilaç, boya, aroma, koku, böcek ilacı gibi farklı şekillerde kullanılmaktadır (2, 3). Bu kimyasal bileşenler, bitkilerden ekstrakte edilebilir veya saflaştırılabilir (3). Potansiyel biyoaktif bileşik içeren tıbbi bitkiler, inflamasyon, oksidatif stres, hipertansiyon, obezite, diyabet, yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalık durumlarıyla mücadelede yardımcı kaynaklardır. Aynı zamanda, tıbbi bitkiler çeşitli gen ifadelerini düzenleme potansiyeline sahiptir (4).

Bitkiler, insanlık tarihi boyunca binlerce yıldır uygulanan çeşitli geleneksel tıp sistemlerinin ve halk ilaçlarının temelini oluşturmuştur (5). Yapraklar, kökler, gövdeler, tohumlar ve meyveler gibi bitki parçaları, insan için besin kaynağı ve farklı hastalıkların tedavisinde güvenli bir ilaç kaynağı olarak kullanılmaktadır (6). Günümüzde antimikrobiyal, kardiyovasküler, immünosupresif ve antikanser ilaçların yaklaşık % 80'i bitkilerden veya bitkilerden izole edilen bileşiklerden türetilir. Bitkilerin tıbbi değeri, içerdikleri biyolojik aktif bileşenlerin varlığına bağlıdır. Ayrıca, bitkisel ilaçların güvenli ve en uygun kullanımı, bitki-sentetik madde/bitki-bitki etkileşim profillerinin tam olarak anlaşılmasını gerektirir (5).

Lysimachia türleri Primulaceae familyasına aittir ve halk arasında “kargaotu” veya “altın kamy” olarak isimlendirilmektedir (7). *Lysimachia* türleri, flavonoidler, triterpenler, fenolik asitler gibi çeşitli ikincil metabolitleri bolca içermektedir. Zengin içeriği sayesinde önemli biyolojik aktivitelere sahip olan *Lysimachia* türleri, halk arasında yara iyi edici, ateş düşürücü, ağrı kesici, öksürük giderici olarak ve bronşit tedavisinde kullanılmaktadır (8-17).

Yaralanma travma, fiziksel veya kimyasal zedelenme veya belirli patolojik durumlardan kaynaklı gelişebilir. Yara iyileşmesi, hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal olayların iç içe geçtiği karmaşık bir süreçtir (18). Yara iyileşme fazlarında yaşanabilecek sorunlar yara iyileşmesini engelleyebilir, hatta yara iyileşmesinde gecikmelere sebep olabilir (19). İlk uygarlık zamanlarından günümüze kadar yara bakımı görülmekte ve bu

tedaviler çoğunlukla bitkisel tedavilere dayanmaktadır. Geleneksel ilaçların yaklaşık üçte biri, yara ve cilt bozukluklarını gidermek için kullanılmaktadır (20).

Şener'in yapmış olduğu tez çalışması kapsamında *Lysimachia verticillaris*'in toprak üstü kısımlarından gallik asit, (+)-kateşin, mirsetin 3-O- α -arabinozit, mirsetin 3-O- α -ramnozit, kersetin 3-O- β -glukozit, kersetin 3-O- α -arabinozit ve kersetin 3-O- α -ramnozit izole edilmiştir. Bu izole edilen bileşiklerden kersetin 3-O-glukozitin yara iyileştirici etkisinin olduğu literatürlerde belirtilmiştir. Ayrıca, Baytop'un kitabında *Lysimachia* türlerinin Anadolu'da halk arasında yara iyileştirme amacıyla kullanıldığına dair bilgiler mevcuttur (8, 11). Bu veriler ışığında tez çalışmasında; Türkiye'de yetişen *Lysimachia verticillaris* ve *Lysimachia vulgaris* bitkilerinin yara iyileştirme potansiyellerinin değerlendirilmesi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Sıçanların sırt bölgelerinde dairesel yaralar oluşturulmuş ve bu bitkilerin su ekstraktları kullanılarak hazırlanan merhem yaralara topikal olarak uygulanmıştır. Yara iyileşmesindeki değişiklikler *in vivo* olarak biyolojik ve histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir. Biyolojik aktivite çalışmaları ile yeni yara iyileştirici ajanların geliştirilmesi oldukça önemlidir. Antioksidan, antiinflamatuvar ve hidroksiprolin aktiviteleri, yara iyileşmesine ve cildin yenilenmesine katkıda bulunmaktadır. Antioksidan aktivite gösteren maddeler, canlı bir dokuyu koruyabilir ve yara iyileşmesini kolaylaştırabilir. Bitkilerin antioksidan etki bakımından değerlendirilmesi ile yara iyileştirici etkileri hakkında önemli bilgiler elde edileceği düşünüldüğünden bu tez kapsamında antioksidan aktivite çalışmaları yapılmıştır. Akut inflamatuvar yanıt, yaranın erken aşamalarında, doku büyümesi ve tamiri için gerekli olan faktörleri üretir. Yara iyileşmesini kolaylaştırmak ve hasta konforunu geliştirmek için antiinflamatuvar etkiden faydalanılabilir. Bu yüzden, yara iyileştirici aktivitenin tespit edilmesinde destekleyici deney olarak tercih edilen antiinflamatuvar aktivite deneyleri yapılmıştır. Ekstraselüler matriks (ECM) elemanlarından biri olan kolajen hücrelere destekleyici bir iskelet oluşturan ve yara iyileşmesinde rol oynayan ana yapısal bir proteindir. Dokulardaki kolajen miktarı kolajenin yapısında bulunan hidroksiprolinin ölçümü ile belirlenmiştir. Yara iyileşmesinin düzeyinin belirlenmesinde en önemli ölçütlerden birisi de yara dokusu üzerinde yapılan histopatolojik araştırmalardır. İyileşmenin belirlenmesi amacıyla, histopatolojik incelemelerde bulunulmuştur. Real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) çalışmaları ile yara iyileşmesindeki etkili genler incelenmiştir.

Bitki ekstralarının kolajenaz ve tirozinaz enzim inhibisyonu, antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Kolajenazların yara iyileşmesi, sinir gelişimi, çekirdek şekillenmesi, anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu) gibi birçok fizyolojik süreçte önemi büyüktür. Bu amaçla, kolajenaz inhibisyonu çalışmaları ile ekstraların yara iyileşmesine katkısı incelenmiştir. Tirozinaz enzimi yara iyileşme fazlarının pigmentasyonunda rol aldığı düşünüldüğünden, tirozinaz enzim inhibisyonu çalışmaları yapılmıştır. Yara bölgesinde mikroorganizmaların çok bulunması, yara iyileşmesinin gecikmesine neden olabilir. Bu yüzden, yara iyileşmesine katkısını belirlemek için ekstraların antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Aynı zamanda, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) çalışmaları ile fenolik madde içerikleri ortaya konulmuştur. Ekstrelerin hem oksijenaz-1 (HO-1) aktivitesini, siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitör etkisini ve nitrik oksit (NO) içeriğini belirlemek için hücre kültürü çalışmaları yapılarak mekanizmanın aydınlatılması amaçlanmıştır.

Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında, *L.verticillaris* ve *L.vulgaris* su ekstralarının yara iyileştirme potansiyelleri ortaya konulmuş olacaktır. Bu iki bitkinin halk arasındaki kullanım amacının doğrulanması ile yara iyileştirici etkiye sahip yeni ilaç moleküllerinin tespit edilmesi ve yapılarının aydınlatılmasının yolu da açılmış olacaktır.

2. GENEL BİLBİLER

2.1. Bitkiler ile İlgili Genel Bilgiler

2.1.1. *Lysimachia verticillaris* ve *Lysimachia vulgaris* L. ile İlgili Genel Bilgiler

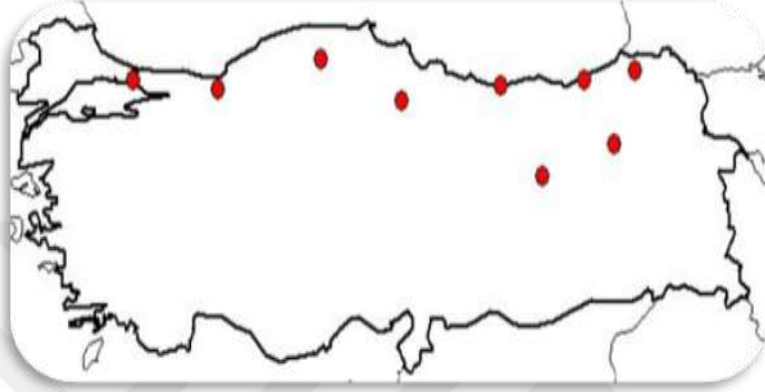
Primulaceae familyasına ait olan *Lysimachia* cinsi dünya çapında 193 tür, ülkemizde ise 8 tür ile temsil edilir (21, 22). Çok yıllık veya tek yıllık otsu bitkilerden oluşan *Lysimachia* cinsi, Avrasya’da sulak alanlar, nemli çayırliklar ve ormanlarda doğal olarak yetişir. Bu cinsin yaprakları karşılıklı, almalı, nadiren dairesel dizilişlidir. Saplı veya sapsız, kırmızı bezeli çilli görünümde olabilir. Çiçek durumu bileşik salkım, salkım veya başak dizilişli; bazı türlerinde brakteler mevcut olmakla beraber 5 parçalı kalikse bölünmüştür. Genel olarak sarı çiçeklere sahiptir, ancak pembe veya koyu mor çiçekli türleri de mevcuttur. Stamenler taçdan daha kısa ya da nadiren daha uzun olup yumurtalık üst durumludur (8, 22).

Cins ismi Antik Sicilya Kralı “Lysimachus” onuruna verilmiştir. *Lysimachia* cinsinin ülkemizde bulunan türleri *L. atropurpurea* (mor kargaotu), *L. dubia* (ikiz kargaotu), *L. linium-stelletum*, *L. nummularia* (yer kargaotu), *L. punctata* (benekli kargaotu), *L. japonica* (Japon kargaotu), *L. verticillaris* (hilal kargaotu) ve *L. vulgaris* (kargaotu)’tir (7, 21).



Resim 1. *L. verticillaris* bitkisinin genel görünümü

L. verticillaris, dik gövdeli, çok yıllık, otsu bir bitki olup orman ve çalılıklarda veya orman ve çalılıkların ıslak yerlerinde görülmektedir. Halk arasında “hilal kargaotu” olarak isimlendirilmektedir (Resim 1). Dünya’da Kırım, Kafkasya, Kuzey İran’da; Türkiye’de ise Düzce, İstanbul, Kastamonu, Amasya, Artvin, Erzurum, Giresun, Rize ve Tunceli illerinde (0-2440 m yükseklikte) doğal olarak yetişmektedir (Resim 2) (7, 12).



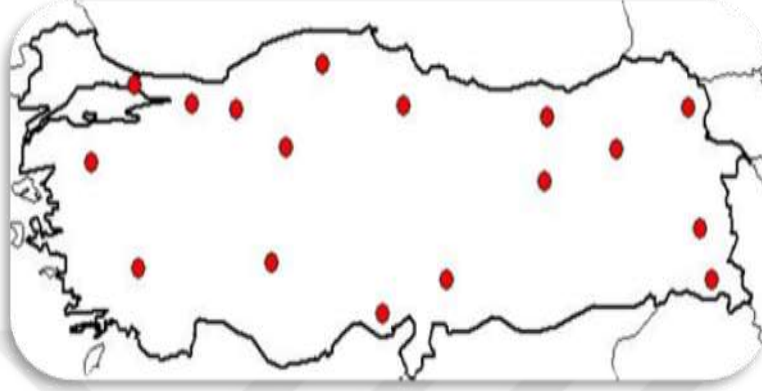
Resim 2. *L. verticillaris*’in Türkiye’de yetiştiği yerlerin haritası



Resim 3. *L. vulgaris* L. bitkisinin genel görünümü

L. vulgaris, dik gövdeli, çok yıllık, otsu bir bitki olup dere kenarlarında veya bataklık arazilerde görülmektedir. Halk arasında “kargaotu” olarak isimlendirilmektedir (Resim 3). Dünya’da Kuzey Avrupa, Batı Avrupa, Güney Avrupa, Kuzeybatı Afrika, Kafkasya, Kuzey Irak, Kuzey İran, Batı İran, in ve Amerika’da; Türkiye’de ise Adana,

Bolu, İstanbul, Kars, Hakkari, Kastamonu, Amasya, Ankara, Balıkesir, Denizli, Erzurum, Gümüşhane, Konya, Kahramanmaraş, Sakarya, Tunceli ve Van illerinde (0-2150 m yükseklikte) doğal olarak yetişmektedir (Resim 4) (7, 12).



Resim 4. *L. vulgaris*'in Türkiye'de yetiştiği yerlerin haritası

2.1.2. *Lysimachia* Türleri ile Yapılmış Çalışmalar

L. verticillaris'in izolasyonun yapıldığı bir çalışmada, bitkiden fraksiyonlanma ile dört farklı ekstre (metanol, su, etil asetat ve kloroform) elde edilmiştir. Tütün kolinesteraz, tirozinaz inhibitör etkisi ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Tütün orta düzeyde tirozinaz, yüksek düzeyde kolinesteraz inhibitör etki ve güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. En yüksek aktivite gösteren etil asetat fraksiyonunda izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Açık kolon kromatografisi ve yarı preparatif YPSK yöntemleri ile etil asetat fraksiyonundan gallik asit; (+)-kateşin; mirsetin 3-O- α -arabinozit, mirsetin 3-O- α -ramnozit, kersetin 3-O- β -glukozit, kersetin 3-O- α -arabinozit ve kersetin 3-O- α -ramnozit izole edilmiştir (9)

L. vulgaris L.'nin izolasyonu ile ilgili bir çalışmada elde edilen bileşiklerin *in vitro* antifungal ve sitotoksik aktivitesi belirlenmiştir. Tütün toprak altı kısımlarının kloroform ve metanol ekstraktları hazırlanmıştır. Kloroform ekstresinden benzokinon pigmenti ve metanol ekstresinden ise üç triterpen saponozit (A, B ve C) izole edilmiştir. Çalışmada, bu bileşiklerin antifungal ve sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bu test sonuçlarına göre saponozit B'nin, özellikle insan melanom hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Benzokinon pigmenti ise bir antifungal ajan olarak aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (10).

L. foenum graecum Hance ile ilgili yapılan bu çalışmada, türün su, metanol, etil asetat ve n-bütanol ekstreleri hazırlanarak antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Fosfomolibden metoduyla toplam antioksidan kapasite, 2,2 -Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal, süperoksit anyon radikal metodlarıyla hidroksil radikal süpürücü etkileri belirlenmiştir. Belirlenen antioksidan aktiviteler ile ekstrelerdeki flavonoit ve fenolik bileşiklerin miktarları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bütün ekstrelerin ve fraksiyonların antioksidan ve radikal temizleyici aktiviteler sergiledikleri gözlenmiştir. Aynı zamanda antioksidan aktivitenin flavonoit ve fenolik bileşik miktarları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, *L. foenum-graecum* elde edilen ekstrelerin değerli doğal antioksidan kaynaklar olabileceği belirtilmiştir (13).

L. nummularia L. metanol ekstresinin izolasyonunun yapıldığı bir çalışmada, yeni bir triterpen saponin olan protoprimumagenin A bileşiği elde edilmiştir. Türden izole edilen bu bileşiğin prostat hücre hatlarında (DU-145 ve PC3) sitotoksik aktivitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (16).

L. vulgaris L.'nin biyolojik aktivitesini incelemek için tarlada ve *in vitro* şartlarda yetiştirilen bitkiler kullanılmıştır. Bu amaçla bitkilerin su, etanol ve aseton ekstreleri hazırlanmıştır. 10 farklı patojenik bakteri kullanılarak agar disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Bitki ekstrelerinin, gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, tarlada yetiştirilen bitkinin *in vitro* şartlarda yetiştirilen bitkiden daha iyi antibakteriyel etkisinin olduğu gözlenmiştir. Antitümör aktivitenin belirlenmesinde kullanılan patates disk difüzyon yöntemine göre tarlada yetişen bitkinin su ekstresinin en güçlü antitümör aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için DPPH, toplam fenolik madde ve toplam flavonoit madde tayin yöntemleri kullanılmıştır. Sonuçlara göre *L. vulgaris* ekstrelerinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve fenolikler ve flavonoitler bakımından zengin olduğu görülmüştür. Son olarak, bitki ekstrelerinin YPSK yöntemi ile fenolik içerikleri (gallik asit monohidrat, kafeik asit, kersetin-3-rutinozit, luteolin-7-O- β -D glukozit, kemferol-3 β -D-glukozit, mirsetin, kersetin, kumarin ve apigenin) belirlenmiştir. YPSK analizlerinin sonuçlarına göre, tarlada yetiştirilen bitki ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin miktarı daha yüksek bulunmuştur. *L. vulgaris* L.'nin, gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisini iyileştirebilecek ilaçlar için uygun bir kaynak olabileceği ve antioksidan gıda katkı maddesi kaynağı olabileceği düşünülmektedir (17).

L. verticillaris su ekstresinin ve türden izole edilmiş bileşiklerin antidiyabetik ve antioksidan etkisinin incelendiği bir çalışmada, ekstre ve izole bileşikler streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlara oral olarak verilmiştir. Uygulama sonrasında, yüksek kan glukoz seviyelerinin düştüğü, antioksidan parametrelerin ise arttığı saptanmıştır. İzole edilmiş bileşikler içerisinde kersetin 3-*O*- β -glukozit en iyi antidiyabetik etkiyi gösterdiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, türün ve izole bileşiklerin diyabet tedavisinde potansiyel bir doğal kaynak olabileceği vurgulanmıştır (21).

L. clethroides Duby'nin antikanser etkiye sahip olup olmadığını araştırmak için yapılan bir çalışmada, kronik miyeloid lösemi (K562) hücrelerine, farklı zaman aralıklarında farklı bitki konsantrasyonları uygulanmıştır. Hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir. Flow sitometri, Hoechst 33258 boyama, COMET yöntemi ile hücre apoptozu saptanmıştır. Bu deneylerin sonuçlarına göre, bitkiden elde edilen toplam flavonoidlerin, K562 hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği ve apoptoz yoluyla potansiyel antikanser aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (23).

L. clethroides'ten elde edilen hidro-alkolik ekstrenin vasorelaksan aktivitesini belirlemek ve bu etki varsa altta yatan mekanizmayı aydınlatmak için Lee ve arkadaşları tarafından bir çalışma yapılmıştır. Hücre kültürü, vasküler reaktivite, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz aktivitesinin belirlenmesi, protein kinaz B'nin ve endotelial nitrik oksit sentaz'ın fosforilasyon düzeyinin belirlenmesi ve reaktif oksijen türleri (ROT)'nin belirlenmesi çalışmaları sonuçları umut verici bulunmuştur. Çalışmanın bulguları incelendiğinde, türün NO üretimi ve endotel disfonksiyonu ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklar için doğal bir bitkisel ilaç adayı olabileceğini göstermiştir (24).

Moon ve arkadaşlarının Jeju adası bitkileri ile ilgili yaptığı bir çalışmada, bitkilerin elastaz inhibisyon aktivitesi ve tirozinaz inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. İncelenen bitkilerden biri olan *L. mauritian*'ın etanol ekstresi hazırlanmış ve düşük düzeyde tirozinaz ve elastaz inhibisyon aktivite gösterdiği belirlenmiştir (25).

L. heterogenea ile yapılan bir çalışmada, iki yeni triterpenoitin (heterojenosit E and F) yanısıra 8 bilinen bileşik (palmitik asit, β -stigmasterol, kemferol, kersetin, hiperin, isoramnetin, isoramnetin-3-*O*-galaktozit ve anagallis C) izole edilmiştir. Anagallis C, heterojenosit E ve F'nin düşük düzeyde sitotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (26).

Hepatoprotektif etkinin incelendiği bir çalışmada, *L. christinae* %75'lik etanol ekstresinin ve türden izole edilen kersetinin, farelerde alkole bağlı karaciğer hasarına karşı koruyucu özelliğinin olduğu gözlenmiştir. Altta yatan potansiyel mekanizmanın karaciğer oksidatif stres hasarını inhibe etmekle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, *L. christinae*'nin ana hepatoprotektif bileşeninin kersetin olduğu kanıtlanmıştır (27).

L. foenum-graecum'un antiobezite etkisinin incelendiği bir çalışmada, türün etanol ekstresinden izole edilen foenumozit B, preadipositlerin, adipogenez deneyinde doza bağımlı bir şekilde farklılaşmayı bloke ettiği saptanmıştır. Aynı zamanda, foenumozit B adipogenezin ana düzenleyicisi olan peroksizom proliferatörle aktifleştirilen reseptör γ 'nın indüklenmesini baskılamıştır. Foenumozit B, 5'-adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinazın aktivasyonunu uyararak farklılaşmış adipositlerde lipit metabolizmasında yer alan genlerin ekspresyonunu modüle etmiştir. Fare deneyi modelinde, foenumozit B'nin oral uygulaması ile yüksek yağlı diyetin yol açtığı vücut ağırlığı artışını, gıda alımını etkilemeden önemli ölçüde azaltmıştır. Foenumozit B'nin tedavisi ile beyaz adipoz dokularda ve karaciğerde lipit birikimi baskılanmış ve yüksek yağlı diyet ile indüklenen obez farelerde kandaki glukoz, trigliserit, alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyeleri düşmüştür. Ayrıca, foenumozit B'nin adipoz dokuda yüksek yağlı diyetin indüklediği proinflatuvar sitokin üretimini bloke ettiği ve insülin direncine karşı koruyucu rolünün olduğu ortaya konulmuştur. Bu bulgular ele alındığında, foenumozit B içeriği ile *L. foenum-graecum*'un obezite ve obezite ile ilişkili metabolik hastalıklarda terapötik potansiyelinin olduğu görülmüştür (28).

L. clethroides Duby'nin farklı ekstrelerinin (petrol eteri, etil asetat, n-bütanol) antioksidan aktivitesi ve karbon tetraklorür (CCl_4) ile indüklenen akut karaciğer hasarı oluşturulan fareler üzerinde hepatoprotektif etkisi bir çalışmada incelenmiştir. DPPH ve 2,2-azino-bis(3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) yöntemlerine göre antioksidan aktivite araştırılmıştır. Bu yöntemlere göre etil asetat ve n-bütanol ekstrelerinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. CCl_4 ile indüklenen akut karaciğer hasarı oluşturulan farelere, türün petrol eteri, etil asetat ve n-bütanol ekstreleri sekiz gün boyunca intragastrik olarak verilmiştir. Her bir tedavi grubunda glutamik oksaloasetik transaminaz ve glutamik piruvik transaminaz seviyesi önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Ayrıca, her tedavi grubu için malondialdehit (MDA) seviyesi anlamlı derecede düşerken, süperoksit dismutaz (SOD) seviyesi ise n-bütanol grubu haricinde diğer tedavi gruplarında anlamlı bir

artış göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, *L. clethroides*'in hepatoprotektif özelliklere sahip bileşenler içerdiği belirlenmiştir. Hepatoprotektif aktivite mekanizmasının antioksidan aktivitesinden kaynaklı olabileceği sonucuna varılmıştır (29).

L. parvifolia ile yapılan bir çalışmada, beş yeni olean tipi triterpenoit olmak üzere sekiz olean tipi triterpenoit glikozit izole edilmiştir. Bitkinin n-bütanol ekstresinden elde edilen triterpenoit ve triterpenoit glikozit yapısında bulunan bileşiklerin farklı kanser hücre hatlarında önemli sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (30).

L. nummularia L., *L. vulgaris* L. ve *L. punctata* L.'nin polifenol bileşiminin ve antioksidan özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, aynı zamanda ekstre ve fraksiyonlarının flavonoid içerikleri açısından fitokimyasal ve antioksidan özellikleri arasındaki korelasyon da incelenmiştir. Ekstrelerde kafeik asit türevleri, klorojenik asit, serbest flavonoid aglikonlar ve çeşitli flavonoid glikozitleri tespit edilmiştir. Özellikle, *L. punctata* L.'de güçlü antioksidan aktivite gözlenmiş olup, toplam fenolik bileşiklerin içeriği ile antioksidan kapasite arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür (31).

L. christinae'nin aldoz redüktaz (AR) inhibe edici etkisi ile ilgili bir çalışmada, *L. christinae* bitkisinden yeni AR inhibitörü bir bileşik izole edilmiştir. Spektroskopik yöntemlerden faydalanılarak, bu bileşiğin kimyasal yapısının 1,5-di-hidroksi-1,5-di-[(E)-3-(4-hidroksifenil)-2 propenoik]-3-pentanonil ester olduğu belirlenmiştir. *In vitro* ve *in silico* sonuçlara göre, bu bileşiğin AR aktif bölgesine bağlandığı, substrat ve ürün oluşumunu önlediği belirlenmiştir. *Ex vivo* deney sonuçlarına göre, bu bileşiğin göz merceğine nüfuz edebileceği ve hiperglisemik koşullar altında AR'yi başarıyla inhibe edebileceği, böylece sorbitol birikmesini önleyebileceği ve ardından ozmotik stresi azaltabileceği rapor edilmiştir (32).

L. foenum-graecum Hance'nin toprak üstü kısımları ile ilgili bir fitokimyasal çalışmada, üç yeni oleanan tipi triterpenoit saponin ve bir bilinen saponin izole edilmiştir. Foegraecumozit L (1), foegraecumozit M (2), foegraecumozit N (3) ve 3-O- β -D-glikopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-a-L-arabinopiranosil-siklamiretin A (4) bileşiklerinin, dört farklı insan kanseri hücre hattına (NCI-H460, MGC-803, HepG2 ve T24) karşı sitotoksiteleri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bileşik 4'ün test edilen tüm hücre hatlarına karşı orta düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bileşik 4, ilaca duyarlı ve ilaca dirençli akciğer kanseri hücre dizileri (A549 ve A549/DDP) üzerinde test edilmiştir ve orta derecede sitotoksite gösterdiği belirlenmiştir (33).

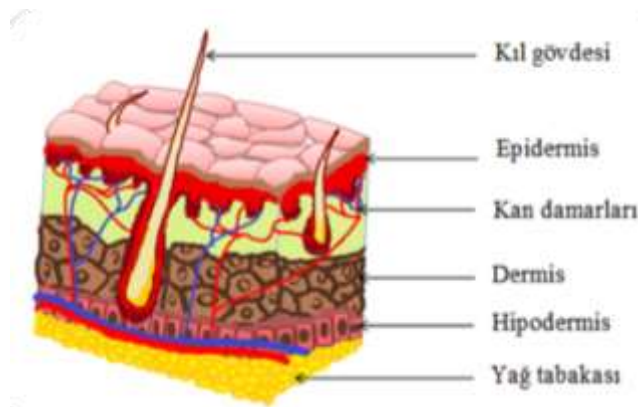
Yapılan birçok fitokimyasal çalışmada, *Lysimachia* türlerinin triterpenler, steroidler, triterpenik saponozitler, steroidal saponozitler, flavonoidler, kumarinler, benzodilakton ve kinon yapısındaki bileşenleri içerdiği belirlenmiştir. Zengin fitokimyasal içeriği ile *Lysimachia* türlerinin yara iyi edici, antibakteriyel, antioksidatif, antitümör, antiinflamatuvar, hipoglisemik, hepatoprotektif ve diüretik etkilere sahip olduğunu gösteren birçok araştırma mevcuttur (8-17; 21-33).

L. verticillaris gallik asit, kateşin, mirsetin 3-O- α -arabinozit, mirsetin 3-O- α -ramnozit, kersetin 3-O- β -glukozit, kersetin 3-O- α -arabinozit, kersetin 3-O- α -ramnozit bileşiklerini içerdiği bilinmektedir (8, 9). *L. verticillaris* bitkisinin halk arasında, yara iyi edici, ateş düşürücü ve ağrı kesici olarak kullanıldığı bilinmektedir (7, 8, 9, 15, 21).

L. vulgaris L. sinapik asit, vanilik asit, gentisik asit, siringik asit, *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit içermektedir (10, 12). *L. vulgaris* L.'nin yara, ateş, ülser, ishal tedavilerinde kullanılmasının yanısıra analjezik, balgam söktürücü ve antiinflamatuvar ajan olarak kullanımı mevcuttur (11, 12).

2.2. Deri ile ilgili Genel Bilgiler

Deri, vücudun ısı ve su dengesini koruyan, boşaltıma yardımcı olan, mikroorganizmaların ve dış antijenlerin penetrasyonunu durduran, vücudu ultraviyole ışınlarla ve dış etkilere karşı koruyan immünolojik olarak aktif bir organdır (34, 35). Deri, epidermis, dermis ve hipodermis olarak adlandırılan üç ana katmandan oluşan bir yapıdır (Şekil 1) (36, 37).



Şekil 1. Deri katmanları (Fumakia'dan, 37)

2.2.1. Deri Katmanları

2.2.1.1. Epidermis

Epidermis, katmanlı epitel hücrelere sahip olan, kılcal damar içermeyen ve sürekli olarak yenilenen derinin en dıştaki tabakasıdır. Epidermis, her biri kademeli olarak farklılaşan hücrelerin üst yüzeylerine doğru itildiği, bir sonraki katmana farklılaşan toplam 5 katman epitel hücreden oluşur (37). Ayrıca, epidermiste tırnaklar, ter bezleri gibi türev yapılar bulunur (36). Epidermis, ana hücre bileşeni olan keratinositler haricinde, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücrelerini de barındırır (37).

Bazal Tabaka: En derindeki epidermal tabaka olup epidermisi kolajen lifleri yoluyla dermise bağlar. Bazal tabaka hücreleri küçük ve kübik yapıda (çapı 10-14 nm) ve büyük çekirdeklere sahiptir. Bazal tabakada keratinosit, merkel ve melanosit hücreleri bulunur. Keratinositler, yeni hücreler üretmek için sürekli olarak mitoz geçirerek mevcut hücrelerin en dış tabakadan atılmasını sağlarlar. Merkel hücreleri reseptör olarak işlev görüp beynin dokunuş olarak algıladığı duyuusal sinirlerin uyarılmasından sorumludur (34, 38).

Spinosum Tabakası (Dikensi Tabaka): Diğer bir epidermal tabaka olup, bazal tabaka ile granulosum tabakası arasında yer alır. Bu tabakada tonofilament ve desmozom filamentleri görülür. Desmozom filamentleri hücreler arasındaki bağı güçlendirir. Bu tabakada, keratin sentezini başlatan keratinosit hücreleri ve keratinosit hücreleri arasında Langerhans hücreleri bulunur. Langerhans hücreleri, bakterileri, yabancı partikülleri ve bu tabakada meydana gelen hasar görmüş hücreleri içine alan makrofaj olarak işlev gören bir tür dendritik hücredir (38).

Granülosum Tabakası (Granüllü Tabaka): Epiderminin en ince tabakası olan keratin proteinini ve histidin ve sisteince zengin keratohiyalin granüllerini içerir, bu yapılar keratinleşmeden sorumludur (38). Spinosum tabakası ve granülosum tabakası hücrelerinin sitoplazmasında bulunan sayısız granül hücre katmanına girdikten sonra hücrelerin çevresine doğru göç ederken lipid bileşenlerini hücre içi boşluğa boşaltırlar. Bu granüller hem bariyer fonksiyonu için hem de korneum tabakası içindeki hücreler arası birleşme için önemli rol oynar (34).

Lisudum Tabakası (Saydam Tabaka): Granülosum tabakasının hemen üstünde ve korneum tabakasının altında bulunan, epiderminin düz, yarı saydam tabakasıdır. Bu tabakada bulunan keratinosit hücreleri yoğun bir şekilde, lipidler bakımından zengin,

keratohyalinden türetilmiş olan berrak bir protein olan eleiden bakımından zengindir. Eleiden bu hücrelere şeffaf bir görünüm verir ve suya karşı bir bariyer sağlar (38).

Korneum Tabakası (Boynuzsu Tabaka): Dış çevreye maruz kalan epidermin en yüzeysel tabakasıdır. Bu tabaka, protein bakımından zengin ve lipit içeriği düşük olan korneosit hücrelerini içerir. Bu tabakada genellikle 15 ila 30 hücre katmanı bulunur. Bu katman, diğer katmanların dehidrasyonunu engeller ve mikroplara karşı koruma işlevini yerine getirir (38).

2.2.1.2. Dermis

Dermis, epidermis ve hipodermis arasında kalan cildin bir diğer tabakasıdır. Dermis kan damarları, lenfositler, sinir lifleri, ter bezleri, yağ bezleri ve saç köklerinden oluşur (37). Dermis, derinin esnekliğini ve gerilme mukavemetini sağlar. Dermis, epidermis ile etkileşime girerek yaralar iyileşirken cildin onarılmasında ve yeniden şekillenmesinde işlev görür (36). Dermis, fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar ve lenfositler gibi yara iyileşmesinden sorumlu hücrelerden oluşur (37). Fibroblastlardan ve ECM proteinlerinden kolajen ve elastin sentezlenir. Kolajen derinin gerginliğinden, elastin ise derinin esnekliğinden sorumludur. Ayrıca, kolajen deriyi nemli tutmak için suyu bağlarken, elastin kan akımına yardımcı olur (39). Dermis, ECM bileşenlerinden proteoglikanlar ve glikozaminoglikanları (GAG) da bünyesinde bulundurur. Negatif yüklü ve hidrofilik yapıları proteoglikanlar (versican, perlecan) ve GAG'lar (dermatan sülfat, keratan sülfat, heperan sülfat, kondrotin sülfat, heparin) vücudun su dengesini, hücre ve fibröz komponentlerin kararlılığını sağlar. Dermiste, Merkel ve Meissner cisimcikleri gibi dokunma reseptörleri de bulunur (38).

2.2.1.3. Hipodermis

Dermisin altında yer alan hipodermis (deri altı tabaka), büyük oranda yağ dokularından, bağ dokularından, kan damarlarından ve kolajen hücrelerinden oluşur. Vücudun yalıtılması, içindeki enerjinin depolanması, cildin altta yatan yapılar üzerinde hareketliliğinin ve korumasının sağlanması, bu tabakanın ana işlevleridir. Aynı zamanda vücut için bir enerji rezervi olarak yağ depolar. Lenf damarları, kan damarları ve kıl folikülleri bu tabaka boyunca vücudun geri kalanına bölünür (37).

2.3. Yara ve Yara İyileşmesi

Vücutta bulunan dokuların, organların normal yapısının fiziksel, kimyasal zedelenme veya belirli patolojik durumdan kaynaklı bozulması sonucu yara oluşumu gözlenir (40). Yara iyileşmesi, yaralı dokunun veya organların bütünlüğünün yeniden sağlanmasıdır. Yara iyileşmesi, hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal olayların iç içe geçtiği karmaşık bir süreçtir.

Deri en sık yaralanan doku olup, deriyi oluşturan çok katmanlı dokunun yeniden oluşturulması için yara bölgesinde çeşitli hücre tiplerinin farklılaşması, hücre göçünün olması, hücre çoğalması ve apoptozun gerçekleşmesi gerekir (41). Onarım işlemi, yaralanmadan hemen sonra, yaralı kan damarlarından, çeşitli büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, proteazların ve düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin salınmasıyla başlatılır (42). Aynı zamanda, yaralı kan damarlarından; fibrin, fibronektin, vitronektin ve trombospondin gibi hücre dışı matris proteinleri aracılığıyla kan pıhtısı oluşumu gözlenir (43). Kan pıhtısı istilacı mikroorganizmalara karşı bir engel sağlamanın yanı sıra, iyileşme işleminin sonraki aşamalarında gerekli olan büyüme faktörlerinin bir deposu olarak da işlev görür. Doku hasarına cevap olarak, inflamatuvar hücreler birkaç saat içinde yara bölgesine akın eder. İnflamatuvar hücreler hem savunma fonksiyonu için hem de yara onarımının proliferatif fazını başlatan önemli büyüme faktörü ve sitokin kaynağı olması açısından önemli hücrelerdir. Bu hücreleri takiben, ilk olarak nötrofiller olmak üzere monositler, lenfositler de yara bölgesine göç eder. Nötrofiller, monositler, lenfositler kontamine edici mikroorganizmalara karşı savunma olarak çok çeşitli proteinazlar ve ROT üretirler. Daha sonra yara bölgesinde keratinositlerin göçü ve çoğalması başlar. Bunu, yaranın çevresinde kolajen ve fibrin de dahil olmak üzere çeşitli doku bileşenlerinin sentezlenmesinden sorumlu hücreler olan dermal fibroblastların çoğalması izler. Bu hücreler daha sonra geçici matrise geçer ve büyük miktarlarda hücre dışı matris biriktirir. Ayrıca, yara fibroblastları kasılma fenotipi kazanır ve yara kasılmasında büyük rol oynayan bir hücre tipi olan myofibroblastlara dönüşür (43, 44). Hızlı hücresel proliferasyon meydana gelir, bu da sonuçta yeni kan damarlarının ve epitel oluşumuna neden olur (44). Elde edilen yara bağ dokusu, çok sayıda kılcal damarın granüler görünümü nedeniyle granülasyon dokusu olarak bilinir. Son olarak, sürekli kolajen sentezi ve kolajen katabolizması ile karakterize edilen granülasyon dokusu yerini olgun skara (yara izine) bırakır (43). Skar oluşumunun mekanizması inflamasyon, fibroplazi (fibröz

bağ dokunun oluşumu), granülasyon dokusu oluşumu ve skar olgunlaşmasını içerir (44). Skar dokusu saç kökleri, yağ bezleri ve ter bezleri gibi uzantıları içermez (43).

2.3.1. Yara İyileşmesi Süreçleri

Yara iyileşmesi; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarından oluşan dinamik bir süreçtir. Yara iyileşmesi farklı hücre tipleri, sitokin ve kemokin mediyatörleri ve ECM arasındaki etkileşimleri içerir. Bu süreçteki kesintiler, anormallikler veya uzama, gecikmiş yara iyileşmesine veya iyileşmeyen kronik bir yaraya neden olabilir (19, 45).

2.3.1.1. Hemostaz

Herhangi bir travma ile oluşan yaralanma sonucu ilk olarak kanama kontrol altına alınmalıdır. İyileşme sürecinin başlangıç adımı ve temeli olan hemostaz, vazokonstriksiyonun, trombosit agregasyonunun ve kan pıhtılaşmasının sıkı bir şekilde düzenlenmiş süreçlerini kapsar (46, 47). Endotel hücreleri hem hemostazın düzenlenmesinde hem de yara bölgesinde biriken fibrin miktarını belirleyerek onarıcı süreçlerin ilerlemesini etkiler (48).

Hemostaz esas olarak prostaglandin H₂ (PGH₂)'yi tromboksan A₂ (TxA₂)'ye dönüştüren üç enzimin (fosfolipaz A₂, COX-1/COX-2 ve TxA₂ Sentaz) ardışık etkisiyle üretilen araşidonik asidin metabolitleri olan eikosanoidler tarafından kontrol edilir (49). TxA₂, trombositlerin aktivasyonunu ve trombosit agregasyonunu uyardığı için protrombotik özelliklere sahiptir. Ayrıca TxA₂'nin vazokonstriksiyona neden olarak, trombositlerin birbirine yakın olması nedeniyle trombosit agregasyonuna yardımcı olarak fibrin pıhtısı oluşumuna yol açar. Kolajen, trombositler, trombin, vitronektin, fibrin ve fibronektinden oluşan bu pıhtı inflamatuvar yanıtı başlatan sitokinleri ve büyüme faktörlerini serbest bırakır (46, 50). Ayrıca, trombositlerin sitoplazması, büyüme faktörleri ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), epidermal büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörleri gibi sitokinlerle dolu α -granülleri içerir. Bu moleküller, nötrofiller ve makrofajlar; endotel hücreleri ve fibroblastları aktive ederek yara iyileşme süreçlerine destekleyici olarak işlev görür (48).

