



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN YARA
MODELİNDE *PILOSELLA HOPPEANA* SUBSP.
TESTIMONIALIS BİTKİ EKSTRESİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTESİ**

Nuriye KORKMAZ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

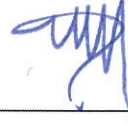
TRABZON-2020

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Nuriye KORKMAZ'ın hazırladığı “Sıçanlarda Oluşturulan Yara Modelinde *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* Bitki Ekstresinin Biyolojik Aktivitesi” başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/02/2020

Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU
(Danışman)



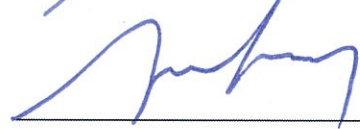
Prof. Dr. Nurettin YAYLI



Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ



Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ



Doç. Dr. İbrahim TURAN



Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne...../...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun...../...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdür V.

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.

17/02/2020

Nuriye KORKMAZ

İthaf

Doktora tezimi aileme ithaf ediyorum



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU'na teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmamda yardım ve desteklerini benden esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Ufuk ÖZGEN ve Dr. Öğr. Üyesi Ebru ÖZDEMİR NATH'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim boyunca ayırdıkları zaman ve kattıkları bilgi ve tecrübeler için KTÜ Eczacılık Fakültesi Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.

Histoloji çalışmalarındaki yardımlarından dolayı KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Engin YENİLMEZ ve Araş Gör. Dr. Tuğba ZENGİN'e teşekkür ederim.

Çalışmamda ve iş hayatımda yardımlarını benden hiç esirgemeyen, her an desteklerini gösteren, takıldığım an çözüm yolları üretmemde yardımcı olan güzel dostluklar kurduğumuz candan öte arkadaşlarım Dr. Ecz. Merve BADEM, Arş. Gör. Nevin ULAŞ ÇOLAK, Arş. Gör. Dr. Sıla Özlem ŞENER, Arş. Gör. Şeyda KANBOLAT'a ve Ecz. Bürde Suheyra BAYRAKTAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca yurt içi doktora burs desteğinden dolayı TÜBİTAK'a,

Doktora tez çalışmamı TSA-2017-6865 proje koduyla destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi'ne ve 118S746 proje koduyla desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a,

Beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen çok sevgili canım aileme, evlilik hayatımda ve çalışma hayatımda desteklerini esirgemeyen eşimin ailesine çok teşekkür ederim.

Son olarak tanıştığım günden beri her anımın mutlu geçmesi için elinden geleni yapan, çalışma hayatımda da her türlü desteği ve özveriye gösteren, hayattaki en büyük şanslarımdan biri olan canım eşim Göker KORKMAZ'a ve ailemizin neşesi minik oğlumuza candan teşekkür ederim.

Arş. Gör. Nuriye KORKMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Botanik Kısım	4
2.1.1. Asteraceae Familyası	4
2.1.2. <i>Pilosella</i> Cinsinin Özellikleri	4
2.1.3. <i>Pilosella hoppeana</i> (Schult.) F.W.Schultz & Sch.Bip	5
2.1.4. <i>Pilosella hoppeana</i> Sinonimleri	7
2.1.5. <i>Pilosella</i> Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	7
2.1.5.1. <i>Pilosella</i> Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar	7
2.1.5.2. <i>Pilosella</i> Türlerinin Halk Arasında ve Geleneksel Tedavi Sistemlerinde Kullanılışı	7
2.1.5.3. <i>Pilosella</i> Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları	8
2.2. Yara İyileşmesi ile İlgili Genel Bilgiler	9
2.2.1. Deri	9
2.2.1.1. Epidermis	9
2.2.1.2. Dermis	10
2.2.1.3. Hipodermis (Subkutan)	10
2.2.2. Deri Ekleri	11
2.2.3. Derinin Sinirleri	11
2.2.4. Derinin Damarları	11

2.2.5. Derinin Lenf Damarları	11
2.2.6. Yara İyileşmesi	11
2.2.7. Yara İyileşmesi Tipleri	12
2.2.7.1. İyileşme Dönemlerine Göre Yara Tipleri	12
2.2.7.2. Mekanizmasına Göre Yara Tipleri	13
2.2.8. Yara İyileşmesinin Ölçülmesi	14
2.2.8.1. <i>In vitro</i> Çalışmalar	14
2.2.8.2. <i>In vivo</i> Çalışmalar	14
2.2.8.3. Histopatolojik İncelemeler	14
2.2.8.4. Biyokimyasal Analizler	15
2.2.9. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	15
2.2.9.1. Lokal Faktörler	15
2.2.9.2. Sistemik Faktörler	16
2.2.10. Yara İyileşmesi Evreleri	18
2.2.10.1. Hemostaz	18
2.2.10.2. İnflamasyon	19
2.2.10.3. Proliferasyon	21
2.2.10.4. Yeniden Şekillenme	24
2.3. Antioksidan Aktivite	26
2.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	27
2.3.1.1. Endojen Antioksidanlar	27
2.3.1.2. Eksojen Antioksidanlar	29
2.4. Antiinflamatuvar Aktivite	29
2.4.1. Vazoaktif Aminler	31
2.4.2. Plazma Proteazları	31
2.4.3. Araşidonik Asit (AA) Metabolitleri	32
2.4.4. Lökosit Ürünleri	33
2.4.5. Trombosit Aktive Eden Faktör (TAF)	33
2.4.6. Sitokinler	34
2.4.7. Büyüme Faktörleri	35
2.4.8. Diğer Medyatörler	36
2.5. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	37
2.6. Antimikrobiyal Aktivite	39

2.6.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	40
2.6.1.1. Difüzyon Testleri	40
2.6.1.2. Dilüsyon Testleri	41
2.6.2. Antimikrobiyal Aktivitede Kullanılan Mikroorganizmalar	42
2.7. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu	44
2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YBSK)	46
2.8.1. YBSK Tipleri	46
2.8.1.1. Normal Faz Kromatografisi (NP-YBSK)	46
2.8.1.2. Ters Faz Kromatografisi (RP-YBSK/RPC)	46
2.8.1.3. Boyut Eleme Kromatografisi (SEC)	47
2.8.1.4. İyon Değişim Kromatografisi	47
2.8.1.5. Biyo-Afinite Kromatografisi	47
3. GEREÇ ve YÖNTEM	48
3.1. Gereç	48
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Çözücü, İlaç ve Cihazlar	48
3.1.2. Bitki Toplanması, Teşhisi, Kurutulması ve Öğütülmesi	50
3.2. Yöntem	50
3.2.1. <i>In vivo</i> Aktivite Deneyleri	50
3.2.1.1. Deney Hayvanları	50
3.2.1.2. Test Numunelerinin Hazırlanması	51
3.2.1.3. Referans Madde	52
3.2.1.4. Dairesel Eksizyon Yara Modeli	52
3.2.2. Biyolojik Aktivite Deneyleri	54
3.2.2.1. Antioksidan Aktivite Tayini	54
3.2.2.2. Anti-inflamatuvar Aktivite Tayini	55
3.2.2.3. Kollajen Bağ Dokunun Saptanması	55
3.2.2.4. Protein Miktarı Tayini	57
3.2.3. Histopatolojik İncelemeler	57
3.2.4. RT-PCR Çalışmaları	58
3.2.4.1. Dokudan RNA İzolasyonu	60
3.2.4.2. RNA'dan cDNA İzolasyonu	61
3.2.4.3. RT-PCR Analizi	62
3.2.5. Mekanizma Aydınlatma Çalışmaları	63

3.2.5.1. Hem Oksijenaz Aktivitesinin Ölçülmesi	63
3.2.5.2. Makrofajlarda Nitrik oksit Üretiminde Bitkinin Hücre Canlılığına Etkisi	63
3.2.5.3. COX-2 İnhibitör Aktivite Tayini	64
3.2.6. Tirozinaz Enzim İnhibitör Aktivite Çalışmaları	64
3.2.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	65
3.2.7.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu	65
3.2.7.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi	65
3.2.8. YBSK ile Bitki Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	66
3.2.9. İstatistiksel Analiz	67
4. BULGULAR	68
4.1. <i>In vivo</i> Çalışmalar	68
4.1.1. Dairesel Eksizyon Yara Modeli Deney Bulguları	68
4.1.2. Yara Dokularının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi	69
4.2. Biyolojik Aktivite Deney Bulguları	76
4.2.1. Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları	76
4.2.2. Anti-inflamatuvar Aktivite Tayini Bulguları	80
4.2.3. Hidroksiprolin Tayini Bulguları	82
4.3. RT-PCR Çalışma Bulguları	83
4.4. Mekanizma Aydınlatma Çalışmaları	83
4.4.1. Hem Oksijenaz Aktivite Bulguları	83
4.4.2. Nitrik Oksit İçeriği Bulguları	84
4.4.3. COX-2 İnhibitör Aktivite Bulguları	84
4.5. Tirozinaz Enzim İnhibitör Aktivite Çalışma Sonuçları	85
4.6. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Bulguları	86
4.7. YBSK Bulguları	87
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	89
6. KAYNAKLAR	101
EKLER	118
Ek 1. Etik Kurul Onayı	119
ÖZGEÇMİŞ	121

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Yara iyileşme evreleri	18
Tablo 2. Yara iyileşmesinde ekstrasellüler elementler	23
Tablo 3. İnflamasyonun kimyasal maddeleri	31
Tablo 4. Sitokinlerin sınıflandırılması	34
Tablo 5. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer moleküller	36
Tablo 6. Kullanılan kimyasal maddeler	48
Tablo 7. Kullanılan çözücüler	49
Tablo 8. Kullanılan ilaçlar	49
Tablo 9. Kullanılan cihazlar	49
Tablo 10. Dairesel eksizyon yara modeli deney grupları	51
Tablo 11. Genlerin primer dizileri	60
Tablo 12. RT-PCR bileşenleri	62
Tablo 13. RT-PCR analiz koşulları	62
Tablo 14. Dairesel eksizyon yara modeli deney sonuçları	68
Tablo 15. Sıçanlardan alınan yara dokularının yara iyileşme skorları	70
Tablo 16. Gruplardan alınan yara dokularında hidroksiprolin miktarları	83
Tablo 17. RT-PCR ile belirlenen gen ekspresyon oranları	83
Tablo 18. <i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> metanol ekstresinin COX-2 enzimine inhibisyon etki sonuçları	85
Tablo 19. <i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> metanol ekstresinin tirozinaz enzimi inhibisyon etki sonuçları	86
Tablo 20. Mikroorganizma inhibisyon çapları bulguları	87
Tablo 21. Minimal inhibisyon konsantrasyon bulguları	87
Tablo 22. Bitkide bulunan fenolik bileşikler	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Epidermis katmanları	10
Şekil 2. Yara iyileşmesinde görevi bulunan hücrelerin zamana bağlı olarak miktarları	19
Şekil 3. Reaktif türlerin üretimine yol açan reaksiyonlar	27
Şekil 4. SYBR Green I yöntemi	59
Şekil 5. Dokuda SOD analizi	76
Şekil 6. Serumda SOD analizi	77
Şekil 7. Dokuda katalaz analizi	77
Şekil 8. Serumda katalaz analizi	78
Şekil 9. 1,1,3,3-Tetraetoksi propan standart grafiği	78
Şekil 10. Dokuda MDA analizi	79
Şekil 11. Serumda MDA analizi	79
Şekil 12. Dokuda TNF- α analizi	80
Şekil 13. Serumda TNF- α analizi	81
Şekil 14. Dokuda IL-1 β analizi	81
Şekil 15. Serumda IL-1 β analizi	82
Şekil 16. Hidroksiprolin standart grafiği	82
Şekil 17. <i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> ekstresi ve kersetin uygulanan hücrelerde HO içeriği	84
Şekil 18. <i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> ekstresi ve indometasin uygulanan hücrelerde NO içeriği	84
Şekil 19. <i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> ekstresi uygulanan hücrelerde COX-2 % inhibisyon	85
Şekil 20. Kojik asit tirozinaz inhibisyon grafiği	86
Şekil 21. <i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> metanol ekstresi tirozinaz inhibisyon grafiği	86
Şekil 22. Standartların (25 μ M) YBSK kromatogramı	88
Şekil 23. Bitkide bulunan fenolik bileşiklerin YBSK kromatogramı	88

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Bitkinin Türkiye’de yetiştiği yerler	5
Resim 2. <i>Pilosella hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> çiçek ve yaprakları	6
Resim 3. <i>Pilosella hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> genel görünüş	6
Resim 4. Sıçanların barındırıldığı kafesler	51
Resim 5. <i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> metanol ekstresinden hazırlanan merhem	52
Resim 6. Pozitif kontrol olarak kullanılan merhem	52
Resim 7. Sıçanların derisinde oluşturulan yara	53
Resim 8. Sıçanların yaraları üzerine bitkiden hazırlanan merhemın uygulanışı	54
Resim 9. RT-PCR analizinde çalışılan ependorflar	61
Resim 10. Thermal cyclers	61
Resim 11. Applied biosystem steponeplus RT-PCR cihazı	62
Resim 12. Tüm gruplar için 4., 7., 14. ve 21. günlerde iyileşmiş eksizyon yarası	69
Resim 13. 4. Gün kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama	70
Resim 14. 4. Gün pozitif grup hematoksilen-eozin boyama	71
Resim 15. 4. Gün ekstre grubu hematoksilen-eozin boyama	71
Resim 16. 7. Gün kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama	72
Resim 17. 7. Gün pozitif grup hematoksilen-eozin boyama	72
Resim 18. 7. Gün ekstre grubu hematoksilen-eozin boyama	73
Resim 19. 14. Gün kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama	73
Resim 20. 14. Gün pozitif grup hematoksilen-eozin boyama	74
Resim 21. 14. Gün ekstre grubu hematoksilen-eozin boyama	74
Resim 22. 21. Gün kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama	75
Resim 23. 21. Gün pozitif grup hematoksilen-eozin boyama	75
Resim 24. 21. Gün ekstre grubu hematoksilen-eozin boyama	76