2.3.1.2. İnflamasyon

Pıhtı oluşuktan hemen sonra, lökositlerin yara bölgesine akışı ile inflamasyon fazının hücresel yanıtı başlamış olur. Hücresel yanıt ilk 24 saat içinde oluşur ve bu yanıt iki

güne kadar uzayabilir. Mast hücreleri, Langerhans hücreleri aktive olarak bazı kemokin ve sitokinleri serbest bırakırlar. Bu hücreler, yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar ve lizozomal enzimlerin ve ROT'nin salınmasına katkıda bulunur, ayrıca çeşitli hücre döküntülerinin temizlenmesini kolaylaştırırlar (51).

IL-1, TNF- α , TGF- β ve trombosit faktörü-4 (PF-4) gibi kemokin ve sitokinler yaralanan bölgeye nötrofil göçünü uyarır (19, 46). Yaralanmadan sonra 24-48 saat içinde nötrofiller, bakterileri, yabancı partikülleri ve hasarlı dokuları yok etmek ve uzaklaştırmak için fagositozun kritik görevi ile başlar. Aynı zamanda, nötrofiller proteazlar ve ROT gibi maddeleri de serbest bırakarak yara ortamındaki yabancı partikülleri yok eder (46, 48).

Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan makrofajlar, yaralanmadan 48-72 saat sonra görülür ve fagositoz sürecine devam ederler. Keratinositleri, fibroblastları ve anjiyogenezi uyaran interlökinler ve TNF, keratinositleri uyaran TGF gibi sitokinler, yaranın temizlenmesine yardımcı olan kolajenazlar, metaloproteinazlar gibi bazı enzimler makrofajlar tarafından salınarak inflamasyon fazının düzgün ilerlemesini sağlarlar. Aynı zamanda makrofajlar, apoptotik hücrelerin indüklenmesini ve temizlenmesini sağlamanın yanı sıra anjiyogeneze, fibroplazi ve NO sentezine aracılık ederler. Bu şekilde, makrofajlar, iyileşmenin proliferatif aşamasına geçişi düzenler (19, 52).

2.3.1.3. Proliferasyon

Proliferasyon, yaralamadan sonraki üçüncü günde başlar ve daha sonra yaklaşık iki hafta kadar sürer. Proliferasyon fazında anjiyogeneze, fibroplazi ve yeniden epitelizeasyon ile yaranın kapanması hedeflenir. Bu fazda, endotel ve fibroblast hücreleri kılcal büyümeyi, kolajen oluşumunu ve yaralanma bölgesinde granülasyon dokusu oluşumunu destekler (46). Endotel hücreleri, yeni kılcal damarlar oluşturmaya başlamak için vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) tarafından indüklenir.

Yaralanmanın üç gününde, çevre dokulardan yara bölgesine göç eden fibroblastlar ve miyofibroblastlar aktive olarak kolajeni sentezlemeye başlar ve çoğalır. Fibroblastların ana sinyalleri olan PDGF, epidermal büyüme faktörü (EGF) ile TGF- β fibroblastlar, trombositler ve makrofajlar tarafından üretilir. PDGF'nin salınımı ile fibroblastlar; kolajen tip I ve III, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve fibronektinden oluşan geçici bir matriksi sentezlemeye başlar (46). İlk haftanın sonunda, hücre göçünü daha da destekleyen ve onarım işlemi için gerekli olan bol miktarda ECM birikir. Fibroblastlardan sentezlenen kolajenler yara iyileşme süreçlerinin proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarında

anahtar rol oynar. Kolajenin temel görevlerinden biri yara içindeki hücre içi matriksi oluşturmaktır. Yaralanmamış dermis % 80 tip I ve % 25 tip III kolajen içerirken, yara granülasyon dokusu % 40 tip III kolajeni içerir. Kolajen matriksi, fibrinojen, fibronectin ve hiyalüronik asit ile birlikte çoğalan fibroblast ve vaskülarize stroma makrofajlar, fibrin bazlı geçici matriksin yerini alan akut granülasyon dokusunu oluşturur. Kolajen birikimi ile kan damarlarının yoğunluğu azalır ve granülasyon dokusu yavaş yavaş bir skar oluşturmak için olgunlaşır (48).

Anjiyogenez, yara iyileşmesinde kritik öneme sahiptir ve iyileşme sürecinin tüm aşamalarında eşzamanlı olarak gerçekleşir. Anjiyogenez, bazal membranın proteazlar ile yıkılmasını ve yeniden düzenlenmesini, endotel hücre proliferasyonunu ve olgunlaşmasını içeren koordineli bir süreçtir (51, 53). Nötrofiller ve makrofajlar, hemostatik faz sırasında salgılanan birçok anjiyojenik faktör, anjiyogenezi teşvik eder (48). Kemotaktik ajanlar, yara iyileşmesi sırasında anjiyogeneze karışan hücre göçünü yönlendirmek için hücre yüzeyi reseptörleri üzerinde etki ederler. Bunlar ayrıca hücre büyümesi ve farklılaşmasının önemli modülatörleridir ve endotelial hücre büyüme faktörü, TGF- α , VEGF, anjiyopietin-1, fibrin ve lipid büyüme faktörlerini içerir. Hücresel göç kemotaktik aktivitenin sonucudur ve anjiyogenez için gereklidir (46).

Granülasyon dokusu yara oluşumundan yaklaşık dört gün sonra görülmeye başlar. Fibroblastik proliferasyonda bir artış, kolajen ile elastin sentezi ve fibroblastlar tarafından kemotaktik faktörler ve interferon- β (IFN- β) üretimi yoluyla granülasyon dokusu oluşur (54). Fibroplazi granülasyon dokusunun oluşumu ile başlar. Olgun bir bağ dokusu skarının ana bileşeni kolajendir. Tüm bu olaylara paralel olarak epitel hücrelerde spesifik sitokinlerin etkisi ile yeniden epitelizasyon görülür.

2.3.1.4. Yeniden Şekillenme

Olgunlaşma ve yeniden şekillenme fazı yara iyileşmesi için oldukça önemlidir. Yaralanmadan 2-3 hafta sonra başlayan ve 1 yıldan daha uzun sürebilen bu fazda yapım ve yıkım olayları görülür. Yara iyileşmesinin son aşamasında granülasyon dokusu yeniden şekillenir, ECM yeniden düzenlenir, skar dokusu oluşur. Yara bölgesi yüzeyi tek bir keratinosit tabakası ile kaplanır kaplanmaz, epidermal göç durur ve yeni tabakalı epidermis yaranın sınırlarından iç kısmına yeniden kurulur. ECM su, proteinler ve polisakkaritlerden oluşur. Her doku, çeşitli hücresel bileşenler (epitelial, fibroblast, adiposit, endotelial elementler gibi) ve gelişen hücresel ve protein mikroçevresi arasında doku gelişimi

sırasında üretilen benzersiz bir bileşime sahip ECM'e sahiptir (55). ECM'e hücre adezyonu (yapışması), integrinler, diskoidin alan reseptörleri gibi ECM reseptörler aracılığıyla gerçekleşir (55-57). Adezyon, ECM'in hücre iskeleti birleşmesine aracılık eder ve ECM yoluyla hücre göçüne yol açar (55). Başlangıçta, yara bölgesindeki ECM, esas olarak fibrin ve fibronektin proteinlerinden oluşur (46). Fibronektin, hücre göçünü ve adezyonu mümkün kılarak yara iyileşmesine katkı sağlar (58). Daha sonra, fibroblastlar tarafından sentezlenen proteoglikanlar, GAG ve diğer proteinler matriks içeriğine katkı sağlar. Proteoglikanlar benzersiz tamponlama, hidrasyon, bağlama ve kuvvet direnci özelliklerine sahiptir (55). GAG'lar hidrasyon, yapısal iskele, hücre sinyalleşmesinde önemli rol oynar. Aynı zamanda, GAG'lar hücre büyümesinin ve çoğalmasının düzenlenmesine, hücre adezyonunun artırılmasına, antikoagülasyona ve yara onarımına katkı sağlar (59).

Bu geçici matriksin yerini kolajenden yapılmış daha güçlü ve organize bir matriks alır. Yeniden şekillenme fazında kolajen birikmesi en önemli aşamadır (46, 51). ECM'in ana yapısal elemanını oluşturan kolajenler, gerilme mukavemeti sağlar, hücre adezyonunu düzenler, kemotaksis ile göçü destekler ve doğrudan doku gelişimini sağlar (55). Yaralanmamış dokuda % 80-90 tip I kolajen ve % 10-20 tip III kolajen bulunur. Granülasyon dokusunda tip III kolajen oranı artarken tip I kolajen oranı azalır. Yaranın kapanması ile tip III kolajen bozulmaya uğrar ve tip I kolajen sentezi artmaya başlar (46). Olgunlaşma ve yeniden şekillendirme işlemleri sırasında, kan damarlarının, fibroblastların ve inflamatuvar hücrelerin çoğu, göç süreçleri, apoptoz veya diğer bilinmeyen hücre ölümü mekanizmaları nedeniyle yara alanından kaybolur (51).

2.3.2. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Derinin anatomisini ve fizyolojisini, iyileşme sürecinin evrelerini, yara tiplerini ve yara onarımı seçeneklerini tam olarak anlamak için yara iyileşmesini zorlaştırabilecek veya geciktirebilecek faktörleri tanımak önemlidir (18). Yara iyileşmesini etkileyen faktörler, yaranın kendisini doğrudan etkileyen lokal faktörler ve bireyin iyileşme yeteneğini etkileyen, bireyin genel sağlık veya hastalık halini belirten sistemik faktörlerdir (Tablo 1) (60).

Tablo 1. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Lokal Faktörler	Sistemik Faktörler
Oksijenasyon	Cinsiyet hormonları
Enfeksiyon	Yaş
Yabancı cisimler	Stres
Hematom oluşumu	Diyabet
	Obezite
	Alkol ve sigara tüketimi
	Beslenme
	İlaçlar

2.3.2.1. Lokal Faktörler

Oksijenasyon: Hücrelere gerekli olan adenozin trifosfat (ATP)'ın üretilmesi ve hücrelerin enerji gereksiniminin karşılanması için oksijen oldukça önemlidir (61). Aynı zamanda oksijen, yaraların enfeksiyondan korunmasını sağlamak, anjiyogenezi indüklemek, keratinosit farklılaşmasını, göçünü ve yeniden epitelizasyonunu artırmak, fibroblast proliferasyonunu, kolajen sentezini artırmak ve yara kasılmasını desteklemek gibi birçok yara iyileşme sürecinde yer almaktadır (60, 62).

Başlangıçta, bir yara bozulmuş damar sistemine maruz kalır ve artan oksijen tüketimi nedeniyle hipoksik bir ortama maruz kalır. Hipoksik bir ortamda, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) gibi ROT üretilir. Düşük konsantrasyonlarda ROT, yara iyileşmesi için önemli sitokinleri indükleyerek yara iyileşmesi ile ilgili anahtar süreçleri uyarır. Fakat artan ROT üretimi ek doku hasarına da sebep olabilir (60, 62). Uygun yara iyileşmesi için oksijen seviyesi oldukça önemlidir. Hipoksi, büyüme faktörlerinin serbest bırakılmasını ve anjiyogenez gibi yara iyileşmesini uyarır, fakat iyileşme sürecini sürdürmek için oksijene ihtiyaç duyulur (60).

Doku hipoksisinin tedavisi için hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT) kullanılmaktadır. Bu tedavide riskler göz önünde alındığında, faydaların risklerden daha fazla olduğu durumlarda tedavi uygulanabilmektedir. Bir başka tedavi yöntemi daha az toksik, ucuz ve evde uygulanabilen, daha az komplikasyona sebep olan topikal oksijen terapisi (63). Bu terapinin HBOT için daha iyi bir alternatif olacağını öne süren çalışmalar mevcut olsa da çalışmalar henüz yetersizdir.

Enfeksiyon: Yara bölgesinde görülen enfeksiyonlar, inflamatuvar yanıtı başlatan önemli bir etkidir. Yara enfeksiyonu sonucu, kızarıklık, ağrı, şişme, eksüda, koku, sağlıklı granülasyon dokusu gibi belirtiler görülebilir (64). Bu enfeksiyonlar genel olarak mikroorganizmaların (bakteriler, virüsler, parazitler gibi) varlığı ile ilişkilendirilmekle beraber sistemik hastalıklar (diyabet, ramatoid artrit gibi) ve lokal faktörler (arteriyel yetmezlik, venöz hipertansiyon, travma gibi) de enfeksiyon riskini artırmaktadır (65). İyileşmeyen yaralar biyolojik olarak uzun süreli inflamasyon, kusurlu yeniden epitelizasyon ve bozulmuş matriksin yeniden şekillenmesi ile karakterize edilir. Ayrıca, tüm kronik yaralarda, hasta ile yarada bulunan bakteriler arasında bir etkileşim vardır. Bu etkileşim, kontaminasyon, kolonizasyon, kritik kolonizasyon ve enfeksiyon olarak sıralanabilir:

- Kontaminasyon: Yaradaki üremeyen mikroorganizmaların varlığı olarak tanımlanır ve konak savunmaları tarafından hızla giderilir.
- Kolonizasyon: Hücreye, hücreye zarar vermeden yara bölgesinde üreyen mikroorganizmaların varlığını ifade eder.
- Kritik kolonizasyon: Yara bölgesinde üreyen mikroorganizmalar sayısal olarak artmış olup bu mikroorganizmalar yara iyileşmesini geciktirebilir. Kritik kolonizasyonun klinik belirti ve semptomları gecikmiş iyileşme, ağrı/hassasiyet, artan seröz eksüda, yara yatağının rengindeki değişiklik, gevrek granülasyon dokusu, eksik veya anormal granülasyon dokusu ve kötü koku şeklindedir.
- Enfeksiyon: Yara bölgesindeki mikroorganizmaların sayısı artmaya devam ederse ve enfeksiyon tedavi edilmezse sepsis ile sonuçlanan sistemik yayılma görülebilir. Bu ilerleme çoklu organ yetmezliğine ve hatta ölüme neden olabilir (64).

Etkili dekontaminasyon yapılamazsa, mikrobiyal temizleme tamamlanmadığından inflamasyon uzayabilir. İnterlökin-1 (IL-1) ve Tümör nekroz faktör- alfa (TNF- α) gibi pro-inflamatuvar sitokinler mikroorganizmaların varlığı ile uzun süre yüksek seviyede kalır. Bu durum inflamatuvar fazın uzamasına ve yaranın kronik bir hale gelmesine sebep olup iyileşmeyi geciktirebilir. Uzun süreli inflamasyon, ECM'i bozabilecek bir proteaz ailesi olan matriks metaloproteazların (MMP) artışına yol açabilir. Proteaz dengesindeki bu değişim, kronik yaralarda ortaya çıkan büyüme faktörlerinin hızla bozulmasına neden olabilir (60, 65). Benzer şekilde, enfekte olmuş yaralardaki bakteriler, kendi kendine

salgılanan bir hücre dışı polisakkarit matriksine gömülü karmaşık bakteri toplulukları olan biyofilmlerin oluşumuna neden olabilir. Biyofilmler, korunan mikroortamlar geliştirir ve geleneksel antibiyotik tedavisine direnç gösterebilir (65).

Yabancı cisimler: Yarada bulunan yabancı cisimler inflamatuvar yanıtın uzamasına neden olur. Yabancı cisimler, hem enfeksiyon için risk oluşturur hem de yara iyileşmesini önemli ölçüde yavaşlatır (66).

Hematom oluşumu: Aşırı kanama ve yara içinde hematom oluşumu, sadece mekanik olarak yara kapanmasını bozmakla kalmaz, aynı zamanda mikroorganizmaların büyümesi için uygun bir ortam oluşturabilir. Yara iyileşmesinin uzamasının engellenmesi için kanamanın kontrol altına alınması oldukça önemlidir (66).

2.3.2.2. Sistemik Faktörler

Cinsiyet Hormonları: Cinsiyet hormonları (östrojenler, androjenler, dehidroepiandrosteron gibi) yaşa bağlı yara iyileşmesinde oldukça önemlidir. Yara iyileşmesinde esas düzenleyici hormon olan östrojen inflamasyon, epidermal fonksiyon, matriks üretimi, proteaz inhibisyonu ve rejenerasyon ile ilgili genleri düzenler. Bazı çalışmalarda, kadınlarda ve erkeklerde yaşa bağlı olarak östrojenin iyileşmeye katkıda bulunduğu, androjenin ise ters etki yaptığı rapor edilmiştir (60, 67, 68).

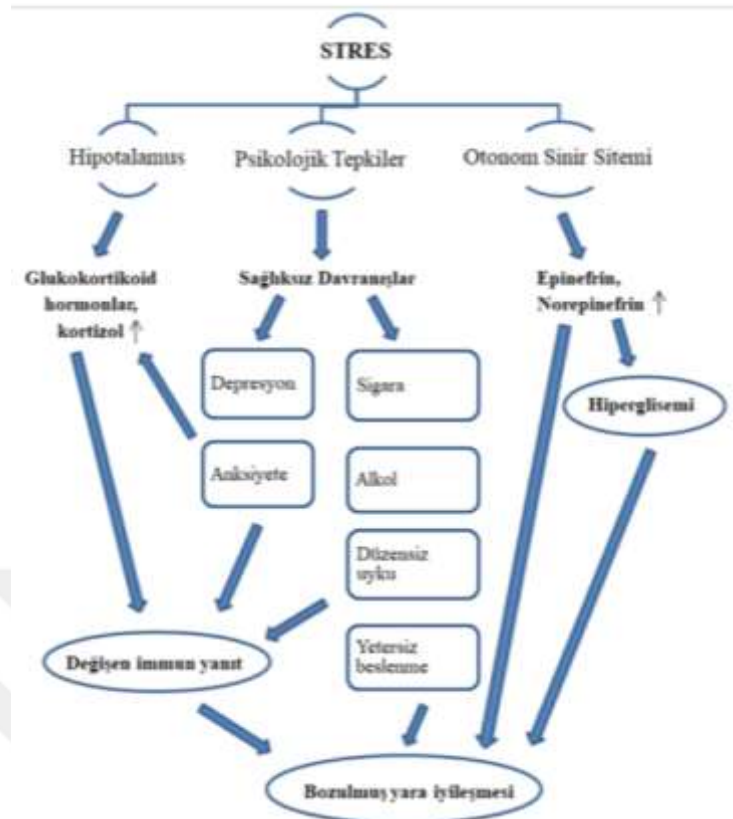
Yaş: Yaşlanma, iyileşme kalitesinde bir bozulmaya yol açmaz, sadece yara iyileşmesinde zamansal bir gecikmeye neden olabilir (69, 70). Yara iyileşme fazlarında yaşa bağlı olarak birçok değişim gözlenebilir (Tablo 2).

Tablo 2. Yaşa bağılı olarak yara iyileşme fazlarında görülen değişimler

Yara İyileşme Fazları	Görülen Değişiklikler
Hemostaz	Artan trombosit agregasyonu Artan α -granullerin salınımı
Proliferasyon	Gecikmiş yeniden epitelizasyon Gecikmiş anjiyogenez Gecikmiş kolajen birikimi
İnflamasyon	Azalan vasküler geçirgenlik Artan inflamatuvar medyatörlerin (aracıların) salgılanması Gecikmiş makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu Bozulmuş makrofaj fonksiyonu Azalan büyüme faktörlerinin salgılanması
Yeniden Şekillenme	Azalmış kolajen döngüsü Gecikmiş yara mukavemeti Azalmış yara mukavemeti

Yaşlı kişilerde yara iyileşmesi, kemokin üretiminde değişiklikler ve azalmış makrofaj fagositik kapasitede azalmalarla birlikte yara bölgesine gecikmiş T hücresi infiltrasyonu gibi, değiştirilmiş bir inflamatuvar yanıtla ilişkilidir (71). Fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlardan oluşan dermisin hücresel içeriğinin yaşla azalması, Langerhans ve mast hücrelerinin sayısında ve fonksiyonunda azalma, kolajen ve elastin miktarının azalması gibi değişiklikler, iyileşme kapasitesinde yaşa bağılı değişikliklerdendir (70-72). Dermisin mikrosirkülasyonu yaşla birlikte azalır; bu durum yaralanmaya ve sıcaklık değişikliklerine uyum sağlama yeteneğini önemli ölçüde etkiler.

Stres: Stresin diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve yara iyileşmesi üzerinde olumsuz etkileri bilinmektedir (73). Stresin yara iyileşmesinde önemli bir gecikmeye neden olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir. (74, 75). Stres, glukokortikoidlerin (GC) salınımını düzenler ve yara bölgesinde proinflamatuvar sitokinlerin IL-1, IL-6 ve TNF- α seviyelerini azaltır. Ayrıca, GC'ler, farklılaşma ve çoğalmayı baskılayarak, gen transkripsiyonunu düzenleyerek hücre adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak immün hücreleri etkiler (76). GC'lerden biri olan kortizol, bir antiinflamatuvar madde olarak işlev görür ve iyileşmenin ilk aşaması için gerekli olan Th-1 aracılı immün tepkileri modüle eder. Bu nedenle stres, yara bölgesindeki normal hücre kaynaklı bağışıklığı bozmakta ve iyileşme sürecinde önemli bir gecikmeye neden olmaktadır (60, 77). Stresin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri Şekil 2'de özetlenmiştir.



Şeki 2. Stresin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri

Diyabet: Dünya çapında yüz milyonlarca insanı etkileyen diyabet, yara iyileşmesinde bazı sorunlara sebep olabilir. Diyabetli bireylerde hipoksi, ROT, hiperglisemi, yüksek metaloproteaz seviyeleri, fibroblastlarda ve epidermal hücrelerde disfonksiyon, bozulmuş anjiyogeneze ve neovaskülarizasyon gibi sebeplerle yara iyileşmesinde bozulmalar görülebilir. Bu bireylerde özellikle kronik ayak ülseri görülme riski fazladır (60, 78).

Obezite: Obez bireylerde, koroner kalp hastalığı, tip 2 diyabet, kanser, hipertansiyon, dislipidemi, felç, uyku apnesi, solunum problemleri ve bozulmuş yara iyileşmesi gibi birçok hastalığın görülme riski oldukça fazladır. Bu bireyler, cilt yara enfeksiyonları, hematom, basınçtan kaynaklı ülserler ve venöz ülserler şeklinde yara komplikasyonları ile karşı karşıya kalabilirler (79). Cilt kıvrımları enfeksiyon ve doku bozulmasına katkıda bulunan mikroorganizmaları barındırabilir, bu durum yara iyileşmesinde sorun çıkarabilir. Aynı zamanda obezite, stres, endişe, depresyon ve immün yanıtın bozulmasına neden olabilecek tüm durumlar ile bağlantılı olarak yara iyileşmesinde gecikmeler gözlenebilir (60, 79).

Alkol ve Sigara Tüketimi: Alkol tüketimi, enfeksiyon riskini artırmakla beraber yara iyileşmesinde sorun oluşturabilir. Etanol maruziyeti, erken inflamatuvar yanıtı bozarak, yara kapanmasını, anjiyogenez ve kolajen üretimini engelleyerek ve yara bölgesindeki proteaz dengesini değiştirerek, yara iyileşmesinin bozulmasına yol açabilir. Sigara dumanına maruz kalma sonucu, lökosit göçünde bozulmaya bağlı olarak yara bölgesinde enfeksiyon riski oldukça artmaktadır. Aynı zamanda, lenfosit fonksiyonu, IL-1 üretimi baskılanmakta, fibroblast göçü ve çoğalması bozulmakta, hücre dışı matriks üretimi azalmaktadır (60, 80, 81).

Beslenme: Yara iyileşmesini etkileyen önemli faktörlerden biri de beslenmedir. Karbohidrat, lipid, protein, mineral ve vitamin dengesine sahip iyi bir beslenme, yara iyileşmesini kolaylaştırır (82, 83). Fibroblast proliferasyonu, kolajen sentezi, yaranın yeniden şekillenmesi gibi yara iyileşmesini etkileyen faktörler için beslenme tipinin özellikle proteince zengin olması önemlidir. Protein eksikliği, sonuçta azalmış lökosit fagositoz ve enfeksiyona karşı duyarlılığın artması ile bağışıklık sistemini de etkiler (60). Kolajen sentezi, lizin ve prolin hidroksilasyonunu, demir ve C vitamini gibi ortak faktörleri gerektirir. Yara iyileşmesi bozukluğu, bu eş faktörlerin herhangi birindeki eksikliklerden kaynaklanabilir (19). Glutamin, plazmada en bol bulunan amino asittir ve fibroblastlar, lenfositler, epitel hücreleri ve makrofajlar gibi hızlı çoğalan hücreler için ana metabolik enerji kaynağıdır. Glutamin, yara iyileşmesinde erken dönemde ortaya çıkan inflamatuvar immün yanıtın uyarılmasında çok önemli bir role sahiptir (19, 82).

Beslenme içeriğinde lipdlerin bulunması yara iyileşmesi ve doku onarımında oldukça önemlidir. Omega-3 yağ asitlerinin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri kesin olmamakla beraber, proinflamatuvar sitokin üretimini, hücre metabolizmasını, gen ekspresyonunu ve yara bölgelerindeki anjiyogenezi etkileyerek yara iyileşmesine katkı sağladıkları düşünülmektedir (84, 85).

C, A ve E vitaminleri güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir. C vitamini eksikliği, kolajen sentezinin azalmasına, bağışıklık tepkisinin bozulmasına ve yara enfeksiyonuna duyarlılığın artmasına neden olur (19, 82). Benzer şekilde, A vitamini eksikliği, yara iyileşmesine engel olur. Antioksidan aktivite, artan fibroblast proliferasyonu, hücresel farklılaşması ile proliferasyonun modülasyonu, artan kolajen/hiyalüronat sentezi ve azalmış MMP'lı ECM degradasyonu; A vitamininin

biyolojik özelliklerindendir (60). Bir antioksidan olan E vitamini, oksidasyon ile tahribata karşı koruma sağlayarak hücrel membran bütünlüğünü korur ve dengeler.

Uygun bir yara iyileşmesi için özellikle magnezyum, bakır, çinko ve demir gibi çeşitli mikro besin öğeleri önemlidir. Protein ve kolajen sentezinde görevli çoğu enzimin kofaktörü magnezyumdur. Bakır, SOD ve sitokrom oksidazın kofaktörü olarak görev yapar. Ribonükleik asit (RNA) ve deoksiribo nükleik asit (DNA) polimeraz için yardımcı faktör olarak çinko işlev görür. Kolajen üretimi, prolin ve lisinin hidroksilasyonu için demir gereklidir (19, 82, 83).

İlaçlar: Glukokortikoid steroidler, antiinflamatuvar etkiler yoluyla fibroblast proliferasyonunu ve kolajen sentezini baskılamaktadır. İbuprofen gibi steroidal olmayan antiinflamatuvar ilaçların yara iyileşmesi üzerinde antiproliferatif etki göstererek, fibroblast sayısının azalmasına, gecikmiş epitelizasyona ve bozulmuş anjiyogeneze neden olduğu bilinmektedir. Kemoterapötik ilaçlar yaranın içine hücre göçünü geciktirme, fibroblastların çoğalmasını engelleme ve yaraların büzüşmesini önleme gibi yollarla yara iyileşmesini geciktirebilir (60).

2.3.3. Yara İyileşmesinin Ölçülmesi

2.3.3.1. *İn vitro* Yöntemler

Hücre kültürü uygulamaları ile yara iyileşmesi süreçleri *in vitro* olarak ölçülebilir. Bu süreçte fibroblast, keratinosit ve endotel hücreleri kilit hücrelerdir ve uygun kitler ile yara iyileşmesi değerlendirilebilir. Fibroblast kültür testi ve keratinosit kültür testi yara iyileşmesinin incelenmesi için en çok uygulanan hücre kültürü yöntemlerindendir (86).

Cildin en önemli yapı taşlarından biri olan kolajen, bağ dokusu, saç ve tırnakların ana bileşenidir. Elastaz, cildin elastikiyetinden, kuvvetinden sorumludur. Kolajen ile elastaz bağ dokusunun mekanik özelliklerini belirler. Hyaluronik asit, cildin nemini, yapısını ve elastikiyetini korumada rol oynar. Aynı zamanda besinlerin ve atık ürünlerin değişimini kolaylaştırır ve hızlı doku proliferasyonu, rejenerasyonu ve onarımı ile ilgilidir (87).

Hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri, matriks metaloproteinaz ailesinden olup dokuların yeniden şekillenmesinde ve onarımında önemli bir rol oynarlar. Bu enzimler, yaraların yeniden epitelizasyonu için gerekli olan ECM'in yıkımının ve birikiminin düzenlenmesinde görev alır. Hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimlerinin

inhibitör etkilerinin incelenmesi, yara iyileşmesinin ölçülmesi için önemli parametrelerdendir (88, 89).

2.3.3.2. *İn vivo* Yöntemler

Yara iyileşmesinin belirlenmesi amacı ile *in vivo* yöntemlerde fare, sıçan, kobay ve tavşan gibi deney hayvanları tercih edilir. Çünkü, bu deney hayvanlarının yara iyileşmesi hızlıdır ve beslenme ihtiyaçları az, temini ucuz ve kolaydır. Yara iyileşmesi deneylerinde, hayvanlar üzerinde insizyon, eksizyon, yanık ve ölü alan yara modelleri oluşturulabilir. Oluşturulan yaralar üzerine bazı bitki ekstraktlarından ve etken maddelerden hazırlanan merhem uygulaması yapılarak, bu örneklerin yara iyileştirme özelliği belirlenebilir. Yara alanındaki küçülme gözlenerek ve yara kontraksiyonu hesaplanarak yara iyileşmesi değerlendirilir (89, 90).

2.3.3.3. Histopatolojik Yöntemler

Deney hayvanlarından örnek alındıktan sonra yara dokuları %10'luk formalin ile fiksasyon işlemine tabi tutulur. Doku takibi işlemlerini takiben dokular parafine gömülerek ince kesitler alınır. Bu kesitler, Hematoksilen-eozin boyası kullanılarak boyama işlemi tamamlanır. Mikroskop altında inceleme yapılarak yara dokusunun iyileşmesi süreçleri ile ilgili bilgiler edinilir (89-91).

2.3.3.4. Biyokimyasal Yöntemler

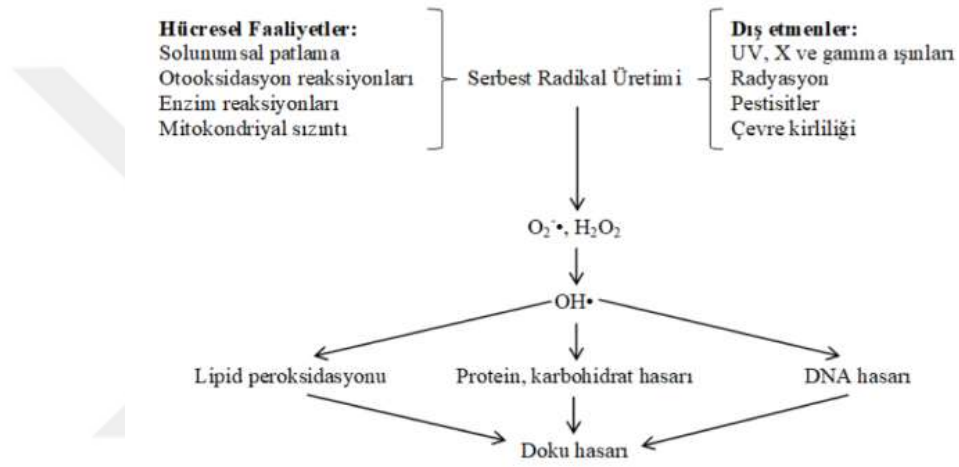
Yara iyileşmesinin incelenmesi için deney hayvanlarından alınmış örnekler kullanılarak antioksidan, antiinflamatuvar, kolajen bağ dokunun saptanması, DNA ve toplam protein analizleri gibi biyokimyasal yöntemler uygulanabilir (90-92).

2.3.4. Antioksidan Aktivite

2.3.4.1. Serbest Radikaller

Bir atomik orbitalde eşleşmemiş bir elektron içeren, kararsız yapıda ve oldukça reaktif atom, molekül ve iyonlar serbest radikal olarak tanımlanmaktadır (90, 93). Hücresel faaliyetler sonucu veya UV, X, gama ışınları, radyasyon, pestisitler, hava kirliliği gibi dış etmenlerin aracılığıyla oluşan serbest radikaller diğer moleküllerle çeşitli şekillerde reaksiyona girebilirler. İki radikal bir araya gelerek eşleşmemiş elektronlarını paylaşarak kovalent bir bağ oluşturabilir. Bir radikal, eşleşmemiş elektronunu başka bir moleküle aktararak veya elektronunu eşlemek için başka bir molekülden elektron alarak bir dizi

zincirleme reaksiyonu başlatabilme özelliğine sahiptir (94). Canlı organizmalar tarafından üretilen ROT, reaktif azot türleri (RNT) ve reaktif kükürt türleri (RST) gibi serbest radikaller, lipitler, proteinler, karbohidratlar ve DNA gibi hücre bileşenlerinde oksidatif hasara neden olurlar (90, 93, 95, 96). Oksidan/antioksidan arasındaki dengenin oksidanlar lehine değişmesi ile “oksidatif stres” oluşur. Akut solunum sıkıntısı sendromu, astım, ateroskleroz, diyabet, hipertansiyon, iske mi/perfüzyon, kanser, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve nörolojik bozukluklar gibi birçok patolojik durum oksidatif stres ile ilişkilendirilebilir (Şekil 3) (95, 97, 98).



Şekil 3. Başlıca serbest radikal kaynakları ve serbest radikal hasarının sonuçları

ROT, normal hücre sel metabolizmanın bir sonucu olarak moleküler oksijenden üretilir. H₂O₂, hidroksil radikali (OH•), singlet oksijen (¹O₂) ve süperoksit radikali (O₂^{•-}) fizyolojik öneme sahip ROT'e örnektir (99, 100). Düşük ROT seviyeleri, protein fosforilasyonu, transkripsiyon faktörü aktivasyonu, hücre farklılaşması, apoptoz, hücre bağışıklığı, kardiyak ve vasküler hücre işleyişinin düzenlenmesinde ikincil haberciler gibi çeşitli fizyolojik süreçler için gereklidir. Ancak, ROT'nin aşırı miktarda artması çoğu hastalığın başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır (100,101).

Hücre sinyallemede merkezi bir role sahip olan nitrik oksit radikali (NO•) ana RNT'dür. NO metabolizması ve reaktivitesi, peroksinitrit (ONOO⁻), azot dioksit (NO₂•), diazot trioksit (N₂O₃) ve diazot tetroksit (N₂O₄) olmak üzere birçok başka RNT oluşumuna yol açar (102). Disülfid-S-oksitleri, sülfenik asitleri ve tiyil radikallerini içeren RST, hücre

içinde kendi özel hedefleri ve redoks dönüşüm yolları ile oksidatif hasara neden olabilirler (102, 103).

2.3.4.2. Antioksidanlar

Reaksiyona girme kabiliyetleri çok fazla olan radikaller, neredeyse tüm hücrelerdeki bileşenlere hasar verebilir. Hücresel bileşenleri serbest radikal kaynaklı hasarlardan korumak için hem endojen hem de eksojen kapsamlı bir antioksidan savunma yelpazesi mevcuttur. Bir antioksidan, bir serbest radikale bir elektron vererek, onu nötralize edecek kadar kararlı bir moleküldür. Bu antioksidanlar, temel olarak serbest radikal temizleme özellikleri sayesinde hücresel hasarı geciktirebilir veya inhibe edebilir (93, 96).

Antioksidanlar, endojen (enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar) ve eksojen antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler. Endojen antioksidan hücresel savunma sistemi, serbest radikallerin ve metabolitlerinin üretimini düzenleyerek biyolojik sistemleri oksidatif hasardan korumada anahtar rol oynar. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler serbest radikal hasarını en aza indirir (100, 104, 105, 106).

Süperoksit dismutazlar (SOD'lar), katalitik olarak süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) oksijene (O_2) ve H_2O_2 'e dönüştürmek için işlev gören metal kofaktör temelli enzimlerdir (100, 107). Tüm SOD'lar, aktif bölgelerinde Fe, Mn veya Cu gibi bir geçiş serisi metali içerir. Manganez SOD formu bakterilerde, demir SOD formu bakterilerde ve bazı bitki türlerinde, bakır-çinko SOD formu bitkilerde, hayvanlarda ve mantarlarda bulunmaktadır. Ayrıca, ökaryotlarda mitokondriyal bir enzim olarak manganez SOD, bazı bakteri türlerinde membrana bağlı bir bakır-çinko SOD enzimi mevcuttur (108).

SOD'lar vücutta oksidatif strese karşı çok önemli bir antioksidan savunma oluşturur. SOD, ciltte serbest radikal hasarını azaltarak kırışıklıkları, ince çizgileri ve yaşlılık lekelerini önleme özelliğinden dolayı yaşlanmayı geciktirici bir bileşendir. SOD, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde antioksidan olarak kullanılır. SOD'lar, kanser, iskelet, inflamatuvar hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok sağlık sorununda terapötik bir ajan görevi görebilir. Ayrıca SOD, yara dokusunu yumuşatarak yara iyileşmesine yardımcı olur (109).

Katalaz (CAT), O_2 ve H_2O oluşturacak şekilde H_2O_2 'nin bozulmasını katalize eden hem içeren peroksizomal bir enzimdir (100, 110). Tipik katalazlar veya tek işlevli memeli tipi katalazlar, iki işlevli katalaz-peroksidazlar ve yalancı (psodö) katalazlar olmak üzere üç tür katalaz mevcuttur. Memeli tipi katalazlar genellikle hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunur ve bu tür katalazlar, az miktarda peroksidaz etkinliği gösterir. İki işlevli katalaz-peroksidazlar, bakteri ve mantarlardan izole edilmiştir. Hem içeren bu katalazlar çift işlevlidir, hem katalaz hem de peroksidaz görevi görür ve hidrojen vericisi olarak çeşitli organik maddeler kullanabilir. Üçüncü grup olan Hem olmayan katalazlar, bazı bakteri türlerinde bulunur. Bu tür katalazlarda aktivite bir Hem grubundan ziyade manganezce zengin bir reaksiyon merkezinden türetilir, bu nedenle yalancı katalazlar olarak adlandırılırlar. (100, 111).

CAT, inflamasyon, mutagenез, apoptozun önlenmesinde önemli bir faktördür. CAT, önemli oksijen konsantrasyonlarına maruz kalan insan eritrositlerinde H_2O_2 'nin zararlı etkilerine karşı hemoglobini korumada oldukça önemlidir (112).

Glutasyon peroksidaz (GPx), H_2O_2 veya organik hidroperoksitlerin suya veya karşılık gelen alkollere indirgenmesini, bir elektron vericisi olarak indirgenmiş glutasyon (GSH) kullanarak katalize eden çoklu izozimler ailesindendir (113, 114). Memeli dokularında selenyuma bağımlı dört GPx izozimi bulunmaktadır ve enzim aktif bölgesi dört protein alt biriminden oluşur. GPx1 sitozolde, çekirdekte ve mitokondride, GPx2 sitozolde ve çekirdekte, GPx3 sitozolde (bir protein) ve membrana bağlı GPx4 çekirdekte, sitozolde, mitokondride konumlanmıştır (100, 113, 114). Memelilerde tanımlanan diğer iki izozim, GPx5 ve GPx6, GPx3 ile yakından ilişkilidir. Bununla birlikte, GPx5 aktif bölgede selenosistein içermez ve epididimden salgılanır. GPx6 insanlarda ve domuzlarda tanımlanmıştır ve koku alma epitelinde bulunan selenyum bağımlı bir GPx'tir (113, 114). GPx-1, kanser ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere birçok hastalığın önlenmesinde rol oynamaktadır (115).