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

A549	İnsan akciğer karsinomu
AA	Araşidonik asit
BSA	Sığır serum albümini
CO	Karbonmonoksit
COX	Siklooksijenaz
CRP	C-reaktif protein
DAD	Diode Array Detector
DETC	Dendritik epidermal T hücreleri
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DHI	Dihidroksiindol
DHICA	Dihidroksiindol-2-karboksilik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2 -Difenil-1-pikrilhidrazil
ECM	Ekstraselüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FBS	Fetal bovin serum
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FGF-7	Fibroblast büyüme faktörü 7
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
GST	Selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz
GTP	Guanozin üç fosfat
HBOT	Hiperbarik oksijen tedavisi
HETE	Hidroksieikozatetraenoik asit
HMWK	Yüksek molekül ağırlıklı kininogen
HO-1	Hem oksijenaz 1
HPETE	Hidroperoksieikozatetraenoik asit

HT 29	İnsan kolon adenokarsinomu
IC₅₀	Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan konsantrasyon
IFN	İnterferon
IGF	İnsülin büyüme faktörü
IL	İnterlökin
LC-PDA-ESI/MS	Sıvı kromatografi-fotodiyot dizi-elektrosprey iyonizasyon/ kütle spektrometresi
L-DOPA	3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
LPS	Lipopolisakkarit
LT	Lökotrien
MAPK	Mitojenle-etkinleşen protein kinaz
MCP-1	Monosit kemotaktik protein-1
MDA	Malondialdehit
MHA	Mueller-hinton agar
MIF	Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
MIK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MMP	Metalloproteaz
MTT	3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NCCLS	National committee for clinical laboratory standard
NK	Naturel killer
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentetaz
NP-YBSK	Normal faz sıvı kromatografisi
NSAİİ	Non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar
P-4	Trombosit faktör 4
PDA	Potato dextrose agar
p-dAB	p-Dimetilaminobezaldehit
PDGF	Trombosit türevli büyüme faktörü
PG	Prostaglandin
PGI₂	Prostasiklin
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri

RSS	Reaktif sülfür türleri
RT-PCR	Real time-polimeraz zincir reaksiyonu
SDF	Stromal kökenli faktör
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEC	Boyut eleme kromatografisi
Se-GPx	Selenyuma bağımlı glutatyon peroksidaz
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
SOD	Süperoksit dismutaz
TAF	Trombosit aktive eden faktör
TBA	Tiobarbitürik asit
TGF-β	Transformasyon büyüme faktörü
TIMP	Doku inhibitörü metalloproteinaz
TNF-α	Tümör nekroz faktör- alfa
TNF-β	Tümör nekroz faktör-beta
TRP	Tirozinaz bağlı protein
TXA2	Tromboksan A2
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
YBSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
YNBB	Yeast nitrogen base
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

Semboller

$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit anyonu
$HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil radikali
$\cdot OH$	Hidroksil radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
1O_2	Singlet oksijen
$HOCl$	Hipoklorik asit
$ONOO^-$	Peroksinitrit

ÖZET

Sıçanlarda Oluşturulan Yara Modelinde *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* Bitki Ekstresinin Biyolojik Aktivitesi

Bu tez çalışmasında Türkiye’de Balıkesir bölgesinde halk tarafından yaraları iyi etmek amacıyla yıllardır yaygın bir şekilde kullanılan ve halk arasında “tırnak otu, tüylü ot” olarak bilinen *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* bitkisinin yara üzerindeki etkisinin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda bitkinin metanol ekstresi sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan yaralara dairesel eksizyon yöntemi ile topikal olarak uygulanarak *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sıçanlardan alınan yara deri dokusu üzerinde biyolojik aktivite çalışmaları (antioksidan, anti-inflamatuar, hidroksiprolin tayini), histolojik çalışmalar ve gen ekspresyon çalışmaları (RT-PCR) gerçekleştirilmiştir. Bitkinin yara iyileşmesi üzerine mekanizmasını aydınlatmak amacıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca bitki ekstresi üzerinde antimikrobiyal, tirozinaz enzim inhibisyon ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon çalışmalarında bitkinin inflamasyonda etkili olan tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), interlökin 1-beta (IL-1 β) ve interlökin-10 (IL-10) genlerinin ekspresyonlarını artırarak iyileşmeye katkı sağladığı görülmektedir. Mekanizma aydınlatma çalışmalarında bitkinin yara iyileşmesi üzerine etkisini hücrelerde HO konsantrasyonunu artırma ve siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini inhibe etme yoluyla gerçekleştirdiği görülmüştür. Antimikrobiyal çalışmalarında da inflamasyona sebep olan mikroorganizmalar üzerinde bitkinin etkili olduğu görülmüştür. YBSK çalışmalarında bitkinin toprak üstü ekstresinin içeriğinde şiringaldehit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin bulunmuştur. Çalışma sonucunda bitkinin halk arasında kullanımını destekler nitelikte yara iyileşmesi üzerine etkili olduğu açıkça görülmektedir.

Bu tez çalışması bitkinin yara iyileştirme etkisi üzerine yapılan ilk çalışma olup, bitki üzerinde ilk defa *in vivo* çalışmalar, antimikrobiyal, RT-PCR, mekanizma aydınlatma ve tirozinaz enzim inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmesi bakımından özgün bir çalışma niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: *In vitro*, PCR, *Pilosella hoppeana*, yara iyi edici, YBSK

ABSTRACT

Biological Activity of *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* Extract in Wound Model Created in Rats

In this study we aimed to investigate wound healing activity with *in vitro* and *in vivo* studies of *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* which is grown in region of Balıkesir, has widely used for healing the wounds for many years and known as “tırnak otu, tüylü ot” in public. In the study, the methanol extract of the plant was applied topically by circular excision method in experimentally generated wounds in rats and *in vivo* studies were performed. Biological activity studies (antioxidant, anti-inflammatory, hydroxyproline assay), histological studies and gene expression studies (RT-PCR) were performed on the wound skin tissue obtained from rats. Cell culture studies were carried out to clarify the mechanism on wound healing of the plant. In addition, antimicrobial, tyrosinase enzyme inhibition and HPLC studies were performed on the plant extract. In gene expression studies, it is observed that the plant contributes to healing by increasing the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), interleukin 1beta (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) genes which are effective in inflammation. It was seen on mechanism studies that the effect of the plant on wound healing was achieved by increasing the HO concentration and inhibiting of the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme in the cells. In the antimicrobial studies, the plant has been seen to be effective on microorganisms which cause inflammation. Syringaldehyde, sinapic acid, benzoic acid and quercetin were found in the aerial parts of the plant in the HPLC studies. As a result of the study, it is clearly seen that the plant is effective on wound healing in the manner supporting using the plant by the people.

This thesis study is the first study on the wound healing effect of the plant, and it is original study with regard to investigating the first time in the plant to perform *in vivo* studies, antimicrobial, RT-PCR, mechanism studies and tyrosinase enzyme inhibition studies.

Key Words: HPLC, *in vitro*, PCR, *Pilosella hoppeana*, wound healing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanoğlu yaratılmasından bu yana bitkileri, besin kaynağı olarak kullanmasının yanında, tekstilde, ilaç, kozmetik, boya, ahşap ve kâğıt endüstrisi ile inşaat sektöründe sıklıkla kullanmışlardır. Bitkilerin kök, gövde, çiçek, yaprak gibi çeşitli kısımları tek başına ya da karışım halinde kullanılarak lapa, şurup, krem gibi çeşitli formülasyonları hazırlanmış ve geleneksel tıpta hastalıkların tedavi ve önlenmesinde yüzyıllardır kullanılmıştır (1).

Zengin iklim ve coğrafi koşullara sahip olması nedeniyle bitkisel flora açısından oldukça çeşitli bir özelliğe sahip olan ülkemiz, bitkileri yüzyıllar boyunca geleneksel olarak kullanarak günümüze kadar ulaşan zengin bir halk ilacı kültürüne sahip olmuştur. Bitkilerin geleneksel tıpta etki göstermesini takiben etkinin bitkinin hangi kısım ve hangi bileşeninden kaynaklandığını incelemek araştırmacıların araştırma konusu olmuştur. Doğal kaynaklı ilaçların yapımının yanında, bitkilerden izole edilen etkili bileşiklerden yola çıkılarak sentetik ilaçlar da üretilmiştir. Sentetik ilaçların kullanımından kaynaklı yan etki ve toksik etkilerinin ortaya çıkması, mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı bağışıklık kazanması, ya da ilaçların çeşitli organlara zarar vermesi açısından doğal kaynaklı ilaçlara yönelim artmıştır. Bitkisel ilaçların çok eski çağlardan beri kullanılıyor olması, onların yan etkilerinin daha iyi bilinmesi ve buna karşı önlem alınmasına kolaylık sağlamıştır (2, 3).

Asteraceae cins ve tür bakımından oldukça çeşitliliğe sahip olan bir familyadır (4). Familyada yer alan bir tür olan *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* Türkiye’de yaygın bir yayılım göstermekte olup, halk arasında “tüylü ot, saplı tırnak otu” olarak bilinmektedir (4, 5). Bitki fenolik bileşikler bakımından zengin içeriğe sahip olup, antioksidan özellik göstermektedir (6, 7). Ayrıca insanlar, yıllar boyunca bitkinin toprak üstü kısımlarından infüzyon yöntemiyle bir preparat hazırlayıp yaranın üstüne sürerek yaraları etkili bir şekilde iyi etmişlerdir (8).

Yara, dokuların yanık, kesik, delici alet ya da vücutta meydana gelen biyokimyasal, fizyolojik sebeplerden ötürü dokunun anatomik ve fonksiyonel olarak yapısının bozulmasıdır. Bozulmuş doku bütünlüğünün yerini canlı dokuların alma süreci ise yara iyileşmesi olarak tanımlanmaktadır (9). Yara iyileşmesi süreci birbirini takip eden karmaşık iç içe geçmiş hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme süreçlerini kapsamaktadır. Bu süreçlerin düzgün işlemesi yaranın iyileşmesi bakımından oldukça önemlidir. Süreçlerde çeşitli sebeplerden meydana gelen aksaklıklar yaranın

iyileşmemesine, iyileşmenin gecikmesine ya da daha ciddi farklı komplikasyonların oluşmasına neden olabilmektedir (10-12). Yara iyileşmesinde bitkiler sıklıkla kullanılmakta olup, Dünya sağlık örgütü (WHO) hastaların yaklaşık yüzde sekseninin bitki kaynaklı ilaç kullandığını düşünmektedir. Bitkilerin bazıları yeni oluşmuş yaraların tedavisinde kullanılırken bazıları kronik hale gelmiş yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (13).

Hazırladığımız bu tezde amacımız Türkiye’de yaygın olarak bulunan ve halk tarafından yaraları iyi etmek amacıyla yıllardır kullanılan *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* bitkisinin yara iyi edici etkisini araştırmaktır. Bunun için öncelikle bitkinin metanol ile elde edilen ekstresinden hazırlanan merhem, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan yaralara topikal olarak uygulanmıştır. Yara iyileşmesindeki değişiklikler ilk olarak *in vivo* yöntem “daireseleksizyon yöntemi” ile değerlendirilmiştir. Alınan doku ve serum örnekleri üzerinde bitkinin yara iyileşme fazlarının düzenli ve sorunsuz ilerlemesine katkı sağlayan antioksidanların tayini amacıyla antioksidan aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bitkinin yara iyileşme fazlarından inflamasyon fazına etkisini incelemek amacıyla anti-inflamatuar çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bitkinin yara iyileşmesinde önemli bir parametre olan kollajen sentezine etkisini ölçmek amacıyla hidroksiprolin miktar analiz çalışmaları yapılmıştır. Yara iyileşmesinde aktif görevleri olan genler üzerinde bitkinin etkisini incelemek amacıyla gen ekspresyon çalışmaları (real time-polimeraz zincir reaksiyonu) gerçekleştirilmiştir. Alınan yara dokuları üzerinde yara iyileşmesinin ölçülmesinde önemli bir parametre olan histolojik çalışmalar yapılmıştır. Bitkinin antimikrobiyal aktivitesini ölçerek, bu etkisinin iyileşmeye katkı sağlayıp sağlamadığını belirlemek amacıyla antimikrobiyal çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bitkinin yara iyileşmesi üzerine mekanizmasını aydınlatmak amacıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Yara iyileşme fazlarının düzgün ilerlemesi için aktif görevi olan HO ve NO’in hücrelerdeki içeriği ölçülerek bitkinin iyileşmeye bu yollarla katkı sağlayıp sağlamadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bitkinin COX-2 enzimine karşı inhibitör etkisini ölçmek amacıyla COX-2 inhibitör aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve bitkinin uzamış inflamasyonda anti-inflamatuar ajan olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Yara iyileşme fazlarında meydana gelen pigmentasyon sürecinde tirozinaz enzimi aktif rol almaktadır. Pigmentasyon sürecinde bitkinin tirozinaz enzimine etkisi yönünden araştırılması amacıyla tirozinaz enzim inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bitkide, yara iyileşmesine katkı sağlayan fenolik madde içeriğinin belirlenmesi amacıyla

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YBSK) çalışması yapılmıştır. Günümüze kadar yapılan literatür taramalarında bitkiyle ilgili bir *in vivo* çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında yara iyi edici etkinin bulunması halinde doğal kaynaklı, yeni yerli ilaç gelişiminin sağlanmasına yönelik prelinik çalışmalara öncülük edilip, bitkiden ilaç geliştirilmesinin yolu açılacaktır. Böylece ilaç elde edilmesinin yanında bitkinin yetiştiği yerde üretiminin artırılması ile de ülke ekonomisine katkı sağlanmış olacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Kısım

2.1.1. Asteraceae Familyası

Türkiye florasında Asteraceae familyası 134 cins ve 1209 tür ile temsil edilmekte olup türlerin 447'si endemiktir. Familya tek yıllık ya da çok yıllık, otsu ya da ağaçsı tipleri barındırmaktadır. Antartika hariç dünyanın her yerinde yayılış göstermektedirler (4, 14).