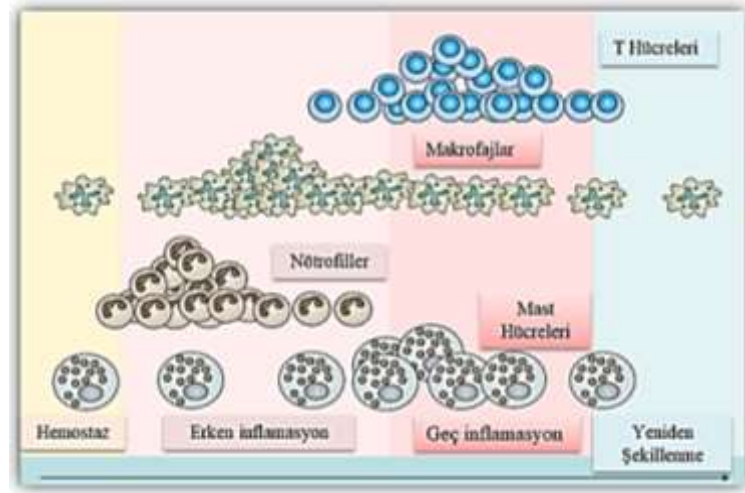
Metabolik ve besleyici antioksidanlar olmak üzere enzimatik olmayan antioksidanlar iki sınıfta toplanabilir. Metabolik antioksidanlar, vücutta metabolizma yoluyla üretilen, bilirubin, glutasyon, koenzim Q10, L-ariginin, melatonin, metal şelatlayıcı proteinler, transferrin, ürik asit ve α -lipoik asit gibi bileşiklerdir. Besleyici antioksidanlar ise vücutta üretilemeyen ve C vitamini, E vitamini, eser metaller (çinko, manganez, selenyum gibi), flavonoidler, karotenoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri gibi

besinlerden veya takviyelerden sağlanması gereken bileşiklerdir (104, 105). Besleyici antioksidanlar, ROT'nin detoksifikasyonunda (116) ve oksidatif stresin nötralizasyonunda önemli bir rol oynar (117).

2.3.5. Antiinflamatuvar Aktivite

Hem normal hem de patolojik yara iyileşmesinde inflamasyon önemli bir role sahiptir. Yaralanmanın erken aşamalarındaki akut inflamatuvar yanıt, doku büyümesi ve onarımı için gerekli olan faktörleri oluşturur (118, 119). Ancak uzun süreli kronik inflamasyon, yaranın yeniden şekillenmesini ve matriks sentezini önleyerek, yara kapanmasında gecikmeye ve yara ağrısında artışa yol açarak zararlı olabilir (118, 120).

Hasarlı dokunun iyileşmesinde ve zararlı uyaranların uzaklaştırılmasında doğuştan gelen bağışıklık sistemi aktive olur. Bu zararlı koşullara yanıt olarak akut inflamasyon koruyucu bir savunma hattı oluşturur (119, 121). Akut inflamasyon, vücudun enfeksiyonlardan korunmasına yardımcı olur, kısa sürer ve genellikle terapötik inflamasyon olarak kabul edilir (122). Yaralanma bölgesine tomboositler ve mast hücrelerinin degranülasyonu ile inflamasyon başlar. Bağışıklık hücreleri doku hasarına yanıt olarak salınan proinflamatuvar araçlar tarafından aktive edilir. İnflamatuvar yanıtın temel hücresel bileşenleri olan lökositlerin; hücre göçü, proliferasyon, farklılaşma ve iyileşme yanıtının kalitesi üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır (119, 123). Yara dokusundaki en belirgin lökosit türleri mast hücreleri, notrofiller, makrofajlar ve T hücreleridir. Erken inflamatuvar fazda, yara bölgesine nötrofiller ile dolaşımdaki monositler eş zamanlı olarak girer ve monositler olgun makrofajlara dönüşürler. Yaralanma sonrası mast hücre sayıları artar ve inflamasyon boyunca baskın hücrelerdir. Hatta, uzun yeniden şekillenme fazı sırasında yara bölgesinde düşük sayıda yerleşik mast hücreleri ve makrofajlar mevcuttur (119, 124). Mast hücreleri, aynı zamanda doku homeostazında, yeniden şekillenmesinde ve onarımında temel bir rol oynar (124). Geç inflamatuvar fazda ise, T hücreleri yara yatağında görülür ve yaranın çözülmesini ve yeniden şekillenmesini etkileyebilir. İnflamasyon düzeldikçe ve lökosit sayısı azaldıkça, yara uzun bir yeniden şekillenme ve çözülme dönemine maruz kalabilir (Şekil 4).



Şekil 4. Yara dokusunda lökosit infiltrasyon modeli (Koh ve DiPetro'dan, 119)

Eğer inflamasyon uzun bir süre devam ederse, diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar, obezite ve pulmoner hastalıklar dahil olmak üzere çoğu kronik hastalıkla ilişkili kronik inflamasyon ortaya çıkar (122). Kronik inflamasyonda, akut inflamasyondan farklı olarak makrofajlar ve plazma hücreleri açısından zengin hücre infiltrasyonu gözlenir (42).

2.3.5.1. İnflamasyonda Kimyasal Aracılar

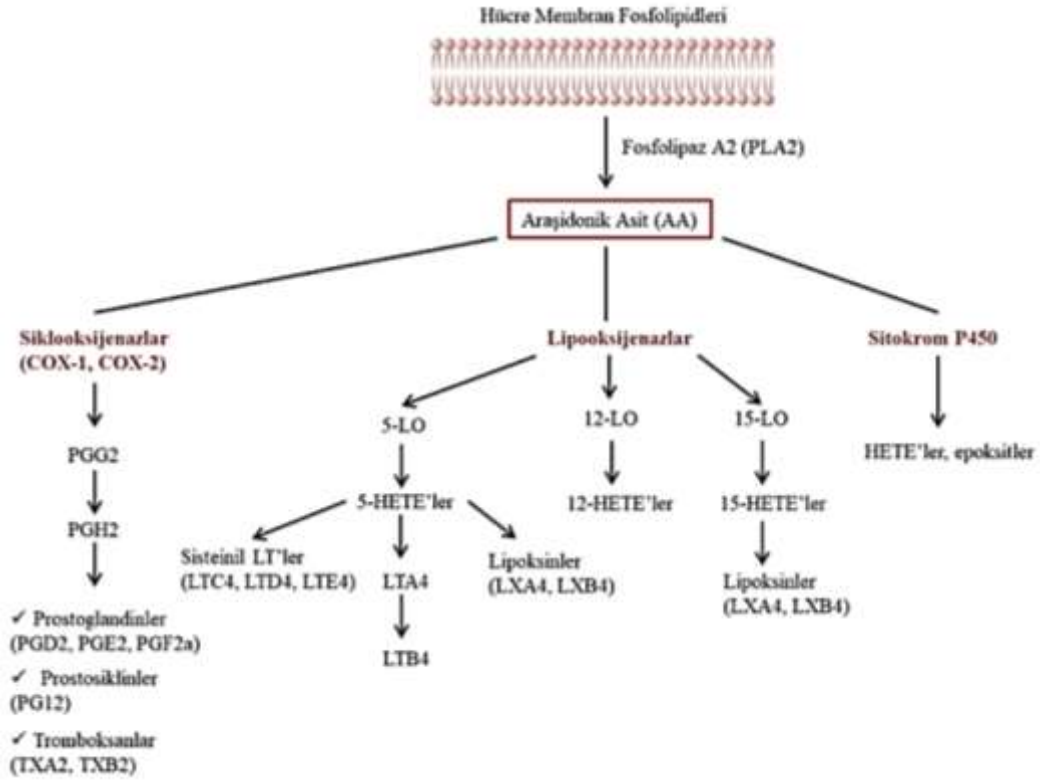
Doku hasarını takiben oluşan inflamatuvar yanıt sırasında kimyasal aracılar salınımı gerçekleşir. Bu kimyasal aracılar, yaralanma veya enfeksiyon bölgesinde sistemik ve lokal olarak hareket eden çözünabilir, yayılabilir moleküllerdir. Eikosanoidler, sitokinler, büyüme faktörleri, proteazlar ve nitrik oksit inflamasyondaki kimyasal aracılar arasında yer alır (Tablo 3) (46, 125).

Tablo 3. İnflamasyondaki kimyasal araçılar

Hücre türevli kimyasal araçılar	Fonksiyonları
Histamin	Arteriyol genişlemesi ve artmış venöz geçirgenlik
Serotonin	Denerve dokuda vazokonstriksiyon, sağlam dokuda vazodilatasyon
Prostaglandinler	Vazodilatasyon, acı algısı
Lökotrienler	Lökosit adezyonu, güçlü kemoatraktan, lizozomal enzimlerin salınımı
Sitokinler	Vazodilatasyon, artmış vazopermeabilite ve fagositöz
İnterlökınler	Nötrofillerin aktivasyonu ve kemoatraksiyonu
Plazma türevli kimyasal araçılar	Fonksiyonları
Bradikinin	Vazodilatasyon, vasküler geçirgenliği artırma, düz kas kasılması ve ağrıya neden olma
Komplemen sistem	Mast hücreleri tarafından histamin salınımını uyarma

Eikosanoıdler: Lökotrienler (LT'ler), lipoksinler (LX'ler), prostaglandinler (PG'ler) ve tromboksanlar (TX'lar) dahil olmak üzere eikosanoıdler, esas olarak araşıdonik asitten oksidatif bir yolla üretilen biyolojik olarak aktif moleküllerdir (46, 126). Eikosanoıdler, antikor oluşumu, sitokin üretimi, inflamasyon, hücre proliferasyonu ve göçü gibi önemli olayların düzenlenmesinde rol oynar. Aynı zamanda eikosanoıdler, vazokonstriksiyon, vazodilatasyon, trombosit agregasyonu, böbrek filtrasyonu, renal kan akışı gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alır (126).

Serbest araşıdonik asit ve fosfolipaz A2 (PLA2) enziminin etkisiyle eikosanoıdler sentezlenebilir ve daha sonra farklı eikosanoıdlere dönüştürülebilir. Araşıdonik asit, siklooksijenaz, lipoksijenaz veya sitokrom P-450 epoksijenaz yolu ile biyolojik olarak aktif bileşiklere dönüştürülebilir (Şekil 5).



Şekil 5. Eikosanoidlerin biyosentezi (Harizi ve ark., 126)

PG'ler, prostosiklinler ve TX'lar, COX-1 ve COX-2 enzimleri aracılığıyla siklooksijenaz yolu ile oluşur. Prostaglandin D2 (PGD2), prostoglandin E2 (PGE2), prostoglandin F2a (PGF2a), prostosiklin I2 (PGI2) ve TXA2 inflamasyonda önemli olan eikosanoidlerdir. COX-1 renal, vasküler hemostazı düzenleyen ve mide mukozasını koruma gibi reaksiyonlarda görev alan bir enzimdir. İnflamasyondaki kimyasal araçılara yanıt vermediği düşünülse de, yüksek araşidonik asit konsantrasyonlarında PG üretimine katkı sağlayarak inflamatuvar yanıtı tetikleyebilir. COX-2, özellikle inflamasyon esnasında çeşitli büyüme faktörlerine, sitokinlere ve hormonlara yanıt olarak hızla sentezlenen bir enzimdir. COX-2, düşük araşidonik asit konsantrasyonlarında bile PG sentezler. PG'ler, inflamasyonda ağrı ve ateşin patogenezinde rol oynarlar (46, 125, 126, 127). PGD2, vazodilatasyonda, trombosit agregasyonunun inhibisyonunda, gastrointestinal kaslarının gevşemesinde ve hipofiz hormonlarının salınmasında görev alır. PGE2, intestinal, bronşiyal ve gastrointestinal düz kasların kasılmasına, PGF2 α , insanlarda miyometriyal kasılmaya, bazı türlerde luteoliz ve bronkokonstriksiyona neden olur. PGI2, vasodilatör ve güçlü bir trombosit agregasyon inhibitörü olarak rol oynar. TxA2 vazokonstriksiyona,

trombosit agregasyonuna neden olur ve TxA₂ kararsız yapıda olup hızla inaktif formu olan TxB₂'ye dönüşür (46, 125).

Lipoksijenaz yolu ile 5-lipoksijenaz (5-LO), 12-lipoksijenaz (12-LO) ve 15-lipoksijenaz (15-LO) üretilir. Nötrofillerde baskın olan 5-LO enzimi, hidroksieikosatetraenoik asitlere (HETE) dönüştürüldükten sonra LT'ler üretilir. Sistein amino asiti içeren LT'ler C₄, D₄ ve E₄ (LTC₄, LTD₄ ve LTE₄) yoğun vazokonstriksiyonda ve artmış vasküler geçirgenlikte rol oynar. Kararsız bir bileşik olan LTA₄, LTB₄'e dönüşür. LTB₄, lökositlerin topaklaşmasına ve endotelyuma yapışmasına sebep olur. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar etkisi olan LX'ler, nötrofil kemotaksisini ve adezyonunu inhibe ederken, monosit yapışmasını uyarırlar. LxA₄ vazodilatasyonu uyarırken, aynı zamanda LTC₄ ile uyarılan vazokonstriksiyonun etkilerini azaltır (46, 125).

P-450 epoksijenaz yolu ile HETE'ler ve epoksitler oluşur (46, 126).

Sitokinler: Sitokinler, hücrel büyüme, farklılaşmayı, metabolizmayı ve protein sentezini kontrol ederek bağışıklık veya onarım süreçlerini düzenleyen küçük peptitler veya glikoproteinlerdir. TNF'ler, IL'ler, IFN'ler, kemokinler, koloni uyarıcı faktörler, lenfokinler ve monokinler şeklinde sınıflandırılabilirler (46, 125).

TNF- α , inflamasyon, bağışıklık yanıt ve apoptoza aracılık eden önemli bir sitokindir (128). TNF- α , özellikle aktive edilmiş makrofajlardan olmak üzere, T hücreleri, keratinositler gibi diğer hücre tiplerinden üretilir (128, 129). TNF- α , inflamasyonun başlamasından, onarım ve rejeneratif süreçlerden sorumludur. Sağlıklı epiderminin üst tabakasında düşük düzeyde TNF- α mevcuttur. Yaralanma, enfeksiyon, UV radyasyonu gibi durumlarda keratinositlerden TNF- α salınımı önemli ölçüde artar. TNF- α , sedef hastalığı, kontakt dermatit, kutanöz T hücreli lenfoma gibi inflamatuvar hastalıklarda ana sitokin düzenleyici olarak görev alır. TNF- α bağışıklık tepkilerini aktive etmek için, IL-1, IL-8, TGF- β ve hücreler arası yapışma molekülü-1 gibi ek sinyallerin üretimini indükler (128).

IL'ler; lenfositler, keratinositler veya nötrofiller tarafından üretilen sitokinlerin bir alt grubudur. IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 ve IL-10 yara iyileşmesi üzerinde etkili olan interlökinlerdendir. Bu interlökinlerin yara iyileşmesi üzerindeki rolleri Tablo 4'te verilmiştir (46). IL-1, akut ve kronik inflamasyona, onarıma ve çözülmeye katılan birincil inflamatuvar sitokindir (125). IL-1 β , ağrı, inflamasyon ve otoimmün durumlarla

ilişkilendirilen pro-inflamatuvar bir sitokindir. IL-1 β , hücre yaralanması, enfeksiyon ve inflamasyon esnasında monositler, makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücrelerinden salınır (130, 131).

Tablo 4. Yara iyileşmesi boyunca önemli olan interlökinlerin rolleri

	Yara iyileşmesi boyunca rolleri	Kaynak
IL-1	Ateşi, adrenokortikotropik hormon salınımını uyarmak, TNF- α ve IFN- γ 'yı artırmak, granüositleri ve endotel hücrelerini aktive etmek ve hematopoezi uyarmak.	Makrofajlar, mast keratinositler, lenfositler hücreleri,
IL-2	Makrofajları, T hücrelerini, doğal öldürücü hücreleri ve lenfokinle aktive olan öldürücü hücreleri aktive etmek, aktive B hücrelerinin farklılaşmasını uyarmak, aktive edilmiş B ve T hücrelerinin çoğalmasını uyarmak ve ateşi tetiklemek.	Makrofajlar, mast keratinositler, lenfositler hücreleri,
IL-4	Erken safhada fibroblast proliferasyonunu uyarmak, geç safhada (72 saat sonra) sitokin ekspresyonunu azaltmak.	Mast hücreleri
IL-6	IL-1'e yanıt olarak salınmak ve ateşi tetiklemek, akut faz reaktanlarının karaciğer tarafından salınmasını artırmak ve proliferasyon sırasında ECM'nin parçalanmasını engellemek.	Makrofajlar, mast keratinositler, lenfositler hücreleri,
IL-8	Nötrofil yapışmasını, kemotaksisi ile granül salınımını artırmak ve epitelizasyonu artırmak.	Makrofajlar, mast keratinositler, lenfositler hücreleri,
IL-10	Erken safhada etkisi bilinmiyor. Geç safhada (72 saat sonra) ise sitokin ekspresyonunu azaltmak.	Bilinmiyor

İnterferonların α , β ve γ olmak üzere üç üyesi bulunmaktadır. IFN- γ yara iyileşmesindeki önemli sitokinlerdendir. IFN- γ , monositler tarafından sitokin üretimini uyarmanın yanı sıra yapışma, fagositoz, sekresyon, solunum patlaması ve nitrik oksit üretimi dahil olmak üzere monosit efektör fonksiyonlarda görev alır (46).

Kemokinler; lökositleri çeken, immun ve inflamatuvar reaksiyonlarda işlev gören sitokinlerdendir. Kemokinler, hem G proteinine bağlı reseptörler hem de gen ekspresyonunu etkileyen fosforilasyon kaskadlarını düzenleyen kinaza bağlı reseptörler üzerinde işlev görür (72, 125). Lenfokinler, aktive T lenfositleri; monokinler ise mononükleer fagositler tarafından üretilen sitokin sınıfındadırlar. Koloni uyarıcı faktörler makrofajlardan salgılanan, uyarıcı bir yara iyileştirici etkiye sahip sitokindir (46).

Büyüme Faktörleri: Büyüme faktörleri; protein üretimini, ECM sentezini ve apoptozu uyararak yara iyileşmesini düzenler. Protein yapısında olan büyüme faktörleri çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinden sorumludurlar (46).

PDGF trombositler, keratinositler, makrofajlar, endotel hücrelerden ve fibroblastlardan üretilir. PDGF inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu, yeniden epitelizasyon, matriks oluşumu ve yeniden modelleme fonksiyonlarına sahip olup, yara iyileşmesinin her aşamasında rol oynayan önemli bir büyüme faktörüdür (43, 46, 132).

Aktif makrofajlar, trombositler, keratinositler tarafından üretilen TGF- α , mezenkimal, epitel ve endotelyal hücre büyümesi ile endotelyal hücre kemotaksisini uyarır. TGF- β trombositler, makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilir. TGF- β fibroblast kemotaksisini, proliferasyonunu ve monositlerin bazı büyüme faktörlerini (PDGF, TNF- α ve IL-1) salgılaması için uyarır. Aynı zamanda, TGF- β ECM'i düzenleme kabiliyetine sahiptir ve yara izinin yeniden şekillenmesine katkı sağlar (46).

EGF'ler tükürük, idrar, süt bezlerinde, plazma ve trombositlerde bulunur. EGF epitelial, endotelyal ve fibroblast hücreleri için mitojenik uyarıcı olmanın yanı sıra anjiyogenez ve kolajenaz aktivitesini uyarır. EGF, heparin bağımlı-EGF ve TGF- α yara iyileşme süreçlerinde olumlu bir etki gösterir (43, 72).

Vazoaktif Aminler: Vazoaktif aminler (serotonin ve histamin) mast hücreleri, trombositler ve bazofiller tarafından üretilir (125).

Histamin mast hücreleri ve bazofillerde depolanmış L-histidin dekarboksilaz enzimi ile oluşturulan vazoaktif bir amindir. Histamin vazodilatasyon, endotel boşluk oluşumunu artırıcı, anafilakside aracı olma gibi işlevlere sahiptir. Histamin IL-1, TNF- α gibi sitokinlerin ve biyojenik aminlerin salınımını tetikler (125).

Triptofanın dekarboksilasyonu ile oluşan ve salgı granüllerinde depolanan serotonin, vazokonstriksiyona neden olur. Aynı zamanda, düz kas kasılmasına, trombosit agregasyonuna, merkezi sinir sisteminin uyarılmasına ve inhibisyonuna yol açar (125).

Trombosit Aktive Eden Faktör (TAF): Hem akut hem de kronik inflamasyonda önemli bir aracı olan TAF, oldukça düşük konsantrasyonlarda etki oluşturabilen biyolojik olarak aktif bir lipiddir. TAF, mast hücreleri, alveolar makrofajlar, akciğerde bulunan bazı inflamatuvar hücreler tarafından üretilir. TAF vazodilatasyona, artmış vasküler geçirgenliğe sebep olabilir (125).

Diğer Aracılar:

Nitrik Oksit (NO): L argininin amino asitinden nitrik osit sentaz (NOS) enzimi tarafından oluşan NO küçük bir radikaldır. NOS'lar iki yapısal (endotelyal ve nöronal) ve bir indüklenebilir olmak üzere üç farklı izoformda bulunur. Nöronal NOS (nNOS) nöronlarda, iskelet kasında, pankreasta ve böbreklerde; endotelyal NOS (eNOS) çoğunlukla membrana bağlı endotel hücrelerinde olmak üzere diğer hücre tiplerinde de bulunur (46, 133). İndüklenebilir NOS (iNOS) çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve inflamatuvar uyaranlar tarafından indüklenir. iNOS yapısal izoformlar tarafından üretilen miktarların üzerinde ve yüksek seviyelerde NO salınımına yol açar (133). Yara iyileşmesi sırasında salgılanan ve salınan çok sayıda kimyasal aracı arasında IL-1, TNF- α ve IFN- γ , ve iNOS en olası indükleyicileridir. NO'nun birincil etkilerinin çoğu vazodilatasyon, antimikrobiyal aktivite, antitrombosit etkiler, neovaskülarizasyon ve vasküler geçirgenliğin indüksiyonu gibi yara iyileşmesi ile ilgilidir (133, 134).

Hem oksijenaz (HO): Hem oksijenazlar, prooksidan Hem molekülünü karbon monoksit, serbest demir ve biliverdine indirger, daha sonra bilirubine dönüştürür (135, 136). HO-1 indüklenebilir form, HO-2 ve HO-3 yapısal formları olmak üzere üç izoformu mevcuttur (135). Proanjiyojenik, antioksidan, antiinflamatuvar, sitoprotektif özellikleri, hücre proliferasyonu ve göçü üzerindeki etkisi ile HO-1, yara iyileşmesi sürecinde rol oynayan bir enzimdir (136, 137). HO-1 adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltıp sitokinlerin ve kemokinlerin indüksiyonunu baskılayarak veya COX-2 ile sitokrom P450 gibi proinflamatuvar hemoproteinleri inhibe edip lökosit toplanmasını engelleyerek inflamatuvar yanıtı düzenleyebilir (137). Ayrıca, HO-1 sinyal iletim mekanizmalarında rol oynar ve hücrel hemostazın sürdürülmesine diğer enzimatik sistemlerle eş zamanlı hareket eder (138).

2.3.6. Antimikrobiyal aktivite

Mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar ve bulaşıcı hastalıklar dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerindendir. Antimikrobiyal maddelerin keşfi ile bakteriyel enfeksiyonlardan kaynaklanan morbidite ve mortalite önemli ölçüde azalmıştır. Fakat, antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı çeşitli patojenik bakterilerin direnç kazanmasına neden olmuştur. Mevcut birçok antibiyotiğin, dirençli patojenlere karşı yetersiz kalması yeni antibiyotiklere olan ihtiyacı artırmıştır. Bu yüzden, tıbbi bitkilerden elde edilebilecek doğal alternatif ilaçlara ilgi giderek çoğalmaktadır (139).

Tıbbi bitkiler, fenolik bileşikler, terpenoitler, uçucu yağlar, alkaloitler, glikozitler, saponinler ve polipeptitler gibi antimikrobiyal özelliklere sahip maddeleri sentezlerler ve bu maddeler mikroorganizmalara karşı savunma görevi görür (140-142). Antimikrobiyal maddeler, membran bozulması, enzim inhibisyonu, enzim inaktivasyonu, protein bağlama, disülfid köprü oluşumu, DNA etkileşimi ve hücre duvarına veya DNA'ya interkalasyon aracılığıyla mikroorganizmalar üzerinde etki mekanizmalarını gösterirler. Eski çağlardan beri bitkiler, birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakta ve yeni ilaç üretimi için potansiyel bir kaynak oluşturmaktadır. Bitki kökenli antimikrobiyallerin, mikroorganizmaları geleneksel antibiyotiklere göre farklı mekanizmalar yolu ile inhibe edebilmesi ve bu nedenle dirençli enfeksiyonların tedavisinde kullanımı açısından oldukça önem kazanmıştır (140, 142).

Bazı mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıklar aşağıdaki gibi özetlenmiştir:

- *Escherichia coli* (Ec) sepsisemilere, menenjitte, yara enfeksiyonlarına, ishale ve idrar yolu iltihabına neden olan gram negatif bir bakteridir (139, 143).
- *Yersinia psödotüberküloz* (Yp), fekal-oral yolla bulaşan, tipik olarak bağırsakla ilişkili enfeksiyonlara ve nadiren ölümcül sepsisemiye neden olan gram negatif bir bakteridir (144).
- *Staphylococcus aureus* (Sa), sepsisemi, endokardit, pnömoni, yara, kemik ve eklem enfeksiyonları da dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklardan sorumlu gram pozitif bir patojendir (145, 146).
- *Enterococcus faecalis* (Ef), idrar yolu enfeksiyonu, kan enfeksiyonları, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan, diyabetik ayak ülserleri ve yanıklar dahil olmak üzere tüm yara türlerinde görülen gram pozitif bakteri türüdür (147, 148).
- *Bacillus cereus* (Bc), gram-pozitif aerobik veya fakültatif anaerobik, hareketli, spor oluşturan, çubuk şeklinde bir bakteridir. Bu bakteri, gastrointestinal enfeksiyonlar, gıda zehirlenmesi ve ciddi göz enfeksiyonları ile ilişkilendirilir (149).
- *Candida albicans* (Ca), insanlarda deri, ağız boşluğu ve yemek borusu, gastrointestinal sistem, vajina ve damar sisteminde yaygın görülen kandidiyazise neden olan bir mantardır (150).

- *Klebsiella pneumoniae*, gram negatif bakteriler arasında yer alan, idrar yolu enfeksiyonlarına, nozokomiyal pnömoniye ve intraabdominal enfeksiyonlara neden olan bir patojendir (139, 151).
- *Proteus mirabilis*, yara enfeksiyonlarına, idrar yolu enfeksiyonlarına, ülserlere, ağrılı yaralara neden olan *Enterobacteriaceae* ailesine ait gram negatif bir bakteridir (139, 152).

Yara bölgesinde mikroorganizmaların varlığı yara iyileşme sürecinde gecikmeye, enfeksiyonlara ve uygun olmayan kolajen birikimine neden olabilir (145). Bir yaranın bakteri yükünü azaltmak, yara iyileşmesini kolaylaştırmanın yanısıra lokal iltihaplanmayı ve doku tahribatını azaltmak için gereklidir. Yara enfeksiyonunun önlenmesi ve kontrolü için ideal bir ajan, patojenleri doğrudan yok etmeli ve aynı zamanda immün aktiviteyi de uyarmalıdır (118). Mikroorganizmalar vücuda yaralardan girdiklerinde vücudun derinlerine girerek koloni oluşturabilirler ve bu durum doğal iyileşme süresini uzatabilir. Aynı zamanda, yara iyileşmesinin inflamatuvar aşamasını uzatır. Oluşan enfeksiyonlar, yara bölgesindeki pıhtılaşma mekanizmasının bozulmasına neden olarak anjiyogenez sürecini geciktirebilir. Sağlıklı bir yara iyileşmesi için bu enfeksiyonların tedavi edilmesi oldukça önemlidir (145, 153).

2.3.7. Enzim Aktivitesi

Enzimler, yaşamın tüm süreçlerinde hayati öneme sahip, kimyasal dönüşüm için gerekli olan biyomoleküllerdir (154, 155). Tüm metabolik süreçleri hızlandıran ve belirli bir görevi yerine getiren enzimler, kimyasal reaksiyonların hızlarını artırmada oldukça etkili katalizörlerdir. Teknolojik gelişmeler ile enzimlerin farklı endüstriyel ve terapötik amaçlarla kullanımını giderek yaygınlaştırmaktadır (155). Hücrelerin biyokimyasal fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için enzimlere ihtiyaç vardır, bu nedenle enzim yönünden zengin yiyecek tüketimi de hastalıkların önlenmesinde oldukça önemlidir. Vücudun tek bir hücreden olgun bir organizmaya büyümesini düzenlemek, vücudun ihtiyaçlarını karşılamak için yiyecekleri enerjiye dönüştürmek ve hücrenin içindeki belirli maddeleri parçalamak veya oluşturmak enzimlerin önemli işlevlerinden bazılarıdır (156).

Enzim aktivitesini azaltan moleküllere inhibitör denir ve enzim inhibitörleri, sağlık alanında, herbisitler ve böcek ilacı gibi farmasötik ajanlar olarak kullanılabilir. Tersinir ve tersinmez inhibitörler olarak iki grupta incelenirler. Tersinir inhibitörler, enzim yüzeyinin çeşitli parçalarıyla kovalent olmayan etkileşimler oluştururken; tersinmez inhibitörler,

güçlü kovalent bağlar oluşturarak enzim yüzeyindeki farklı fonksiyonel gruplarla etkileşime girer (157).

2.3.7.1. Kolajenaz Enzim Aktivitesi

İnsan derisindeki en önemli yapısal proteinlerden biri olan kolajen, derinin gerilme mukavemetinden sorumludur (158, 159). Kolajen deride, tendonlarda, kıkırdakta, kemiklerde, dişlerde ve korneada baskın bileşendir (160, 161). Kolajen üç paralel polipeptit zinciri içeren üçlü sarmal yapıda çubuk benzeri bir moleküldür. Üçlü sarmal, zincirler arası hidrojen bağı ve moleküller arası çapraz bağlantılar ile kararlı bir yapıdadır (160). Kolajen lifleri, fibroblastlar tarafından üretilir ve hücre şeklinin farklılaşmasının kontrolünde, göçünde, bir dizi proteinin sentezinde, pigmentasyon, ciltteki kırışıklık değişikliklerinde rol oynar (158, 161). Ayrıca kolajen cerrahi dikişler, kozmetikler, yara iyileşmesi ve deri yapımı gibi alanlarda tercih edilen önemli bir biyomateryaldir (161).

Kolajenazlar, MMP ailesinden, transmembran çinko endopeptitaz enzimlerindendir (158, 159). MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 olmak üzere 4 tip kolajenaz bulunur ve fizyolojik pH, sıcaklık ve iyonik güç koşulları altında fibriller formdaki kolajen moleküllerinin sarmal bölgelerini hidroliz ederler (160-162). Kolajenazlar, kolajen ve elastin liflerini sindirebilir ve gelişim sırasında doku yeniden şekillenmesi, doku homeostazı, yara iyileşmesi ve tümör hücrelerinin yayılması gibi birçok süreçte görev alırlar (159, 160, 163). MMP-1 iki tip kolajenin (II ve III), MMP-13 ve MMP-18, çeşitli fizyolojik koşullar altında dört tip kolajenin (I, II, III ve IV) üçlü sarmal bölgeleri hidrolizleme yeteneğine sahiptirler. MMP-8, tip I kolajeni MMP-1 veya MMP-13'ten üç kat daha güçlü bir şekilde parçalayabilir. Kolajen küçük parçalar haline getirildikten sonra, sarmal olmayan bölgeleri pepsin, tripsin, kimotripsin gibi enzimler aracılığıyla bozunabilir (162).

Bakterilerden elde edilen kolajenazlar, memeli kolajenazlarına göre daha geniş substrat özgüllüğü sergiler. *Clostridium histolyticum* bakteriyel kolajenazdır ve hücre izolasyonunda, yara iyileşmesinde ve yara debrimanında yaygın olarak kullanılmaktadır (162, 164). *C. histolyticum* olmak üzere çeşitli mikrobiyal kolajenazlar, her bir kolajen polipeptit zincirini birden çok bölgeye ayırabilir. Ayrıca, rekombinant bakteriyel kolajenazlar, hem suda çözünmeyen doğal kolajenleri hem de suda çözünür denatüre kolajenleri hidrolize edebilir (162).

Yanıkların, yara iyileşmesinin ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde kolajenazlar tercih edilmektedir. Yara iyileşme sürecinde, kolajenazlar dermal hücrelerin proliferasyonuna, anjiyogenezine ve göçüne neden olarak iyileşme sürecine katkı sağlar. Üstelik kolajenazlar, yara bölgesindeki nekrotik dokuları yok ederken sağlıklı dokulara zarar vermez. Kolajenazlar kısmi tabakalı yanık yaralarında oldukça etkilidir (162, 165, 166).

Bitkilerden elde edilen sekonder metabolitlerin (fenolik asitler, flavonoidler, terpenoidler gibi) antikolajenaz aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (158, 161, 167). Genistein, kersetin, nobiletin, baicalein gibi bazı flavonoidler MMP-1 ekspresyonunu regüle eder (167-169). Ayrıca bazı topikal olarak kullanılan flavonoidler, kolajen bozulmasına karşı koruma görevi görür. Flavonoidler, dermal dokunun tahribatının azalmasına ve iltihaplı veya fotoyaşlanmış deri hasarının azalmasına katkı sağlayabilir (167, 170). Aloe jelin bileşeni olan aloin flavonoidi, kateşin ve epigallokateşin gallatın (EGCG) gibi yeşil çay polifenollerinin ve Trabzon hurması yaprağından izole edilen polifenollerin kolajenaz inhibe edici etkileri vardır (158, 161, 171, 172).

2.3.7.2. Tirozinaz Enzim Aktivitesi

Melanin, dermisin bazal tabakasında yer alan melanosit hücreleri tarafından salgılanan pigmentin ana bileşenidir. Melanosit hücreleri endokrin, immün, inflamatuvar ve merkezi sinir sistemleri ile etkileşim halindedir. Melanin, ROT'ni ortadan kaldırarak deriyi ultraviyole hasardan korumakla beraber, toksik ilaç ve kimyasalları temizleme gibi deri homeostazında görev yapar (173, 174).

Tirozinaz melanin sentezi için anahtar enzim olup, L-tirozinin L-3,4-dihidroksifenilalanine (L-DOPA) ortohidroksilasyonu ile reaksiyon başlar ve L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonu ile melanin sentezlenir (174-176). Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi pek çok organizmada yaygın olarak bulunan tirozinaz, bakır içeren polifenol oksidaz enzimidir (173, 175, 176, 177). Tirozinaz, monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonunu (monofenolaz aktivitesi) ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu (difenolaz aktivitesi) katalize eder (175, 177, 178). Tirozinaz hayvanlarda melanizasyondan, bitkilerde kahverengileşmeden sorumludur (175). Yaşlılık lekeleri, kırışıklık oluşumu, kötü huylu melanom gibi cilt hasarı melaninin aşırı bir şekilde birikiminden kaynaklanabilir. Ayrıca, fenolik asitlerin oksidasyonu sonucu meyve ve sebzelerde olan kahverengileşme, gıda pazar değeri açısından da istenmeyen bir durumdur

(176, 178, 179). Bitkisel ürünlerde meydana gelen kararmaların esas nedeni, fenollerin tirozinazlar tarafından enzimatik oksidasyona uğratılmalarıdır. Bu durum, esansiyel amino asitlerin yok olması, beslenme kalitesinin bozulması ve toksik bileşiklerin oluşumu ile sonuçlanabilir (180). Bu tür istenmeyen kararmalar, dermatolojik bozukluklar endişe oluşturmakta ve güçlü tirozinaz inhibitörlerine ihtiyacı artırmaktadır.

Tirozinaz inhibitörleri kozmetik, tıbbi ürünler ve gıda endüstrilerinde büyük öneme sahiptirler. Tirozinaz inhibitörlerinin, pigmentasyon ile bağlantılı bazı dermatolojik bozuklukları tedavi etmek için, güneş yanığı sonrasında pigment gidermek için ve gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanımı mevcuttur. Ayrıca, yara iyileşmesinde ve böcek zararlılarının kontrolünde tirozinaz inhibitörlerinin önemli etkileri görülmüştür (173, 176, 177, 178).

Doğal kaynaklardan elde edilen tirozinaz inhibitörleri, monofenolaz, difenolaz veya her iki aktiviteyi birden inhibe edebilirler. Zengin biyoaktif kimyasal içeriklere sahip bitkiler ve mantarlardan çeşitli tirozinaz inhibitörleri üretilmiştir. Bu tirozinaz inhibitörleri, birçok cilt rahatsızlıklarının giderilmesinde, pigmentasyon bozuluklarının önlenmesinde ve gıda kalitesinin iyileştirilmesinde etkili olmuştur (176, 180). Bitki ekstraktlarından, mantarlardan elde edilen bileşiklerin tirozinaz inhibitörü olarak araştırılması oldukça önem arz etmektedir (179).

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, flavonoidler, aldehitler ve türevleri tirozinaz inhibitörü olarak kullanılmaktadır (173, 180). Anisik asit, benzoik asit, *p*-benzoik asit, *p*-kumarik asit, sinamik asit, *p*-metoksisinamik asit gibi fenolik bileşikler tirozinaz inhibitörü olarak hareket eder ve hem monofenolaz hem de *o*-difenolaz aktivitesini inhibe ederler (181). Luteolin 4'-*O*-glukozit, luteolin 7-*O*-glukozit, kersetin, kemferol ve galangin gibi güçlü tirozinaz inhibitörleri olan flavonoidler çeşitli bitkilerden izole edilmiştir (178, 180, 182, 183). Gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak kullanılan galik asit ve türevleri de güçlü tirozinaz inhibitörleri olarak tanımlanmıştır (180, 183). Anisaldehit, küminaldehit, trans sinnamaldehit ve benzaldehit türevleri bitkilerden elde edilen tirozinaz inhibitörlerindendir (180, 184, 185).

En bilinen tirozinaz inhibitörü olan kojik asit mantar kökenli olup, cilt beyazlatma ve tüylenme önleyici ajan olarak kullanılmaktadır (178, 183, 185). Mantar kaynaklı tirozinaz inhibitörlerinden azelaik asit, anormal melanosit hücreleri üzerinde de sitotoksik

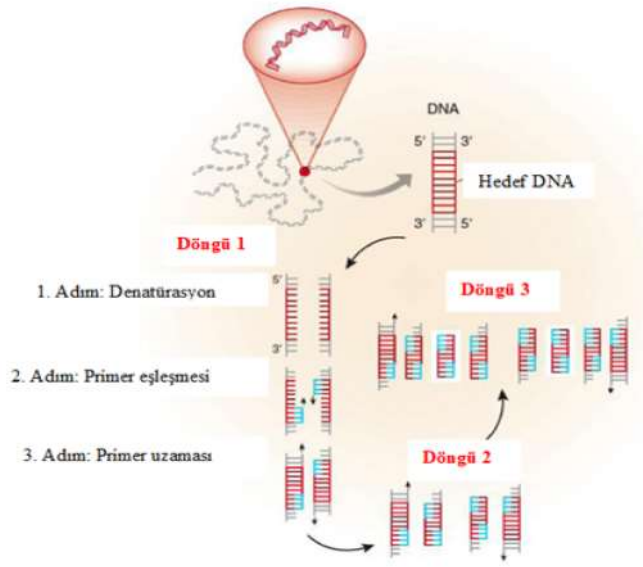
etki gösterir (183, 186, 187). Bir başka mantar kökenli tirozinaz inhibitörü metallotiyonindir (180, 183).