Familyadaki bitkiler, salgı ve süt kanalları bakımından zengin olup, epidermiste papillaların olması, daha çok anomositik ve anizositik stomaların varlığı, homojen veya heterojen mezofilin bulunması ve hipodermis varlığı bakımından karakteristiktir (4, 15). Asteraceae familyasında bulunan bitkilerin yaprakları almaşlı, çok azı karşılıklı, nadiren dairesel, basit ayalı, genellikle loblu ya da dişli, bazen bileşiktir. Familyanın karakteristik özelliklerinden bir diğeri de çiçek durumunun kapitulum olmasıdır. Kapitulumlar gövdede başak, panikula gibi farklı dizilişlerde olup, her kapitulum genişlemiş reseptakulumla bağlı sapsız, çok sayıda küçük çiçekten oluşmaktadır. Bu çiçekleri dıştan saran involukrum bulunmaktadır. Çiçekler; ovaryumu alt durumludur, hem erkek hem dişi organ taşımakta, erkek organlar dişi organda daha önce olgunlaşmaktadır. Meyve genellikle yaprak döken pappus taşıyan bir akendir (4).

Bu familyada yer alan *Achillea* L., *Ageratina* Spach, *Ageratum* L., *Achyrocline* (Less.) D.C., *Matricaria* L., *Arnica* L., *Calendula* L., *Centaurea* L., *Chromolaena* DC., *Cichorium* L., *Echinacea* Moench, *Helichrysum* Mill, *Inula* L., *Scorzonera* L., *Senecio* L., *Sphaeranthus* L., *Stevia* Cav, *Tridax* L., *Vernonia* Schreb, *Wedelia* Jacq. gibi cinsler yara iyileşmesinde kullanılmaktadır (16).

2.1.2. *Pilosella* Cinsinin Özellikleri

Pilosella Hill P.D. Sell and C. West Avrupa Florası'nda *Hieracium* cinsi içinde bulunurken, Türkiye Florası'nda ise ayrı bir cins olarak belirtilmiştir. Bu cins Dünya'da 15 tür ile temsil edilmektedir (4, 17).

Pilosella cinsi, *Hieracium* cinsi ile hibritler bakımından yoğun interspesifik hibridizasyonun neden olduğu taksonomik çeşitliliği ve karmaşıklığı bakımından çoğunlukla karıştırılmaktadır (18). Her iki grupta bol miktarda hibridizasyona rağmen, *Pilosella* ve *Hieracium* türleri arasında melezler bilinmemektedir. Nükleer Deoksiribo

Nükleik asit (DNA) içeriği *Pilosella*'da olduğu gibi *Hieracium*'da yaklaşık iki kat yüksektir (19).

Pilosella'nın çeşitliliğini temsil eden çeşitli melez sürüler, çeşitli enlem bölgelerinde bulunabilmektedir; kuzeyde bulunanlar orman/çayır, bozkır ve dağlara özgüdür. *Hieracium* çeşitliliğinin ana alanları ise en başta Alpler, Karpatlar ve Pireneler olmak üzere ılıman florayı barındıran başlıca Avrupa dağlarıdır. Kuzey enlemlerinde, bu cinsin belirgin bir çeşitliliği, İskandinavya'da ve komşu bölgelerde bulunmaktadır (18).

Bu cinste yer alan türler çoğunlukla eşeyli çoğalmaktadırlar. Yapılarında stolon bulundurmakta; aken boyu 2,5 mm ve üstünde olup; meyve sırt çizgileri hafif bir çıkıntı ile sonlanmakta, pappus tüyleri tek sıra şeklinde bulunmaktadır (17).

2.1.3. *Pilosella hoppeana* (Schult.) F.W.Schultz & Sch.Bip

Pilosella hoppeana kümeler halinde ya da tek tek ışık alan kumlu veya kuru alanlarda, fundalık, kayalık, bataklık yerlerde ve yol kenarlarında yayılmıştır. Halk arasında “tüylü ot, saplı tırnak otu” olarak bilinen *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* (Naegly Ex Peter) Sell Et West, Dünya'da O. Avrupa, Kırım, Balkan Yarımadası, Kafkasya, Suriye, İran'da; Türkiye'de ise Resim 1'de gösterildiği gibi Balıkesir, Bolu, Giresun, Kayseri, Ordu, Rize, Sivas bölgelerinde (700-2300 m) doğal olarak yetişmektedir. Mayıs-Ağustos aylarında çiçek açan çok yıllık bir bitkidir (4, 5).



Resim 1. Bitkinin Türkiye’de yetiştiği yerler

Pilosella hoppeana türü; *Pilosella hoppeana* subsp. *lydia*, *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis*, *Pilosella hoppeana* subsp. *troica*, *Pilosella hoppeana* subsp. *cilicica*,

Pilosella hoppeana subsp. *isaurica*, *Pilosella hoppeana* subsp. *pilisquama* olmak üzere 6 alt tür içermektedir (4).

Bitkinin yaprakları 6-14 x 1-3.5 cm çapındadır. Stolonları kısa ve kalın olan bitkinin yapraklarının çoğu ters mızrakımsı veya dikdörtgenimsi olup çok sayıdadır. Yapraklarının çoğu basit ve salgı bezi bulunmayan tüylere sahip olup alt yüzeyleri koyu renkli yıldızsı tüylerle doludur Çiçek sapları ise ortalama 40 cm uzunluğunda olup yumurtamsı, şeritsi-mızraksı veya dar, küt/sivri uçlu görünümündedir (Resim 2, 3) (4).



Resim 2. *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* çiçek ve yaprakları

Anatomik incelemelerde ise; kökte yer alan radyal iletim demetlerindeki ksilemlerin floemlere göre daha geniş yer aldığı görülmüştür. Gövdede yoğun tüyleri bulunmakta olup, epidermis hücreleri kalın kutikula tabakası ile örtülmüştür. İletim demetleri sırasıyla büyük ve küçük demetler halinde dizilmişlerdir. Yaprakların tipi bifasiyal yaprak olup, palizat ve sünger parankiması ayrımı açıkça görülmektedir. Yaprığın her iki yüzünde de stoma hücreleri üst durumlu olup, örtü ve salgı tüyleri ile çeşitli aralıklarla dizilmişlerdir (17).



Resim 3. *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* genel görünüş

2.1.4. *Pilosella hoppeana* Sinonimleri

Sinonimleri;

Hieracium testimoniale (Peter) Prain,

Hieracium hoppeanum subsp. *testimoniale* (Peter),

Hieracium macranthum subsp. *testimoniale* (Peter) Gottschl,

Pilosella hoppeana subsp. *pilisquama* (Peter),

Pilosella hoppeana subsp. *lydia* (Bornm & Zahn),

Hieracium hoppeanum subsp. *lydium* (Bornm & Zahn) olarak belirtilmiştir (4, 5).

2.1.5. *Pilosella* Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

2.1.5.1. *Pilosella* Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

Pilosella hoppeana subsp. *testimonialis* üzerinde bitkinin fenolik içeriğinin belirlenmesi amacıyla çeşitli standartların (klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, rozmarinik asit, *p*-kumarik asit, apigenin, luteolin, kersetol, hiperozit, rutin, hesperidin) kullanıldığı YBSK yöntemi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda klorojenik asit, apigenin ve luteolin bitkiden analiz edilmiştir (7). YBSK yöntemi ile yapılan başka bir çalışmada bitkinin içeriğinde apigenin 4'-O- β -D-glukuronit, izotin 4'-O- β -D- glukuronit, luteolin 7-O- β -D-glukopiranozit, luteolin 7-O- β -D- glukuronit, luteolin 4'-O- β -D-glukopiranozit, klorojenik asit, sinarin, 3,5-dikafeoilkuinik asit ile 4,5- dikafeoilkuinik asit bulunmuştur (6).

Becker ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Pilosella officinarum* (*Hieracium pilosella*) bitkisinin içeriği "Sıvı kromatografi-fotodiyot dizi-elektrosprey iyonizasyon/kütle spektrometresi" (LC-PDA-ESI/MS) ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bitkinin içeriğinde luteolin-7-glukopiranozit, umbelliferon ve klorojenik asit bulunmuştur (20). Bitki üzerinde yapılan başka bir çalışmada yeni bir flavonoid olan izotin 4'-O- β -D-glukopiranozit izole edilmiştir (21).

2.1.5.2. *Pilosella* Türlerinin Halk Arasında ve Geleneksel Tedavi Sistemlerinde Kullanılışı

Nath ve arkadaşlarının yapmış olduğu etnobotanik bir çalışmada *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* bitkisinin toprak üstü kısmından infüzyon ile hazırlanan sulu çözeltinin halk tarafından uzun yıllardır yaraları iyi etmek amaçlı kullanıldığı rapor edilmiştir (8).

P. officinarum (*Hieracium pilosella*, Mouse-ear hawkweed) bitkisinin İngiltere’de, Washington’da, Kolombiya’da halk arasında tonik amaçlı ayrıca, diyare, diyabet ve yara tedavisinde sıklıkla kullanıldığı rapor edilmiştir (22, 23).

P. officinarum idrar yolu enfeksiyonları ve deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmakta olup aynı zamanda, diüretik, astrenjan, antiseptik ve iltihap azaltıcı etkileri nedeniyle Avrupa’da halk tarafından kullanılmaktadır (21). Bu bitki aynı zamanda Polonya halk tıbbında sistit, nefrit, ürolityazis, öksürük, solunum yolu iltihapları ve kanamaları tedavi etmek için amacıyla yüzyıllardır kullanılmıştır (21, 24).

2.1.5.3. *Pilosella* Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Antioksidan Etki

P. hoppeana subsp. *testimonialis* üzerinde yapılan bir çalışmada bitkinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla bitkinin kök ve toprak üstü kısmından metanol/su (80:20) ekstresi hazırlanmış, *in vitro* testler ile 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivite yöntemi ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülmüştür. Testler sonucunda bitkinin DPPH analizinde kök ve toprak üstü kısmı için maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan konsantrasyon (IC_{50}) değerleri sırasıyla 0.231 ve 0.864 mg/mL olarak bulunmuştur. MDA düzeyleri ise sırasıyla 3.91 ve 53.16 (nmol/mL) olarak hesaplanmıştır. Yapılan *in vitro* deneyde antioksidan analiz sonucunda bitkinin güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür (7).

Becker ve arkadaşları *P. officinarum* (*H. pilosella*) bitkisinin antioksidan aktivitesini ölçmek amacıyla DPPH analizleri gerçekleştirmişlerdir. Bunun için bitkinin farklı konsantrasyonda hidrometanolik ekstreleri hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerin troloks eşdeğerleri 12-22.5 mg arasında değişmektedir. Araştırmacılar bitkinin antioksidan aktivitesinin içerdiği fenolik bileşiklerle yüksek oranda bağlantılı olduğunu beyan etmişlerdir (20).

Sitotoksik Çalışmaları

Gawronska ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada insan akciğer karsinomu (A549) ve insan kolon adenokarsinomu (HT 29) üzerinde “3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)” yöntemi ile *P. officinarum* bitkinin içeriğinde bulunan izotin 4'-O- β -D-glukopiranozit maddesinin etkisi incelenmiştir. Bitkinin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkili olduğu görülmüştür (21).

Antimikrobiyal Etki

P. officinarum bitkinin içeriğinde bulunan izotin 4'-O- β -D-glukopiranozit bileşiğinin antimikrobiyal etkisi agar difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bitkinin *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) bakterisine karşı etkili olduğu (MIK 125 μ g/mL) bulunmuştur (21).

Farmakolojik Etki

P. officinarum bitkisinin diüretik aktivitesi *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada diüretik etki için bitkinin 200 mg/kg dozunun yeterli olduğu bulunmuştur (25).

Toksisite

Bitkiyle ilgili herhangi bir toksisite çalışmasına rastlanmamıştır.

2.2. Yara İyileşmesi ile İlgili Genel Bilgiler

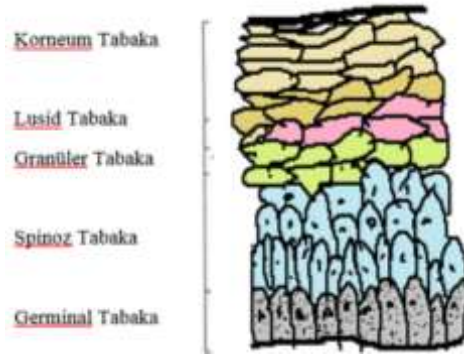
2.2.1. Deri

Deri renk, doku yapısı, kalınlık, esneklik açısından kişiden kişiye farklılık gösteren, vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını oluşturan vücudun en dış katmanıdır. Derinin görevleri arasında vücut ısı kaybını engellemek, vücutta su dengesini sağlamak, solunum ve vücudu dış etmenlerden korumak sayılmaktadır (26, 27).

Deri; epidermis, dermis ve hipodermis (subkutan tabaka) olmak üzere üç farklı doku tabakasından oluşmaktadır.

2.2.1.1. Epidermis

Vücudun en dış tabakasını oluşturmaktadır (Şekil 1). Keratinositler başta olmak üzere langerhans hücreleri, melanositler ve Merkel hücrelerinden meydana gelmektedir. Doku yaralanması oluştuğunda keratinosit hücrelerinin sayısı artmaktadır (28). Epidermis germinal, spinoz, granüler, lusid ve korneum olmak üzere 5 tabakadan oluşmaktadır.



Şekil 1. Epidermis katmanları

Germinal tabakada bulunan keratinositlerin bünyesinde holoklon, merokrin ve paraklon hücreleri bulunmaktadır. Spinoz tabaka, deriye sağlamlık veren 5-10 sıra yassı hücreden oluşan tabakadır. Nukleus dahil başka hücre organellerinin çözölmeye hazırlandığı tabaka ise granüler tabakadır. Korneum tabakasının altında ise lusid tabaka bulunmaktadır. Bu tabaka ayak tabanı ve avuç içi derisinin epidermisinde yer almaktadır. Korneum tabakada hücreler cansız ancak biyokimyasal olarak aktif hücrelerdir. Bu hücreler “korneosit” olarak adlandırılmıştır. Deriyi hem dış ortamda tehlikelere karşı korumakta hem de deriden su geçişini kontrol etmektedir (27, 29).

2.2.1.2. Dermis

Ciltte kan akımının olduğu, deriye elastikiyet ve dayanıklılık sağlayan epidermisin altında yer alan tabakadır. Bu tabakada kıl folikülleri, apokrin ve erkin bezler bulunmaktadır. Ayrıca yüksek oranda fibroblast bulunmakla birlikte histiyosit, lenfosit, plazma ve mast hücreleri, kollajen, elastin ve retikulum lifleri, hyaluronik asit, kondroitin sülfat, dermatan sülfat, fibronektin ve glikozaminoglikan da bulunmaktadır (27, 30, 31).

2.2.1.3. Hipodermis (Subkutan)

Deri altı yağ dokusunun yanında fibröz yapılarının da bulunduğu tabaka hipodermistir. “Pannikulus adipozus” adı verilen yağ hücre topluluklarının bulunduğu bu tabakada bağ dokusu lifleri, deri yüzeyine doksan derecelik açıyla yerleşmiştir.

Yapısında çok miktarda damar ve sinir bulunan hipodermisin ısı kaybını önleme, darbelere karşı direnç gösterme ve besin deposu gibi görevleri bulunmaktadır (27, 30).

2.2.2. Deri Ekleri

Deri ekleri epitelizasyonda önemli görev almaktadır. Keratinize ve salgı yapan deri ekleri olmak üzere deri ekleri ikiye ayrılmaktadır. Keratinize deri eklerine kıllar ve tırnaklar; salgı yapan deri eklerine ise sebace ve ter bezleri örnek verilebilmektedir.

2.2.3. Deri Sinirleri

Duyusal sinirler, dokunma duyusunu alan Merkel hücreleri ve Meissner korpükülleri, basınç ve vibrasyonla ilgili Pacinian korpükülleri ile kan damarları ve deri eklerini uyaran afferent sinirler derinin sinirlerini oluşturmaktadır.

2.2.4. Derinin Damarları

Subkutan doku ve dermis arasında yerleşen derin pleksus ile dermiste yer alan yüzeysel pleksus papiller derinin damarlarını oluşturmaktadır (30, 32).

2.2.5. Derinin Lenf Damarları

Deride spinoz tabakadaki hücrelerin arasında yer alan boşlukta lenf damarları başlamaktadır. Lenf kapilleri ilk olarak papiller bölgede başlamakta ve zamanla daha büyük damarlara dönüşerek, subkutan tabakanın altındaki genel lenf sistemine ulaşmaktadır (30).

2.2.6. Yara İyileşmesi

Yara, epitel dokunun normal anatomik yapısının ve fonksiyonunun hasarı veya bozulması olarak ifade edilmektedir. Cildin epitel yapısında meydana gelen hafif bir bozulma tendon, kas, damar, sinir, parenkimal organ ve hatta kemik gibi diğer yapılara zarar veren subkutanöz dokuya kadar uzayabilmektedir. Yaralar, ilgili organın içinden veya dışından başlayan patolojik süreçlerden kaynaklanabildiği gibi kendiliğinden veya bir hastalık sürecinin sonucu olarak da oluşabilmektedir. Yaralanma, sebebi ne olursa olsun dokuya zarar vermekte ve fizyolojik yapıyı etkilemektedir (33).

Yara iyileşmesi, çeşitli sebeplerle meydana gelen yaralı dokunun yerini yeni doku oluşumunun almasıdır. İyileşme sürecinde problem olan yaralar genellikle iyileşmenin normal aşamaları boyunca ilerleme kaydetmekte başarısız olmuş yaralardır. Bu gibi yaralar sıklıkla ertelenmiş, tamamlanmamış veya koordinasyonsuz iyileşme sürecinden dolayı patolojik bir iltihap durumuna girmektedirler. İyileşmeyen yaralar Birleşik Devletler'de yaklaşık 3-6 milyon insanı etkilemekte ve 65 yaş ve üstü kişiler bu olayların % 85'ini

oluşturmaktadır. İyileşmeyen yaralar, toplam maliyetin yılda 3 milyar dolardan fazla olduğu tahmin edilen önemli sağlık harcamaları ile sonuçlanmaktadır (11, 12, 34).

Yaralar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilir. Zaman, yaralanma sürecinde ve yara onarımında önemli bir faktördür (33, 35).

2.2.7. Yara İyileşmesi Tipleri

2.2.7.1. İyileşme Dönemlerine Göre Yara Tipleri

Akut Yaralar

Kendi kendine iyileşen, zamanında ve düzgün bir iyileşme süreci izleyerek normal şekilde ilerleyen yaralar akut yaralar olarak sınıflandırılmaktadır. İyileşme genelde 5-30 gün arasında gerçekleşmektedir. Akut yaralar, travmatik olarak veya cerrahi bir işlem sonucunda doku kaybı ile oluşabilmektedir. Örneğin cilt üstünde ve altında bulunan parankimadaki yumuşak doku tümörünü çıkarmak için yapılan bir işlem, dokudaki büyük hasardan ötürü yaranın oluşmasına neden olabilmektedir. Travmatik yaralara da sıkça rastlanmaktadır (33, 36).

Açık Yaralar

Açık yaralar; yaralanmaya neden olan objelere göre insizyon, laserasyon, abrazyon, delici yara, penetrasyon yaraları (kesici yaralar), ateşli silah yaraları ve yanıklar olarak sınıflandırılmaktadır (37, 38).

Kapalı Yaralar

Kapalı yaralar; açık yaralardan daha tehlikeli olup Kontüzyon, Hematom ve Ezilme olmak üzere üç temel başlıkta sınıflandırılmaktadırlar (37, 38).

Kronik Yaralar

Kronik yaralar, iyileşmenin normal aşamaları boyunca ilerleyemeyen, zamanında onarılamayan yaralanmalardır. Hemostaz, inflamasyon, proliferasyon veya yeniden şekillendirme aşamalarının bir veya birkaçında meydana gelen sorun sonucunda yara iyileşme süreci tamamlanamamaktadır. Bu aşamalar enfeksiyon, doku hipoksisi, nekroz, eksüdat ve inflamatuvar sitokin seviyelerinin artması faktörlerini içermektedir. Yarada inflamasyon sürecinin uzaması iyileşmeyen doku hasarı sürecini başlatmaktadır. İyileşme düzeni bozulduğu için işlevsel ve anatomik sonuçlar meydana gelmekte ve yaralar sıklıkla

tekrarlanmaktadır. Kronik yaralar natüropatik, basınç, arteriyel ve venöz yetmezlik, yanıklar ve vaskülit gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanabilmektedir (33, 39).

Komplike Yaralanmalar

Enfeksiyon ve doku defektinin birlikte gerçekleştiği özel yara tipidir. Enfeksiyon yarayı sürekli canlı tutmaktadır. Doku hasarı; travmatik veya enfeksiyon etiyolojisinden veya geniş bir doku parçasından (örn., Tümör yönetiminde) gelişmektedir. Yara büyüklüğü, yeri ve işlevi ne olursa olsun devamlı kontamine haldedir. Açık bir enfeksiyon oluşup oluşmaması, mikroorganizma sayısına ve türüne, kan akışına ve hastanın kendine has direncine bağlıdır. Enfeksiyonun tipik beş özelliği kızarıklık, ısı, ağrı, ödem ve doku fonksiyon kaybıdır (40, 41).

2.2.7.2. Mekanizmasına Göre Yara Tipleri

Primer İyileşme

Doku kaybı olmaksızın yaranın kenarlarının sütür, stapler veya yapışkan bantlar ile bir araya getirilerek kapatılması esasına dayanan iyileşme “primer iyileşme” olarak adlandırılmaktadır. Primer iyileşmede epidermis, zaman içinde kalınlaşarak yara birleşme yerinde ince bir tabaka oluşturmaktadır. Doku oluşumunu sağlayan kollajen ve diğer matriks proteinlerinin sentezi dengeli bir şekilde gerçekleşmekte ve bakteriyel kontaminasyon için bariyer oluşmaktadır (42-44).

Sekonder İyileşme

Aşırı oranda hücre doku kaybı varlığında, iyileşme süreci daha karmaşık bir hal almaktadır. Sekonder iyileşme kontraksiyon ve kenar epitelizasyonu ile karakterize olup primer iyileşmeden farkı, inflamatuvar yanıtın daha şiddetli geçmesi, granülasyon dokusunun daha fazla oranda meydana gelmesi ve yara kontraksiyonudur (42, 45).

Tersiyer İyileşme

İlk günlerde ileri derecede kontamine olmuş, kapatılamayan ancak bir hafta açık bırakıldıktan sonra iyi kanlanabilen dokularda gerçekleşmektedir. Bu yöntem, yaradaki inflamatuvar süresince bakteri kontaminasyonunu en aza indirmek için süre tanımaktadır. Daha sonra genellikle primer kapama uygulanmaktadır.

2.2.8. Yara İyileşmesinin Ölçülmesi

2.2.8.1. *In vitro* Çalışmalar

Yara iyileşme fazlarından proliferasyon evresinde miktarları artan fibroblast, keratinosit ve endotel hücrelerin proliferasyonu *in vitro* olarak uygun kitler kullanılarak hücre kültürü çalışmalarıyla değerlendirilmektedir (46). Ayrıca hyaluronik asit, kolajen ve elastin gibi bağ dokularının yıkımına neden olan hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimlerinin inhibisyonu üzerine de çalışmalar yapılmaktadır (11, 47, 48).

2.2.8.2. *In vivo* Çalışmalar

Yara iyileşmesi üzerine yapılan *in vivo* çalışmalarda fare, sıçan, kobay gibi küçük memeli hayvanlar kullanılmaktadır. Denekler üzerinde mekanik ya da termal travma yollarıyla belirli yaralar oluşturularak belirlenen maddelerin yara üzerine etkileri incelenmektedir (49).

Denekler belirli gruplara ayrılmaktadır. Cilt üzerinde belirlenen protokol dahilinde insizyon, eksizyon veya yanık yara modelleri uygulanmaktadır. Belirlenen süre boyunca test edilecek numuneler yaralara uygulanmakta, yara alanları fotoğraflanmakta ve ölçülmektedir. Yara alanında meydana gelen küçülme yara iyileşmesinin görsel ifadesi olarak değerlendirilmektedir (16, 49, 50).

2.2.8.3. Histopatolojik İncelemeler

Deneklerden alınan yara dokuları histopatolojik olarak değerlendirilmektedir. Kollajen değerlendirilirken histokimyasal olarak Trikrom reaksiyonundan yararlanılmaktadır. Lezyonlara ait kesitler Hematoksilen-eozin ile boyanarak inflamasyon, fibroblast proliferasyonu, iltihabi granülasyon dokusu oluşumu ve şiddeti 0-3 arasında skorlanarak değerlendirilmektedir. Dokular ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit içinde 48 saat fikse edilmektedir. Dokulara ait preparatların değerlendirilmesinde ışık mikroskopu kullanılmaktadır. Bütün dijital görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmaktadır. Değerlendirme 40x ve 400x'lük büyütmede gerçekleştirilmektedir (16, 51).

Korioallantoik zar üzerinde oluşturulan yara alanının iyileşme sürecinin incelenmesi başka bir deney modelidir. Bu deney modelinde epitelizasyon, fibroblast artışı ve damar oluşumu mikroskopla incelenmektedir (48, 52).

2.2.8.4. Biyokimyasal Analizler

Deney modelinde deneklerden belirli günlerde alınan doku ve serum örnekleri üzerine antioksidan, antiinflamatuvar, DNA, protein içeriği, heksozamin, glikozaminoglikan, kollajen ve hidroksiprolin miktar tayin analizleri yapılmaktadır (48, 53-55).

2.2.9. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Birden fazla faktör yara iyileşmesinde bozulmaya neden olabilmektedir. Genel anlamda onarımı etkileyen faktörler lokal ve sistemik olarak kategorize edilebilmektedir. Lokal faktörler yaranın kendisinin özelliklerini doğrudan etkileyen faktörlerdir. Sistem faktörleri ise iyileşme kabiliyetini etkileyen bireyin genel sağlık durumu veya hastalığı halidir. Bu faktörlerin birçoğu birbirleriyle ilişkilidir.

2.2.9.1. Lokal Faktörler

Enfeksiyon Etkisi: İnflamasyon yara iyileşme sürecinin normal bir parçasıdır. Bununla birlikte yara yerinde ve çevresinde kontamine mikroorganizmaların bulunması yara iyileşmesinde inflamatuvar fazın uzamasına ve inflamasyon şiddetinin artmasına sebep olmaktadır. İnflamasyonun uzaması, yaranın kronik bir duruma geçmesine yol açabilmekte ve yara iyileşmesinin başarısızlıkla sonuçlanmasına sebep olabilmektedir. Bu uzun süren iltihap, aynı zamanda ekstraselüler matriks (ECM)'i bozabilen bir proteaz ailesi olan matris metalloproteazların (MMP'ler) artmasına neden olmaktadır (12, 56-58).