2.3.8. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA'nın *in vitro* replikasyonu için hızlı ve güçlü bir tekniktir (188, 189). PCR ile az miktarda DNA molekülü üstel olarak birçok kez çoğaltılabilir. PCR tıbbi, moleküler biyoloji araştırma laboratuvarlarında, kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların teşhisinde, genlerin klonlanmasında, adli vakalarda yaygın olarak tercih edilen önemli bir yöntemdir (190, 191). PCR yönteminin gerçekleştirilmesi için bazı temel bileşenlere ihtiyaç vardır (191, 192):

- **Kalıp DNA:** Ana kalıp görevi görecektir DNA, çoğaltılacak bölgeyi üzerinde taşıyan genomik, plazmid DNA'dır.
- **Primerler:** DNA dizilerinin başlangıcına ve sonuna eklenebilen yaklaşık 15-50 nükleotidden oluşan kısa, yapay DNA zincirleridir.
- **Taq DNA polimeraz:** DNA polimerazlardan PCR yönteminde en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus*'tan elde edilen Taq DNA polimeraz'dır.
- **Nükleotitler:** Son reaksiyon karışımındaki her bir dNTP'nin konsantrasyonu genellikle 200 µM civarında olmalıdır ve her bir dNTP'nin (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) konsantrasyonları eşit olmalıdır.
- **Tampon çözelti:** PCR için uygun pH, iyonik şiddeti içeren karışımdır.
- **Mg²⁺ iyonu:** Enzim aktivitesine, primerin bağlanabilmesine, DNA erime ısısına etki eden kofaktördür (189, 191, 192, 193).

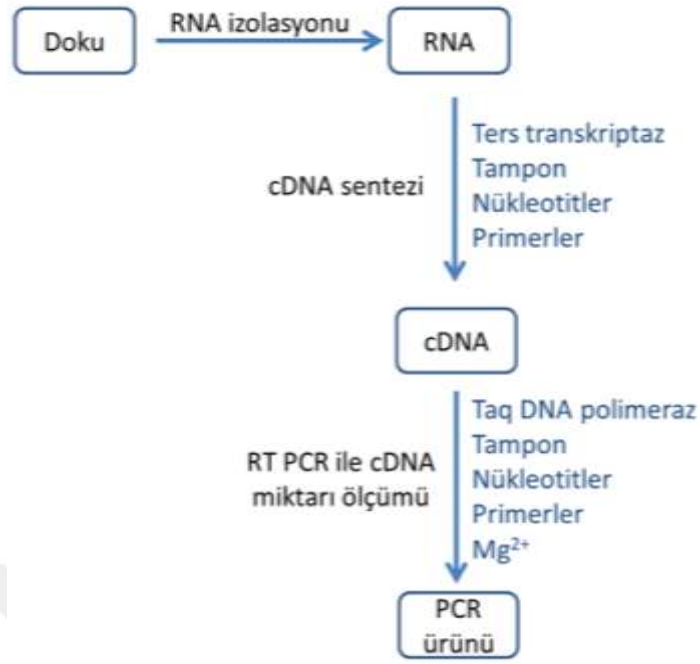
PCR süreci, yirmi ila otuz beş döngüden oluşan bir diziden oluşur. Her bir dizi ise üç adımdan oluşur (Şekil 6). İlk adımda, yaklaşık 92-95 °C sıcaklıkta, çoğaltılacak DNA denatürasyona uğrar, yani çift zincirli DNA tek zincirli hale getirilir. İkinci adımda, sıcaklık düşürülerek (37-65 °C) primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. Üçüncü adımda, DNA Taq polimeraz enzimi sıcaklık ile nükleotitleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekler ve primerlerin uzaması sağlanır. Böylece, hedef DNA'nın iki zincirli kopyası elde edilmiş olur (190, 193, 194).



Şekil 6. PCR basamakları (Garibyan ve Avashia'dan, 194)

RT PCR ile çok küçük miktardaki bir örnekteki belirli nükleik asit dizilerini kesin olarak ayırt etmeyi ve miktarını ölçmeyi sağlayan hızlı, spesifik ve çok hassas bir yöntemdir (Şekil 7). RT PCR'ın klasik PCR'dan en önemli farkı, her döngüde amplifiye PCR ürününün ölçümüdür. RT PCR yönteminde, PCR örneği bir floresan sinyali oluşturur ve bir video kamera ile DNA birikimi görselleştirilip kaydedilir (195, 196). Ayrıca bu yöntem ile mRNA seviyeleri büyük hassasiyet ve kesinlik ile değerlendirilebilir. DNA polimerazlar DNA'yı kalıp olarak kullanırken, RNA'yı aynı şekilde çoğaltma yeteneğine sahip değildirler. Bu yüzden mRNA seviyelerini belirlemek için, RNA'yı tamamlayıcı DNA (cDNA)'ya dönüştürmek gerekir. Ters transkriptaz enzimleri, retrovirüsler tarafından viral RNA'dan cDNA üretmek için kullanılır (196, 197).

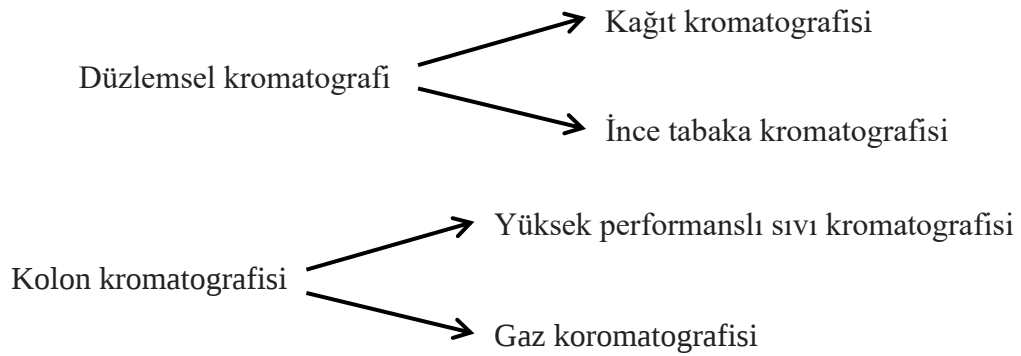
RT PCR'ın tespiti için, etidyum bromür veya SYBR Green I gibi DNA bağlayıcı boyalar ve hidroliz problemleri (5-nükleaz problemleri), hibridizasyon problemleri, peptid nükleik asit ışıklı problemler gibi özel floresan problemler kullanılabilir. Reaksiyon ortamında çift sarmallı DNA miktarı ne kadar fazla ise, boyalar veya problemler DNA'ya bağlanır ve yayılan floresan sinyali miktarı o kadar fazla olur. Böylece, reaksiyon ortamındaki DNA amplifikasyonu ölçülmüş olur (195-197).



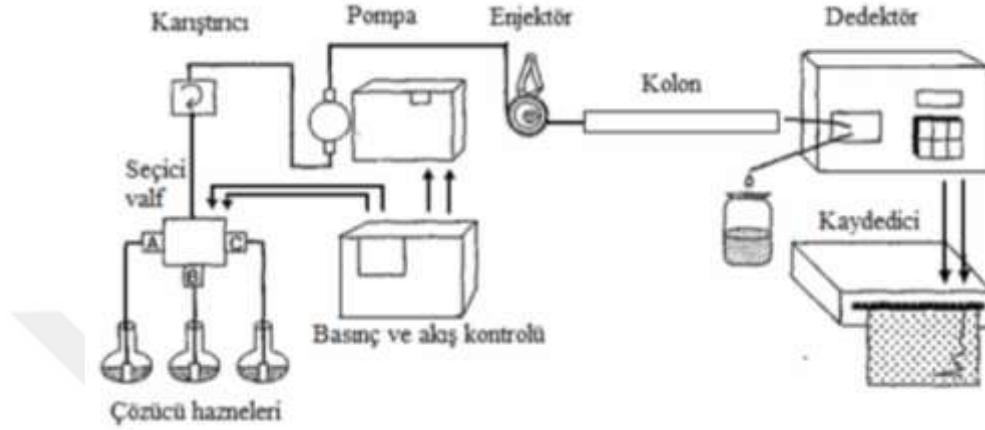
Şekil 7. RT PCR basamakları

2.3.3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Kromatografi, moleküllerin yapıları veya bileşimlerindeki farklılıklarına göre ayırımın gerçekleştiği bir yöntem olup, çeşitli maddelerin sabit bir fazda sistem içinde, hareketli bir faz yardımı ile hareket ettirilmesi esasına dayanır. Bir numunedeki moleküller, farklı afinitelere ve etkileşimlere sahip olmaları nedeniyle kolon içinde hareket ederken farklı bileşikler birbirinden ayrılabilirler (198-200). Kromatografik yöntemler uygulanma biçimine göre düzlemsel ve kolon kromatografisi olarak ikiye ayrılabilir:



YPSK, çözelti içinde çözülmüş bileşikleri ayırmak ve miktarını belirlemek için kullanılan bir tür sıvı kromatografi türüdür. Bir YPSK cihazı, esas olarak detektör, enjektör, kaydedici, kolon ve pompadan oluşur (Şekil 8).



Şekil 8. Bir YPSK cihazının gösterimi (Höl'den, 199)

Genel olarak, YPSK ayrımları, C18 ters fazlı kolonlara ve ikili bir çözücü gradiyent sistemine dayanır. Hareketli faz olarak, asetik asit, asetonitril veya metanol gibi organik çözücüler yaygın bir şekilde tercih edilir (201). Normal fazlı YPSK için çözücü genellikle apolar iken, ters fazlı YPSK'de ise çözücü su ve polar bir organik çözücü karışımıdır. Bileşenlerin ayrılmasını hareketli fazın tipi, bileşimi ve kullanılan çözücü etkiler. Mobil fazı dolgu sabit fazdan geçirmek için yüksek basınçlı pompalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, pompa basıncının tekrarlanabilirlik ve doğruluk için sabit tutulması gerekir. Kolonlar, farklı uzunluklarda, parçacık boyutlarında ve dolgu malzemelerini içerecek şekilde üretilir. Farklı ayırma türleri için farklı kolon boyutları ve farklı dolgu malzemeleri ve akış hızları kullanılabilir. YPSK ayrımları için en yaygın kullanılan dolgu malzemesi silika bazlıdır. Yüksek basınçla kolondan hareketli faz sayesinde ayrılan bileşenler, kolondan farklı sürelerde ayrılırlar ve dedektör tarafından elektronik sinyal olarak ölçülürler. Dedektörün yanıtı bir bilgisayar yardımı ile okunur ve yorumlanması için bir kromatograma dönüştürülür (183, 198).

Bitkisel kökenli gıdalarda fenolik ve flavonoit bileşikler bolca bulunur ve bu bileşikler etkili antioksidanlardır. Fenolik bileşikler antibakteriyel, antiviral, antikarsinogenik, antiinflamatuvar ve vazodilatör aktivitelere sahiptirler. Flavonoitler,

antioksidan özelliklerinden ötürü hücrelerin yaşlanmasının geciktirilmesi, koroner hastalık ve kanser gibi belirli hastalıklara karşı koruma sağlarlar. İnsan sağlığını olumlu yönde etkileyen bu bileşiklerin çeşitli örneklerde analiz edilmeleri oldukça önemlidir. Bu amaçla en yaygın kullanılan ayırma tekniklerinden biri YPSK'dir (202-205).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan bütün cihazlar bir tablo halinde verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Marka
Biyogüvenlik kabini	BİLSER
Buzdolabı	Arçelik
Evaporatör	Heidolph
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Homojenizatör	Heidolph
İnkübatör	Memmert
Kamera ataçmanı	Olympus DP71; <i>Olympus</i> , Tokyo, Japan
Karıştırıcılı su banyosu	NÜVEST402
Manyetik karıştırıcı	Heidolph
Mikroskop	Olympus BX51; <i>Olympus</i> , Tokyo, Japan
pH metre	Ohaus
Real Time PCR cihazı	Applied Biosystems® StepOnePlus™
Santrifüj cihazı	Sigma
Spektrofotometre cihazı (ELISA Cihazı)	UV-1800 Shimadzu
Thermal Cycler Cihazı	Proflex
Vorteks	İSOLAB
YPSK	Shimadzu

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tüm çalışmalarda kullanılan kimyasallar aşağıda verilen Tablo 6'da listelendiği gibidir. Bu tez çalışmasında Madecassol® (Bayer Consumer Care AG, İsviçre), ketamin (Pfizer, New York, ABD), ampisilin (Mustafa Nevzat) ve flukonazol (Phizer) ilaçları kullanılmıştır.

Tablo 6. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasallar/Marka	Kullanılan Kimyasallar/Marka
Formaldehit / Sigma-Aldrich	Etil alkol / Sigma-Aldrich
Glikol stearat /Tekkim	Hematoksilen-Eozin boyası / Sigma-Aldrich
Sıvı parafin / Sigma-Aldrich	Kateşin / Sigma-Aldrich
1,2 Propilen glikol / Tekkim	o-Fosforik asit / Sigma-Aldrich
Sığır serum albümini (BSA) / Sigma-Aldrich	Tiyobarbitürik asit (TBA) / Merck
Fosforik asit (H ₃ PO ₄) / Sigma-Aldrich	1,1,3,3-Tetraetoksi propan / Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit (HCl) / Sigma-Aldrich	p-Dimetilaminobenzaldehit / Sigma-Aldrich
Metil kırmızısı / Sigma-Aldrich	Hidroksiprolin / Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH) / Merck	Kojik asit / Sigma-Aldrich
Kloramin T / Sigma-Aldrich	Tirozinaz / Sigma-Aldrich
3,4-Dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA) / Sigma-Aldrich	Coomassie Blue G-250 boyası / Sigma-Aldrich
Kolajenaz / Sigma-Aldrich	DMSO / Sigma-Aldrich
Sıvı Besiyerleri (MHB) / Merck	Mueller Hinton agar (MHA) / Merck
Potato Dextrose agar (PDA) / Merck	Maya ekstreli sıvı besiyeri (YEG) / Merck
L-glutamin / Thermo Fisher	Yeast Nitrogen Base sıvı / Merck
Benzoik asit / Sigma-Aldrich	p-hidroksi benzoik asit / Sigma-Aldrich
Kersetin / Sigma-Aldrich	Şirinaldehit / Sigma-Aldrich
p-Kumarik asit / Sigma-Aldrich	Vanilik asit / Sigma-Aldrich
Sinapik asit / Sigma-Aldrich	Asetik asit / Merck
Metanol / Sigma-Aldrich	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) / Merck
Fetal bovine serum (FBS) / Sigma-Aldrich	İndometasin / Sigma-Aldrich
Streptomisin / Wisent	Penisilin / Wisent
CAT kiti / YLBiont	IL-1 kiti / YLBiont
SOD kiti / CAYMAN	TNF- α kiti / YLBiont
N-[3- (2-Furil) akrilolil] -Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) / Sigma-Aldrich	RT qPCR kiti / GeneAll RealAmp™ SYBR qPCR Master mix
mRNA izolasyonu kiti / GeneAll RiboEx ve Hybrid-R	cDNA kiti / GeneAll HyperScript™ First strand synthesis kit
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄) / Sigma-Aldrich	Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄) / Sigma-Aldrich

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin Temini, Kurutulması ve Ekstraksiyonu

L. verticillaris Artvin'in Kafkasör Yaylası'ndan (1300 m) ve *L. vulgaris* L. Erzurum, Aşkale, Kop Dağı'ndan (2000 m) toplanmıştır. *L. verticillaris* Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr.

Ufuk ÖZGEN tarafından; *L.vulgaris* L. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ufuk ÖZGEN ve Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Handan Gökben SEVİNDİK tarafından teşhis edilmiştir. Herbaryum örnekleri (*L. verticillaris*: AEF 26311 ve *L. vulgaris* L.: AEF 28876) Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan bitkilerin topraküstü kısımları gölgede ve hava akımı olan bir alanda kurutulmuştur. Bu kısımlar değirmen yardımı ile toz edildikten sonra, 100 g alınarak 500 mL ultra saf su ile ekstrakte edilmiştir ve 8 saat süre ile çalkalayıcı yardımı ile ekstraktler hazırlanmıştır. Ardından, ekstraktler süzgeç kağıdından süzölmüştür ve süzüntüler 40 °C'de, evaporatörde yoğunlaştırılmıştır. Bu ekstraksiyon işlemi iki bitki için üç kez tekrarlanarak elde edilen ekstraktler birleştirilmiştir.

3.2.2. Hayvan Deneyi Protokolü

3.2.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Bu tez kapsamında, *in vivo* yara iyi edici aktivitenin belirlenebilmesi için deney hayvanı olarak sıçanlar tercih edilmiştir. KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinde görevli veteriner kontrolü ile 200-250 gram, yetişkin 48 adet dişi Sprague Dawley sıçan seçilmiştir. Bu sıçanlar, sabit oda sıcaklığında (22 ± 2 °C) ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda, standart yem ve içme suyu ile bireysel kafeslerde beslenmiştir (Resim 5). İçme sularına yara yapılmasını takiben ağrı kesici eklenmiştir. Ayrıca, bireysel kafeslere ve deney şartlarına adaptasyon için sıçanlar deneye başlanmadan üç gün önce temin edilmiştir.

Sıçanlar kontrol, pozitif kontrol (Madecassol®), % 1'lik *L. verticillaris* su ekstresi (LVESE-1), % 5'lik *L. verticillaris* su ekstresi (LVESE-2), % 1'lik *L. vulgaris* su ekstresi (LVUSE-1) ve % 5'lik *L. vulgaris* su ekstresi (LVUSE-2) şeklinde altı gruba ayrılmıştır (n=8) (Tablo 7). Deneyin birinci gününde tüm gruplara dairesel iki tane yara oluşturulmuştur. Kontrol grubunun kendi kendine iyileşmesini gözlemek için birinci gün yara yapıldıktan sonra hiçbir uygulama yapılmamıştır. Yara yapılmasını takiben deney sonlanana kadar pozitif gruba her gün günde bir kez 0.5 g Madecassol® pomad, ekstre gruplarına ise her gün günde bir kez 0.5 g ekstreyi içeren merhem uygulaması yapılmıştır. Deney 14. günde sonlandırılarak deri dokusu ve kan örnekleri alınmıştır. Bu çalışma KTÜ

Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul Başkanlığı 53488718-662 sayılı kararıyla onaylanmıştır (Ek-1).



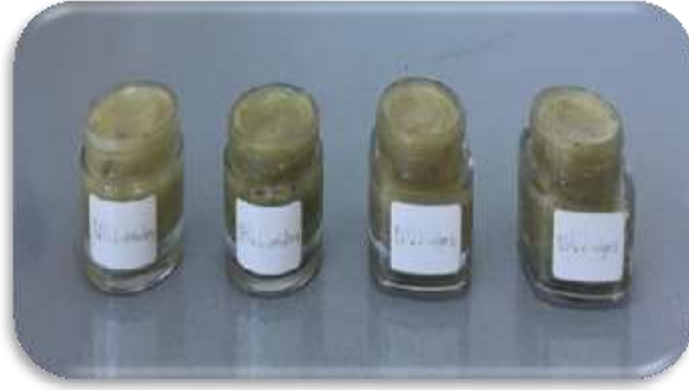
Resim 5. Sıçanların barındırıldığı kafesler

Tablo 7. *İn vivo* dairesel eksizyon yara modeli sıçan grupları

Gruplar		Hayvan Sayısı (Adet)
K:	Kontrol	8
P:	Pozitif Kontrol (Madecassol®)	8
LVESE-1:	% 1'lik <i>L. verticillaris</i> Su Ekstresi	8
LVESE-2:	% 5'lik <i>L. verticillaris</i> Su Ekstresi	8
LVUSE-1:	% 1'lik <i>L. vulgaris</i> Su Ekstresi	8
LVUSE-2:	% 5'lik <i>L. vulgaris</i> Su Ekstresi	8

3.2.2.2. Test Numunelerinin Hazırlanması

Bitkilerin su ekstraktlarının yara iyileştirme potansiyellerinin doza bağlı etkisinin incelenmesi için %1 ve %5 oranlarında merhemler hazırlanmıştır (Resim 6). Doz ayarlaması Süntar'ın yapmış olduğu çalışma örnek alınarak belirlenmiştir (89). Merhem hazırlanmasında glikol stearat:sıvı parafin:1,2 propilen glikol ve 3:1:6 oranlarında olacak şekilde kullanılmıştır. Son olarak, bu karışıma %1 ve %5 oranlarında bitki ekstraktları eklenerek doz ayarlaması yapılmıştır (89).



Resim 6. Bitki ekstrelerinden hazırlanan merhemler

Referans madde olarak, yara iyi edici özelliği bilinen Madecassol® pomat kullanılmıştır (Resim 7). Madecassol® merhemin pozitif kontrol amacı ile seçilmesinin bir diğer nedeni *Centella asiatica* bitki ekstresini içermesidir. Bu amaçla pozitif kontrol grubuna haricen %1'lik Madecassol® merhem uygulaması yapılmıştır.



Resim 7. Referans madde, Madecassol® merhem

3.3. *In vivo* Aktivite Deneyleri

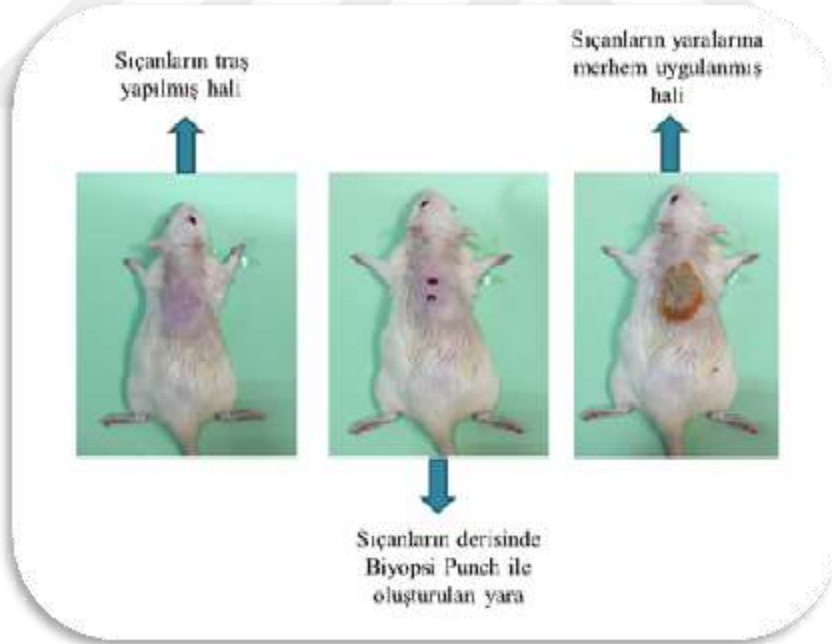
3.3.1. Dairesel Eksizyon Yara Modeli Deneyi

Dairesel eksizyon yara modeli deneyi Sadaf ve arkadaşlarının yönteminde bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (206). İlk olarak, 90 mg/kg dozunda ketamin olacak şekilde sıçanlara anestezi uygulanmıştır ve sıçanların sırt bölgesi traş edilmiştir. Tüm yara modeli deney gruplarının sırt dorsal bölgesinin vertebral kolonunda birbirinden en az 1 cm uzaklıkta, 2 adet 5 mm çapında biyopsi punch yardımı ile dairesel alan şeklinde yara oluşturulmuştur ve yaralar açık bırakılmıştır (Resim 8). 14 gün boyunca kontrol grubuna

hiçbir uygulama yapılmazken, Madecassol® ve ekstre içeren merhem gruplarına her gün günde bir kez olacak şekilde merhem uygulaması yapılmıştır. Yara alanlarındaki küçülmenin gözlenebilmesi için ilk gün ve gün aşırı dijital fotoğraf makinesi ile sıçanların fotoğrafları çekilmiştir. 14. gün sonunda, biyolojik aktivite deneylerinde kullanılmak üzere sıçanların abdominal aortundan kan alınmıştır. Daha sonra kansızlaştırma yoluyla ötanazi sağlanmıştır ve oluşturulan 2 yaradan deri doku örnekleri alınmıştır. Bu deri dokusundan biri biyolojik aktivite çalışmaları ve RT-PCR çalışmaları için; diğer deri dokusu ise histopatolojik değerlendirmeler için alınıp saklanmıştır.

Bu çalışmada yara alanındaki küçülme AutoCAD programı kullanılarak hesaplanmıştır ve yüzde yara kontraksiyonu da aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Yara Kontraksiyonu} = \frac{(\text{Birinci gündeki yara alanı} - \text{n. gündeki yara alanı})}{(\text{Birinci gündeki yara alanı})} \times 100$$



Resim 8. Sıçanların traş yapılmış hali, derilerinde biyopsi punch ile oluşturulmuş yara ve yaralarına merhemin uygulanmış hali

3.2.3. Histopatolojik İncelemeler

Sakrifikasyon sonrası elde edilen deri dokularında histopatolojik incelemeler için ilk olarak tüm dokular 48 saat boyunca formaldehit (%10) ile muamele edilmiştir. Ardından, 24 saat boyunca yıkama işlemine tabi tutulan dokular %80, %96, %96 ve %100'lük etil alkolden geçirilmiştir. Dokular ksilende şeffaflaştırıldıktan sonra parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklar 5 µm boyutlarda olacak şekilde mikrotom bıçaklar ile kesilmiştir ve lam üzerine alınmıştır. Lam üzerinde Hematoksilen-Eozin boyası ile boyanmıştır (207) ve bu preparatlar Olympus BX51 mikroskop kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca ışık mikroskobuna adapte kamera ataçmanı ile preparatlar fotoğraflanmış ve bu görüntüler dijital ortama aktarılmıştır. Değerlendirme yapılırken kullanılan skorlama tekniği, Kim ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı teknikten uyarlanarak oluşturulmuştur ve Tablo 8'de gösterilen skorlamaya göre gerçekleştirilmiştir (208).

Tablo 8. Yara iyileşmesi değerlendirme skorlaması

Skor	Epitelizasyon	Anjiogenez	İnflamasyon	Hemoraji
0	Yok	Yok	Yok	Yok
1	Kısmi gelişmiş	Az	Az	Küçük bir alanda
2	Tam fakat ince/immatür	Orta	Orta	Geniş bir alanda
3	Tam/matür	Çok	Çok	Yaygın/yara boyunca

3.4. Biyolojik Aktivite Deneyleri

Doku örnekleri için uygulanan ön işlem: Doku örnekleri 1 gram olarak tartılıp cam levha üzerinde jilet yardımı ile kesildikten sonra tampon çözelti ile yıkanarak temizlenmiştir ve süzgeç kağıdı ile kurutulmuştur. Önceden numaralandırılmış tüplerin içine alınan parçalanmış dokuların üzerine 9 katı kadar 0.5 mM, pH'ı 7.4 olan fosfat tampon ilave edilmiştir. Tüpler sırasıyla homojenizatörde 16000 devir/dakika hızda 30 sn boyunca karıştırılmıştır. Her doku örneği için homojenize işlemi bittikten sonra tampon ile yıkama işlemi yapılmıştır. Elde edilen homojenatlar soğutmalı santrifüj yardımı ile yaklaşık 30 dakika boyunca 1000 g'de santrifüje tabi tutulduktan sonra, ependorf tüplere süpernatantlar aktarılmış ve bu örnekler -80°C'de saklanmıştır.

Serum için uygulanan ön işlem: Antikoagülan içermeyen tüpe kan örnekleri alınmıştır. Oda sıcaklığında pıhtılaşma olduktan sonra, kan serumlarını elde etmek için yaklaşık 10 dakika kadar 1000 g'de santrifüje tabi tutulmuştur ve -80°C'de saklanmıştır.

Protein Miktarı Tayini: Bütün deri dokularının ve serum örneklerinin protein miktarını belirlemek üzere Bradford yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem, proteinlerin Coomassie Blue G-250 boyasını bağlayarak 595 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır (209).

Bradford ayracının hazırlanması için 20 mg Coomassie Blue G- 250 tartılmıştır ve 10 mL %96'lık etanol ile çözülmüştür. Bu çözeltinin üzerine, 20 mL %85 o-fosforik asit eklenmiştir ve son hacim 200 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti Whatman (No:1) süzgeç kâğıdından süzölmüştür ve koyu renkli cam şişede muhafaza edilmiştir.

Tüm örnekler için ependorf tüpler hazırlandıktan sonra ependorf tüplerin hepsine 2 mL Bradford ayracı ve üzerine 20 µL deri dokularından veya serum örneklerinden konulmuştur. Kör için ise 2 mL Bradford ayırıcı üzerine 20 µL saf su eklenmiştir. Tüm ependorf tüpler karıştırılmıştır ve oluşan mavi renkli çözeltinin absorbansı 595 nm'de okunmuştur. Standart olarak kullanılan sığır serum albümini (BSA) için aynı işlemler uygulanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 mg/mL) hazırlanan BSA ile standart çalışma grafiğı oluşturulmuştur. Oluşturulan grafiğın denkleminde faydalanarak deri dokularının ve serum örneklerinin protein miktarı (mg/mL) hesaplanmıştır.

3.4.1. Antioksidan Aktivite

Hazır hale getirilen doku ve serum örneklerinde, antioksidan aktivitenin belirlenebilmesi için CAT, MDA ve SOD düzeyleri çalışılmıştır. Bu amaçla, katalog numarası YLA0123RA olan CAT (YLBiont), katalog numarası 706002 SOD (Cayman) ticari kitleri kullanılmıştır. Deneyler kitlerin kullanım kılavuzuna uygun olarak çalışılmıştır.

Deri dokusu ve serum örneklerinde MDA düzeyleri belirlenmesi için Ohkawa ve arkadaşlarının yönteminde değışiklikler yapılmıştır (210). Homojenizasyon işlemi sonrası elde edilen süpernatantlardan 500 µL alınarak başka tüplere konulmuştur. Bu tüplerin üzerine 3 mL, %1'lik H₃PO₄ ve %0.8'lik, 1 mL tiyobarbitürük asit (TBA) eklendikten sonra tüm tüpler 101 °C'de 45 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Yaklaşık 10 dakika

kadar, 4000 rpm’de santrifüj işlemi sonrası 300 µL olacak şekilde tüm örnekler elisa pleytlerine pipetlenmiştir ve 532 nm’de absorbanslar okunmuştur. Aynı işlemler, standart olarak kullanılan 1,1,3,3-tetraetoksi propan’a uygulanmıştır. 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 ve 10 nmol/L konsantrasyonlarında hazırlanan 1,1,3,3-tetraetoksi propan ile standart çalışma grafiği elde edilmiş ve bu grafiğin denkleminde faydalananak deri dokularının ve serum örneklerinin MDA düzeyleri (nmol/L) hesaplandıktan sonra her numunenin kendi protein miktarına bölünmesi ile sonuçlar “nmol/mg protein” olarak verilmiştir.

3.4.2. Antiinflamatuvar Aktivite

Antiinflamatuvar aktivitenin belirlenebilmesi için ön işleme tabi tutulmuş doku ve serum örneklerinde, TNF- α ve IL-1 çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda, katalog numarası YLA0118RA olan TNF- α (YLBiont) ve katalog numarası YLA0153RA olan IL-1 (YLBiont) ticari kitleri kullanılmıştır. Sıçanlara uygun olan bu kitlerin kullanım kılavuzuna göre deneyler yapılmıştır.

3.4.3. Kolajen Bağ Dokunun Saptanması Deneyi

3.4.3.1. Hidroksiprolin Deneyi

Hidroksiprolinin kolajenin yapısında bulunan proteinlerden bir tanesi olması sebebiyle kolajen bağ dokusunun saptanması için hidroksiprolin deneyi yapılmıştır. Hidroksiprolinin oksidasyonu ile pirol bileşiği oluşur ve oluşan bu bileşik p-dimetilaminobenzaldehit ile renkli bir kompleks oluşturur.

Woessner yönteminde bazı değişiklikler uygulanarak deney aşamaları verildiği gibi çalışılmıştır (211). Deri doku örnekleri tartıldıktan sonra ağzı kapaklı pyrex tüplere konulmuştur. Pyrex tüplere 5 mL, 6 N hidroklorik asit (HCl) ilave edilip 130°C’de 3 saat boyunca bekletilmiştir. Tüpler soğuduktan sonra 3-4 damla, %0.02’lik metil kırmızısı tüm tüplere eklenmiştir. Tüplerde bulunan çözeltilerin rengi sarı olana kadar 2.5 N sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi konularak test çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan test çözeltilerinden 2 mL başka tüplere alınarak 1 mL, 0.05 M kloramin T çözeltisi ilave edilmiş ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 1 mL, %10’luk p-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi tüm tüplere eklenerek vortekslenmiş ve tüm tüpler 60°C su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir. Son olarak, tüm tüpler soğutulduktan sonra, 557 nm’de absorbanslar okunmuştur. Hidroksiprolin (standart) için tüm işlemler aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Standart için uygulama yapılmadan önce, 5 mg

hidroksiprolin, 50 mL, 0.001 N HCl'de çözülerek stok çözelti hazırlanmış ve bu stok çözeltilerden 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 5.0 µg/mL konsantrasyonlarında test çözeltileri hazırlanmıştır.

3.4.4. Antimikrobiyal Aktivite

Bitkilerin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için ilk olarak agar kuyucuk difüzyon metodu uygulanmıştır. Aktivitenin gözlemlendiği örneklerde antimikrobiyal aktivitenin kantitatif olarak değerlendirilebilmesi için minimal inhibisyon deneyi yapılmıştır. Bu deneylerde kullanılan test mikroorganizmaları Tablo 9'da belirtildiği gibidir.

Tablo 9. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan test mikroorganizmaları

Test Mikroorganizmaları	
Gram pozitif kok	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
Gram pozitif kok	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Gram pozitif sporlu basil	<i>Bacillus cereus</i> 702 Roma
Gram negatif enterik basil	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Gram negatif non fermentatif bakteri	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911
Maya mantarı	<i>Candida albicans</i> ATCC 60193

3.4.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Deneyi

Bitkilerin su ekstraktlarında agar kuyucuk difüzyon deneyi için ilk olarak agar ve besiyerleri hazırlanmıştır. Mueller Hinton agar (MHA) ve sıvı besiyerleri bakteriler için tercih edilirken maya ekstraktı sıvı besiyeri (YEG) ve Potato Dextrose agar (PDA) mantarlar için kullanılmıştır. Bu deneyde kullanılacak bakteriler bir gece boyunca kültüre edilmiştir. Bu kültürlerden yaklaşık 10^6 kob/mL olacak şekilde sıvı besiyerine uygun seyreltmeler yapılmıştır. Bu esnada katı besiyerleri uygun şekilde hazırlanmıştır ve yaygın ekimi yapılmıştır. Daha sonra 2 cm aralık olacak şekilde 5 mm çapında kuyucuklar steril cam boru yardımı ile besiyeri üzerinde açılmıştır. Açılan bu kuyucuklara bitkilerin su ekstraktlarının stok çözeltilerinden 50 µL ilave edilmiştir. Bakteri içeren petriler 24 saat ve maya içeren petriler 48 saat 36 °C'de inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda bir cetvel ile inhibisyon zonları ölçülmüştür. Bu deneyde ampisilin (10 µg) bakteriler için, flukonazol (5 µg) maya mantarı için standart ilaç olarak kullanılmıştır (212).

3.4.4.2. Minimal İnhibisyon Deneyi

Minimal inhibisyon deneyi, “National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)” standartlarının belirlediği kritere göre yapılmıştır. MHA ve sıvı besiyerleri bakterilerde (pH.7.3), Yeast nitrogen base sıvı (YNBB, pH 7.0) ve PDA besiyerleri ise mantarlarda uygun besiyeri olarak hazırlanmıştır.

Bu deneyde, mikroorganizmaların kültüre olması için 3-5 gün boyunca 35°C’de aerobik koşullarda inkübasyon uygulanmıştır (90). Minimal inhibisyon deneyi ELISA pleytlerinde yapılmıştır. Bitkilerin su ekstraktlarının 0.1 mL’si sıvı besiyeri ile seri sulandırmaya tabi tutulmuştur. İnoküle edilecek mikroorganizmalar bir gece boyunca kültüre edilmiştir. McFarland 0.5 bulanıklığında (1×10^8 kob/mL) sulandırım hazırlanmış ve 1:10 oranında sulandırılmıştır. Son test konsantrasyonu 5×10^4 kob/kuyucuk olacak şekilde tüm kuyucuklara 0.005 mL mikroorganizma eklenmiş ve pleytler 16-72 saat süre boyunca aerobik koşullarda 35°C’de etüvde inkübe edilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir (213). Bu deneyde ampisilin (10 μg) bakteriler için, flukonazol (5 μg) maya mantarı için standart ilaç olarak tercih edilmiştir (212).

3.4.5. Enzim Aktiviteleri

3.4.5.1. Kolajenaz Enzim İnhibisyonu

Bitki ekstelerinin kolajenaz enzimi üzerine inhibitör etkisi modifiye edilmiş van Wart ve Steinbrink yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (214). Test çözeltisi olarak bitkilerin toz edilmiş topraküstü kısımları ve standart çözelti olarak kullanılan kateşin farklı konsantrasyonlarda (6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$) dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanmıştır. Her örnek için 5 kuyucuk (3’ü test çözeltisi (T), 1’i kontrol (K), 1’i test çözeltisi körü (TK)) olacak şekilde plate hazırlanmıştır ve her bir kuyucuğa 50 mM, 25 μL (pH 7.5) Tris-HCl tamponu pipetlenmiştir. T kuyucuklarına, TK kuyucuğuna 25 μL test örneği, K kuyucuğuna 25 μL DMSO konulmuştur. T kuyucuklarına ve K kuyucuğuna 25 μL kolajenaz çözeltisi (0.8 U/mL), TK kuyucuğuna ise 50 mM, 25 μL (pH 7.5) Tris-HCl tamponu eklenmiştir ve 37°C, 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüm kuyucuklara 50 μL N-[3- (2-Furil) akrilolil] -Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) çözeltisi (2 mM) pipetlenmiş ve 15 dakika daha inkübe edilmiştir. UV spektrofotometresinde 340 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Yapılan çalışmada

hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki örnek çözeltilerin kolajenaz enzimi üzerine inhibitör etkisi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = K'\text{'ün absorbansı} - \frac{(T'\text{'nin absorbansı} - TK'\text{'ün absorbansı})}{(K'\text{'nün absorbansı})} \times 100$$

3.4.5.2. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu

Örneklerin tirozinaz enzim inhibisyonunu belirlemek için L-DOPA substratı/dopakrom metoduna tercih edilmiştir. Test çözeltisi olarak bitkilerin toz edilmiş topraküstü kısımları 25, 50, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 0.2 M, pH'ı 6.8 olan fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. Aynı şekilde standart olarak kullanılan kojik asit (25, 50, 100 ve 500 µg/mL) hazırlanmıştır. Her örnek için 3 numune (N) kuyucuğu, 3 kör (K) kuyucuğu, 3 negatif kontrol (NK) kuyucuğu ve 3 negatif kontrol körü (NKB) kuyucuğu belirlenmiştir. N ve K kuyucuklarına 40 µL test çözeltisi, NK ve NKB kuyucuklarına 40 µL tampon pipetlenmiştir. N ve NK kuyucuklarına 40 µL tirozinaz çözeltisi (46 U/mL), K ve NKB kuyucuklarına 40 µL tampon pipetlemesi yapılmıştır. Daha sonra tüm kuyucuklara 80 µL tampon eklenmiştir. 25°C'de 10 dakika bekletildikten sonra tüm kuyucuklara 40 µL L-DOPA (2.5 mM) pipetlenmiştir. 25°C'de 10 dakikalık ikinci bir inkübasyonun ardından 490 nm'de absorbanlar okunmuştur ve % inhibisyon aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (215).

$$\% \text{ İnhibisyonu} = \frac{(NK'\text{'ün absorbansı} - NKB'\text{'nün absorbansı})}{(N'\text{'nin absorbansı} - NK'\text{'ün absorbansı})} \times 100$$

3.5. Real Time PCR

RT PCR çalışmaları için, sıçanlardan alınan deri dokuları RNA later solüsyonu içerisinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir. İlk olarak, hücrelerden RNA izolasyonu GeneAll RiboEx ve Hybrid-R kiti kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen RNA'dan cDNA GeneAll HyperScript™ First strand synthesis kiti ile elde edilmiştir. Bu cDNA örnekleri ile TNF-α, IL-1β, IL-10 ve MMP-9'un genlerinin ekspresyon düzeyleri RT PCR yöntemi ve GeneAll RealAmp™ SYBR qPCR Master mix kiti ile belirlenmiştir.