Doku Hipoksisi: Uygun oksijen seviyesi optimum yara iyileşmesi için çok önemlidir. Kan akımının yetersiz olduğu yarada yara iyileşmesi için gerekli olan besin, oksijen ve inflamasyon mediyatörlerinin yara yerine gelişi gecikmektedir. Bu durumda dokuda fagositik savunma sistemi yavaşlayarak bakteri oluşumu hızlanabilmekte ve hücre ölümleri gerçekleşebilmektedir. Doku hipoksisinin etkisini telafi edebilen bir tedavi seçeneği olarak hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT) günümüzde kullanılmaktadır. HBOT, hipoksik yaralar için etkili bir tedavi olabilirken, bulunabilirliği sınırlıdır (58-60).

Yabancı Maddeler: Yabancı maddeler inflamatuvar fazın uzamasına sebep olarak yara iyileşmesinde gecikmeye neden olmaktadır (58, 61).

Ödem: Ödem granülasyon dokusunun yapısını etkileyerek yara iyileşmesinde gecikmeye sebep olmaktadır (58, 62).

Yara Bölgesinin Konumu: Dolaşımın daha yoğun olduğu dokularda oluşan yaralar, dolaşımın daha az olduğu bölgelerdeki yaralardan daha hızlı iyileşmektedir (58, 63).

Radyasyon: Radyasyon, yara iyileşme fazlarının hepsini etkileyerek yara iyileşmesini durdurabilmektedir (58, 64).

2.2.9.2. Sistemik Faktörler

Yaş: Yaşlı bireylerde oluşan yaralar genç bireylerde oluşan yaralara oranla daha geç iyileşmektedir. İyileşme kapasitesinde yaşla ilişkili değişiklikler incelendiğinde, iyileşme fazlarının, artan trombosit agregasyonu, inflamatuvar mediatörlerin salgısının artması, makrofajların ve lenfositlerin gecikmiş infiltrasyonu, makrofaj fonksiyonunun bozulması, büyüme salınınının azalması, gecikmiş anjiyojenez, kollajen seviyesi ve döngüsünün azalması, yeniden şekillenme ve azalmış yara direnci gibi karakteristik yaşla ilgili değişikliklere uğradığı ortaya konulmaktadır (58, 65, 66).

Malnütrisyon: İleri düzeyde beslenme eksikliklerinde hücrelerin metabolizması ve proliferasyonu yavaşlamakta buna bağlı olarak iyileşme hızı azalmaktadır.

Protein Eksikliği: Protein eksikliği, immün sistemin zayıflamasına, kollajen ve diğer proteinlerin sentezi için gerekli olan metiyonin, sistein ve arjinin gibi aminoasitlerin yetersizliğine sebep olarak yara iyileşmesini geciktirmektedir (58, 67).

Karbonhidratlar ve Yağlar: Hücrelerin proliferasyonu, hücre metabolizması ve hücrelerin enerji sağlayabilmeleri için karbonhidratlar ve yağlar sıklıkla kullanılmaktadır. Eksikliklerinde yara iyileşmesi olumsuz etkilenmektedir (58, 68).

Elementlerin Eksikliği: Demir eksikliği hidroksiprolin sentezini azaltarak kollajen yapımını önlemektedir. Çinko eksikliğinde ise epitelizasyon hızı ve yara gerilme kuvveti azalmaktadır (58, 69, 70).

Vitaminler: Vitaminlerin vücutta birçok fonksiyonu bulunmaktadır. En önemli görevlerinden biri kofaktör olarak kullanılmalarıdır. A vitamini, epitelizasyon, hücresel differansiyasyon ve immün sistem fonksiyonları için sıklıkla kullanılmaktadır (71). Kollajen sentezinde ve inflamasyon sürecinde C vitamini kullanılmakta, eksikliğinde yara iyileşmesi olumsuz etkilenmektedir (58, 68). Antioksidan olarak hücrede görev alan E vitamini lizozomal membran stabilizasyonunu sağlamaktadır (58, 72).

Diyabet: Diyabetik hastalarda savunma sisteminde meydana gelen defekt ve bakteri miktarındaki artış ile enfeksiyon riski artmakta ve yara iyileşmesinin bazı fazlarında aksaklıklar oluşmaktadır (58, 73).

İlaçlar: Steroidler, antineoplastik ve antikoagülan ilaçlar yara iyileşme fazlarını olumsuz yönde etkilemektedir (74).

Stres: Strese sebep olan ajanlar anksiyete ve depresyon gibi olumsuz duygusal durumlara, dolayısıyla sağlık sonuçlarını etkileyen fizyolojik süreçler üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilmektedir. Endokrin ve bağışıklık fonksiyonu üzerine anksiyete ve depresyonun direkt etkilerine ek olarak, düzensiz uyku, yetersiz beslenme, daha az egzersiz ve alkol, sigara kullanımı kötüye kullanma eğilimleri gibi daha sağlıksız alışkanlıkları olması daha muhtemeldir. Bu faktörlerin hepsi, iyileşme sürecini olumsuz şekilde etkilemektedir (12).

Cinsiyet Hormonları: Kadın östrojenlerin (östrojen ve 17 β -östradiol), erkek androjenlerin (testosteron ve 5 α -dihidrotestosteron) ve bunların steroid prekürsörü dehidroepiandrosteronun (DHEA) yara iyileşmesi sürecinde önemli etkileri olduğu görülmektedir. Özellikle östrojen, rejenerasyon, matriks üretimi, proteaz inhibisyonu, epidermal fonksiyon ve inflamasyon ile başlıca ilişkili genler ile ilişkili çeşitli genleri düzenleyerek yara iyileşmesini etkilemektedir. Araştırmalar, östrojenin hem kadınlarda hem de erkeklerde yaşla ilişkili iyileşme bozukluğunu iyileştirebildiğini göstermektedir (12, 75, 76).

Obezite: Obezite vücudun fizyolojik sürecini önemli ölçüde etkilemektedir. Ciltte sürtünmenin artması, yara gerginliğinde artışın olması, doku basıncının artması, venöz hipertansiyon oluşması ve sitokinlerin salınımının artması gibi faktörlerden dolayı yara iyileşmesinde gecikmeye sebep olmaktadır (12).

Alkol: Alkol kullanımı enfeksiyon insidansını arttırmakta ve yara iyileşmesini engellemektedir. Yaralanma anındaki etanol zehirlenmesi yara enfeksiyonuna duyarlılığın artmasında risk oluşturmaktadır (77, 78).

Sigara: Dumana maruz kalma fibroblast migrasyonunu ve çoğalmasını azaltabilmekte, yaranın kasılmasını engellemekte, epitel yenilenmesini etkilemekte, ekstraselüler matriks üretimini azaltabilmekte ve proteaz dengesinde bozulmaya sebep olabilmektedir. Bu faktörler yara iyileşmesinde gecikmeye neden olmaktadır (12).

2.2.10. Yara İyileşmesi Evreleri

Herhangi bir olayla yaralanma meydana geldikten sonra dokunun morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini yeniden kazanmasını sağlayacak oldukça karmaşık olaylar dizisi başlamaktadır. Bunlara “yara iyileşmesi evreleri” adı verilmekte olup Tablo 1’de gösterilmektedir (79).

Tablo 1. Yara iyileşme evreleri

Yara İyileşme Evreleri	Hücrede Meydana Gelen Olaylar
Hemostaz	Vasküler kontraksiyon Trombosit agregasyonu, degranülasyon, fibrin oluşumu (trombus)
İnflamasyon	Nötrofil infiltrasyonu Monosit infiltrasyonu ve makrofaj göçü Lenfosit infiltrasyonu
Proliferasyon	Reepitalizasyon Angiogenezis Kollajen sentezi ECM
Yeniden şekillenme	Kollajen şekillenmesi Vasküler gelişim ve düzenlenmesi

Yara iyileştirme süreci birbiri ile örtüşen ve oldukça karmaşık olan hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme olmak üzere dört evreden oluşmaktadır (12). Bu evreler ve onların biyofizyolojik işlevleri yaranın tamamen iyileşmesi için belirli bir zamanda ve uygun sırada gerçekleşmelidir.

2.2.10.1. Hemostaz

Hemostazın ilk evresi yaradan hemen sonra, vasküler daralma (vazokonstriksiyon) ve fibrin pıhtı oluşumu ile başlamaktadır. Pıhtı ve çevresindeki yara dokusu, transformasyon büyüme faktörü (TGF- β), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi pro-inflamatuar sitokinler ve büyüme faktörlerini serbest bırakmaktadır (12). Faktörler dört ana biyokimyasal sistemi harekete geçirmektedir. Bunlar; pıhtılaşma, kompleman, kinin sistemi ve plazmin yapımı şeklinde sıralanabilmektedir (80).

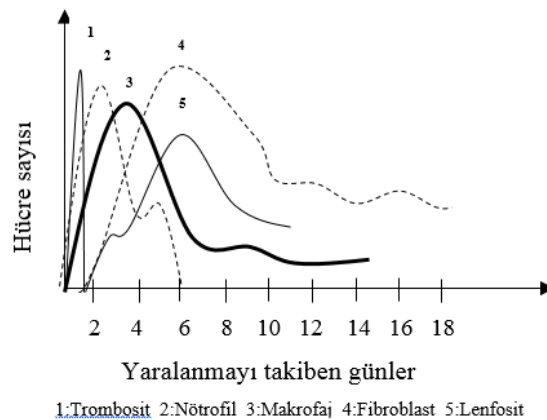
Trombositler, doku onarımının başlaması için mekanizmayı başlatmaktadır (80). Açığa çıkan tromboksan A2 (TXA2), vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonunu sağlayarak trombosit tıkaçını oluşturmaktadır. Ortaya çıkan fibrin ise bariyer oluşturmakta ve inflamatuvar hücre ve fibroblast göçü için uygun bir yer hazırlamaktadır (38).

Kanama pıhtı ile engellenmesini takiben endotel hücrelerinden histamin, prostoglandin E2, prostosiklin ve endotelial büyüme faktörü salgılanmakta ve vazodilatasyon gelişmektedir. Böylece damar geçirgenliği artmaktadır (80, 81). Lökositler ve plazma, kan damarından sızarak yaraya ulaşmaktadır. Yara bölgesine gelen lökositler inflamasyon faktörlerini serbest bırakmaktadır (38).

2.2.10.2. İnflamasyon

Kanama kontrol edildiğinde inflamatuvar hücreler yaraya göç etmekte (kemotaksis); nötrofillerin, makrofajların ve lenfositlerin ardışık infiltrasyonu ile karakterize olan inflamatuvar fazı başlamaktadır (38, 66, 71). Nötrofiller hücrelerde proteazlar ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi maddeler üretmesine rağmen, asıl fonksiyonu yara bölgesindeki mikropların ve hücrenin temizlenmesini sağlamaktır.

İnflamasyon ve doku yenilenmesi, bedenin iç içe geçmiş savunma mekanizmalarıdır. Yara oluşumu ile başlayan inflamasyon hasara sebep olan etkeni ortadan kaldırmaya veya bulunduğu yerden uzaklaştırmaya çalışmaktadır. Bazı durumlarda meydana gelen aşırı duyarlılık reaksiyonlarının oluşması ile reaktif inflamatuvar yanıt artabilmekte ve inflamasyonun bir yan etkisi olarak organlarda hasara sebep olabilmektedir (82). Yara iyileşmesinde görevi bulunan hücrelerin yara oluşmasını takiben zamana bağlı olarak değişen miktarları Şekil 2’de gösterilmektedir (42).



Şekil 2. Yara iyileşmesinde görevi bulunan hücrelerin zamana bağlı olarak miktarları

Vasküler ve hücresele olaylar olarak inflamasyon ikiye ayrılmaktadır

a. Vasküler Olaylar:

1. Damar çapında meydana gelen değişiklikler ve vasküler akım ile oluşan vazodilatasyon sonucunda dokuda kısa süreliğine ısı ve kızarıklık artmaktadır. Kan dolaşımından ekstrasvasküler sıvıya proteinlerin kaçması ile eritrosit birikmesi oluşmaktadır.
2. Vasküler permeabilite artışı: Vazodilatasyon ve artan kan akımı ile intravasküler hidrostatik basınç oluşmakta bunun sonucunda da kapillerden sıvı filtrasyonunu gerçekleştirmektedir. Sıvı ile birlikte zamanla protein kaçışı da oluşmaktadır. Sonuçta ozmotik basınç, intravaskülerde azalırken dokuda artmaktadır. Böylece dokuda ödem oluşmaktadır.

b. Hücresele Olaylar: Bu aşamada lökositlerin yara alanına göçü (kemotaksis) gerçekleşmektedir. Lökositler, damar endoteline yapışmakta, fagositoz ve salgıladıkları enzimlerle sindirimi gerçekleştirmektedir.

Trombositler damar endoteline yapışarak fosfolipaz A2' yi aktive etmektedirler. Fosfolipaz A2 aktive olduktan sonra ekstrasellüler aralığa araşidonik asit salınmaktadır. Bu evrede prostoglandin E1 ve prostoglandin E2 miktarı artmaktadır. Kan akımının artması ve trombositlerden salınan kemotaktik faktörler aracılığı ile yara bölgesine inflamatuvar hücre göçü gerçekleşmektedir. Artan damar geçirgenliği ile IL-1, TNF- α , tümör nekroz faktör-beta (TNF- β), trombosit faktör 4 (P-4) gibi sitokinler, nötrofil göçünü uyarmaktadır (38).

İnflamasyonun erken fazında etkili olan nötrofiller yara oluşumunu takiben 6 saat sonra ortaya çıkan ve iki gün boyunca etkili olan hücrelerdir. Nötrofiller yara bölgesinde bakterilerin fagositozunu sağlayarak ve proteaz salınımıyla zarar gören hücre kalıntılarının yara bölgesinden temizleyerek yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır (38, 42, 45).

Yara oluşumunu takiben 2. ve 3. günlerde nötrofil sayısı azalmakta monositlerin sayısı ise artmaktadır. 3. günden sonra yarada makrofajlar etkili olmaktadır (38, 42, 45).

Makrofajların yara iyileşmesinde rolleri büyüktür. Erken yarada makrofajlar iltihaplanma evresinde rol oynayan sitokinleri ve nitrik oksiti (NO) serbest bırakmaktadır. Makrofajlar aynı zamanda apoptotik hücrelerin (nötrofiller dahil) indüklenmesinden ve temizlenmesinden sorumludur, böylece iltihaplanmanın çözülmesine yol çmaktadır. Makrofajlar bu apoptotik hücreleri temizlediğinde doku rejenerasyonunu teşvik etmek için

keratinositler, fibroblastları ve anjiyogenez uyarıcı bir onarıcı duruma geçiş yapılmaktadır (83, 84). Bu sayede, makrofajlar iyileşmenin proliferatif evresine geçişi teşvik etmektedirler.

T-lenfositleri inflamatuvar hücreleri ve makrofajları takiben yaralara göç etmekte ve geç proliferatif/erken yeniden şekillenme aşamasında sayıları oldukça artmaktadır. T-lenfositlerin rolü tam olarak anlaşılamamıştır ve yoğun bir araştırma alanıdır. Bazı çalışmalar, gecikmiş T hücre infiltrasyonunun, yara alanındaki azalmış T hücre konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu, bazıları ise CD4⁺ hücrelerinin (T yardımcı hücreleri) yaranın iyileşmesinde pozitif bir role sahip olduğunu ve CD8⁺ hücrelerinin (T-bastırıcı-sitotoksik hücreler) ise yara iyileşmesinde inhibe edici bir rol oynadığını ifade etmişlerdir (12, 85, 86).

Ayrıca, cilt gama-delta T-hücreleri, doku bütünlüğünün korunması, patojenlere karşı savunma ve inflamasyonun düzenlenmesi de dahil olmak üzere yara iyileşmesinin birçok yönünü düzenlemektedir. Bu hücrelere, eşsiz dendritik morfolojileri nedeniyle dendritik epidermal T hücreleri (DETC) denmektedir. DETC, stresli, hasar gören veya dönüştürülmüş keratinositler tarafından aktive edilmektedir. DETC, keratinosit çoğalmasını ve hücre yaşamını desteklemek için FGF-7, keratinosit büyüme faktörleri ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 üretmektedir. DETC ayrıca, yara iyileşmesi sırasında inflamatuvar yanıtın başlatılmasına ve düzenlenmesine katkıda bulunan kemokinler ve sitokinleri de üretmektedir. DETC ile keratinositler arasındaki bağlantı, normal cildin ve yaranın iyileştirilmesine katkıda bulunurken, cilt gama-delta T hücrelerinden yoksun veya eksik olan dokular yara kapanmasında gecikme ve keratinositlerin proliferasyonda bir azalma göstermektedir (12, 87, 88).

2.2.10.3. Proliferasyon

İnflamasyonu takiben proliferasyon başlamaktadır. Epitelyal hücrelerin çoğalması ve yara içindeki geçici matris üzerinde göç ile karakterizedir. Dermiste, fibroblastlar ve endotel hücreleri mevcut en belirgin hücre tipidir ve kılcak büyüme, kollajen oluşumu ve hasar bölgesinde granülasyon dokusunun oluşumunu desteklemektedir. Yara dokusunda onarım yapan fibroblastlar hücre dışı matrisin ana bileşenleri olan kollajenin yanı sıra glikozaminoglikanlar ile tenaskin, fibronektin, hyaluronik asit gibi proteoglikanları da üretmektedirler (66, 71). Bu proteinler kollajen fibrillerinin oluşumu esnasında bunların

çapını ve büyüklüğünü etkileyerek bağ dokusunun fiziksel özelliklerinin belirlenmesinde görev almaktadırlar (37, 45).

Fibroblastların aktif olduğu, bağ dokunun sentezlendiği dönem fibroplazi evresi olarak adlandırılmaktadır. Bu evrede fibroblastların yanında epitel ve endotel hücreleri de aktiftir. Fibroblastlar kollajenin sentezi ve birikiminin yanında bağ dokusunun yapısal ve fonksiyonel olarak uygun şekil almasında da görev almaktadırlar. Fibroblastların çoğalmasından sorumlu başlıca büyüme faktörleri PDGF ve EGF'dir. Ekstrasellüler matriks sentezi 2-3. günlerde başlayıp, 15-20. güne kadar devam etmektedir (42).

Yaralarda epitelyal hücre artışı, sıvı kaybının ve enfeksiyon oluşumunun engellenmesi bakımından önemlidir. Epitelizasyon yaralanmadan 24 saat sonra başlamaktadır. Yaranın temiz olması ve ortam neminin uygun olması durumunda epitelizasyon hızı artmaktadır.

Ekstrasellüler matriks, büyüme faktörleri ve yara bölgesindeki değişiklikler epitelyal hücrelerin göçü için uyarıcı etki göstermektedirler. Epitelizasyonun düzenlenmesinde görev alan en güçlü büyüme faktörü EGF'dir (38, 45).

Yaranın iyileşme alanında damarların tomurcuklanmasıyla yeni damarların oluşumu olayına anjiogenezis veya neovaskülarizasyon adı verilmektedir (89). Anjiogenezis yara oluşumunun dördüncü gününde belirginleşip yara iyileşmesinin sonuna kadar devam etmektedir. Anjiogenezi primer uyaran, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)'dür. İlk dönemlerde trombositler tarafından salgılanan transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) ve PDGF dolaylı olarak anjiogenezi uyarmaktadır. Makrofajlar ise salgıladıkları TNF- α ve fibroblast büyüme faktörü gibi büyüme faktörleriyle NO sentezini sağlamaktadırlar (38, 89).

Anjiyogenez sırasında trombosit kökenli maddeler, heparin ve fibronektin gibi kemotaktik faktörler oldukça önemli rol oynamaktadır. Bu faktörler endotel hücre hareketini artırmaktadır (89, 90).

Yaralanmanın yaklaşık beşinci gününde granülasyon dokusu yeni damar oluşumu ile başlamaktadır (32). Granülasyon dokusunda makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, mast hücreleri, lenfositler ve yapı molekülleri ile bağ dokusu elemanlarını eritebilen proteazlar bulunmaktadır (43).

Granülasyon doku gelişimi ile birlikte aktin filamentlerinden zengin miyofibroblastlarca başlatılan yara kontraksiyonu da gerçekleşmektedir (91).

Kontraksiyonun artmasıyla yara alanı daralmakta ve zamanla granülasyon dokusunun üstünü kapatmaktadır. Yara alanının örtülmesiyle epidermis keratinize olmaya başlamaktadır. Yara iyileşmesindeki elementler Tablo 2’de gösterilmiştir (38, 42).

Tablo 2. Yara iyileşmesinde ekstrasellüler elementler

Yara Elemanları	Yara Oluşumunu Takiben Görülme Zamanları	Yara İyileşmesindeki Ana Etkileri
Trombositler	Hemen	Hemostaz, büyüme faktörlerinin (PDGF, TGF- β , EGF ve TGF- α) ve proteolitik enzimlerin salınımı
Nötrofiller	6. saat ile 2. ve 3. günde pik	Yara debribmanı, bakteri ve yabancı cisimlerin temizlenmesi
Makrofajlar	3-5 günlerde en fazla	Yara debridmanı, büyüme faktörlerinin salınımı (PDGF, TGF- β , EGF, TGF- α , FGF, IL-1)
Fibroblastlar	2. ve 3. günler	Kollajen, proteoglikan ve elastin sentezi, büyüme faktörlerinin salınımı (PDGF, TGF- β , KGF, FGF, IGF-1 ve IFN), yara kontraksiyonu, yaranın yeniden yapılanması
Keratinositler	Epidermal göç başlayınca	Mitoz ve göçe sekonder epidermal iyileşme, fibronektin sentezi, büyüme faktörlerinin salınımı (TGF- β , EGF ve TGF- α)
Endotel Hücreleri	2. ve 3. günler	Fibronektin sentezi, büyüme faktörlerinin salınımı (TGF- β , PDGF, IGF-1)
Fibronektin	Erken dönemde	Hücre göçü için yapısal destek, kollajenin düzenlenmesi
Kollajen	Tip III: 2 gün sonra Tip I: birkaç hafta sonra	Yapısal destek ve güç, hücreler arası etkileşimi düzenleme
Proteoglikanlar	2. haftada pik	Kollajen sentezinin düzenlenmesi, hücreler arası etkileşimler, matriks komponenti
Hyaluronik asit	İlk gün başlayıp 4. günde pik	Hücre motilitesinin artırılması

EGF; Epidermal büyüme faktörü, FGF; Fibroblast büyüme faktörü, IFN; İnterferonlar, IGF-1; İnsülin büyüme faktörü, IL-1; İnterlökin-1, KGF; Keratinosit büyüme faktörü, PDGF; Trombosit türevli büyüme faktörü, TGF; Transforming büyüme faktörü, TNF- α ; Tümör nekroz faktör-alfa

Matriks yara çevresi matriks metalloproteinazlar ve plazminojen aktivatörleri gibi çeşitli enzim sistemleri ile düzenlenmektedir. Bu enzimler aşırı matriks degradasyonunu önleyerek doku bütünlüğünün sağlanmasında görev almaktadırlar. Yara kenarında keratinositlerin bir kısmı proliferer olurken bir kısmı transformasyona uğramaktadırlar. Keratinositler başkalaşım sonrasında debrisleri fagosite ederek yara yatağı boyunca göç edebilir hale gelmektedirler. Keratinosit migrasyonu sonucunda yara kontraksiyonu ve reepitelizasyon ile yara kapanması gerçekleşmektedir (92-94).

2.2.10.4. Yeniden Şekillenme

Hücre proliferasyonu ve ECM sentezini takiben, yara iyileşmesi yıllarca sürebilen yeniden yapılanma aşamasına girmektedir. Bu fazda, yeni oluşan kılcal damarların birçoğunun küçülmesi meydana gelmekte; böylece yaranın vasküler yoğunluğu normale dönmektedir (12).

Granülasyon dokusunun yerini skar dokusu almaktadır. Skar dokusu daha az hücre ve damardan oluşmaktadır. Gelişen skar dokusu başlangıçta pembe renkte olup, damarsal yapıların azalması ile rengi açılmaktadır. Yaranın iyileşmesiyle metabolik ihtiyaç azalmakta ve buna bağlı olarak kapiller ağı gerilemektedir. Kollajen matriks moleküler çapraz bağlarla skar dokusunun içine sabitleşerek biriken Tip III kollajen'in yerini Tip I kollajen almaktadır (95). Bu evrede yapım olayı ile birlikte bir yandan yıkım da gerçekleşerek yeniden şekillenme gerçekleşmektedir. Bu yıkım olaylarının birçoğunu MMP'ler üstlenmektedir (96). MMP aktivitesi doku inhibitörü metalloproteinazlar (TIMP) tarafından düzenlenmektedir. TIMP'lar, MMP'lere karşı doğal bir direnç oluşturarak yeniden doku oluşumunun dengesini sağlamaktadır. Bu dengenin herhangi bir sebepten bozulması, matriks oluşumunda meydana gelen olumsuzluklar yaranın kapanmaması veya kapanmanın gecikmesi ile sonuçlanabilmektedir (95, 97).

Matriksinler olarak da adlandırılan matriks metalloproteinazlar homolog bir enzim ailesidir. Aktif bölgelerinde çinko bulunmaktadır. Ekstrasellüler matriks ile bazal membran komponentlerini yok etme kabiliyetleri vardır.

MMP'lar, metalloproteinaz enzim ailesine aittir. Büyük bir kısmı bağ dokusu matriks metalloproteinaz hücreleri ve inflamatuvar fagositleri tarafından ortama bırakılmaktadır. MMP'lar doku yenilenmesi, morfogenezis, yaraların iyileşmesi gibi olaylarda görev almaktadırlar. Ayrıca; tümör hücrelerin dokuya yayılımı ve metastaz gibi durumlarda da görevleri bulunmaktadır. MMP enzim ailesi, kollajenazlar (MMP-1, -8, -13, -18), stromelizinler (MMP-3, -7, -10, -11, -12), jelatinazlar (MMP-2, -9) ve membran tip MMP'lar (MT-MMP-14, -15, -16, -17) olmak üzere dört farklı gruptan oluşmaktadır. Yara iyileşmesinde MMP'lar öncelikle hasarlı bölgeye keratinosit göçünü sağlarlar. Anjiogenezde görevi olan MMP elemanları; MMP-1, MMP-2, MMP-9, MT-MMP ve MMP-19'dır. MMP-9'un etki ettiği substratlar "Pro IL-1 β , IL2R α , pro IL-8, pro-TNF- α , pro-TGF β , IFN- β , fibroblast büyüme faktörü reseptörü-1 (FGFR-1), stromal kökenli faktör-1 (SDF-1), endostatin, plazminojen, kisspeptin-1/metastin"dir.

Vücutta meydana gelen normal fizyolojik olayların yanında akciğer hastalıkları, kanser, deri hastalıkları gibi patolojik durumlarda da MMP'ların üstlendiği görevler bakımından MMP enzimleri ve inhibitörlerin önemi büyüktür (98).