3.5.1. RT PCR Protokolü

İlk olarak, hücrelerden dokuların RNA'sı izole edildikten sonra bu örneklerden ilk dizi cDNA elde edilmiştir. cDNA elde etmek için revers transkripsiyon yöntemine uygun olacak şekilde HyperScript First-Strand Synthesis kit uygulaması yapılmıştır. RT PCR analizi için Applied Biosystems® StepOnePlus™ RT-PCR cihazı kullanılmıştır. Ayrıca, bir internal house keeping geni (β -aktin) ekspresyonunun değişmediğini göstermek ve sürekli olan bu kontrol genlerine göre kıyaslama yapabilmek için kullanılmıştır. Analiz sonuçları, PCR sistemi içerisindeki software ile (comparative CT (ÄÄCT)) metoduna göre yapılmıştır. Genlerin primer dizileri Tablo 10 gibidir.

Tablo 10. Real Time PCR genlerin primer dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi
ACTB-F:	GCAGGAGTACGATGAGTCCG
ACTB-R:	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC
IL-1 β -F:	GACTTCACCATGGAACCCGT
IL-1 β -R:	GGAGACTGCCCATTCTCGAC
IL10-F:	TTGAACCACCCGGCATCTAC
IL10-R:	CCAAGGAGTTGCTCCCGTTA
MMP9-F:	GATCCCCAGAGCGTTACTCG
MMP9-R:	GTTGTGGAACTCACACGCC
TNF- α - F:	ACTGAACTTCGGGGTGATCG
TNF- α -R:	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC

3.6. YPSK ile Bitki Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Bitkilerin kuru ekstraterinden 10 mg/mL kadar alınıp YPSK saflıkta metanol ile yeniden çözülmüştür. Bu çözelti membran filtreden (0.45 μ m) geçirilmiştir. Bu çalışmada benzoik asit, kersetin, şiringaldehit, *p*-hidroksi benzoik asit, *p*-kumarik asit, sinapik asit ve vanilik asit standart fenolik bileşik olarak kullanılmıştır. 100 mg/L standart bileşik YPSK saflığındaki metanol ile çözülmüştür ve membran filtreden (0.45 μ m) geçirilmiştir. Çalışmada kullanılacak tüm standart bileşikleri karışım halinde içeren stok çözelti (100 mg/L) hazırlanmıştır. Tablo 11'de gösterildiği gibi YPSK şartlarına uygun olarak yöntem uygulanmıştır. Bu çalışmada, C18 kolonu, 1.5 mL/dk akış hızı ile ikili çözücü sistemi

kullanılarak gradient elüsyon uygulanmıştır. Yöntem 16 dakika sürmüştür ve süre sonunda kromatogramlar elde edilmiştir (216).

Tablo 11. Bitkilerin fenolik içeriğinin belirlenmesi için uygulanan YPSK şartları

YPSK Şartları	
Kolon	C18 kolonu (RP-C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm)
Akış hızı	1.5 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Dalga boyu	232, 246, 260, 270, 280, 290, 308, 328 nm
Dedektör	Diode Array Detector (DAD)
Yöntem	Gradient elüsyon
Hareketli faz	A: %100 metanol B: %2 sulu asetik asit çözeltisi (pH 2.8)

3.7. Mekanizma Aydınlatma Çalışmaları

3.7.1. Hem Oksijenaz Aktivite

Hem oksijenaz aktivitenin *in vitro* olarak belirlenmesi için fibroblast hücre hattı (L9N29) tercih edilmiştir. Fetal bovine serum (FBS) (%10), penisilin (100 U/mL), L-glutamin (2 mM) ve streptomisin (100 µg/mL) içeren besiyeri hazırlanmıştır. Bu çalışmada, fibroblast hücreleri bu besiyerinde 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edilerek hücreler %70-85 doygunluğa ulaşana kadar beklenmiştir. %85 doygunluğu ulaşan bu hücreler ELISA pleytine alınmıştır.

Deney, birinci grup kontrol grubu, ikinci grup H₂O₂ grubu, üçüncü grup *L. verticillaris* su ekstresi grubu ve dördüncü grup *L. vulgaris* su ekstresi grubu olarak planlanmıştır. Bu amaçla, kontrol grubuna hiçbir işlem uygulanmazken ikinci grup olan H₂O₂ grubu 4 saat boyunca 150 µM H₂O₂'e maruz bırakılmıştır. Üçüncü ve dördüncü gruplar ise, ilk olarak 6 saat boyunca 150 µM H₂O₂'e maruz bırakılmıştır ve ardından 4 saat boyunca bitkilerin 12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki su ekstraktları ile muamele edilmiştir. Bu ön işlemlerden sonra, Human Heme Oxygenase 1 ELISA ticari kitinin kullanım kılavuzuna göre çalışma tamamlanmıştır.

3.7.2. COX-2 İnhibitör Etki

COX-2 İnhibisyonunun *in vitro* olarak belirlenmesi için fibroblast hücre hattı (L9N29) tercih edilmiştir. Fetal bovine serum (FBS) (%10), penisilin (100 U/mL), L-glutamin (2 mM) ve streptomisin (100 µg/mL) içeren besiyeri hazırlanmıştır. Bu çalışmada, fibroblast hücreleri bu besiyerinde 37°C ve %5 karbon dioksit (CO₂)'li ortamda inkübe edilerek hücreler %70-85 doygunluğa ulaşana kadar beklenmiştir. %85 doygunluğu ulaşan bu hücreler ELISA pleytine alındı ve 4 saat süre ile bitkilerin su ekstraktlarına (12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL) maruz bırakılmıştır. Bu ön işlemlerden sonra, Human Cyclooxygenase ELISA ticari kitinin kullanım kılavuzuna göre çalışma tamamlanmıştır.

3.7.3. Nitrik Oksit İçeriği

Nitrik oksit içeriğinin *in vitro* olarak belirlenmesi için RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin hücre kültür flasklarında %85 doygunluğa ulaşması beklenmiştir. Doygunluğu ulaşan bu hücreler ELISA pleytlerine alınmış ve 4 saat süre ile bitkilerin su ekstraktlarına (12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL) maruz bırakılmıştır. Bu ön işlemlerden sonra, Nitrit Oksit Assay ticari kitinin kullanım kılavuzuna göre çalışma tamamlanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan indometasin aynı işlemlere tabi tutulmuştur.

Ayrıca bu çalışmada toplam protein tayini ile protein içerik de belirlenmiştir. Bu amaçla, Total Protein Assay ticari kiti kullanılmış ve kullanım kılavuzuna göre deney tamamlanmıştır.

3.8. İstatistiksel Analiz

Tüm verilerin istatistiksel analizi Statistics Program for Social and Science (SPSS) programı ile değerlendirilmiştir. Biyokimyasal aktivite çalışmalarında sonuçlar, ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Ayrıca, Mann Whitney U testi ikili grupları karşılaştırırken, Kruskal-Wallis testi çoklu grupları karşılaştırırken kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4. 1. *In vivo* Çalışmalar

4.1.1. Dairesel Eksizyon Yara Modeli Deney Bulguları

Kontrol, pozitif kontrol (Madecassol®), % 1 oranında *L. verticillaris*, % 5 oranında *L. verticillaris*, % 1 oranında *L. vulgaris* ve % 5 oranında *L. vulgaris* içeren su ekstraktları şeklinde 6 gruba ayrılan sıçanlara daireysel eksizyon yara modeli uygulaması yapılmıştır. Gün aşırı yaralar gözlenmiştir ve yara alanı ölçümleri yapılarak yara alanının yüzde azalması hesaplanmıştır. Yara alanı ölçüm sonuçları ve yüzdeleri Tablo 12 ve Tablo 13'te verilmiştir. 1., 4., 7. ve 14. günlerdeki yara görüntüleri tablo içinde verilmiştir (Tablo 14).

Tablo 12. Dairesel eksizyon yara modelinde yara alanı ölçüm sonuçları (mm)

Gruplar	1.Gün	4. Gün	7.Gün	14. Gün
K	5	4.346 ± 0.047 ^a	3.755 ± 0.060 ^a	0.478 ± 0.047
PK	5	4.024 ± 0.049 ^{a,b}	3.144 ± 0.073 ^{a,b}	0.334 ± 0.030 ^b
LVESE-1	5	3.835 ± 0.122 ^{a,b}	2.281 ± 0.212 ^{a,b}	0
LVESE-2	5	3.578 ± 0.094 ^{a,b}	0.526 ± 0.042 ^{a,b}	0
LVUSE-1	5	4.414 ± 0.119 ^a	2.485 ± 0.047 ^{a,b}	0
LVUSE-2	5	4.155 ± 0.114 ^{a,b}	0.739 ± 0.036 ^{a,b}	0

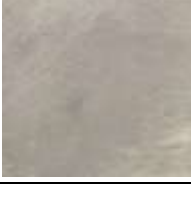
^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

Tablo 13. Dairesel eksizyon yara modelinde yaranın kapanma yüzdesi sonuçları (%)

Gruplar	1.Gün	4. Gün	7.Gün	14. Gün
K	% 0	% 13.075 ± 0.948 ^a	% 24.900 ± 1.200 ^a	% 90.450 ± 0.931
PK	% 0	% 19.525 ± 0.990 ^{a,b}	% 37.125 ± 1.459 ^{a,b}	% 93.325 ± 0.591 ^b
LVESE-1	% 0	% 23.300 ± 2.437 ^{a,b}	% 54.375 ± 4.230 ^{a,b}	% 100
LVESE-2	% 0	% 28.450 ± 1.889 ^{a,b}	% 89.475 ± 0.848 ^{a,b}	% 100
LVUSE-1	% 0	% 11.725 ± 2.383 ^a	% 50.300 ± 0.938 ^{a,b}	% 100
LVUSE-2	% 0	% 16.900 ± 2.278 ^{a,b}	% 85.225 ± 0.717 ^{a,b}	% 100

^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

Tablo 14. 1., 4., 7. ve 14. günlerde iyileşmiş eksizyon yaraları görüntüleri

Gruplar	1. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
K				
PK				
LVESE-1				
LVESE-2				
LVUSE-1				
LVUSE-2				

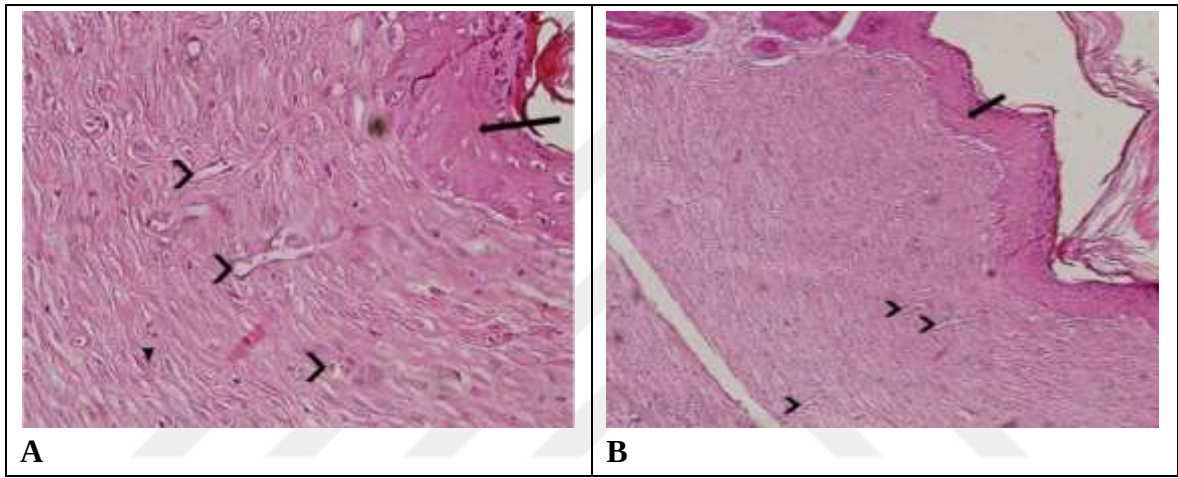
4.1.2. Yara Dokularının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Sıçanlarda oluşturulan yara dokularından uygun örnekler alınarak histopatolojik olarak incelenmiştir. Sonuçların değerlendirmesi yapılarak yara iyileşme skorları Tablo 15 ve resimlerle verilmiştir.

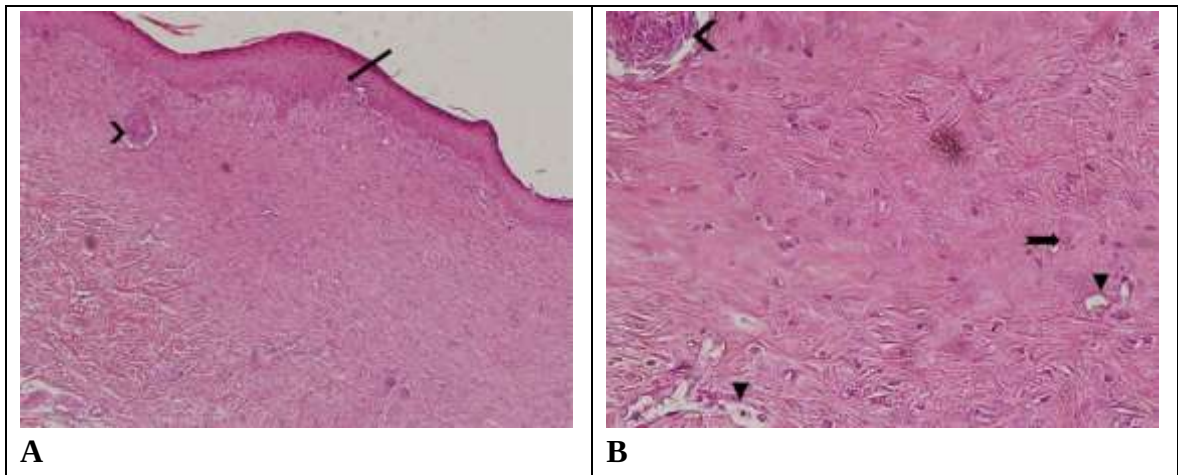
Tablo 15. Yara dokularının yara iyileşme skorları

Gruplar	Epitelizasyon	Anjiyogenez	İnflamasyon	Hemoraji
K	3	3	2	0
PK	3	1	0	0
LVESE-1	3	1	1	0
LVESE-2	3	2	0	0
LVUSE-1	3	1	0	0
LVUSE-2	3	2	0	0

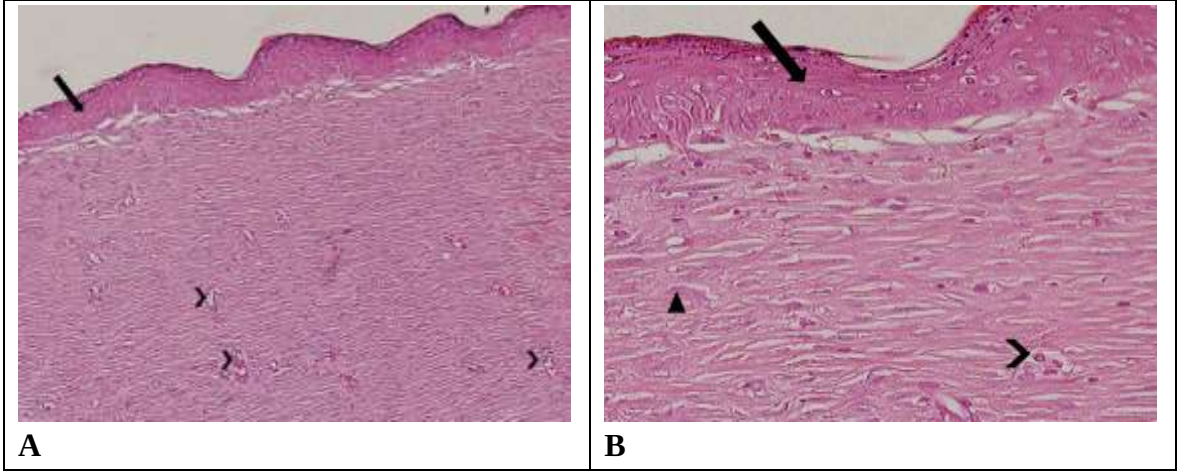
Skorlar: 0 - yok, 1 - hafif, 2- orta ve 3- şiddetli



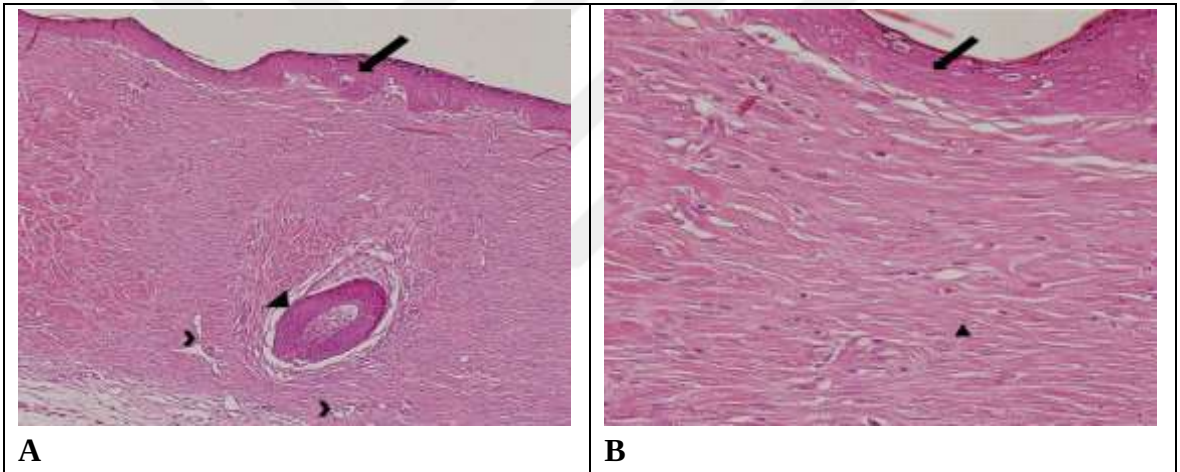
Resim 9. K: Kontrol grubu hematoksilin-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başları; anjiyogenez (x10). B) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başları; anjiyogenez, ok başı; fibroblast (x40)



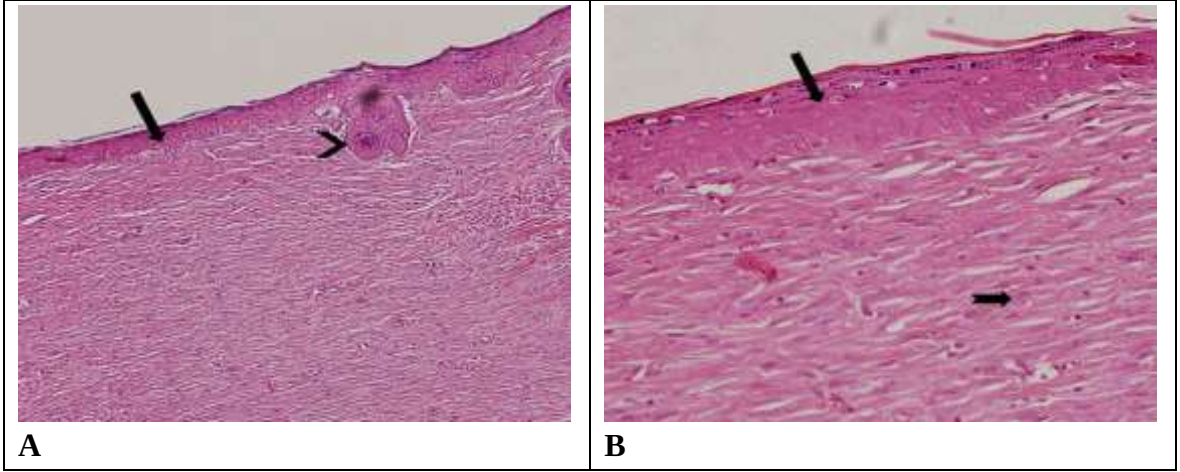
Resim 10. PK: Pozitif grubu hematoksilin-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başı; kıl kökü folikülü (x10). B) çentikli ok başı; kıl kökü folikülü, ok başı; anjiyogenez, çentikli ok; fibroblast (x40)



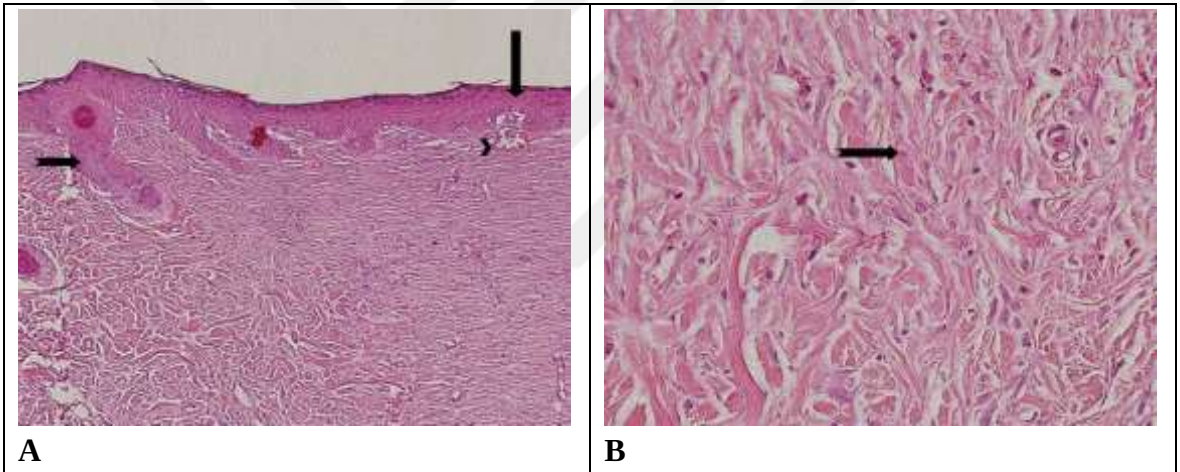
Resim 11. LVESE-1 hematoksisilen-eozin boyama. A) ok olgun epitel tabakası, çentikli ok başı; anjiogenez (x10). B) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başı; anjiogenez, ok başı; fibroblast (x40)



Resim 12. LVESE-2 hematoksisilen-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, ok başı; kıl kökü folikülü, çentikli ok başı; anjiogenez (x10). B) ok; olgun epitel tabakası, ok başı; fibroblast (x40)



Resim 13. LVUSE-1 hematoksilin-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok başı; kıl kökü folikülü (x10). B) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok; fibroblast (x40)

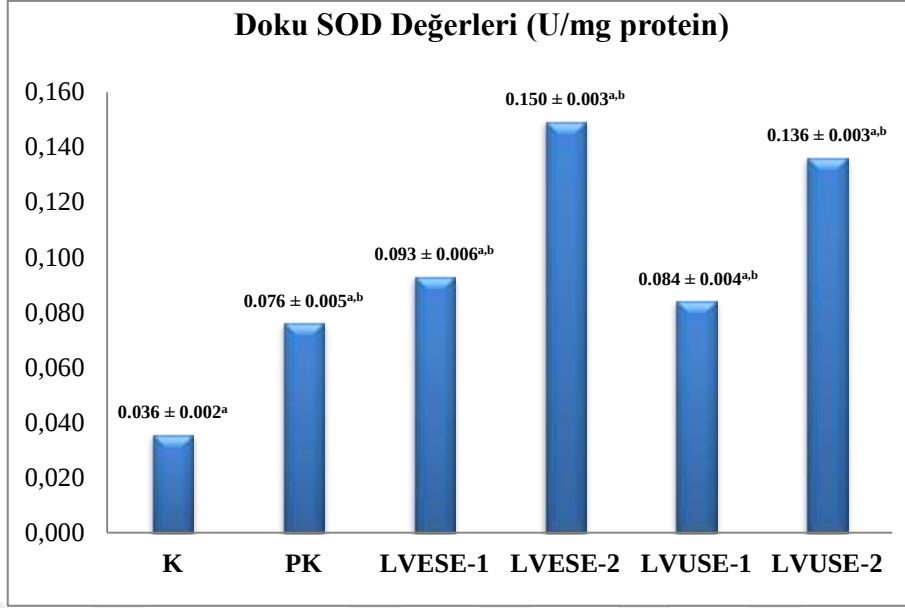


Resim 14. LVUSE-2 hematoksilin-eozin boyama. A) ok; olgun epitel tabakası, çentikli ok; kıl kökü folikülü, çentikli ok başı; anjiogenez (x10). B) çentikli ok; fibroblast (x40)

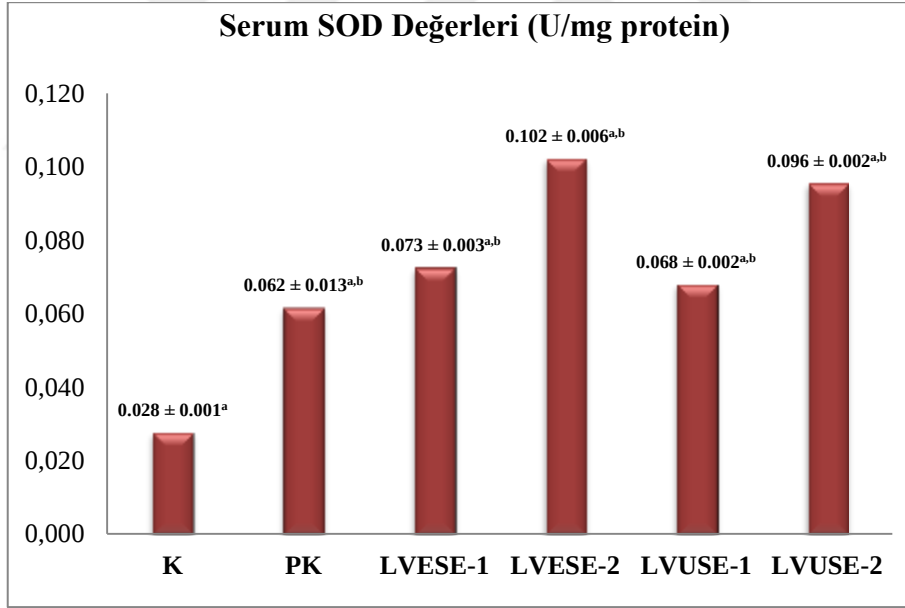
4.2. Biyolojik Aktivite Deney Bulguları

4.2.1. Antioksidan Aktivite Deney Bulguları

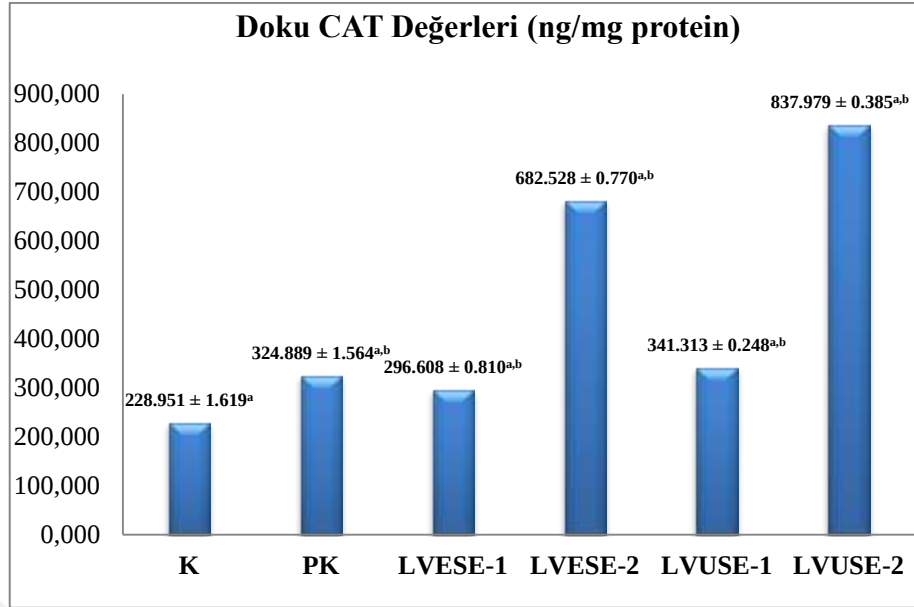
Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için sıçanlardan alınan serum ve deri dokuları örneklerinde SOD, CAT ve MDA deneyleri yapılmıştır. Elde edilen bulgular grafikler halinde verilmiştir (Şekil 9-15).



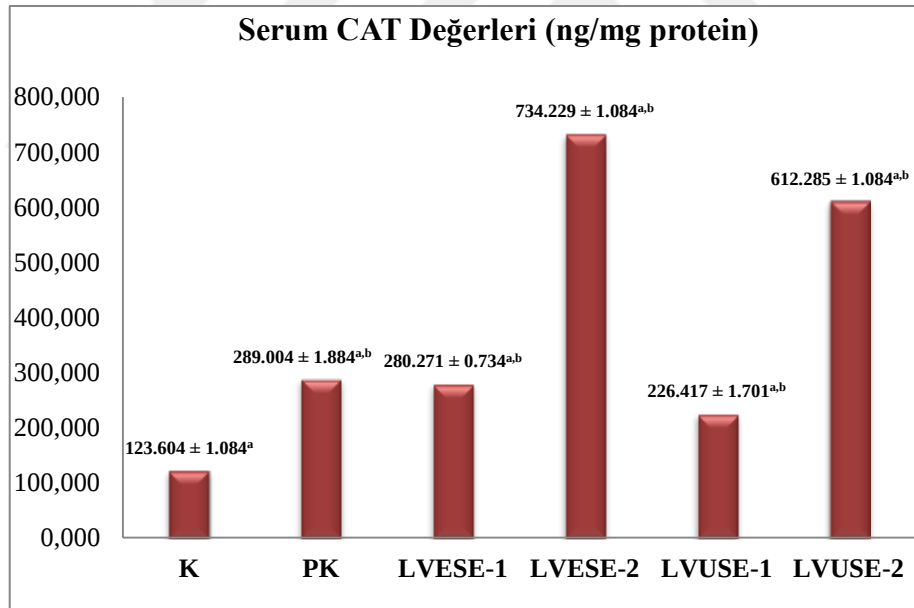
Şekil 9. Deri dokusunda SOD değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.



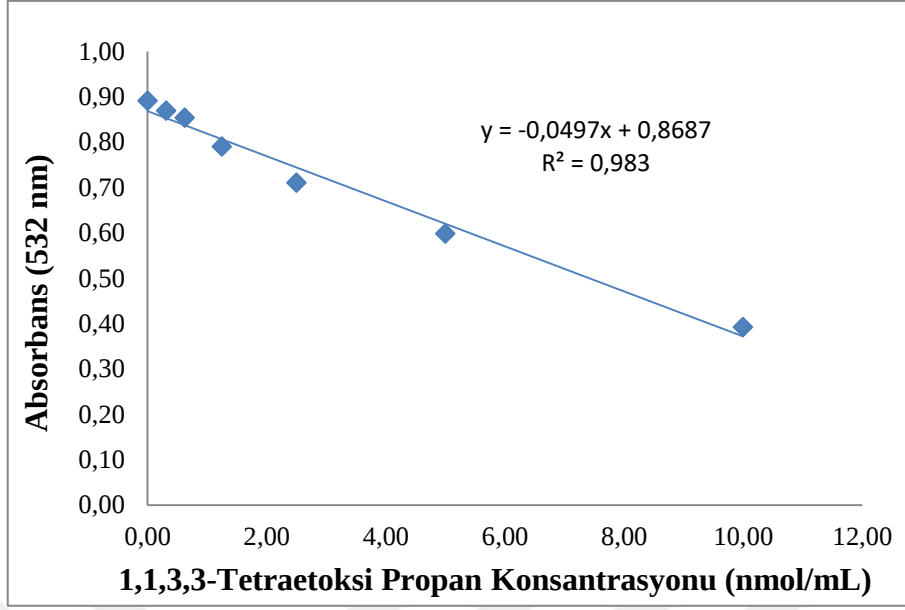
Şekil 10. Serumda SOD değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.



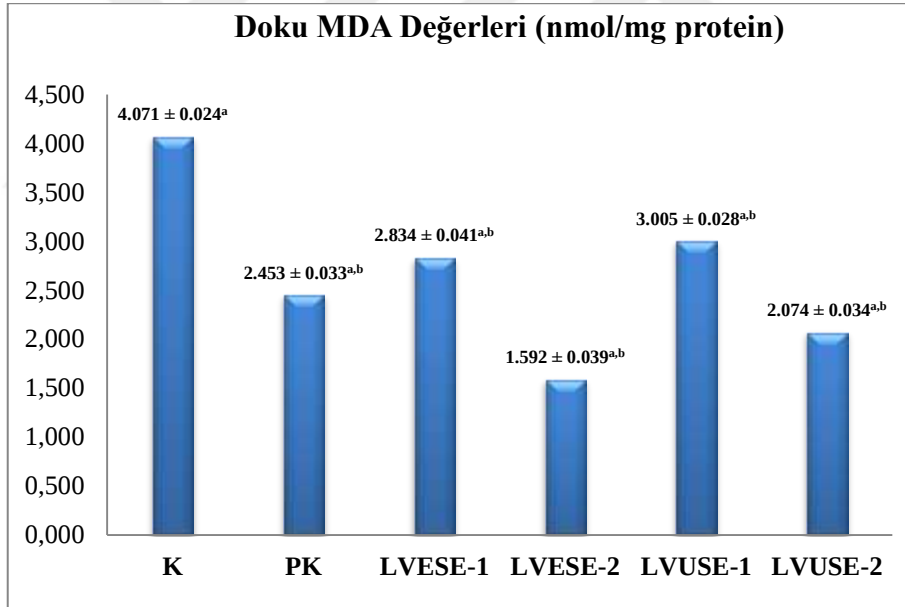
Şekil 11. Deri dokusunda CAT değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.



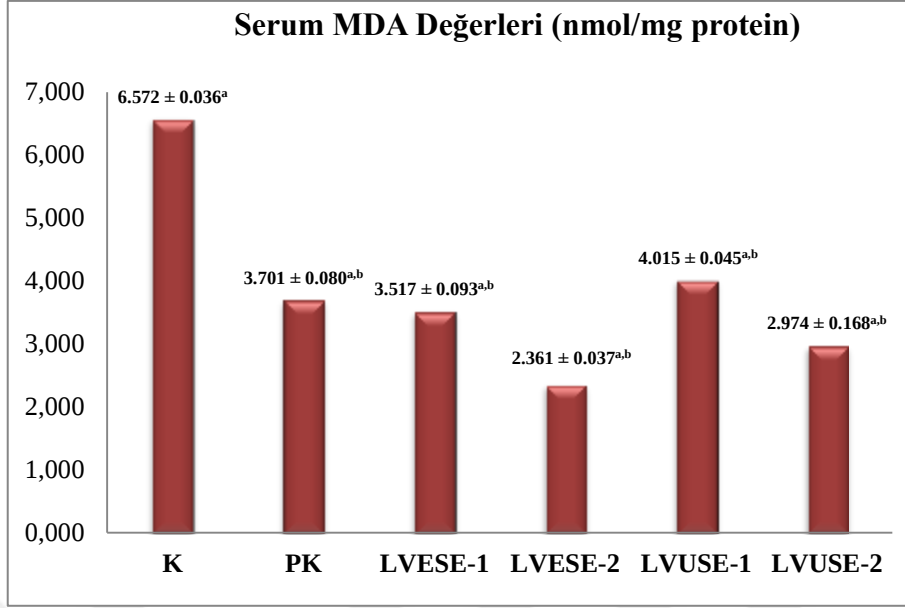
Şekil 12. Serumda CAT değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 13. 1,1,3,3-tetraetoksi propan konsantrasyonuna karşı absorbans grafiği



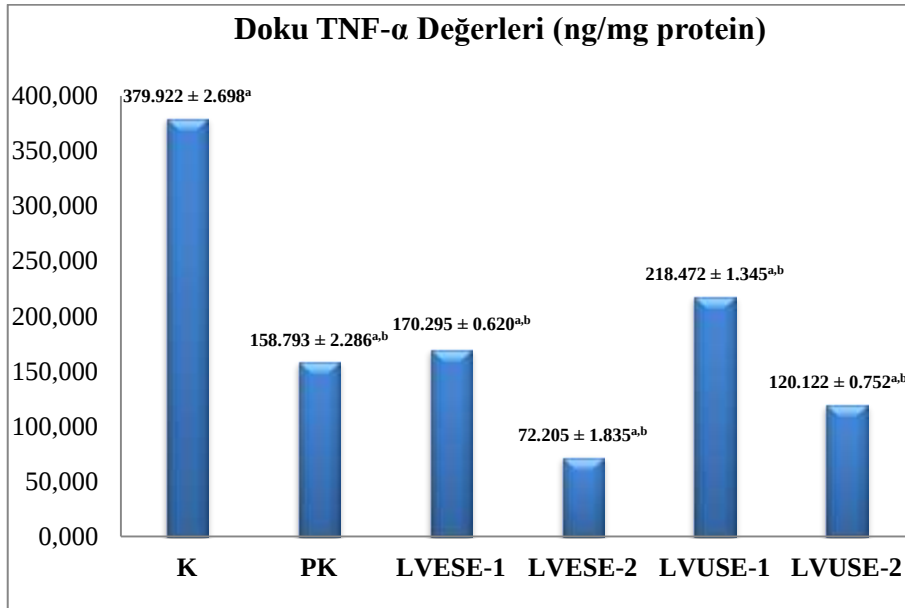
Şekil 14. Deri dokusunda MDA değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.



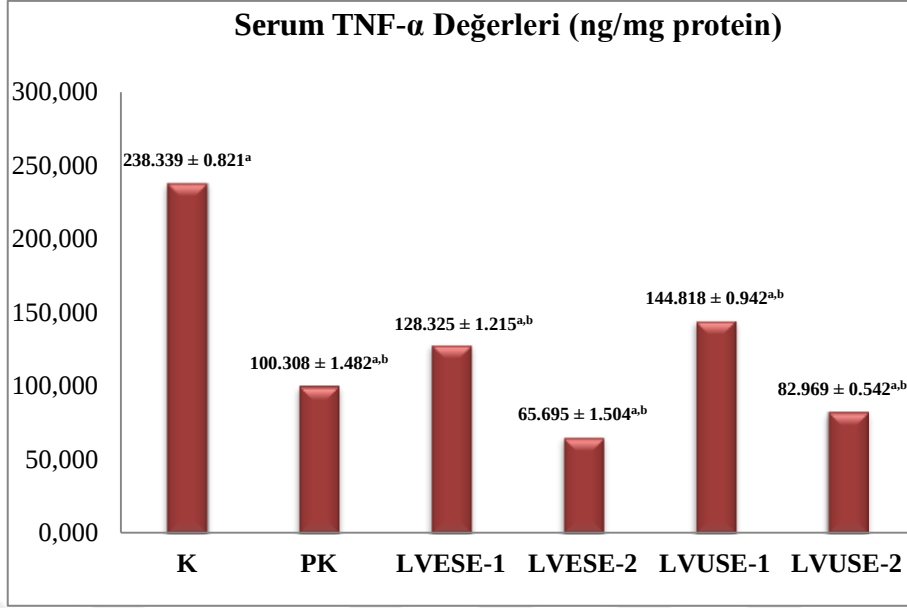
Şekil 15. Serumda MDA değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

4.2.2. Antiinflamatuvar Aktivite Deney Bulguları

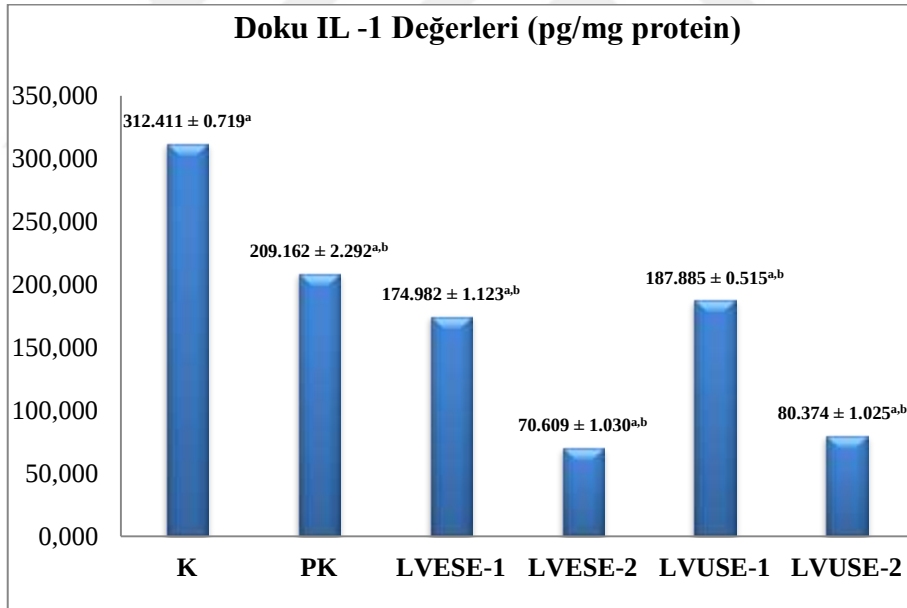
Sıçanlardan alınan serum ve yaralı deri doku örneklerine TNF- α ve IL-1 deneyleri çalışılarak elde edilen bulgular Şekil 16-19'da verilmiştir.



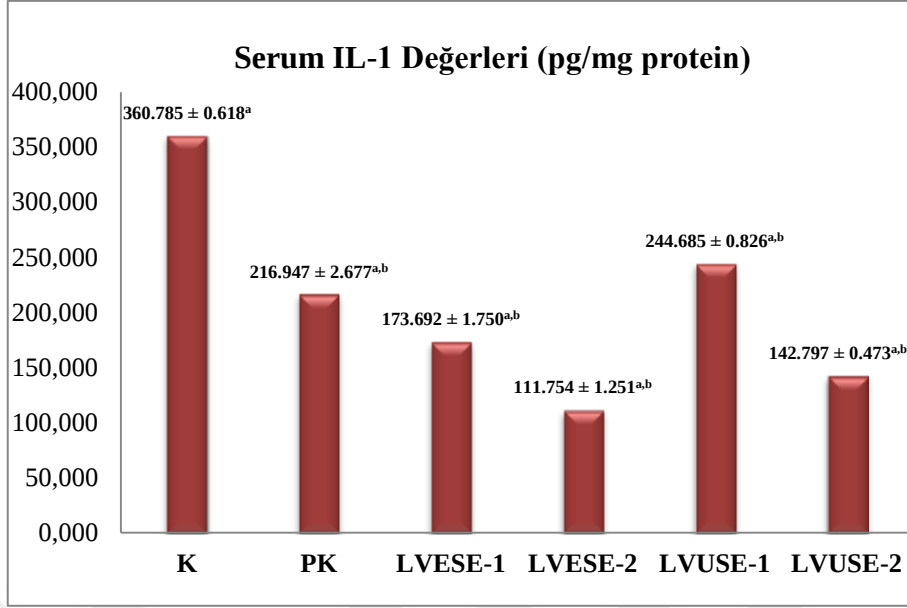
Şekil 16. Deri dokusunda TNF- α değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 17. Serumda TNF- α değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 18. Deri dokusunda IL-1 değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

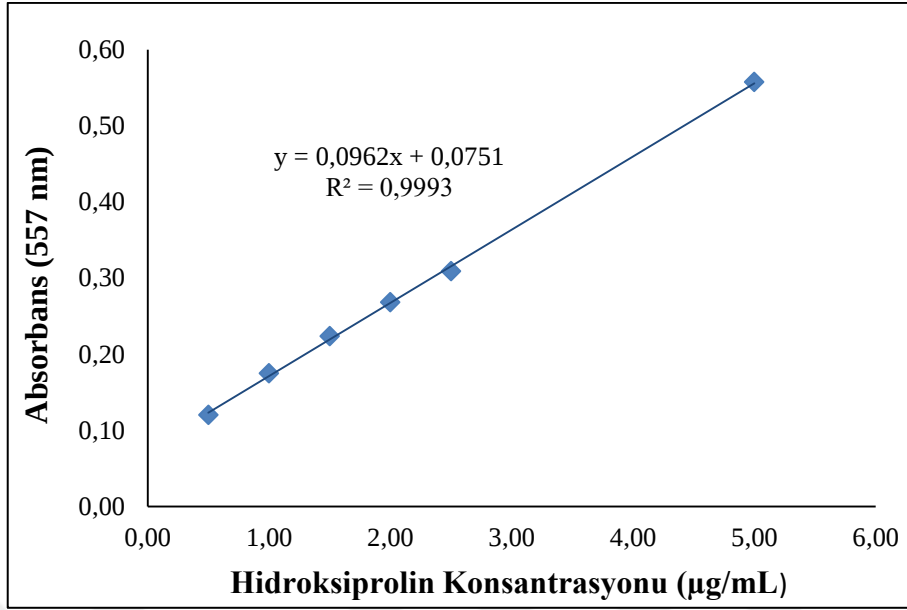


Şekil 19. Serumda IL-1 değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

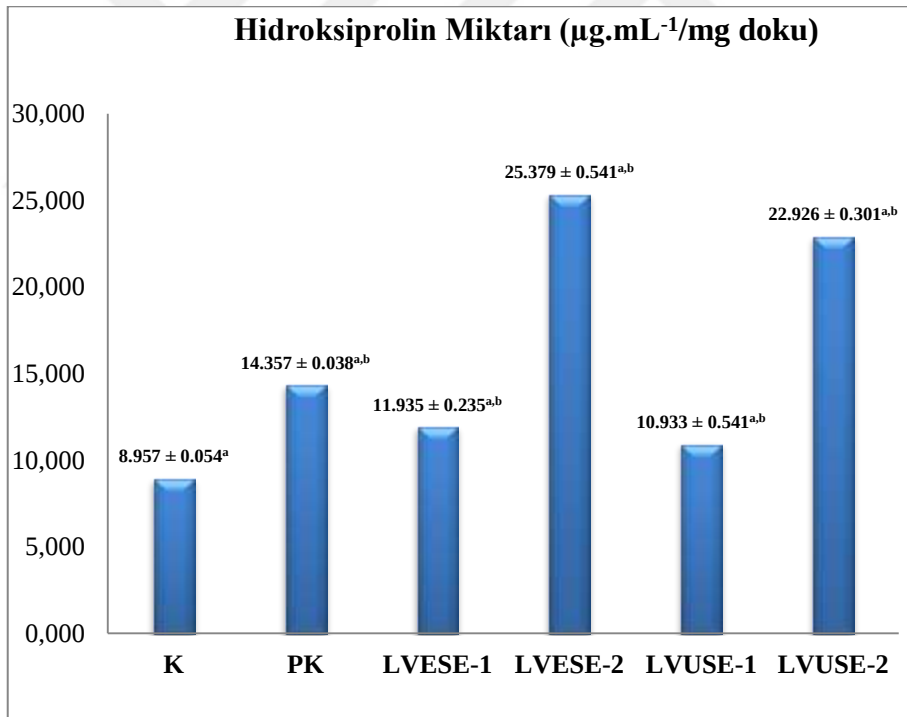
4.2.3. Kolajen Bağ Dokunun Saptanması Deney Bulguları

4.2.3.1. Hidroksiprolin Deney Bulguları

Kolajen bağ dokunun saptanması için yara dokularına hidroksiprolin deneyi uygulanmıştır. Yara dokularındaki hidroksiprolin miktarları Şekil 20’de gösterilmiştir. Hidroksiprolin deneyi için hidroksiprolin (standart) konsantrasyonuna karşı absorbans grafiği Şekil 21’de verilmiştir.



Şekil 20. Hidroksiprolin konsantrasyonuna karşı absorbens grafiği



Şekil 21. Deri dokusunda hidroksiprolin değerleri. ^a $p \leq 0.01$ Kruskal Wallis testi, ^b $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

4.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Deney Bulguları

4.2.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Deneyi Bulguları

E. coli, *Y. pseudotuberculosis*, *S. aureus*, *E. faecalis* ve *B. cereus* bakterileri, *C. albicans* mantarı test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır. Kontrol olarak ampisilin ve flukonazol antibiyotikleri tercih edilmiştir. Bitkilerin *S. aureus*, *E. faecalis* ve *B. cereus* bakterilerine ve *C. albicans* mantarına karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 16. Mikroorganizma inhibisyon zon çapları bulguları

	Miktar (µg/mL)	Mikroorganizma ve İnhibisyon zonları (mm)					
		Gram- Negatif		Gram-Pozitif			Mantar
		<i>Ec</i>	<i>Yp</i>	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Bc</i>	<i>Ca</i>
<i>L. verticillaris</i> Su Ekstresi	10 000	-	-	12	10	12	12
<i>L. vulgaris</i> Su Ekstresi	10 000	-	-	12	10	12	12
Ampisilin	10	10	18	10	10	15	
Flukonazol	5						25

Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922, **Yp:** *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, **Sa:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **Ef:** *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, **Bc:** *Bacillus cereus* 702 Roma, **Ca:** *Candida albicans* ATCC 60193, **(-):** aktivite yok

4.2.4.2. Minimal İnhibisyon Deneyinin Bulguları

Agar kuyucuk difüzyon deneyi bulgularında aktivite gözlenen bakteri gruplarında minimal inhibisyon deneyi yapılmıştır. *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* su ekstrelerinin minimal inhibisyon konsantrasyonu gözlenmemiştir (Tablo 17).

Tablo 17. Minimal inhibisyon konsantrasyonu bulguları

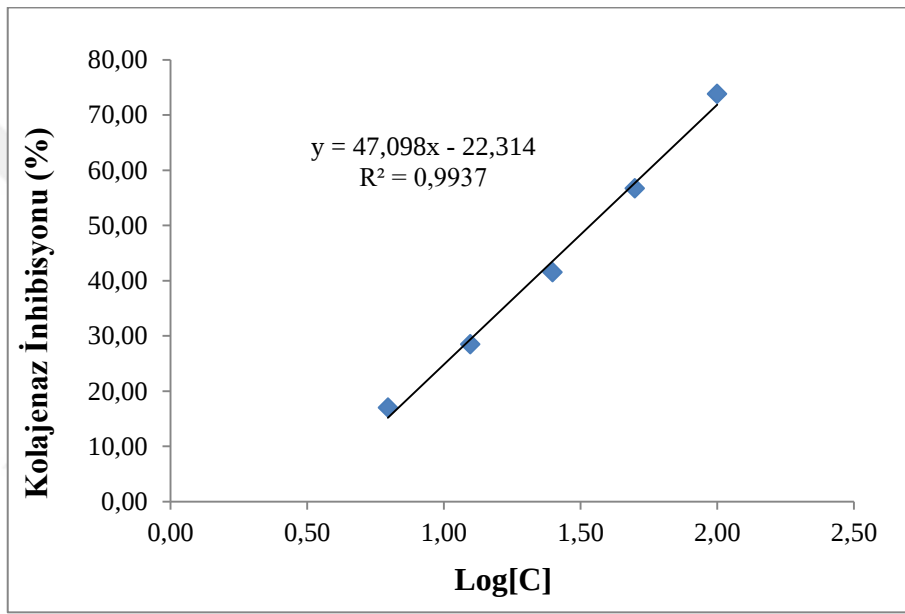
	Miktar (µg/mL)	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) (µg/mL)			
		Gram-Pozitif			Mantar
		<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Bc</i>	<i>Ca</i>
<i>L. verticillaris</i> Su Ekstresi	10 000	430	1200	700	380
<i>L. vulgaris</i> Su Ekstresi	10 000	500	2700	425	800
Ampisilin	10	35	10	15	
Flukonazol	5				<8

Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **Ef:** *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, **Bc:** *Bacillus cereus* 702 Roma, **Ca:** *Candida albicans* ATCC 60193

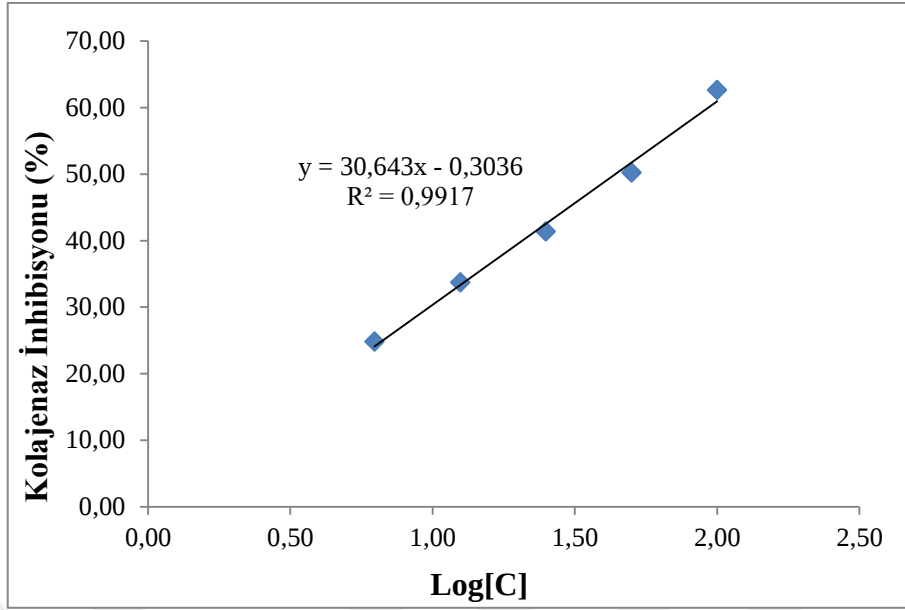
4.2.5. Enzim Aktivitesi Deney Bulguları

4.2.5.1. Kolajenaz Enzim İnhibisyonu Deney Bulguları

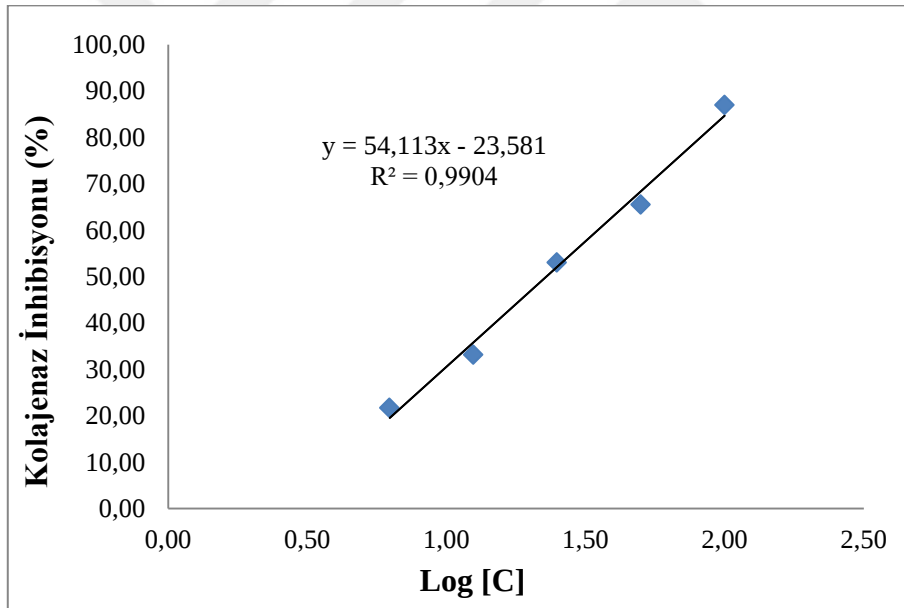
Türlerin su ekstraktlarının kolajenaz enzim inhibisyonu tez kapsamında çalışılmıştır. *L. verticillaris* ve *L.vulgaris*'in kolajenaz enzim inhibisyonları sırasıyla 34.674 ± 2.055 ve 43.652 ± 2.494 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (Şekil 22-23). Standart olarak kullanılan kateşin'in kolajenaz enzim inhibisyonu ise 22.909 ± 1.633 $\mu\text{g/mL}$ 'dir (Şekil 24). Elde edilen sonuçlar IC_{50} değeri olarak hesaplanmıştır (Şekil 25).



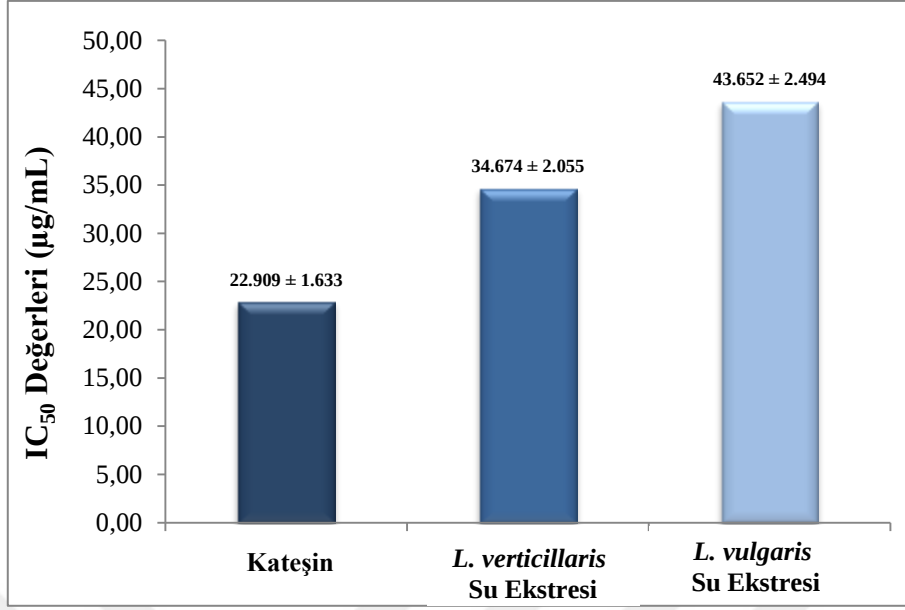
Şekil 22. *L. verticillaris* su ekstresi kolajenaz inhibitör aktivite grafiği



Şekil 23. *L. vulgaris* su ekstresi kolajenaz inhibitör aktivite grafiği



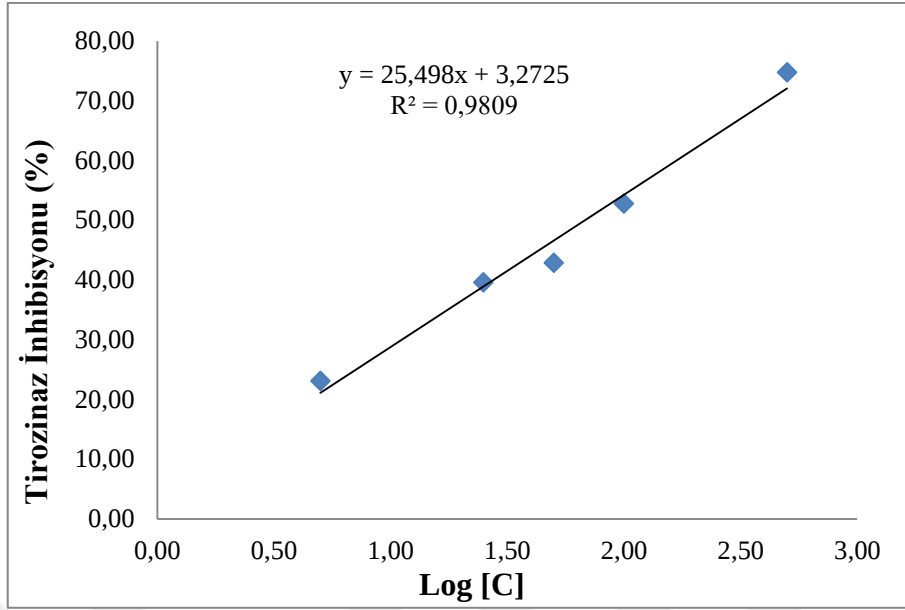
Şekil 24. Kateşin'in kolajenaz inhibitör aktivite grafiği



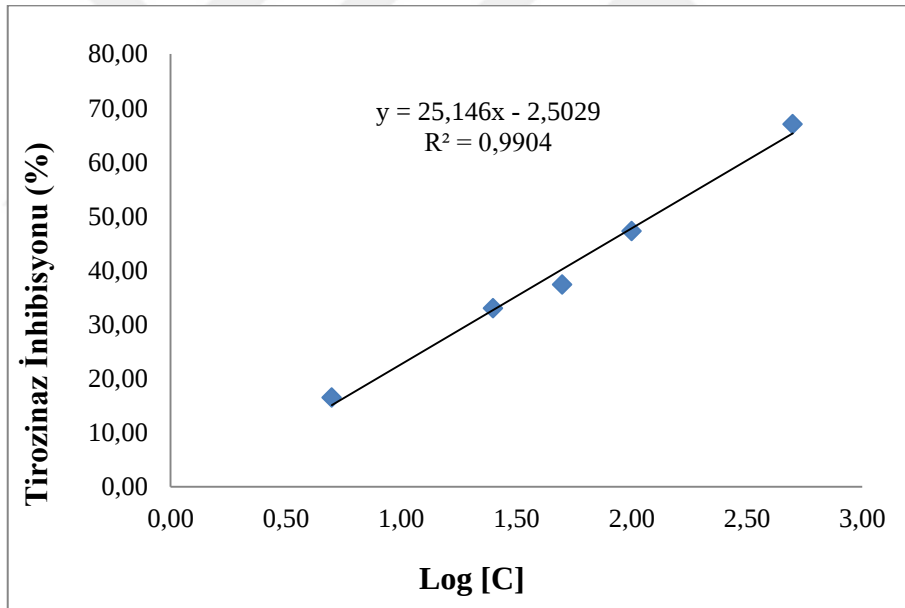
Şekil 25. Kolajenaz enzim inhibisyonu IC₅₀ değerleri

4.2.5.2. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Deney Bulguları

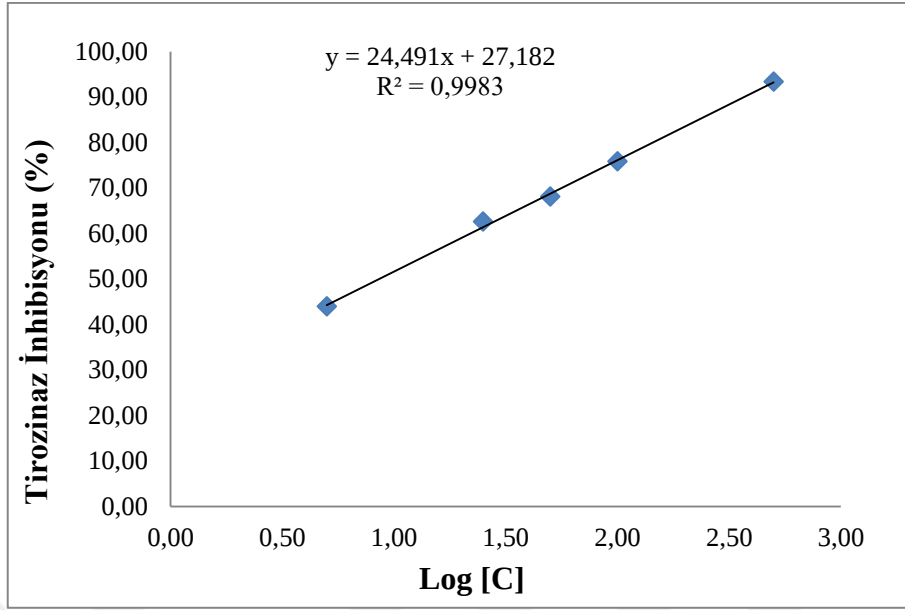
Bu tez çalışmasında, *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* su ekstraktlerinin tirozinaz inhibisyonu Masuda ve arkadaşlarının yöntemine göre belirlenmiştir. *L. verticillaris* ve *L. vulgaris*'in tirozinaz enzim inhibisyonları sırasıyla 68.013 ± 4.111 ve 122.440 ± 3.682 µg/mL olarak bulunmuştur ve grafikler ile belirtilmiştir (Şekil 26-27). Bu çalışmada kojik asit standart olarak kullanılmıştır. Kojik asitin tirozinaz enzim inhibisyonu 8.544 ± 0.493 µg/mL'dir (Şekil 28). Elde edilen sonuçlar IC₅₀ değeri olarak hesaplanmıştır (Şekil 29).



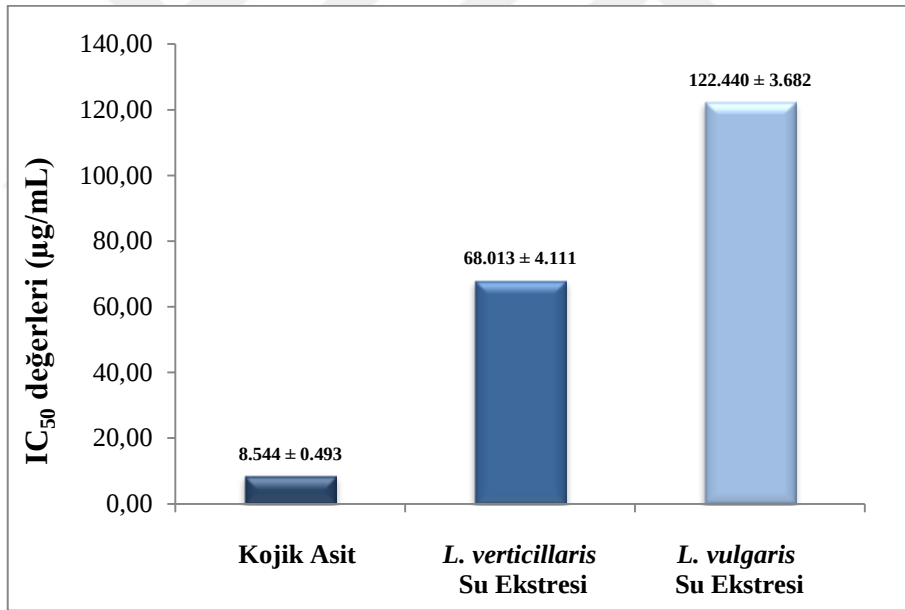
Şekil 26. *L. verticillaris* su ekstresi tirozinaz inhibitör aktivite grafiği



Şekil 27. *L. vulgaris* su ekstresi tirozinaz inhibitör aktivite grafiği



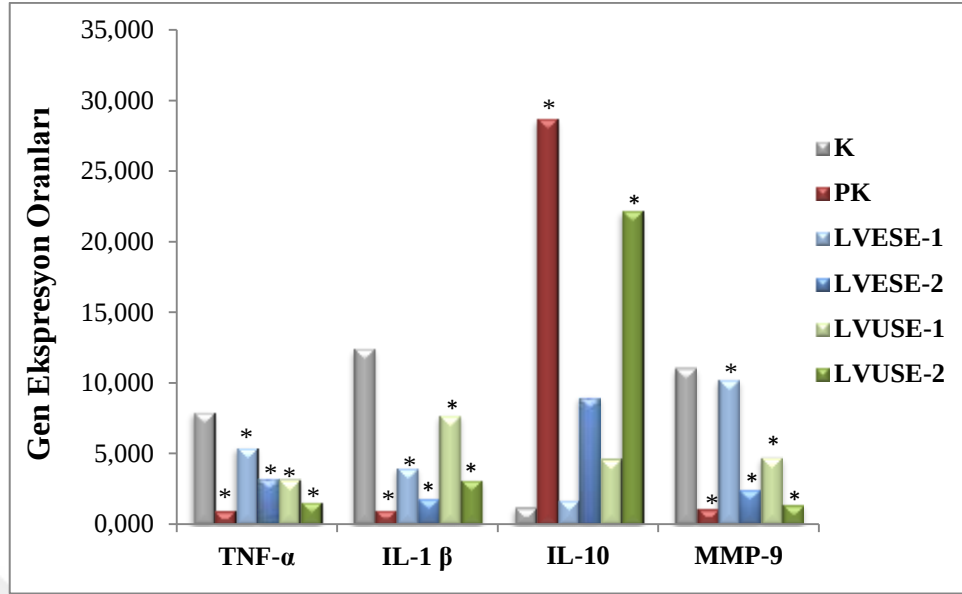
Şekil 28. Kojik asit'in tirozinaz inhibitör aktivite grafiği



Şekil 29. Tirozinaz enzim inhibisyonu IC₅₀ değerleri

4.3. Real Time PCR Deney Bulguları

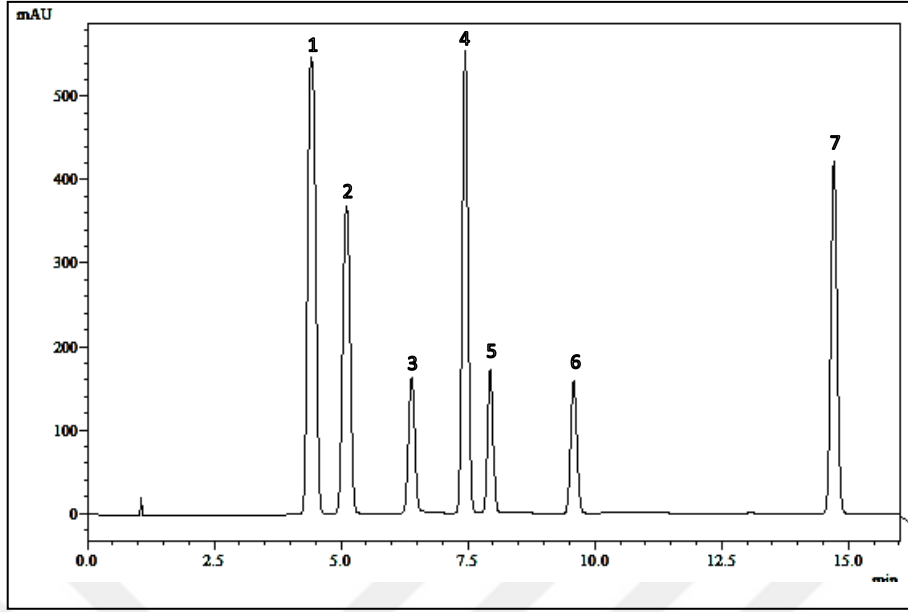
Real Time PCR için TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve MMP-9 genleri ile çalışılmıştır. Bu genlerin ekspresyon düzeyleri β -aktine göre saptanmıştır. Gruplardaki gen ekspresyon artış azalış oranları kontrol ile karşılaştırma yapılarak belirlenmiştir (Şekil 30).



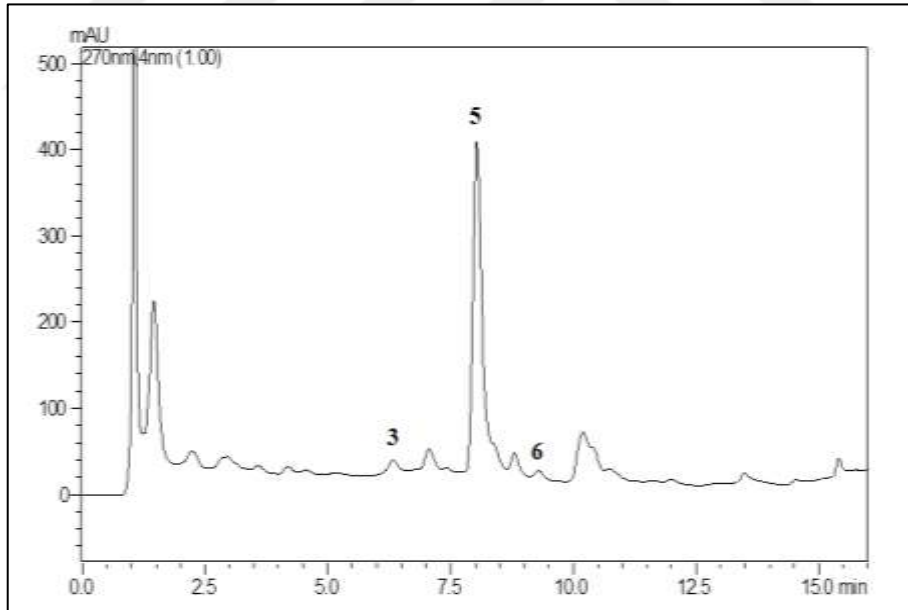
Şekil 30. mRNA gen ekspresyon oranları. * $p \leq 0.05$ Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

4.4. YPSK ile Türlerin Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi Deney Bulguları

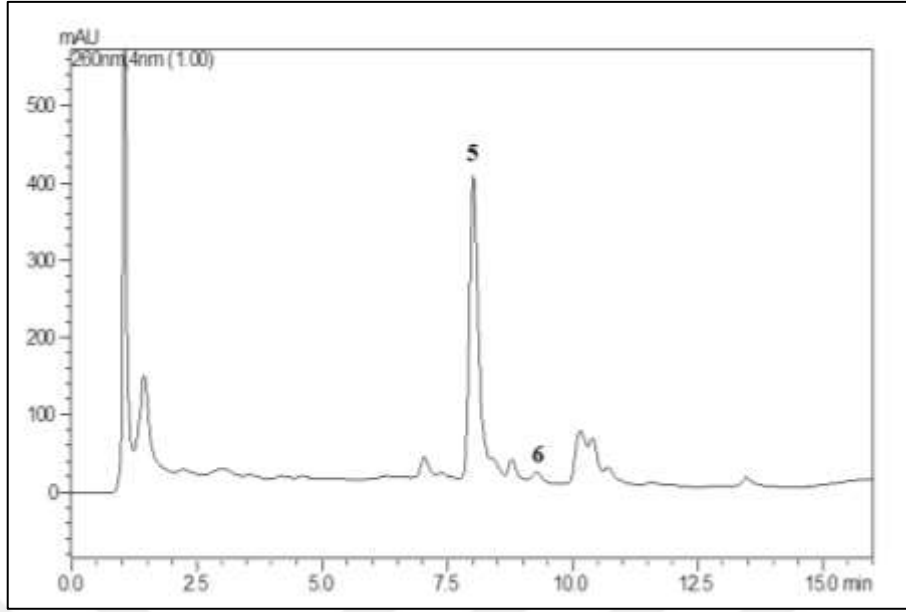
Bu tez çalışmasında, türlerin fenolik içeriğinin belirlenmesi için 16 dakikalık YPSK yöntemi uygulanmıştır. Standart olarak p-OH benzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit, p-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin kullanılmıştır. *L. verticillaris*'in içeriğinde şiringaldehit, sinapik asit ve benzoik asit tespit edilirken (Tablo 18), *L. vulgaris*'in içeriğinde sinapik asit, benzoik asit tespit edilmiştir (Tablo 18). Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin kromatogramı Şekil 31'de, *L. verticillaris*'in kromatogramı Şekil 32'de ve *L. vulgaris*'in kromatogramı Şekil 33'te gösterilmiştir.



Şekil 31. Standartların (25 µM) YPSK kromatogramı (270 nm, DAD, RP-C18 column (4.6×150 mm, 5 µm), 1.5 mL/dk. Pik tanımlaması: (1) *p*-OH benzoik asit, (2) vanilik asit, (3) şiringaldehit, (4) *p*-kumarik asit, (5) sinapik asit, (6) benzoik asit, (7) kersetin



Şekil 32. *L. verticillaris* su ekstresinde bulunan fenolik bileşiklerin YPSK kromatogramı (270 nm, DAD). Pik tanımlaması: (3) şiringaldehit, (5) sinapik asit, (6) benzoik asit



Şekil 33. *L. vulgaris* su ekstresinde bulunan fenolik bileşiklerin YPSK kromatogramı (270 nm, DAD). Pik tanımlaması: (5) sinapik asit, (6) benzoik asit

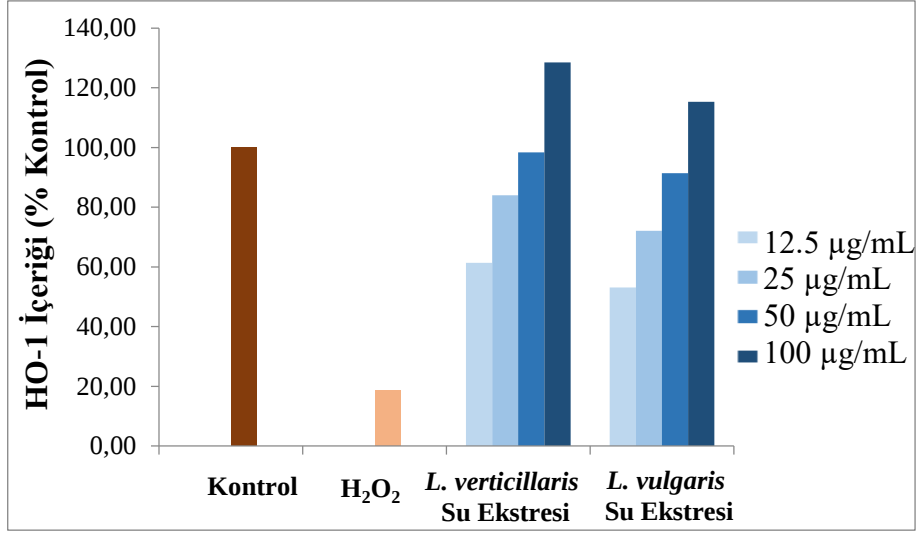
Tablo 18. *L. verticillaris* ve *L. vulgaris*'in içerdiği fenolik bileşikler

	Standart Bileşikler	Alıkonma zamanı	<i>L. verticillaris</i> Konsantrasyon (mg/g)	<i>L. vulgaris</i> Konsantrasyon (mg/g)
1	<i>p</i> -OH Benzoik asit	4.4	-	-
2	Vanilik Asit	5.1	-	-
3	Şiringaldehit	6.3	7.49	-
4	<i>p</i> -Kumarik asit	7.4	-	-
5	Sinapik Asit	7.9	49.78	38.31
6	Benzoik Asit	9.5	3.89	3.03
7	Kersetin	14.7	-	-

4.5. Mekanizma Aydınlatma Çalışmaları Deney Bulguları

4.5.1. Hem Oksijenaz Aktivite Deney Bulguları

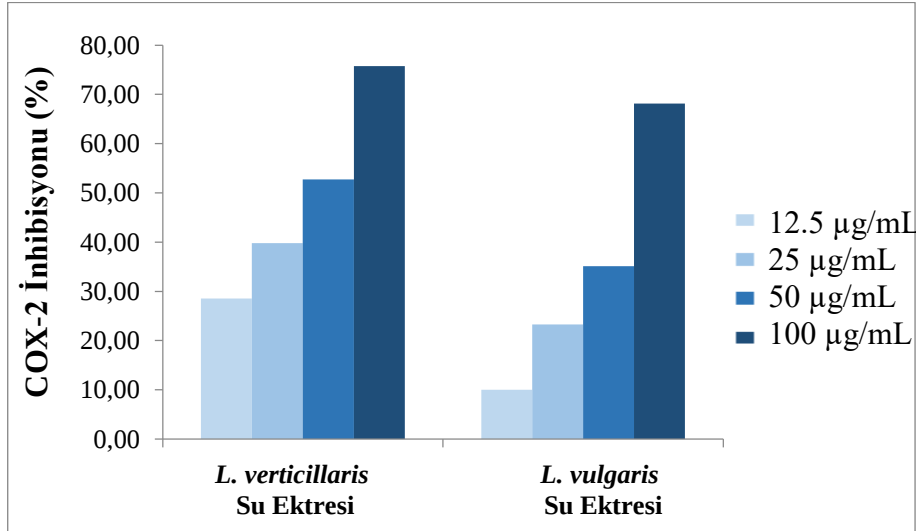
İlk olarak, Hem oksijenaz deneyleri için, türlerin farklı konsantrasyonda (12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL) hazırlanan su ekstreleri L9N29 hücreleri ile 4 saat boyunca muamele edilmiştir. Ölçümler kit çalışmasındaki prosedüre uygun şekilde yapılarak ölçüm sonuçları Şekil 34 ile gösterilmiştir.