Yarada oluşan yeni kollajen lifler öncelikle kendi aralarında, daha sonra eski kollajen liflerine kovalent bağlarla bağlanarak dokunun bütünlüğünü sağlamaktadırlar. Kollajen miktarı ve gerginliği, oluşan yeni dokunun sağlamlığında ve dokunun mekanik etkilere verdiği tepkide doğrudan etkilidir. Bu evrenin süresi hastanın yaşına, genetik yapısına, yaranın tipine, vücuttaki pozisyonuna ve inflamasyon periyodunun süresine bağlıdır (99).

Kollajen ve Hidroksiprolin

Kollajen, deri, kıkırdak, kemik ve tüm canlı dokuların başlıca yapı proteini olup yara iyileşmesini gösteren parametrelerden en önemlisidir. Vücudumuzda en yüksek oranda bulunan protein kollajen olup total vücut proteininin %30'unu oluşturmaktadır. Vücut ısısında proteolitik enzimlerin etkisine karşı oldukça dayanıklıdır. Kollajen üç tane polipeptit alt biriminden meydana gelen sarmal yapıda bir proteindir. Polipeptit alt birimlerden α -zincirler, ortak bir eksen etrafında dönerek fibrilleri oluşturmakta ve fibriller de kümelenerek fiberleri oluşturmaktadırlar. Kollajen birinci aminoasit glisin, ikincisi genelde prolin ve üçüncüsü ise hidroksiprolin olan tekrarlayan amino asit dizilerinden oluşmaktadır. Prolin ve lizin, prolin hidroksilaz ve protokollajen lizil hidroksilaz enzimlerinin katalizlediği bir reaksiyon ile protokollajenin peptit zincirlerine bağlanarak hidroksiprolin ve hidroksilizin moleküllerini oluşturmaktadır. Bu reaksiyonda, α -ketoglutarat, oksijen, demir ve askorbik asit kofaktör olarak kullanılmaktadır (100).

Kollajenler fibroblast, kondroblast, osteoblastın yanında odontoblast, düz kas, Schwan hücreleri, hepatositler, retiküler hücreleri tarafından sentezlenmektedirler.

Kollajen Tipleri

Kollajen tip I: En çok bulunan tiptir. Kemik, diş dokusu, dermis, fibröz kıkırdakta bulunmaktadır. Demetleşme göstermektedir.

Kollajen tip II: Kıkırdak dokuya özgü olan tiptir.

Kollajen tip III: Dokuda çoğunlukla kollajen tip I'le birlikte bulunmaktadır. Retiküler fibrillerin yapısında yer almaktadır. Diğer kollajen tipleri ile birarada bulunabilmektedir.

Kollajen tip IV: Bazal lamina yapısı olarak bulunmaktadır.

Kollajen tip V: Embriyonik membranlarda, kan damarlarında bulunmaktadır.

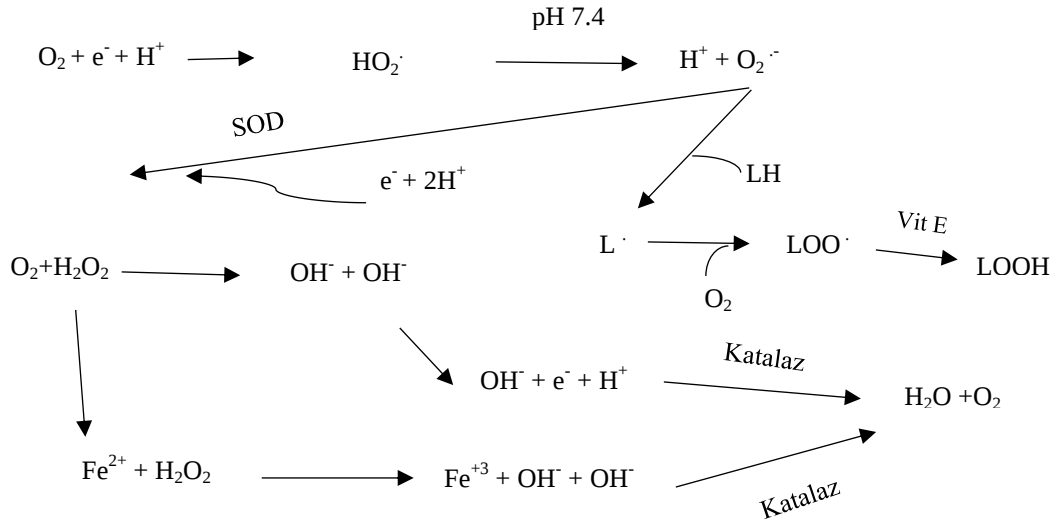
Hidroksiprolin kollajen molekülünün yaklaşık %11'ini oluşturmaktadır. α zincirler üçlü helezon meydana getirerek tropokollajen moleküllerini oluşturmaktadırlar. Bu moleküller hücre dışına transferaz enzimleri ile çıkartılmakta ve daha sonra biraraya gelerek kollajen fibrillerini oluşturmaktadırlar. Kollajen molekülünde çapraz bağların sayısı arttıkça çözücülerdeki çözünürlüğü azalmaktadır (100).

Kollajen sentezi C vitamini, TGF- β , insülin büyüme faktörü- 1 (IGF-1) ve insülin büyüme faktörü-2 (IGF-2) tarafından etkilenmektedir. İnterferon gamma (IFN- γ) ve glukokortikoidler tip I prokollajenin gen yazılımını bozarak kollajen sentezini azaltmaktadırlar. Kollajen yapımında meydana gelen çeşitli genetik bozukluklar sonucunda osteogenesis imperfekta ve Ehler-Danlos sendromu gibi konjenital hastalıklar görülmektedir (101).

2.3. Antioksidan Aktivite

Serbest radikaller, diğer moleküller ile kimyasal reaksiyonlara karşı oldukça dengesiz ve aktif olan, eşleşmemiş elektronlara sahip atom, molekül veya iyonlardır. Radikaller oksijen, azot ve kükürt olmak üzere üç elementten türetilmektedir. Sonuçta ROS, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif sülfür türleri (RSS)'nden oluşmaktadır. ROS, süperoksit anyonu (O_2^-), hidroperoksil radikali ($HO_2^\cdot$), hidroksil radikali ($^\cdot OH$), nitrik oksit (NO), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2), hipoklorik asit (HOCl) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi serbest radikalleri içermektedir. RNS, NO'dan türetilmekte; süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşmaktadır. RSS, ise ROS'un tiyollerle reaksiyonu sonucu kolaylıkla oluşmaktadır (102, 103).

ROS ile ilgili olarak, reaktif türlerin üretimine yol açan reaksiyonlar Şekil 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3. Reaktif türlerin üretimine yol açan reaksiyonlar

Vücutta serbest radikallerin üretilmesi hücrelerde oksidatif hasar meydana getirerek kanser, ateroskleroz ve inme, nörolojik bozukluklar, böbrek bozuklukları, karaciğer bozuklukları, hipertansiyon, romatoid artrit, solunum sıkıntısı sendromu, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok ciddi hastalıkların yanında immun eksikliği hastalıkları, inflamasyon, yaşlanma ile ilişkili dejeneratif hastalıklar, diyabetik komplikasyonlar, katarakt, obezite, otizm, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları, vaskülit, glomerulonefrit, lupus eritematöz, gastrik ülserler, hemokromatoz ve preeklamps gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır (102-106).

Antioksidanlar düşük konsantrasyonda serbest radikallerle doğrudan ya da dolaylı olarak etkileşime girerek proteinlerin, karbohidratların, lipidlerin ve DNA'nın oksidasyonunu önemli ölçüde önleyen ya da geciktiren maddelere denmektedir (102, 107).

2.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

2.3.1.1. Endojen Antioksidanlar

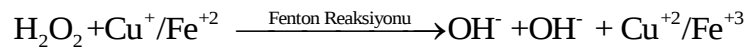
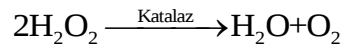
Endojen antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır.

Enzimatik Antioksidanlar

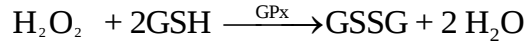
Süperoksit Dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz enzimi hücrede süperoksit anyonu ile etkileşime girerek hidrojen peroksit ve oksijen oluşturmaktadır. Böylece hücrede hasar meydana getirebilecek süperoksit anyonunu etkisiz hale getirmektedir.

İnsanlarda süperoksit dismutaz enziminin 3 şekli bulunmaktadır. Sitozolde bulunan SOD, 32 kDa molekül ağırlığına sahip olup (Cu/Zn SOD) yapısında bakır (Cu) ve çinko (Zn) bulundurmaktadır. Mitokondride bulunan 80 kDa molekül ağırlığına sahip olan SOD (Mn SOD) yapısında manganez (Mn) bulundurmaktadır. Hücre dışı sıvılarda ise 135,000 kDa moleküler ağırlığa sahip SOD'un ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD) hali bulunmaktadır. EC SOD yapısında enzimatik aktivite için gerekli olan Cu ve Zn iyonlarını içermektedir. Ekstrasellüler düzeyde enzimatik olarak süperoksit anyonunu etkisiz hale getirebilen tek antioksidan EC SOD'dir. Bu yüzden birçok akciğer hastalıklarından korunmada önemi çok büyüktür (108).

Katalaz: Karaciğer, kalp, beyin, iskelet kası gibi organlar Katalaz enzimini içermektedir. Hücre içinde daha çok peroksizomlarda, az oranda ise mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunan Katalaz, hidrojen peroksiti, su ve oksijene katalizleyen enzimdir. Böylece hidrojen peroksitten hidroksil serbest radikali oluşmasını engelleyerek antioksidan etkisini göstermektedir. Katalaz enziminin yapısında her bir birimde hem gruba ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) bulunan 4 alt birim bulunmaktadır (108, 109).



Glutasyon Peroksidaz (GPx): Dört alt birimden oluşan Glutasyon Peroksidaz hücrelerin sitoplazmasında bulunmaktadır. GPx glutasyonu kullanarak hidrojen peroksiti, lipid hidroperoksitleri ve DNA hidroperoksitleri metabolize etmektedir. GPx, Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz (Se-GPx) ile selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz (GST) olmak üzere iki formda olmaktadır. Bunlardan Se-GPx daha çok hidrojen peroksit, GST ise organik hidroperoksitlerin metabolize edilmesinden sorumludur. Reaksiyonlar sırasında glutasyon (GSH) okside olmakta ve glutasyon disülfid (GSSG) oluşmaktadır (108).



Glutasyon Redüktaz (GR): Yapısında flavin adenin dinükleotid (FAD) bulunduran Glutasyon redüktaz (GR), okside glutasyonun disülfid bağlarına elektron transferinden sorumludur. Oluşan ürün glutasyon'dur. Hücre içi glutasyon seviyesinin korunmasından bu enzim dolaylı da olsa sorumludur. Elektronu β -nikotinamid dinükleotid fosfat'tan sağlamaktadır. Bu yüzden serbest radikallerin ortadan kaldırılması için NADPH çok önemlidir (108).

Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon, koenzim q10, tiotik asit, siderofilin ve albümin bu antioksidanlardan sayılabilmektedir (108).

2.3.1.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar iki alt grupta incelenmektedir.

Vitamin Kaynaklı Eksojen Antioksidanlar

Bu grupta Vitamin E, Vitamin A, Vitamin C ve Vitamin B9 sayılabilmektedir (108).

İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar

Oksidaz inhibitörlerinden ksantin ve NADPH bu antioksidanlardan sayılabilmektedir. Ayrıca sitokinler, süperoksit dismutaz ve barbitüratlar bu kategorideki antioksidanlardır (108).

2.4. Antiinflamatuar Aktivite

İnflamasyon mikrobiyal kaynaklı enfeksiyon, doku zedelenmesi gibi tehdit oluşturan koşullarda organizmada oluşan koruyucu bir yanıttır (110).

İnflamasyonun başlangıcında, düzenlenmesinde ve çözülmesinde farklı süreçler gerçekleşmektedir. Günümüzde çok sayıda uyarıcı tarafından başlatılan ve çeşitli düzenleyici mekanizmalarla yönetilen pek çok farklı formda inflamasyon yolları tanımlanmıştır. İnflamasyonun normal insan fizyolojisi ve patolojisinin her yönü üzerinde bir etkisi olduğuna inanılmaktadır (110).

Akut iltihap doğuştan gelen bağışıklığın bir parçası olarak kabul edilmektedir. Yabancı maddelere ve tehlikeli moleküllerine karşı savunmanın ilk basamağıdır. Hasara

karşı ani ve erken yanıt oluşmaktadır. Bu fazda plazmada bulunan proteinlerin, sıvının ve lökositlerin göçü gerçekleşmektedir. İnflamasyonun bilinen semptomları arasında kızarıklık, ağrı, şişlik, fonksiyon kaybı ve ısı sayılmaktadır (111).

Kronik inflamasyonda ise inflamasyon yanıt tamir süreci ile iç içe olup süreç uzun sürmektedir. Tamir süreci inflamasyonun ilk evrelerinde başlamakta ve zararlı madde tamamen ortadan kaldırılınca sonlanmaktadır. İnflamasyon aslında koruyucu bir süreçtir fakat bazı durumlarda konakçıya zarar verebilmektedir (110).

Antiinflamatuvar etki inflamasyonu önleyici etki anlamına gelmektedir. İnflamasyon vücudumuzda savunma mekanizması için fizyolojik bir süreç olmakla birlikte bu sürenin uzaması ve semptomlarının yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemeye başlaması durumunda önemli bir problem haline gelmektedir. İnflamasyonun vücut için zararlı hale geldiği durumlarda antiinflamatuvar ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ilaçlar sentetik kaynaklı olabileceği gibi doğal kaynaklı da olmaktadır.