Şekil 34. *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* su ekstreleri uygulanan hücrelerde HO-1 içeriği

4.5.2. COX-2 Yüzde İnhibisyonu Deney Bulguları

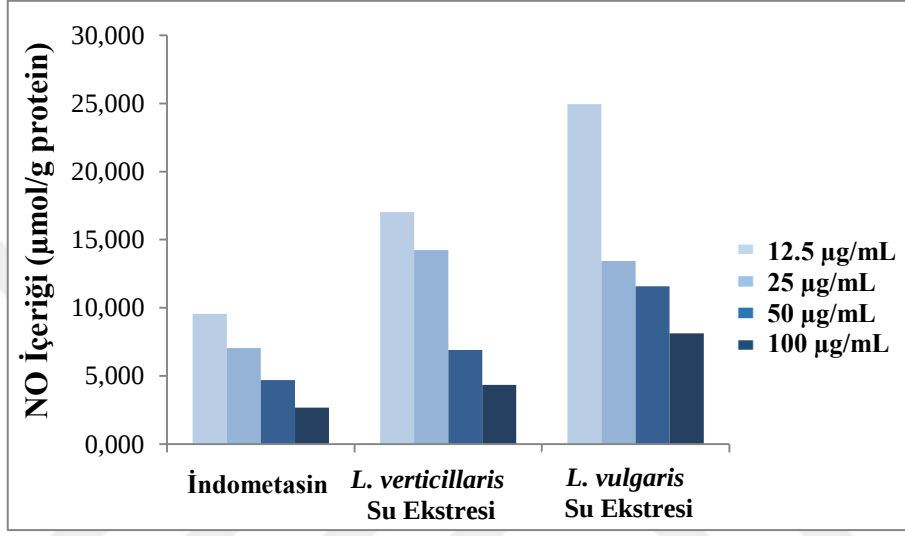
COX-2 inhibisyonunu belirlemek üzere, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su ekstreleri L9N29 hücreleri ile 4 saat boyunca muamele edilmiştir. Ölçümler kit çalışmasındaki prosedüre uygun şekilde yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar Şekil 35'te verilmiştir.



Şekil 35. *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* su ekstreleri uygulanan hücrelerde COX-2 % inhibisyonu

4.5.3. Nitrik Oksit İçeriği Deney Bulguları

Türlerin farklı konsantrasyonda (12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL) hazırlanan su ekstraktları ve indometasin (pozitif kontrol) RAW 264.7 hücreleri ile 4 saat boyunca muamele edilmiştir. Nitrik oksit içeriğinin belirlenmesi için kit çalışmasındaki prosedür uygulanmıştır ve ölçüm sonuçları Şekil 36 ile gösterilmiştir.



Şekil 36. İndometasin, *L. verticillaris* ve *L.vulgaris* su ekstraktları uygulanan hücrelerde NO içeriği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkiler, antiviral, antibakteriyel, antidepresif, antioksidan ve yara iyileştirme gibi birçok özelliklerinden ötürü geleneksel tıpta çok uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bitkiler farklı yapılara sahip polifenoller, terpenler, karotenoitler, saponinler, alkaloitler gibi çeşitli biyoaktif bileşenleri içermelerinden dolayı bu aktiviteleri göstermektedir. Tıbbi bitkilerin özelliklerini, verimliliklerini ve güvenilirliklerini anlayabilmek için bilimsel araştırmalara ihtiyaç vardır (217, 218). Tıbbi bitkiler güvenilir, etkili ve potansiyel ilaç kaynakları olarak dikkat çekmeye devam etmektedir. Bitkisel ilaçlar tentürler, çaylar, tozlar ve diğer bitkisel formülasyonlar şeklinde elde edilmiştir. Bitkisel ürünler ve ilaçlar, çok sayıda araştırma alanını ve çeşitli analiz yöntemlerini içerecek şekilde gelişmiştir ve gelişmeye devam etmektedir (219).

Cildin normal anatomisinde ve işlevinde bozulmaya neden olan yaralar, dünya çapında hastalar ve sağlık uzmanları üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadır. Çünkü, iyileşmemiş yaralar sürekli olarak yara bölgesinde ağrı ve şişlik oluşturan inflamasyon araçlarını üretir, enfeksiyonlara neden olur ve hastaların iyileşme sürecini uzatır. Hatta, kronik yaralar birden fazla organ yetmezliğine veya hastanın ölümüne bile yol açabilir (220, 221)

Yara iyileşmesi, travma ile başlayan ve skar oluşumu ile biten ve bu süreçte bir dizi olayı harekete geçiren yaralanmaya verilen normal biyolojik bir tepkidir. Yara iyileşmesini geciktiren veya engelleyen risk faktörlerinin ortadan kaldırılması yara bakımı için oldukça önemlidir. Bitkilerde bulunan fitokimyasalların birçoğunun yara iyileştirme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (218, 221, 222). Bu bitkisel biyoaktif maddeler, genellikle iyileşme sürecinin bir veya daha fazla aşamasını etkilemektedir (222). Bu sebeplerden dolayı, tıbbi bitkilerin izolasyonu, karakterizasyonu, biyolojik aktiviteleri ve yapı ile aktivite arasındaki ilişkilerin aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Geleneksel ve modern yöntemlerin birlikte kullanılması ile daha az yan etkiye sahip ve yara iyileşmesi için potansiyel ilaçlar geliştirilebilir.

Lysimachia türlerinin, zengin ikincil metabolitleri ile öksürük, bronşit, ülser, sarılık, tüberküloz, soğuk algınlığı, yaraların ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Bu türlerin sitotoksik, analjezik, hepatoprotektif, vazoprotektif, antioksidan, antitümör, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiobezite gibi sayısız aktiviteye sahip olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur (8-17; 23-33).

Lysimachia türlerinin yara iyileştirme (9, 11, 12, 14, 15, 17, 21) ve cilt hastalıklarının tedavisinde (16, 31, 223) kullanıldığına dair kanıtların varlığı sebebiyle, bu tez çalışmasında *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* türlerinin yara iyileştirme potansiyelleri incelenmiştir. Bu türlerin yara iyileştirme potansiyellerini incelemek için *in vivo* olarak “Dairesel Eksizyon Yara Modeli” deneyi uygulanmıştır. Sıçanlara dairesel yara uygulaması yapıldıktan sonra, gün aşırı kontrol grubu hariç diğer gruplara merhem sürülmüştür ve 4., 7., ve 14. günlerde yara iyileşmesi değerlendirilmesi yapılmıştır. Yara alanı küçülmeleri fotoğraflanmış ve gruplar kendi aralarında karşılaştırılmıştır. 4. günde doza bağımlı olarak yara kapanmaları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. 7. günde ise gruplar arasında doza bağımlı olarak yara kapanmalarının kontrol ve pozitif kontrol gruplarına kıyasla daha iyi olduğu saptanmıştır. % 5 oranında ekstre içeren LVESE-2 grubunda yara kapanma yüzdesi 89.475 ± 0.848 iken, LVUSE-2 grubunda bu oran 85.225 ± 0.717 olarak bulunmuştur. %5 oranında ekstre içeren grupların, %1 oranında ekstre içeren gruplara göre yara iyileşmesi potansiyelinin anlamlı derecede etkili olduğu görülmüştür. 14. günde ise, ekstre gruplarında yaraların tamamen kapandığı, kontrol ve pozitif kontrol gruplarında yaraların tamamen kapanmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, hazırlanan merhemlerin yara kapanması üzerine etkisinin pozitif kontrol olarak kullanılan Madecassol® grubuna göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında *Lysimachia* türlerinin triterpenik bileşikler, streoitler, flavonoidler, flavanoller, fenolik asitler gibi bileşiklere sahip olduğu bilgilerine ulaşılmıştır (8-17; 23-33). Ayrıca, tez kapsamında yapılan YPSK çalışmalarında bitkilerin sinapik asit, benzoik asit ve şiringaldehit içerdiği tespit edilmiştir. *Lysimachia* türlerinin zengin fitokimyasal içeriği ile yara iyileşmesine katkı sağladığı düşünülmektedir.

Histopatolojik olarak yapılan değerlendirmelerde, yara iyileşmesinin 14. gününde altı ayrı grup incelenmiş ve bulgular göz önüne alınarak gruplar arası kıyaslamalar gerçekleştirilmiştir. Epitelizasyon açısından gruplar arasında bir fark görülmemiş ve bütün gruplardaki epitel yapısının matür ve tam gelişmiş olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda gözlemlenen anjiyogenez, diğer gruplara oranla daha fazla olup diğer gruplar arasında ise bu patoloji açısından belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Grupların inflamasyon düzeyleri arasında değerlendirme yapıldığında kontrol grubunda anlamsız derecede fazla iken, diğer gruplar arasında belirgin bir fark tespit edilememiştir. Bu durum, inflamasyonun çok büyük oranda gerilediğini ve inflamatuvar hücrelerin yerini fibroblastların aldığını göstermektedir. Gruplar arasında hemaroji açısından yapılan değerlendirmede ise bir fark

görülmemiştir ve bu patolojik bulgunun hemen hemen hiç görülmediği söylenebilir. Buna ek olarak, bazı gruplarda iyileşmenin kısmen daha ileri düzeyde olduğu, deri eklerinin de (kıl kökü, yağ bezi, erektör pili kası) oluşmaya başladığı gözlemlenmiştir. Kıl kökleri pozitif kontrol, LVESE-2, LVUSE-1 ve LVUSE-2 gruplarında olduğu belirlenmiştir. Genel olarak bütün gruplarda ağır patolojik bulguların bulunmadığı tespit edilmiştir. Histopatolojik bulgular ile dairesel eksizyon yara modeli deneylerinden elde edilen bulguların paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Su ekstrelerinden hazırlanan merhemlerin yaraları hızla iyileştirdiği gözle ve mikroskopik olarak gözlemlenmiştir. Tüm bu veriler, ekstrelerden hazırlanan merhemlerin yara iyileşmesine katkı sağladığının başka bir kanıtıdır. Literatür çalışmalarında bitkilerle ilgili yapılmış bir “Dairesel Eksizyon Yara Modeli” ve histopatolojik çalışmalara rastlanmamış olup, bu bitkilerin ilk kez yara iyileştirme potansiyelleri incelenmiştir.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için sıçanlardan alınan doku ve serum örneklerinde SOD, CAT ve MDA düzeylerindeki fark incelenmiştir. Sonuçlara genel olarak bakıldığında, ekstre gruplarında kontrole göre doku ve serum SOD ve CAT düzeylerinde bir artış gözlenirken, MDA düzeylerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.

Kontrol, pozitif kontrol ve ekstre gruplarının SOD bulguları şekil 9-10’da verilmiştir. Bu bulgular incelendiğinde, doku ve serum örneklerinde kontrol grubuna göre pozitif kontrol ve ekstre gruplarının antioksidan etkilerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. % 1 oranında ekstre içeren gruplar ile kıyaslandığında, % 5 oranında ekstre içeren grupların antioksidan etkilerinin daha iyi olduğu görülmüştür. % 5 oranında ekstre içeren gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmemesine rağmen, doku ve serum örneklerinde en iyi etkinin LVESE-2 grubunda (0.150 ± 0.003 U/mg protein, 0.102 ± 0.006 U/mg protein) olduğu belirlenmiştir.

Antioksidan etkinin belirlenmesi için yapılan diğer bir yöntem katalaz düzeylerinin tespit edilmesidir (Şekil 11-12). CAT bulguları incelendiğinde doku ve serum örneklerinin sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Tüm gruplar içinde, doku (228.951 ± 1.619 ng/mg protein) ve serum (123.604 ± 1.084 ng/mg protein) örneklerindeki en düşük değerlerin kontrol grubunda olduğu belirlenmiştir. En yüksek CAT değerleri doku örneklerinde LVUSE-2 grubunda (837.979 ± 0.385 ng/mg protein), serum örneklerinde ise LVESE-2 grubunda (734.229 ± 1.084 ng/mg protein) olduğu görülmüştür.

MDA düzeyleri incelendiğinde en yüksek değerlerin kontrol grubunda olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerden elde edilen bulgular kendi içinde değerlendirildiğinde, LVESE-2 grubunda doku (1.592 ± 0.039 nmol/mg) ve serum (2.361 ± 0.037 nmol/mg) örneklerinde en düşük MDA seviyeleri gözlenmiştir. Aynı zamanda, pozitif kontrol grubuna göre % 5 ekstre içeren gruplarının daha iyi etki gösterdiği belirlenmiştir.

Serbest radikaller doku hasarına yol açarak yara iyileşmesinin gecikmesine neden olabilmektedir. Doku hasarına engellemek ve serbest radikallerin olumsuz etkilerini gidermek için antioksidan özelliğe sahip bileşikler kullanılmaktadır. Yara iyileşmesinin sorunsuz ilerlemesi için antioksidanlar oldukça önemlidir (90). *L. verticillaris* L.'nin izolasyonu ile elde edilen bileşiklerin enzim ve antioksidan aktivitesinin belirlendiği bir araştırmada, izole edilen bileşiklerin güçlü antioksidan etki gösterdiği ve bu etkinin ekstrede bulunan flavonoidlerin sinerjistik etkisinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (9). Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *L. foenum-graecum* Hance'den elde edilen ekstrelerin ve fraksiyonların farklı düzeylerde güçlü antioksidan ve radikal süpürücü aktiviteler gösterdiği saptanmıştır. Aynı çalışmada, antioksidan içerikler ile toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğin paralellik gösterdiği belirlenmiştir (13). *L. clethroides* Duby'nin hepatoprotektif ve antioksidan etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, ekstralarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve bu sayede hepatoprotektif etkisini gösterdiği rapor edilmiştir (29). Üç farklı *Lysimachia* türünün (*L. vulgaris*, *L. nummularia* ve *L. punctata*) polifenol bileşiminin ve antioksidan özelliklerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, daha yüksek mirsetin aglikon ve klorojenik asit içeren ekstraların, DPPH[•] ve ABTS^{•+} radikallerini temizleme yeteneğinin diğer ekstralardan daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (31). *L. nummularia* L. ve *L. vulgaris* L. ekstralarının polifenolik kompozisyonu ve antioksidan kapasitesini belirlemek üzere yapılan bir çalışmada, *L. vulgaris* ekstresinin daha güçlü bir antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, antioksidan aktivitenin toplam polifenolik ve flavonoid içerik ile uyum içinde olduğu belirlenmiştir (223). *L. christinae* Hance'nin ham etanolik ekstresinin farklı polaritelere sahip dört fraksiyonun antioksidan ve endotel koruyucu etkilerinin incelendiği çalışmada, n-bütanol fraksiyonunun yüksek fenolik ve flavonoid içeriği ile en güçlü antioksidan ve endotel koruyucu etkiyi gösterdiği bulunmuştur (224). Literatürdeki bu çalışmalar incelendiğinde, zengin fenolik ve flavonoid içerik ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir korelasyonun olduğu gözlenmiştir. Tez kapsamında elde edilen antioksidan bulgular ile yara kapanması arasındaki uyumluluk bitkilerin zengin fenolik içeriğine bağlanabilir.

Sonuç olarak, fenolik asitlerce zengin ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip ekstrelerin yara iyileşmesine, hücre büyümesine ve cilt yenilenmesine yardımcı olduğu söylenebilir.

İnflamasyon aşamasında makrofajlar gibi hücresel elemanlar TNF- α ve IL-1 gibi çeşitli sitokinlerin salınmasında rol oynarlar. Bu sitokinler yeniden damarlanma, fibroblast göçü ve çoğalması, kolajen üretimi ve yara kontraksiyonu ile ilişkilidir. Yara iyileşmesinin ilk aşamasında bu sitokinlerin seviyesinde görülen artış yara iyileşmesine destek olmaktadır. Ancak, ilerleyen aşamalarda bu seviyelerde görülen artış ile yara iyileşmesinde gecikmelere neden olabilmektedir (90, 225). Bu amaçla, antiinflamatuvar çalışmalar ile türlerin TNF- α ve IL-1 düzeyleri belirlenmiştir. 14. günde belirlenen TNF- α ve IL-1 değerlerinin ekstre ve pozitif kontrol grubunda azaldığı gözlemlenirken, kontrol grubunda ise bu düzeyler oldukça yüksek bulunmuştur. Tüm gruplar arasında TNF- α değerleri incelendiğinde, doku (72.205 ± 1.835 ng/mg protein) ve serum (65.695 ± 1.504 ng/mg protein) örneklerindeki en düşük değerlerin LVESE-2 grubunda olduğu belirlenmiştir. % 5 oranında ekstre içeren grupların, pozitif kontrol grubuna göre TNF- α düzeylerini oldukça düşürdüğü görülmüştür. Doku (70.609 ± 1.030 ng/mg protein) ve serum (111.754 ± 1.251 ng/mg protein) örneklerindeki en düşük IL-1 değerlerinin LVESE-2 grubunda olduğu saptanmıştır. Antiinflamatuvar etkiye sahip ekstrelerin, yara iyileşmesini kolaylaştırdığına ve hasta konforunu artırdığına yönelik birçok çalışma mevcuttur (89, 118, 226).

L. clethroides ekstresinin antiinflamatuvar etkisinin ve altında yatan mekanizmaların araştırıldığı bir çalışmada, ekstrenin temel inflamatuvar mekanizmaları düzenleyerek makrofajlarda LPS ile uyarılan inflamatuvar yanıtları azalttığı belirtilmiştir (227). *L. foenum-graecum* ile ilgili bir çalışmada, bitki ekstresinden izole edilen biyoaktif bir bileşen olan Foenumosit B (FSB)'nin antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu bulunmuştur ve aynı çalışmada antiinflamatuvar moleküler mekanizmalar da aydınlatılmıştır. FSB'nin STAT3, AKT ve p38 MAPK'yı etkisiz hale getirerek LPS'nin neden olduğu inflamatuvar süreçleri inhibe ettiği ve ardından murin makrofajlarında NF-KB ve AP-1'in transkripsiyonel aktivitelerini baskıladığı rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, FSB'nin inflamatuvar ve metabolik hastalıkların tedavisi için potansiyel bir terapötik olarak kullanılabileceğini göstermektedir (228). *L. capillipes* Hemsl. capilliposide'nin analjezik ve antiinflamatuvar aktivitelerinin araştırıldığı bir hayvan modelindeki mekanistik çalışmalar, antiinflamatuvar etkinin MDA, PGE2, TNF- α , COX-1 ve COX-2 üretiminin inhibisyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (229). Diyetle

indüklenerek yağlı karaciğer iltihabı oluşturulan fareler ile ilgili bir çalışmada, *L. vulgaris* ekstresinin hepatik lipid birikimini iyileştirmesinin yanısıra antioksidatif ve antiinflamatuvar etkiler gösterdiği bildirilmiştir (230). Flavonoidlerin ve fenolik asitlerin (sinapik asit, kersetin, luteolin gibi) anlamlı derecede antiinflamatuvar etki gösterdiği ve böylece yara iyileşmesini desteklediği bilinmektedir (89, 90, 226, 231, 232, 233, 234, 235, 236). Tez kapsamında elde edilen biyolojik aktivite sonuçları ile antiinflamatuvar sonuçlar paralellik göstermektedir ve bu sonuçlar bitkilerin yara iyileştirme potansiyelinin yüksek olduğu sonucunu desteklemektedir.

Hidroksiprolin miktarı kolajen molekülünün saptanmasında önemli bir parametredir. Hidroksiprolin düzeylerinin yüksek olması, yara alanında kolajen miktarını artırarak yara iyileşmesine katkı sağlar (89, 90). Bu durum yara iyileşmesinin gerçekleştiğinin önemli bir kanıtıdır. Bu tez kapsamında, hidroksiprolin miktarı en düşük seviyede kontrol grubunda gözlenmiştir ($8.896 \pm 0.150 \mu\text{g.mL}^{-1}/\text{mg doku}$). Ekstre grupları kendi aralarında kıyaslandığında, LVESE-2 ve LVUSE-2 gruplarında hidroksiprolin miktarının en yüksek seviyede olduğu saptanmıştır. Pozitif kontrol grubu ($14.336 \pm 1.431 \mu\text{g.mL}^{-1}/\text{mg doku}$), kontrol grubuna göre daha iyi aktivite sergilerken, LVESE-2 ve LVUSE-2 gruplarından daha düşük aktivite göstermiştir. Ekstre gruplarında ve pozitif grupta hidroksiprolin düzeylerinin yüksek olması yaraların erken kapanmasının nedenlerinden biri olduğu söylenebilir.

Yara bölgesinde mikroorganizmaların çoğalması sonucu deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ortaya çıkabilmektedir. Aynı zamanda bu mikroorganizmalar, anjiyogeneze gecikmelere ve inflamasyon fazı olmak üzere yara iyileşme süreçlerinde gecikmelerin yaşanmasına neden olabilmektedir. Özellikle gram pozitif bakteriler deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının başlıca etkenleridir. Bu bakterilerin tedavi edilmesi ile yara bölgesinin daha düzenli ve sağlıklı bir şekilde iyileşmesi sağlanabilir (145, 146, 147, 148, 153). Bu amaçla, antimikrobiyal aktivite çalışmaları ile türlerin yara iyileşmesine katkı sağlayıp sağlamadıkları incelenmiştir. Bitkilerin su ekstrelerinin gram pozitif bakterilerden *S. aureus*, *E. faecalis* ve *B. cereus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *S. aureus*, *E. faecalis* ve *B. cereus* inhibisyon çapları sırasıyla 12, 10 ve 12 mm olarak bulunmuştur. Türler, *C. albicans* mantarına karşı aktivite sergilemiştir ve inhibisyon çapı 12 mm olarak bulunmuştur.

L. vulgaris L.'nin antibakteriyel, antitümör, antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşenlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, türün gram pozitif bakterilerin (*S. aureus*, *S. epidermidis* ve *Streptococcus pyogenes*) neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için potansiyel bir kaynak olabileceği rapor edilmiştir (17). *L. clethroides* Duby kök ekstrelerinin metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) karşı antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan bir araştırmanın sonucunda ekstrelerin ve n-heksan fraksiyonunun MRSA üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve sinerjistik etkiyi artırdığı belirlenmiştir (237). *L. foenum-graecum* Hance ekstresinden sentezlenen gümüş nanopartiküllerin *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur (238). Csepregi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, *L. nummularia*'nın etanolik ekstreleri, *B. subtilis* ve *S. pyogenes* üzerinde orta düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (239). Literatür taramaları ve tez çalışmaları sonucunda edilen bilgiler ışığında, *Lysimachia* türlerinin potansiyel antimikrobiyal etkinliğinin olduğu sonucuna varılmıştır (17, 237, 238, 239). *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* su ekstrelerinin orta düzeyde antimikrobiyal aktivite sergileyerek yara iyileşmesine destek olduğu söylenebilir.

Yara bölgesinden salınan sitokinler aracılığı ile ekstraselüler matriks sentezi ve kolajen birikimi görülmektedir. Yara bölgesinde kolajen yapımının ve yıkımının bir denge içinde olması yara iyileşmesine katkı sağlamaktadır. Yara debridmanı için kullanılan eksojen enzimlerden biri olan *C. hystolyticum*'dan fermentasyon yoluyla ekstrakte edilen kolajenaz clostridipeptidase A'dır. Bakteriyel kolajenaz, tüm ana kolajen tipleri için yüksek afiniteye sahiptir ve enzimatik yöntemle yara bölgesindeki nekrotik dokunun temizlenmesinde, granülasyon dokusu oluşumunun artırılmasında, yaranın yeniden epitelizasyonunu kolaylaştırmasında ve patolojik skar oluşumunun önlenmesinde faydalı bir matriks metaloproteinazdır (240, 241). Dokuda ileri derecede tahrip edici gücü olan kolajenazlar hasar görmüş dokuların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır, ancak aynı zamanda yeni oluşturulan bağ dokusunun da yıkımına neden olabileceği için kontrol altına alınması gereklidir. Bu amaçla, yaraların düzgün ve hızlı bir şekilde iyileşebilmesi için kolajenaz enzim inhibisyonu etkisine sahip doğal kaynaklı ekstrelerden veya bileşiklerden faydalanılabilir (89). Bu amaçla, türlerin iyileşme sürecine olan katkısını belirleyebilmek için kolajenaz enzim inhibisyonu çalışmaları yapılmıştır. *L. verticillaris* ve *L. vulgaris*'in kolajenaz enzim inhibisyonları sırasıyla 34.674 ± 2.055 ve 43.652 ± 2.494 µg/mL olarak bulunmuştur. Standart olarak kullanılan kateşin ile bitkiler karşılaştırıldığında, kateşine yakın değerler elde edilmiştir. Taçyıldız ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada,

kolajenazın yara iyileşme süreçlerine olan etkisi incelenmiş ve açık yara tedavisinde kolajenazın yara iyileşmesini hızlandırdığı, temiz granülasyon dokusunun oluşumunu sağladığı, fibroblastik ve miyofibroblastik aktivasyon ile düzenli bir kolajen artışına neden olduğu tespit edilmiştir (242). Ratlarda yanık yaralarının iyileşmesi üzerine kolajenaz ve silver sulfadiazine'in etkilerinin karşılaştırılması ile ilgili bir çalışmada, kolajenaz merhem uygulamasının rat modelinde deri yanıklarının iyileşmesi üzerinde anlamlı derecede etkili olduğu belirlenmiştir (243). Fenolik ve flavonoit bileşenlerin kolajenaz enzimi üzerinde etkili olduğu literatür taramalarında görülmüştür (89, 244, 245). Yara alanındaki kolajen miktarındaki artış, bitki ekstraktlarının yara iyileşmesine yardımcı olduğunu göstermiştir.

Yara bölgesindeki sitokinler aynı zamanda melanositleri uyatarak hiperpigmentasyon sorunlarına neden olabilir. Yara oluşumunu takiben iyileşme süreçlerinde görülen pigmentasyon sorunlarının giderilmesinde tirozinaz enzimi aktif rol oynamaktadır (90). Bu durumu incelemek için tirozinaz enzim inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *L. verticillaris* ve *L. vulgaris*'in tirozinaz enzim inhibisyonları sırasıyla 68.013 ± 4.111 ve 122.440 ± 3.682 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Kojik asitle karşılaştırma yapılmış, türlerin orta düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, türlerin yara iyileşme süreçlerinin düzgün olarak devam etmesine katkı sağladığı söylenebilir.

TNF- α ve IL-1 β akut inflammatuar yanıtı başlatan en önemli sitokinler arasında yer almaktadır. Bu sitokinlerde yara oluşumun sürecinin ilk günlerinde oluşabilecek bir azalma, yara iyileşmesinin başlaması için gerekli hücre toplanmasını ve fonksiyon görmesini engelleyebilir, hatta iyileşme sürecini uzatabilir (90, 225). Aksine, proliferatif evrede azalan TNF- α düzeyi yara iyileşmesi sürecine olumlu katkı sağlar. Hücre dışı matriks proteinlerini parçalayan MMP'lar yara iyileşmesinde önemli bir rol oynamaktadır. TNF- α düzeylerinin yara iyileşme süreci boyunca artması MMP'ları aktive eder ve bu durum hücre dışı matriksin sentezini engelleyerek yara onarımına zarar verebilir (225, 246). Aynı zamanda IL-1, yeniden şekillenme aşamasında da etki göstererek yara iyileşmesine katkı sağlar. Antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 ise, TNF- α aktivitesinin azalmasına neden olarak onarım sürecindeki olumsuzlukların kontrol altına alınmasını sağlar. IL-1, T lenfositlerin aktivasyonunu ve yara yerine lokosit migrasyonunu artırırken, IL-10 tam tersi bir etki gösterir (90, 225). Normal yara iyileşmesi boyunca sitokinlerin salınımı ile MMP-9 ekspresyonunda artış gözlenir ve zaman içinde MMP-9 seviyesi

kademeli olarak azalır. Kronikleşmiş bir yarada ise sürekli yüksek MMP-9 seviyesi, iyileşmenin gecikmesine neden olabilir. Kronik bir yarada iyileşmenin gerçekleşebilmesi için MMP seviyelerinde azalma olması gerekir. Fakat MMP-9 seviyesinin çok düşük olması, kolajen üretimini artırarak gereksiz doku onarımına da sebep olabilir (247, 248). Yara iyileşmesi süresince birçok sitokin görev alır ve bu sitokinler bir denge içinde yara iyileşmesini düzenleyebilir. Bu bilgiler ışığında, çalışmada, RT-PCR aracılığı ile yara dokusundaki TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve MMP-9 genlerinin düzeyleri belirlenerek yara iyileşmesine katkısı araştırılmıştır.

TNF reseptörü p55 eksikliği olan farelerde yapılan bir çalışmada, kolajen ve anjiyogenez birikimini artırdığı ve böylece yara iyileşmesini hızlandırdığı öne sürülmüştür (249). *Elaeagnus angustifolia* (EA) su ekstrelerinin yara iyileşmesi üzerine etkisinin incelendiği bir RT-PCR çalışmasında, EA ile muamele edilen grupta hem mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ekspresyonunu hem de TNF- α 'nın protein seviyesini azalttığı ortaya konulmuştur. TNF- α düzeyinin azalması ile yara iyileşmesinin hızlandığını ve bu durumun ekstrenin flavonoit ve terpenoit içeriğinden kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, ekstrenin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olmasının TNF- α ekspresyonunu azaltabileceği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada TNF- α 'nın kolajen geninin transkripsiyonunu azalttığı ve iyileşme sürecine olumsuz katkı sağladığı da belirtilmiştir. (246). Bu çalışmalar incelendiğinde, azalan TNF- α düzeyinin, yara iyileştirme potansiyeline önemli bir katkı sağladığı fikri desteklenmiştir. Yan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, diyabetik kornealarda IL-1 β seviyesinin yükselerek IL-1 reseptör antagonistinin (IL-1Ra) baskılandığını ve bu durumun IL-1 β ile IL-1Ra seviyelerindeki bir dengesizliğe neden olarak kornea epitelyal yara iyileşmesini geciktirdiğini bildirmişlerdir (250).

Çalışmamızda, ekstrelerin TNF- α , IL-1 β ve MMP-9 seviyelerini azalttığı IL-10 seviyesini artırdığı gözlenmiştir, fakat pozitif kontrol olarak kullanılan Madecassol® grubu kadar etkili olmadığı da belirlenmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmamakla beraber, TNF- α düzeyinin LVUSE-2 grubunda oldukça azalmış olduğu ve Madecassol® grubuna yakın bir değer gösterdiği bulunmuştur. IL-1 β ve MMP-9 seviyelerinin en düşük olduğu ekstre grubu LVESE-2'dir. IL-10 seviyesi en yüksek LVUSE-2 grubunda görülmüştür. Veriler incelendiğinde, sitokinlerin bir denge içinde yara iyileşmesine katkı

sağladığı söylenebilir. Aynı zamanda, elde edilen bu sonuçlar ile antiinflamatuvar kit çalışmaları ile elde edilen sonuçlar uyumlu bulunmuştur.

Bitkilerin fenolik içeriğinin belirlenmesi için YPSK çalışmaları yapılmıştır. *L. verticillaris*'in içeriğinde şiringaldehit, sinapik asit ve benzoik asit tespit edilirken, *L. vulgaris*'in içeriğinde sinapik asit, benzoik asit tespit edilmiştir. Birçok çalışmada *Lysimachia* türlerinin zengin fenolik ve flavonoit içeriğe sahip olduğu belirtilmiştir (8, 9, 10, 13, 17, 31). Bazı araştırmalara göre *Lysimachia* türlerinin başlıca flavonoit aglikonları kemferol, kersetin ve mirsetin olarak tanımlanmıştır (223, 251, 252). *L. verticillaris*'in izolasyonu üzerine yapılan bir çalışma sonucunda etil asetat fraksiyonundan gallik asit, kateşin, mirsetin ve kersetin türevleri izole edilmiştir (8). Bazı tıbbi bitkilerin antikanser ve fenolik içeriklerinin incelendiği bir çalışmada, *L. vulgaris* bitkisinin gallik asit monohidrat, kafeik asit, kersetin-3-rutinozit, luteolin 7-O- β -D glukozit, kemferol, mirsetin, kersetin, apigenin gibi fenolik maddeler içerdiği tespit edilmiştir (12). *L. nummularia* ve *L. vulgaris* polifenolik içeriğinin incelendiği bir çalışmada, *p*-kumarik asit, izokersitrin, kersitrin, kersetin, luteolin iki bitkide de görülürken, kersetin-3-rutinozit sadece *L. nummularia*'da ve klorojenik asit, hiperozit, rutozit, kemferol, apigenin ise sadece *L. vulgaris*'te bulunmuştur. *L. vulgaris*'in, zengin polifenol içeriği ile daha yüksek bir antioksidan aktivite sergilediği belirtilmiştir (223). Fenolik içerikleri ile antioksidan kapasiteleri arasında bir uyum olduğu ve antioksidan etkinin de yara iyileşmesi süreçlerine olumlu katkı sağladığı söylenebilir (90). YPSK sonuçları incelendiğinde sinapik asit seviyesinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Sinapik asitin antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel gibi bilinen etkileri ile yara iyileşmesinin hızlı ve düzgün bir şekilde ilerlemesinin mümkün olduğu düşünülmektedir (230, 231, 232, 253, 254, 255). Bitkilerin içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları ile uyum gösterdiği ve bu sayede yara iyileşmesi üzerine olumlu etki gösterdiği fikri desteklenmiştir.

Mekanizma aydınlatma çalışmalarında HO-1 içeriğini belirlemek için su ekstraktları ve kontrol grubu karşılaştırılmıştır. *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* arasında anlamlı bir farklılık olmamakla beraber, bitki ekstraktları muamele edilen hücrelerde HO-1 içeriği konsantrasyon arttıkça artış göstermiştir. Sıçanlarda bleomisin kaynaklı akciğer hasarına karşı sinapik asitin etkisinin incelendiği bir çalışmada, sinapik asitin, apoptozun inhibisyonu ve nükleer faktörü kappa B (NF- κ B) inhibisyonu yoluyla (nükleer faktör eritroid 2) Nrf2 ve HO-1 aracılı antioksidan enzimin indüklenmesi yoluyla bleomisin

neden olduğu akciğer yaralanmalarını iyileştirdiği rapor edilmiştir (256). Sinapik asit ile yapılan başka bir çalışma, sinapik asitin SOD, GPx ve CAT'ın gen ekspresyonunu düzenleyerek, Nrf2/HO-1'i regüle ettiğini ve böylece oksidatif stres ile streptozotosin kaynaklı diyabetik nöropatinin ilerlemesini hafiflettiğini göstermektedir (257). Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, kersetinin hem mRNA hem de protein seviyelerinde HO-1 ekspresyonunu önemli ölçüde uyardığı belirtilmiştir (258). Luteolin kaynaklı HO-1 ekspresyonu ile oksidatif stres baskılanması ile ilgili bir çalışmada, luteolinin apoptozu önlediği, HO-1'in ekspresyonunu arttırdığı ve H₂O₂ kaynaklı oksidatif sitotoksositeye karşı koruyucu etkisinin olduğu vurgulanmıştır (259). Bu bilgiler göz önüne alındığında, bitkilerin içeriğinde bulunan bileşiklerin etkisi ile HO-1 mekanizması üzerinden yara iyileşmesine yardımcı olduğu söylenebilir.

COX-2 yüzde inhibisyonu çalışmalarında bitki ekstrelerinin konsantrasyonu arttıkça hücrelerde COX-2 yüzde inhibisyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, bitki ekstrelerinin COX-2 enzimi inhibe edici etkisi ile yara iyileşmesine katkı sağladığına bir kanıttır. Yun ve arkadaşları, sinapik asitin COX-2 seviyelerini doza bağlı bir şekilde azalttığını ortaya koymuşlardır (260). Huang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sinapik asitin IL-1 β kaynaklı NO ve PGE₂ üretimini engelleyebileceği, aynı zamanda iNOS ve COX-2'nin artan protein seviyelerini de inhibe edebileceği belirtilmiştir (261). YPSK çalışmalarında bitkilerin içeriklerinde sinapik asit'in bol miktarda bulunması COX-2 seviyelerine etki ederek yara iyileşmesinin inflamatuvar fazına katkı sağladığı söylenebilir.

NO içeriğini belirlemek için bitki ekstreleri ve pozitif kontrol (indometasin) grubu ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, indometasin konsantrasyonu arttıkça NO içeriği azalmıştır. Bitki ekstrelerinin konsantrasyonu arttıkça NO içeriğinin de azaldığı görülmüştür. *L. vulgaris*'e göre *L. verticilaris*'teki azalış indometasin kadar etkili olmuştur. Kersetin ile ilgili yapılmış bir çalışmada, lipopolisakkarit tarafından aktive edilen RAW264.7 makrofaj hücrelerinde İNOS kaynaklı NO üretiminin önemli ölçüde inhibe edildiği saptanmıştır (234). Lin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada luteolinin, makrofajlarda lipopolisakkarit kaynaklı NO üretiminin baskılandığı belirtilmiştir (235). Sinapik asitin antiinflamatuvar potansiyelinin ve altta yatan mekanizmanın araştırıldığı bir çalışmada, sinapik asitin lipopolisakkarit ile indüklenen NO, COX-2, TNF- α ve IL-1 β seviyelerini doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği belirtilmiştir (260). Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sinapik asitin, kolajen II, MMP-9 ve MMP-13, iNOS, COX-2 aşırı üretimini tersine çevirdiği rapor edilmiştir (262). Başka bir çalışmada, sinapik asitin

koruyucu mekanizmasının, antioksidan ve inflamatuvar aktivitesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca sinapik asitin, proinflamatuvar sitokinlerin ve inflamatuvar belirteçlerin (TNF- α gibi) salınımını önlediği, antioksidan savunma enzimlerini regüle ettiğini ve lipid peroksidasyonu ve NO üretimini de azalttığı rapor edilmiştir (257). Yapılan literatür taramalarında ve YPSK çalışmalarında bitkilerin kersetin, luteolin ve sinapik asit gibi bileşenleri içermesi sebebiyle NO üretimini önemli ölçüde baskıladığı ve bu şekilde yara iyileşmesine katkı sağladığı düşünülmektedir.

Bu tez kapsamında, *L. verticillaris* ve *L. vulgaris* su ekstreleri ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile türlerin yara iyileştirme potansiyellerinin oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, yara iyileştirme potansiyellerin altında yatan olası mekanizmalar da aydınlatılmıştır. Aynı zamanda, bu tez çalışması ile bitkilerinin *in vivo* yara iyileştirme potansiyeli, olası altta yatan mekanizmalarının aydınlatılması, etkili olan genlerin RT-PCR ile belirlenmesi ve kolajenaz enzim inhibisyonu adına yapılan ilk çalışma olarak özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Bitkilerin yan etkisi az, doğal kaynaklı ve yerli ilaç geliştirilmesi amacı ile kullanımında önünün açık olduğu düşünülmektedir. Yapılacak prelinik ve toksikolojik çalışmalar ile yara iyileşmesi için alternatif doğal kaynaklı ilaç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Namdeo AG (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews* 1(1): 69-79.
2. Akula R, Ravishankar GA (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6(11): 1720-1731.
3. Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1(1): 13-25.
4. Islam S, Alam MB, Ahmed A, Lee S, Lee SH, Kim S (2020). Identification of secondary metabolites in *Averrhoa carambola* L. bark by high-resolution mass spectrometry and evaluation for α -glucosidase, tyrosinase, elastase, and antioxidant potential. *Food Chemistry* 332: 127377.
5. Pan SY, Zhou SF, Gao SH, Yu ZL, Zhang SF, Tang MK, Sun JN, Ma DL, Han YF, Fong WF, Ko KM (2013). New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1-25.
6. Shivatare RS, Musale R, Lohakare P, Patil D, Choudhary D, Ganu G, Hagore DH, Kewatka SM (2020). Isolation, identification and characterization of ximenynic acid with anti-aging activity from *Santalum album*. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* 11(2): 1394-1399.
7. Baytop T (1984). Türkiye'de bitkiler ile tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3255, İstanbul; Sayfa: 1984: 420.
8. Şener SÖ (2014). *Lysimachia verticillaris* üzerinde farmakognozik araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakonozi Anabilim Dalı, Trabzon.
9. Özgen U, Şener SÖ, Šmejkal K, Vaclavik J, Deniz FSŞ, Orhan İE, Svajdlenka E, Gören AC, Žemlička M (2020). Cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential and antioxidant capacity of *Lysimachia verticillaris* L. and isolation of the major compounds. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 17(5): 528.

10. Podolak I, Elas M, Cieszka K (1998). *In vitro* antifungal and cytotoxic activity of triterpene saponosides and quinoid pigments from *Lysimachia vulgaris* L. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 12(1): 70-73.
11. Baytop T (1999). *Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present)*. Istanbul, Turkey: Nobel Medical Book house 1999.
12. Karakas FP, Yidirim AB, Bayram R, Yavuz MZ, Gepdiremen A, Turker AU (2015). Antiproliferative activity of some medicinal plants on human breast and hepatocellular carcinoma cell lines and their phenolic contents. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 14(10): 1787-1795.
13. Li HY, Hao ZB, Wang X, Huang L, Li JP (2009). Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresource Technology* 100: 970-974.
14. Tóth A, Riethmüller E, Alberti Á, Végh K, Kéry Á (2012). Comparative phytochemical screening of phenoloids in *Lysimachia* species. *European Chemical Bulletin* 1(1-2): 27-30.
15. Kızılarıslan Ç, Özhatay N (2012). Wild plants used as medicinal purpose in the south part of İzmit (northwest Turkey). *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 9(2): 199-218.
16. Podolak I, Koczurkiewicz P, Michalik M, Galanty A, Zajdel P, Janeczko Z (2013). A new cytotoxic triterpene saponin from *Lysimachia nummularia*. *Carbohydrate Research* 375: 16-20.
17. Yildirim AB, Guner B, Karakas FP, Turker AU (2017). Evaluation of antibacterial, antitumor, antioxidant activities and phenolic constituents of field-grown and in vitro-grown *Lysimachia vulgaris* L. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 14(2): 177-187.
18. Hess CT (2011). Checklist for factors affecting wound healing. *Advances in Skin and Wound Care* 24(4): 192.

19. Campos AC, Groth AK, Branco AB (2008). Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 11: 281-288.
20. Khalil EA, Afifi FU, Al-Hussaini M (2007). Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). *Journal of Ethnopharmacology* 109: 104-112.
21. Şener SÖ, Badem M, Özgen U, Korkmaz N, Kanbolat Ş, Kerimoğlu G, Aliyazıcıoğlu R, Yenilmez E, Karaoğlu ES (2022). Antidiabetic and antioxidant effect of the aerial parts of *Lysimachia verticillaris* and its isolated phenolic compounds on Streptozotocin-induced diabetic rats. *Bezmialem Science* 10(4): 434-441.
22. Leblebici E. *Lysimachia L.* in flora of Turkey and the East Aegean Islands (edited by P.H. Davis). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press. 1978; 6: 135-138.
23. Liu Y-l, Tang LH, Liang ZQ, You BG, Yang SL (2010). Growth inhibitory and apoptosis inducing by effects of total flavonoids from *Lysimachia clethroides* Duby in human chronic myeloid leukemia K562 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 131: 1-9.
24. Lee JO, Chang K, Kim Y, Jung SH, Lee SW, Oak MH (2010). *Lysimachia clethroides* extract promote vascular relaxation via endothelium-dependent mechanism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 55: 481-488.
25. Moon JY, Yim EY, Song G, Lee NH, Hyun CHG (2010). Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *EurAsian Journal of BioSciences* 4: 41-53.
26. Huang X-A, Shen X-L, Hu Y-J, Liu Y-M, Liu K-L, Zhang F-X, Zhou X-X (2011). Two new triterpenoids from *Lysimachia heterogenea* Klatt and evaluation of their cytotoxicity. *Molecules* 16: 8076-8082.
27. Wang J, Zhang Y, Zhang Y, Cui Y, Liu J, Zhang B (2012). Protective effect of *Lysimachia christinae* against acute alcohol-induced liver injury in mice. *BioScience Trends* 6: 89-97.

28. Seo JB, Park SW, Choe SS, Jeong HW, Park JY, Choi EW, Seen DS, Jeong JY, Lee TG (2012). Foenumoside B from *Lysimachia foenum-graecum* inhibits adipocyte differentiation and obesity induced by high-fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 471: 800-806.
29. Wei JF, Li YY, Yin ZH, Gong F (2012). Antioxidant activities *in vitro* and hepatoprotective effects of *Lysimachia clethroides* Duby on CCl₄-induced acute liver injury in mice. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(10): 743-750.
30. Zhengchun H, Fengjie L, Jing L, Yuanjiang P (2013). Cytotoxic triterpenoids from *Lysimachia parvifolia*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 67: 390-397.
31. Toth A, Toth G, Kery A (2014). Polyphenol composition and antioxidant capacity of three *Lysimachia* species. *Natural Product Communications* 9(10): 1473-1478.
32. Wang Z, Hwang SH, Lim SS (2017). Characterization of DHDP, a novel aldose reductase inhibitor isolated from *Lysimachia christinae*. *Journal of Functional Foods* 37: 241-248.
33. Dai LM, Huang RZ, Zhang B, Hua J, Liao HB, Wang HS, Liang D (2017). Three new triterpenoid saponins from the aerial parts of *Lysimachia foenum-graecum*. *Phytochemistry Letters* 22: 133-137.
34. Burns T, Rook A (2010). Chapter 4: function of the skin. Burns T (Ed.), *Rook's Textbook of Dermatology*, 1-11. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444317633.ch4>
35. Hussain SH, Limthongkul B, Humphreys TR (2013). The biomechanical properties of the skin. *Dermatologic Surgery* 39(2): 193-203.
36. Goodwin C (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* 3(4): 203-213.
37. Fumakia M (2016). Topical nanomedicine for the combination delivery of immuno-modulatory peptides for accelerated chronic wound healing and anti-bacterial activity. Master of Science, College of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba.

38. Anatomy and physiology. (2019). Chapter 5: the integumentary system: layers of the skin [online]. Available from: <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/5-1-layers-of-the-skin/>. [Accessed 9 September 2019].
39. Pereira IO (2011). Design and construction of a decellularization cell. Mestrado Integrado em Bioengenharia, Faculdade de Engenharia, Porto.
40. Ekmekçi P, Bostancı S (2002). Yara iyileşmesi. T Klin Dermatoloji 12(2): 114-120.
41. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA (2013). Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. Cellular and Molecular Life Science 70(12): 2059-2081.
42. Sentürk N (2013). Kütanöz inflamasyon/Cutaneous inflammation. Turkderm 47(1): 28.
43. Werner S, Grose R (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiological Reviews 83(3): 835-870.
44. Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP (2010). Scarless fetal wound healing: a basic science review. Plastic and Reconstructive Surgery 126(4): 1172.
45. MacKay DJ, Miller AL (2003). Nutritional support for wound healing. Alternative Medicine Review 8(4).
46. George Broughton II, Janis JE, Attinger CE (2006). The basic science of wound healing. Plastic and Reconstructive Surgery 117(7): 12-34.
47. Li J, Chen J, Kirsner R (2007). Pathophysiology of acute wound healing. Clinics in Dermatology 25: 9-18.
48. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. Journal of International Medical Research 37(5): 1528-1542.
49. Pandith H, Zhang X, Liggett J, Min KW, Gritsanapan W, Baek SJ (2013). Hemostatic and wound healing properties of *Chromolaena odorata* leaf extract. ISRN Dermatology 1-8.

50. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA (2002). Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 296(5567): 539-41.
51. Gonzalez ACDO, Costa TF, Andrade ZDA, Medrado ARAP (2016). Wound healing- A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 91(5): 614-620.
52. Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE (2000). Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *The Journal of Immunology* 165(1): 435-441.
53. Demirer E, Ayten Ö, Taş D. (2014). Anjiyogenez ve anti-anjiyogenik tedaviler. *Journal Clinical and Analytical Medicine* 5(1): 75-79.
54. Calin MA, Coman TOMA, Calin MR (2010). The effect of low level laser therapy on surgical wound healing. *Romanian Reports in Physics* 62(3): 617-627.
55. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* 123(24): 4195-4200.
56. Harburger DS, Calderwood DA (2009). Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science* 122(2): 159-163
57. Xian X, Gopal S, Couchman JR (2010). Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell and Tissue Research* 339(1): 31.
58. Şensoy E, Öznurlu Y (2009). Hücre adezyon molekülleri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 4(1): 57-68.
59. Raman R, Sasisekharan V, Sasisekharan R (2005). Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chemistry & Biology* 12(3): 267-277.
60. Guo SA, DiPietro LA (2010). Factors affecting wound healing. *Journal Dental Research* 89(3): 219-229.
61. Semenza GL (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes & Development* 14(16): 1983-1991.
62. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic Surgery* 34(9): 1159-1169.
63. Kalliainen LK, Gordillo GM, Schlanger R, Sen CK (2003). Topical oxygen as an adjunct to wound healing: a clinical case series. *Pathophysiology* 9(2): 81-87.

64. Healy B, Freedman A (2006). Infections. *Bmj* 332(7545): 838-841.
65. Edwards R, Harding KG (2004). Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17(2): 91-96.
66. Deodhar AK, Rana RE (1997). Surgical physiology of wound healing: a review. *Journal of Postgraduate Medicine* 43(2): 52.
67. Gilliver SC, Ashworth JJ, Ashcroft GS (2007). The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clinical Dermatology* 25(1): 56-62.
68. Hardman MJ, Ashcroft GS (2008). Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biology* 9(5): 1-17.
69. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW (1997). Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model. *Journal of Investigative Dermatology* 108: 430-437.
70. Gosain A, DiPietro LA (2004). Aging and wound healing. *World Journal of Surgery* 28(3): 321-326.
71. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA (2001). Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *Journal of Investigative Dermatology* 117(5): 1027-1035.
72. Lavker RM, Zheng PS, Dong G (1987). Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *Journal Investigative Dermatology* 88: 44-51.
73. Vileikyte L (2007). Stress and wound healing. *Clinics in Dermatology* 25: 49-55.
74. Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Malarkey WB, Mercado AM, Glaser R (1995). Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet* 346: 1194-1196.
75. Marucha PT, Kiecolt-Glaser JK, Favagehi M (1998). Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosomatic Medicine* 60(3): 362-365.
76. Sternberg EM (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews Immunology* 6(4): 318-328.

77. Godbout JP, Glaser R (2006). Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *Journal Neuroimmune Pharmacology* 1(4): 421-427.
78. Brem H, Tomic-Canic M (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 117(5): 1219-1222.
79. Wilson JA, Clark JJ (2003). Obesity: impediment to wound healing. *Critical Care Nursing Quarterly* 26(2): 119-132.
80. Szabo G, Mandrekar P (2009). A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 33(2): 220-232.
81. Ahn C, Mulligan P, Salcido RS (2008). Smoking-the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences. *Advances in Skin and Wound Care* 21(5): 227-238.
82. Arnold M, Barbul A (2006). Nutrition and wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117(7): 42-58.
83. Shepherd AA (2003). Nutrition for optimum wound healing. *Nursing Standard* 18(6): 55-58.
84. McDaniel JC, Belury M, Ahijevych K, Blakely W (2008). Omega-3 fatty acids effect on wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 16(3): 337-345.
85. Shingel KI, Faure MP, Azoulay L, Roberge C, Deckelbaum RJ (2008). Solid emulsion gel as a vehicle for delivery of polyunsaturated fatty acids: implications for tissue repair, dermal angiogenesis and wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2(7): 383-393.
86. Houghton PJ, Hylands PJ, Mensah AY, Hensel A, Deters AM (2005). In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology* 100(1-2): 100-107.
87. Ndlovu G, Fouche G, Tselanyane M, Cordier W, Steenkamp V (2013). *In vitro* determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13(1): 304.

88. Acıkara OB, İlhan M, Kurtul E, Šmejkal K, Akkol EK (2019). Inhibitory activity of *Podospermum canum* and its active components on collagenase, elastase and hyaluronidase enzymes. *Bioorganic Chemistry* 93: 103330.
89. Süntar İ (2011). Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici amaçla kullanılan bazı bitkilerin aktiviteleri üzerinde araştırmalar. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara.
90. Korkmaz N (2020). Sıçanlarda oluşturulan yara modelinde *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* bitki ekstresinin biyolojik aktivitesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
91. Süntar İ, Baldemir A, Coşkun M, Keleş H, Akkol EK (2011). Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* 135(1): 63-70.
92. Sumitra M, Manikandan P, Suguna L (2005). Efficacy of *Butea monosperma* on dermal wound healing in rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37(3): 566-573.
93. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4(8): 118-126.
94. Halliwell B (1991). Drug antioxidant effects. *Drugs* 42(4): 569-605.
95. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5(1): 9-19.
96. Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 54(3): 176-186.
97. Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczuk A, Oniszczuk T, Waksmundzka-Hajnos M (2016). The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer’s Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 78: 39-49.
98. Sridevi G, Srividya S, Sembulingam K, Sembulingam P (2018). An evaluation of in vitro and in vivo free radical scavenging and antioxidant potential of ethanolic extract of *Pergularia daemia*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 15: 131-137.

99. Sato H, Shibata M, Shimizu T, Shibata S, Toriumi H, Ebine T, Kuroi T, Iwashita T, Funakubo M, Kayama Y, Akazawa C, Wajima K, Nakagawa T, Okano H, Suzuki, N (2013). Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience* 248: 345-358.
100. Patlevič P, Vašková J, Švorc Jr P, Vaško L, Švorc P (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integrative Medicine Research* 5(4): 250-258.
101. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki, I (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta* 436: 332-347.
102. Chiurchiu V, Maccarrone M (2011). Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 15(9): 2605-2641.
103. Giles GI, Tasker KM, Jacob C (2001). Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 31(10): 1279-1283.
104. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44(4): 275-295.
105. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2): 89.
106. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(11): 4405-4409.
107. Glasauer A, Chandel NS (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* 92(1): 90-101.
108. Harris ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes 1. *The FASEB Journal* 6(9): 2675-2683.
109. Younus H (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International Journal of Health Sciences* 12(3): 88.
110. Aksoy Y, Balk M, Ogus H, Ozer N (2005). The mechanism of inhibition of human erythrocyte catalase by azide. *Turkish Journal of Biology* 28(2-4): 65-70.

111. Goyal MM, Basak A (2010). Human catalase: looking for complete identity. *Protein & Cell* 1(10): 888-897.
112. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology* 296(1): 295-309.
113. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M (2008). Glutathione peroxidase family-an evolutionary overview. *The FEBS Journal* 275(15): 3959-3970.
114. Deponte M (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830(5): 3217-3266.
115. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 15(7): 1957-1997.
116. Gupta RK, Singh N (2013). *Morinda citrifolia* (Noni) alters oxidative stress marker and antioxidant activity in cervical cancer cell lines. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention* 14(8): 4603-4606.
117. Donaldson MS (2004). Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal* 3(1): 19.
118. Arun M, Satish S, Anima P (2013). Herbal boon for wounds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(2): 1-12.
119. Koh TJ, DiPietro LA (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 13.
120. Pierce GF (2001). Inflammation in nonhealing diabetic wounds: the space-time continuum does matter. *The American Journal of Pathology* 159(2): 399.
121. Ahmed AU (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers Biology* 6(4): 274.
122. Aggarwal BB, Vijayalekshmi R V, Sung B (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research* 15(2): 425-430.

123. Eming SA, Krieg T, Davidson JM (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 127(3): 514-525.
124. Artuc M, Hermes B, Stckelings UM, Grützkau A, Henz BM (1999). Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing—active participants or innocent bystanders?. *Experimental Dermatology* 8(1): 1-16.
125. Jain P, Pandey R, Shukla SS (2015). Inflammatory mediators. Springer India (Ed.), *Inflammation: Natural Resources and Its Applications* 15-24. <http://www.springer.com/series/10916>
126. Harizi H, Corcuff JB, Gualde N (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine* 14(10): 461-469.
127. Futagami A, Ishizaki M, Fukuda Y, Kawana S, Yamanaka N (2002). Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Laboratory Investigation* 82(11): 1503-1513.
128. Banno T, Gazel A, Blumenberg M (2004). Effects of tumor necrosis factor- α (TNF α) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *Journal of Biological Chemistry* 279(31): 32633-32642.
129. McDermott MF (2001). TNF and TNFR biology in health and disease. *Cellular and Molecular Biology* 47(4): 619-636.
130. Zhang JM, An J (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International Anesthesiology Clinics* 45(2): 27.
131. Ren K, Torres R (2009). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews* 60(1): 57-64.
132. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 16(5): 585-601.
133. Rizk M, Witte M, Barbul A (2004). Nitric oxide and wound healing. *World Journal of Surgery* 28(3): 301-306.
134. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR (2002). Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?. *Nitric Oxide* 7(1): 1-10.

135. Tsui TY, Siu YT, Schlitt HJ, Fan ST (2005). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide stimulates adenosine triphosphate generation in human hepatocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336(3): 898-902.
136. Grochot-Przeczek A, Lach R, Mis J, Skrzypek K, Gozdecka M, Sroczynska P, Milena Dubiel M, Rutkowski A, Kozakowska M, Zagorska A, Walczynski J, Was H, Kotlinowski J, Drukala J, Kurowski K, Kieda C, Herault Y, Dulak J, Walczynski J (2009). Heme oxygenase-1 accelerates cutaneous wound healing in mice. *Plos One* 4(6): 5803.
137. Patil K, Bellner L, Cullaro G, Gotlinger KH, Dunn MW, Schwartzman ML (2008). Heme oxygenase-1 induction attenuates corneal inflammation and accelerates wound healing after epithelial injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49(8): 3379-3386.
138. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ (2000). Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 28(8): 1303-1312.
139. Pandey AK, Kuma S (2013). Perspective on plant products as antimicrobial agents: A review. *Pharmacologia* 4(7): 469-480. 132.
140. Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564-582.
141. Karou D, Nadembega WMC, Ouattara L, Ilboudo DP, Canini A, Nikiema JB, Simpore J, Colizzi V, Traore A (2007). African ethnopharmacology and new drug discovery. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 1: 61-69.
142. Silva NCC, Fernandes JA (2010). Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 16: 402-413.
143. Wasteson Y (2002). Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43(1): 79-84.
144. Pujol C, Bliska JB (2003). The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity* 71(10): 5892-5899.

145. Kaushik M, Niranjana R, Thangam R, Madhan B, Pandiyarasan V, Ramachandran C, Deog-Hwan G, Venkatasubbu GD (2019). Investigations on the antimicrobial activity and wound healing potential of ZnO nanoparticles. *Applied Surface Science* 479: 1169-1177.
146. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Simith JM, Murphy M, Spraat BG, Moore CE, Day NPJ (2003). How clonal is *Staphylococcus aureus*?. *Journal of Bacteriology* 185(11): 3307-3316.
147. Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, Baldassarri L (2004). Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology* 53(1): 13-20.
148. Chong KKL, Tay WH, Janela B, Yong AMH, Liew TH, Madden L, Keogh D, Barkham MS, Ginhoux F, Becker DL, Kline KA (2017). *Enterococcus faecalis* modulates immune activation and slows healing during wound infection. *The Journal of Infectious Diseases* 216(12): 1644-1654.
149. Bottone EJ (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 23(2): 382-398.
150. Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4(2) : 119-128.
151. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Gossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL (2002). Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerging Infectious Diseases* 8(2): 160-166.
152. Rather PN (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environmental Microbiology* 7(8): 1065-1073.
153. Sudheesh Kumar PT, Lakshmanan VK, Anilkumar TV, Ramya C, Reshmi P, Unnikrishnan AG, Nair SV, Jayakumar R (2012). Flexible and microporous chitosan hydrogel/nano ZnO composite bandages for wound dressing: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *ACS Applied Materials & Interfaces* 4(5): 2618-2629

154. Porter CT, Bartlett GJ, Thornton JM (2004). The catalytic site atlas: a resource of catalytic sites and residues identified in enzymes using structural data. *Nucleic Acids Research* 32: 129-133.
155. Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International* 1-18.
156. Kaur R, Sekhon BS (2012). Enzymes as drugs: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education & Research* 3(2): 29-41.
157. Saboury AA (2009). Enzyme inhibition and activation: a general theory. *Journal of the Iranian Chemical Society* 6(2): 219-229.
158. Thring TS, Hili P, Naughton DP (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9(1): 27.
159. Hartmann A, Gostner J, Fuchs JE, Chaita E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Ganzera M (2015). Inhibition of collagenase by mycosporine-like amino acids from marine sources. *Planta Medica* 81(10): 813.
160. Harrington DJ (1996). Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infection and Immunity* 64(6): 1885.
161. Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR, Nair BU (2007). Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *International Journal of Biological Macromolecules* 41(1): 16-22.
162. Alipour H, Raz A, Zakeri S, Djadid ND (2016). Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6(11): 975-981.
163. Visse R, Nagase, H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 92(8): 827-839.

164. Miller JD, Carter E, Hatch JrDC, Zhubrak M, Giovinco NA, Armstrong DG (2015). Use of collagenase ointment in conjunction with negative pressure wound therapy in the care of diabetic wounds: a case series of six patients. *Diabetic Foot & Ankle* 6(1): 24999.
165. Ågren MS, Taplin CJ, Woessner Jr JF, Eagistein WH, Mertz PM (1992). Collagenase in wound healing: effect of wound age and type. *Journal of Investigative Dermatology* 99(6): 709-714.
166. Apakkan Aksun S, Özmen D, Bayındır O (2001). Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 21(4): 332-342.
167. Sin BY, Kim HP. (2005). Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids. *Archives of Pharmacal Research* 28(10): 1152-1155.
168. Kang S, Chung JH, Lee JH, Fisher GJ, Wan YS, Duell EA, Voorhees JJ (2003). Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology* 120(5): 835-841.
169. Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A (2003). Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical Pharmacology* 65(12): 2065-2071.
170. Chi YS, Lim H, Park H, Kim HP (2003). Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: *in vivo* regulation of inflammation-associated gene expression. *Biochemical Pharmacology* 66(7): 1271-1278.
171. Barrantes E, Guinea M (2003). Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Sciences* 72(7): 843-850.
172. An BJ, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Park TS, Lee JT, Son JH, Jo C, Byun, MW (2005). Inhibition of enzyme activities and the antiwrinkle effect of polyphenol isolated from the persimmon leaf (*Diospyros kaki* folium) on human skin. *Dermatologic Surgery* 31: 848-855.

173. Kim YJ, Uyama H (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 707-1723.
174. Lee SY, Baek N, Nam TG (2016). Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(1): 1-13.
175. Karioti A, Protopappa A, Megoulas N, Skaltsa H (2007). Identification of tyrosinase c-inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15(7): 2708-2714.
176. Quispe YNG, Hwang SH, Wang Z, Lim SS (2017). Screening of peruvian medicinal plants for tyrosinase inhibitory properties: identification of tyrosinase inhibitors in *Hypericum laricifolium* Juss. *Molecules* 22(3): 402.
177. Calay, Ö (2010). Tirozinaz enziminin bazı tıbbi bitkiler tarafından inhibisyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
178. Matsuura R, Ukeda H, Sawamura M (2006). Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(6): 2309-2313.
179. Wu L, Chen C, Cheng C, Dai H, Ai Y, Lin C, Chung Y (2018). Evaluation of tyrosinase inhibitory, antioxidant, antimicrobial, and antiaging activities of *Magnolia officinalis* extracts after *Aspergillus niger* fermentation. *BioMed Research International*, 1-11.
180. Parvez S, Kang M, Chung HS, Bae H (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: Mechanism and applications in skin health, cosmetic and agriculture industries. *Phytotherapy Research* 21: 805-816.
181. Lim JY, Ishiguro K, Kubo I (1999). Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from Ginseng leaves. *Phytotherapy Research* 13(5): 371-375.
182. Kubo I, Kinst-Hori I (1999). Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(10): 4121-4125.
183. Badem M (2019). *Barbarea auriculata* var. *paludosa*, *B. integrifolia* ve *B. plantaginea* (Brassicaceae)'nın biyokimyasal, fitokimyasal ve biyolojik

aktivitelerinin araştırılması. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.

184. Lee HS (2002). Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(6): 1400-1403.
185. Chang TS (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. International Journal of Molecular Sciences 10(6): 2440-2475.
186. Schallreuter KU, Wood JW (1990). A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. Archives of Dermatological Research 282(3): 168-171.
187. Küçük ÖS (2018). Melazmada Güncel Tedavi Yaklaşımları. Bezmialem Science 6: 54-62.
188. Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Research 6(10): 995-1001.
189. Singh J, Birbian N, Sinha S, Goswami A (2014). A critical review on PCR, its types and applications. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences 1(7): 65-80.
190. Klug WS, Cummings MR (2002). Genetik kavramlar. Çeviren: Öner C, Palme Yayıncılık, Ankara, 514-525.
191. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M (2013). Polymerase chain reaction (PCR): a short review. Anwer Khan Modern Medical College Journal 4(1): 30-36.
192. Kahya S, Buyukcangaz E, Carlı KT (2013). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) optimizasyonu. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 32(1): 31-38.
193. Yılmaz S, Devran Z (2003). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları. Derim 20(1): 31-42.
194. Garibyan L, Avashia N (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). The Journal of Investigative Dermatology 133(3): 6.
195. Gachon C, Mingam A, Charrier B (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies?. Journal of Experimental Botany 55(402): 1445-1454.

196. Valasek MA, Repa JJ (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29(3): 151-159.
197. Okutucu B, Pehlivan S (2003). Reverz-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve uygulama alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 12(2): 138-148.
198. Kupiec T (2004). Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* 8: 223-227.
199. Höl A (2011). Bazı metal ve organometalik bileşiklerin kromatografik ve spektroskopik tayinleri. Doktora Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
200. Burcu E, Dınçel AS (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi* 2(2): 51-57.
201. Spáčil Z, Nováková L, Solich P (2008). Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta* 76(1): 189-199.
202. Serra Bonvehi J, Soliva Torrentó M, Centelles Lorente E (2001). Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(4): 1848-1853.
203. Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* 12(3): 593-606.
204. Pyrzynska K, Sentkowska A (2015). Recent developments in the HPLC separation of phenolic food compounds. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 45(1): 41-51.
205. Zhang L, Li Y, Liang Y, Liang K, Zhang F, Xu T, Wang M, Song H, Liu X, Lu B (2019). Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry* 276: 538-546.
206. Sadaf F, Saleem R, Ahmed M, Ahmad SI, Navaid-ul Z (2006). Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 161-163.

207. Stevens A, Wilson I (1996). The haematoxylin and eosin. In: Bancroft J. D., Stevens A. editors. Theory and Practice of Histological Techniques. 4. edition: Churchill Livingstone 99.
208. Kim M, Lee HJ, Randy A, Yun JH, Oh SR, Nho CW (2017). *Stellera chamaejasme* and its constituents induce cutaneous wound healing and anti-inflammatory activities. Scientific Reports 7(1): 1-12.
209. Pekyardımcı Ş (2009). Protein saflaştırma yöntemleri: protein analitiği. Ed. Telefoncu A: Ege Üniversitesi Yayınları, 65-85.
210. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 95: 351-358.
211. Eruygur N (2014). Türkiye’de yetişen bazı *Echium* türlerinin yara iyileştirici aktivitesinin araştırılması. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara.
212. Perez C, Pauli M, Bazerque P (1990). An antibiotic assay by the well agar method. Acta Biologia et Medicine Experimentalis 15: 113-115.
213. Woods GL, Brown-Elliott BA, Desmond EP, Hall GS, Heifets L, Pfyffer GE, Ridderhof JC, Wallace RJ, Warren NC, Witebsky FG (2011). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes Approved Standard. 2nd ed. NCCLS document 23: 18.
214. Akkol EK, Süntar I, İlhan M, Aras E (2015). *In vitro* enzyme inhibitory effects of *Rubus sanctus* Schreber and its active metabolite as a function of wound healing activity. Journal of Herbal Medicine 5(4): 207-210.
215. Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, Yonemori S (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of sea shore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinias elliptica*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 69: 197-201.
216. Korkmaz N, Şener SÖ, Kanbolat Ş, Badem M, Aliyazicioğlu R, Abudayyak M, Oztas E, Ozgen U (2019). Investigation of antioxidant, cytotoxic, tyrosinase inhibitory activities, and phenolic profiles of green, white, and black teas. Turkish Journal of Biochemistry 44(3): 278-288.

217. Yadav RNS, Agarwala M (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology* 3(12): 10-14.
218. Crispin MC, Wurtele ES (2013). Use of metabolomics and transcriptomics to gain insights into the regulation and biosynthesis of medicinal compounds: *Hypericum* as a model. In *Biotechnology for Medicinal Plants* (pp. 395-411). Springer, Berlin, Heidelberg.
219. Balunas MJ, Kinghorn AD (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78(5): 431-441.
220. Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK, Dhawan BN (1999). *In vitro* and *in vivo* wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology* 65(1): 1-11.
221. Nagori BP, Solanki R (2011). Role of medicinal plants in wound healing. *Research Journal of Medicinal Plant* 5(4): 392-405.
222. Sumitra M, Manikandan P, Suguna L (2005). Efficacy of *Butea monosperma* on dermal wound healing in rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37(3): 566-573.
223. Hanganu D, Olah NK, Mocan A, Vlase L, Benedec D, Raita O, Toma CC (2016). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of two Romanian *Lysimachia* species. *Studies* 15: 16.
224. Wu NH, Ke ZQ, Wu S, Yang XS, Chen QJ, Huang ST, Liu C (2018). Evaluation of the antioxidant and endothelial protective effects of *Lysimachia christinae* Hance (Jin Qian Cao) extract fractions. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18(1): 1-7.
225. Şensoy E (2013). Deneysel sıçan modelinde sistemik meperidin uygulamasının fasya iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri.
226. Altunay Ç (2014). Türkiye’de yetişen bazı *Alnus miller* taksonları üzerinde farmakognozik araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

227. Shim DW, Han JW, Sun X, Jang CH, Koppula S, Kim TJ, Kang TB, Lee KH (2013). *Lysimachia clethroides* Duby extract attenuates inflammatory response in Raw 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide and in acute lung injury mouse model. *Journal of Ethnopharmacology* 150(3): 1007-1015.
228. Choi HE, Kwak HJ, Kim SK, Cheon HG (2018). Foenumoside B isolated from *Lysimachia foenum-graecum* extract suppresses LPS-induced inflammatory response via NF- κ B/AP-1 inactivation in murine macrophages and in endotoxin-induced shock model. *European Journal of Pharmacology* 832: 120-128.
229. Wu Z, Han H, Xu M, Shen Y, Gao C, Yuan H, Li S, Ye H, Tian J (2020). Analgesic and antiinflammatory activities of the capilliposide derived from *Lysimachia capillipes* Hemsl., a traditional Chinese medicinal herb. *Archives of Biological Sciences* 72(4): 515-523.
230. Son YJ, Jung DS, Shin JM, Kim M, Yoo G, Nho CW (2021). Yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris* var. *davurica*) ameliorates liver fibrosis in db/db mice with methionine-and choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 21(1): 1-11.
231. Lee JY (2018). Anti-inflammatory effects of sinapic acid on 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in mice. *Archives of Pharmacal Research* 41(2): 243-250.
232. Pandi A, Kalappan VM (2021). Pharmacological and therapeutic applications of sinapic acid-an updated review. *Molecular Biology Reports* 48(4): 3733-3745.
233. Tanyeli A, Akdemir FNE, Eraslan E, Guler MC, Sebin SO, Comakli S, Gulcin İ (2022). The possible useful effectiveness of sinapic acid sepsis-induced secondary organ damage in rats. *Clinical and Experimental Health Sciences* 12(1): 134-140.
234. Cho YJ, Kim SJ (2013). Effect of quercetin on the production of nitric oxide in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*. *Journal of Periodontal & Implant Science* 43(4): 191-197.
235. Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets* 8(7): 634-646.

236. Harris GK, Qian Y, Leonard SS, Sbarra DC, Shi X (2006). Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells. *International Journal of Nutrition* 136(6): 1517-1521.
237. Joung DK, Kwon DY, Shin DW (2018). A study on antimicrobial activity of *Lysimachia clethroides* duby root extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean Journal of Plant Resources* 31(6): 719-724.
238. Chartarrayawadee W, Charoensin P, Saenma J, Rin T, Khamai P, Nasomjai P, Too CO (2020). Green synthesis and stabilization of silver nanoparticles using *L. foenum-graecum* Hance extract and their antibacterial activity. *Green Processing and Synthesis* 9(1): 107-118.
239. Csepregi R, Temesfői V, Das S, Alberti Á, Tóth CA, Herczeg R, Papp N, Kőszegi T (2020). Cytotoxic, antimicrobial, antioxidant properties and effects on cell migration of phenolic compounds of selected transylvanian medicinal plants. *Antioxidants* 9(2): 166.
240. Tiras U, Erdeve O, Karabulut AA, Dallar Y, Eksioglu HM (2005). Debridement via collagenase application in two neonates. *Pediatric Dermatology* 22(5): 472-475.
241. Ozdemir O, Ozkan K, Hatipoglu F, Uyaroglu A, Arican M (2016). Effect of asiaticoside, collagenase, and alpha-chymotrypsin on wound healing in rabbits. *Wounds* 28(8): 279-286.
242. Taçyıldız İH, Mızraklı S, Aban N, Akkuş M, Kavak V (1998). The effect of collagenase in wound healing. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery* 4(1): 7-11.
243. Durmus AS, Han MC, Yaman I (2009). Comparative evaluation of collagenase and silver sulfadiazine on burned wound healing in rats. *Firat Universitesi Saglik Bilimleri Veteriner Dergisi* 23(3): 135-139.
244. Szewczyk K, Miazga-Karska M, Pietrzak W, Komsta Ł, Krzemińska B, Grzywa-Celińska A (2020). Phenolic composition and skin-related properties of the aerial parts extract of different *Hemerocallis cultivars*. *Antioxidants* 9(8): 690.

245. dos Santos Nascimento LB, Gori A, Raffaelli A, Ferrini F, Brunetti C (2021). Phenolic compounds from leaves and flowers of *Hibiscus roseus*: potential skin cosmetic applications of an under-investigated species. *Plants* 10(3): 522.
246. Natanzi MM, Khodaii Z, Gerayesh-Nejad S, Kamalinejad M, Sharifi R, Tavangar SM, Dehpour AR, Pasalar P (2017). Wound healing potential of aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* fruit with down regulation of TNF-alpha in rat. *Acta Medica Mediterranea* 33: 305-311.
247. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G (1999). Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair and Regeneration* 7(6): 442-452.
248. Manuel JA and Gawronska-Kozak B (2006). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biology* 25(8): 505-514.
249. Mori R, Kondo T, Ohshima T, Ishida Y, Mukaida N (2002). Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *The FASEB Journal* 16(9), 963-974.
250. Yan C, Gao N, Sun H, Yin J, Lee P, Zhou L, Fan X, Yu FS (2016). Targeting imbalance between IL-1 β and IL-1 receptor antagonist ameliorates delayed epithelium wound healing in diabetic mouse corneas. *The American Journal of Pathology* 186(6): 1466-1480.
251. Toth A, Vegh K, Alberti A, Beni S, Kery A (2016). A new ultra-high pressure liquid chromatography method for the determination of antioxidant flavonol aglycones in six *Lysimachia* species. *Natural Product Research* 30(20): 2372-2377.
252. Toth A, Riethmuller E, Vegh K, Alberti A, Beni S, Kery A (2018). Contribution of individual flavonoids in *Lysimachia* species to the antioxidant capacity based on HPLC-DPPH assay. *Natural Product Research* 32(17): 2058-2061.
253. Reungoat V, Mouterde LM, Chadni M, Couvreur J, Isidore E, Allais F, Ducatel H, Ioannou I (2021). Simultaneous extraction and enzymatic hydrolysis of mustard bran for the recovery of sinapic acid. *Food and Bioproducts Processing* 130: 68-78.

254. Unsal V, Kolukcu E, Firat F, Gevrek F (2021). The protective effects of sinapic acid on acute renal ischemia/reperfusion injury. *Turkish Journal of Biochemistry* 46(5): 563-571.
255. Lee SB and Yang HO (2022). Sinapic Acid Ameliorates REV-ERB α Modulated Mitochondrial Fission against MPTP-Induced Parkinson's Disease Model. *Biomolecules & Therapeutics* 1-9.
256. Raish M, Ahmad A, Ansari MA, Ahad A, Al-Jenoobi FI, Al-Mohizea AM, Khan A, Ali N (2018). Sinapic acid ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 108: 224-231.
257. Alaofi AL (2020). Sinapic acid ameliorates the progression of streptozotocin (STZ)-induced diabetic nephropathy in rats via NRF2/HO-1 mediated pathways. *Frontiers in Pharmacology* 11: 1-11.
258. Liu S, Hou W, Yao P, Li N, Zhang B, Hao L, Liu L (2012). Heme oxygenase-1 mediates the protective role of quercetin against ethanol-induced rat hepatocytes oxidative damage. *Toxicology in Vitro* 26(1): 74-80.
259. Sun G, Xiao S, Min W, Jing-xue Y, Jian-yong S, Hui-bo X, Xiang-bao M (2012). Oxidative stress suppression by luteolin-induced heme oxygenase-1 expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 265(2): 229-240.
260. Yun KJ, Koh DJ, Kim SH, Park SJ, Ryu JH, Kim DG, Lee KT (2008). Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor- κ B inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(21): 10265-10272.
261. Huang X, Pan Q, Mao, Zhang R, Ma X, Xi Y, You H (2018). Sinapic acid inhibits the IL-1 β -induced inflammation via MAPK downregulation in rat chondrocytes. *Inflammation* 41(2): 562-568.
262. Li X, Lin J, Ding X, Xuan J, Hu Z, Wu D, Zhu X, Feng Z, Ni W, Wu A (2019). The protective effect of sinapic acid in osteoarthritis: *In vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23(3): 1940-1950.



EKLER