İnflamasyonun kimyasal maddeleri Tablo 3'te gösterildiği gibi yaralı dokudan, hücrelerden, plazmadan salgılanan çeşitli kimyasal maddelerdir (82). Plazmadan salgılananlar kimyasal maddeler (örneğin: komplemanlar) bir dizi proteolitik değişiklikler sonucunda biyolojik aktivitelerini kazanan maddelerdir. Hücreden salgılanan maddeler histamin mast hücreleri gibi intrasellüler granüllerde bulunmaktadır. Gerekli durumda sentez edilmekte ve salgılanmaktadır. Aktive edilen ve hücreden salgılanan bu kimyasal maddelerin bir kısmı kimyasal farklılaşmaya uğramakta (örneğin: araşidonik asit metabolitleri), bir kısmı ise enzimler tarafından aktive ya da inaktive edilmektedir (örneğin: kininaz bradikininini inaktive eder). Salgılandıktan sonra spesifik hedef reseptörlere bağlanarak kimyasal yanıtı başlatmaktadırlar (82, 112).

Tablo 3. İnflamasyonun kimyasal maddeleri

Kimyasal Madde Grupları	Salgılanan Maddeler
Vazoaktif aminler	Histamin, serotonin
Plazma proteazları	Bradikinin, kallikrein C3a, C5a, C5b-9 Fibrinopeptidler ve fibrin yıkım ürünleri
Araşidonik asit metabolitleri	Prostaglandinler, tromboksanlar, endoperoksitler Lökotrienler, hidroperoksieikozatetraenoik asit (HPETE), hidroksieikozatetraenoik asit (HETE)
Lökosit ürünleri	Lizozomal proteazlar, serbest oksijen radikalleri
Trombosit Aktive Eden Faktör (TAF)	TAF
Sitokinler	IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-14, IL-15, IL-18, Monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1), IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , TNF- β , TGF- β , G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-7
Büyüme faktörleri	VEGF, FGF-2, PDGF, KGF, EGF, TGF- β , TNF- α , IFNs, IL-1
Diğer medyatörler	NO, P maddesi, Kalpainler, HO-1, Yüksek göçlü grup 1

2.4.1. Vazoaktif Aminler

Akut inflamasyonun ilk dakikalarında artan ve permeabiliteden sorumlu olan medyatörlerdir (82, 112).

Histamin: Kan damarlarında bulunan mast hücrelerinden sentezlenmekte, kan bazofilleri ve trombositlerde saklanmaktadır. Yaralanma, sıcaklık, darbe gibi uyarılar, otoimmün olaylar, kompleman elemanları (anafilatoksin), nötrofillerden salgılanan lizozomal proteinler ile nöropeptidler mast hücrelerinden histamin salgılanmasına neden olmaktadır. Salınan histamin damarlarda dilatasyon ile vasküler geçirgenliğinin artmasına sebep olmaktadır.

Serotonin: Trombositlerde ve mast hücrelerindeki granüllerde bulunmaktadır. Mast hücrelerinden salgılanan Trombosit Aktive Eden Faktör (TAF), trombositlerden serotonin salgılanmasına ve trombosit kümelenmesine yol açmaktadır.

2.4.2. Plazma Proteazları

İnflamasyonun oluşumunu takiben plazmada bulunan medyatör çeşitleridir (82, 113).

Kininler: Bradikinin, kallikrein

Kallikrein, Hageman faktörün (Faktör 12) aktif olması ile prekallikreinden meydana gelmektedir. Nötrofil agregasyonunda görevli olan Kallikrein ayrıca kininojenden (HMWK) vazoaktif etkili bradikinin sentezlenmesinden sorumludur. Bradikinin arteriollerde dilatasyona, vasküler permeabilite artışına ve ciltte ağrıya sebep olmaktadır.

Kompleman Sistem: Immünitede ve inflamasyonda rol oynayan kompleman sistemin etkileri aşağıda belirtilmiştir.

- Vasküler etki: Anafilatoksinler (C3a ve C5a) mast hücrelerinden histamin salınmasını sağlarlar. Vasküler geçirgenliği arttırmaktadırlar.
- Kemotaksis: C5a nötrofillerin endotele adezyonunu neden olmaktadır.
- Fagositoz: Bakteriyel hücre duvarına yapışan C3b, fagositozu sağlar.
- Lizis: Lipid çift tabakaya yapışarak membran iyon kanallarının geçirgenliğini arttıran C5b-9 parçalanmasını sağlamaktadır (82, 113).

Koagülasyon-Fibrinolitik Sistem: Koagülasyon aşamasında Hageman faktör ile aktif olan plazma proteinleri görev almaktadır. Fibrinojen trombin aktivasyonu ile fibrine dönmekte ve fibrinopeptidler meydana gelmektedir. Plazmin ile oluşan fibrin parçalanma ürünleri ise vasküler geçirgenlikte artışa sebep olmaktadır.

2.4.3. Araşidonik Asit (AA) Metabolitleri

Membran fosfolipidlerinden fosfolipaz ile meydana gelen poliansatüre yağ asitleridir. Ortaya çıkan araşidonik asit metabolitleri iki yoldan birini izlemektedir (82, 114).

Siklooksigenaz Yolu (Prostaglandinler, Tromboksanlar, Endoperoksitler): Araşidonik asitten siklooksigenaz enzimi (COX) ile öncelikle prostaglandin G₂ (PGG₂) oluşmakta ardından PGG₂, peroksidaz ile PGH₂'ye dönmektedir. PGH₂ daha sonra PGI₂ (prostasiklin), TXA₂, prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin D₂ (PGD₂), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α})'ya dönüşmektedir. TXA₂ kuvvetli damar daraltıcı ve trombosit agreganı olmakla birlikte PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} ise vazodilatasyonu artırıcı olarak görev almaktadırlar.

Siklooksijenaz enziminin COX-1 ve COX-2 olarak 2 izoformu vardır. COX-1 ve COX-2 izoformlarının yapısal benzerliği % 60'dır. Bunlardan COX-1 yapısal bir enzim olup, birçok normal fizyolojik olayda düzenleyici olarak rol oynamaktadır. COX-1 tarafından üretilen prostanooidler, prostaglandin ve tromboksanın fizyolojik etkilerinden sorumludur. COX-2 ise inflamasyonla ilişkili olan prostaglandinlerin sentezinden sorumludur ve COX-2'nin inhibisyonu ile inflamasyon engellenmektedir. Non-Steroid Anti-İnflamatuar İlaçlar (NSAİİ)'in bu iki enzim üzerine olan selektiviteleri farklıdır. Selektif olmayan inhibisyonda COX-1 enzim inhibisyonuna bağlı olarak çeşitli yan etkiler ortaya çıkabilmekteyken, selektif inhibisyonda yan etkiler olmadan inflamasyon yok edilebilmektedir. Klasik NSAİİ her iki enzim üzerine etkili iken, COX-2 selektif inhibitörleri sadece COX-2'yi inhibe etmekte ve yapısal yan etki oluşmaksızın, inflamasyonu baskılamaktadır (115).

Lipoksijenaz Yolu [Lökotrienler (LT), 5-HPETE, 5-HETE]: Araşidonik asitten 5-lipoksijenaz ile Araşidonik asit 5-hidroperoksit (5-HPETE) ve HPETE'den de kemotaktik ajan olan Hidroksieikozatetraenoik asit (HETE) ve vazoaktif lökotrien (LT)'ler meydana gelmektedir. Lökotrien A₄ (LTA₄)'ten Lökotrien B₄ (LTB₄), Lökotrien C₄ (LTC₄), Lökotrien D₄ (LTD₄) ve Lökotrien E₄ (LTE₄) oluşmaktadır. LTB₄, lökositlerin endotele yapışmasını ve agregasyonunu sağlamaktadır (82, 116).

2.4.4. Lökosit Ürünleri

Lizozomal enzimler ile serbest oksijen radikalleri lökosit ürünlerini oluşturmaktadır. Çeşitli sebeplerden aktive edilen nötrofil ve makrofajlar lökosit ürünlerini bırakarak inflamatuvar yanıtı eşlik etmektedirler. Serbest oksijen radikalleri antioksidan savunma ajanları ile ortadan kaldırılmaktadır. Lizozomal proteolitik enzimlerden elastaz, kollajenaz ve katepsin nötrofillerin parçalanması ile serbest hale geçmektedir. Açığa çıkan bu enzimler doku proteinlerini yok ederek doku hasarına neden olabilmektedir (82, 114, 116).

2.4.5. Trombosit Aktive Eden Faktör (TAF)

TAF; Nötrofil, bazofil, monosit ile bazı endotel hücrelerinden salınmaktadır. Trombositlerin ve lökositlerin toplanmasına, vasküler permeabiliteye, PG ve LT gibi diğer medyatörlerin üretilmesine yol açmaktadır (82, 117).

2.4.6. Sitokinler

Sitokinler monositler, makrofajlar ve lenfositler tarafından salgılanan inflamatuvar ve immün yanıtın oluşmasında ve düzenlenmesinde hematopoietik hücrelere eşlik eden, peptid veya glikoproteinlerdir. Sitokinler, etkilerini hücrelerin ihtiyaçlarına ve çevresel koşullarına göre gerçekleştirmektedir. Farklı tip hücreler tarafından yapılan bir sitokin farklı tip hücrelere etki gösterebilmekte, diğer sitokinlerin yapımını düzenleyebilmektedir. Hatta bir sitokinin aynı hücre üzerinde farklı etkileri olabilmektedir (118).

Sitokinler hücre yüzeyinde spesifik reseptörlere bağlanarak etki göstermektedir. Sitokinlerin sınıflandırılması Tablo 4'te verilmiştir (119).

Tablo 4. Sitokinlerin sınıflandırılması

Elgert'in Aile Gruplarına Göre Sitokinler		Fonksiyonlarına Göre Sitokinler	
İnterlökinler	IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-14, IL-15	Doğal immüniteye aracılık edenler	Tip I interferonlar, TNF, IL-1, IL-6, kemokinler
Kemokinler	IL-18, Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP-1)	Lenfosit aktivasyonu, çoğalma ve farklılaşmasını düzenleyenler	IL-2, IL-4, TGF- β
İnterferonlar	IFN- α , IFN- β , IFN- γ	İnflamatuvar yanıtı düzenleyenler	IFN- γ , lenfotoksin, IL-5, IL-10, IL-12, Makrofaj Migrasyon İnhibitor Faktör (MIF)
Sitotoksik/immün düzenleyici/büyüme faktörleri	TNF- α , TNF- β , TGF- β		
Koloni uyarıcı faktörler (Hematopoietik büyüme faktörleri)	G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-7		

Kaşektin olarak da bilinen Tümör nekroz faktör (TNF), tümörlerde hemorajik nekroza sebep olduğu için bu şekilde adlandırılmıştır. TNF, TNF- α ve TNF- β olarak ikiye ayrılmış olup bu ikisi arasında yaklaşık %30 oranında benzerlik bulunmaktadır. 6. kromozom üzerinde yer alan 2 ayrı gen tarafından sentezlenmektedir. Aynı hücre yüzey reseptörüne ilgileri bulunmaktadır. TNF- α başlıca aktif makrofajlar tarafından yapılmaktadır. Endotelin nötrofiller ve mononükleer lökositler için yapışkan olmasını sağlayan adezyon moleküllerinin ortaya çıkmasını sağlayan molekül TNF- α molekülüdür.

Böylece inflamatuvar fazda görevli hücreler yara alanında toplanmaktadır. TNF- α ; nötrofil gibi fagositleri aktive ederek bakterilerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca interlökinlerin üretimini uyarmaktadır. TNF- α , endojen bir pirojendir. Ayrıca damarda antikoagülan faaliyetlerini aktive ederek pıhtılaşmayı uyarmaktadır. TNF- α 'nın uzun zamanlı kullanımı kök hücre bölünmesini baskılamakta; lenfosit düşüklüğü ve immün yetmezlik gelişmesine sebep olmaktadır (120).

Mononükleer fagositler, B lenfositler, doğal öldürücü (natural killer-NK) hücreler, T lenfositler, keratinositler, nötrofiller, endotel ve düz kas hücrelerinden sentez edilen Interlökin (IL-1) ailesi; IL-1 α , IL-1 β , IL-1 reseptör antagonist (IL-1ra) ve IL-1 γ olmak üzere 4 alt gruptan oluşmaktadır (121, 122). Düşük konsantrasyonda lokal inflamasyon mediyatörü olarak etki gösteren IL-1 endotel hücrelerin prokoagülan özelliklerini ve lökosit adezyonunu mümkün kılan yüzey moleküllerinin ekspresyonunu artırmaktadır. Mononükleer fagosit ve endotel hücrelerde ise kemokin sentezini uyarmaktadır. TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-1ra, IL-6, IL-4, IL-10 sentezinde görev alan IL-1 pirojen etkisinden dolayı hipertermiye neden olabilmektedir. Inflamasyon sırasında, lökosit ve nötrofiller iskemi bölgesine hızla gelmektedir. Nötrofil birikmesi ve adezyon moleküllerinin üretiminde artışa sebep olan IL-1 β , ayrıca inflamatuvar metabolit ve enzimlerden, prostoglandinlerin, kollajenaz ve fosfolipaz A2'nin salınımını sağlamaktadır (123). IL-1 β 'nın, iskemi esnasında, intrasellüler kalsiyum düzeyinin artmasında, serbest oksijen radikallerinin oluşumunda, NO sentezi stimülasyonu sonucu NO artışında, araşidonik asit salınımında, C-reaktif protein (CRP), kompleman, β -amiloid düzeylerinin yükselmesinde, mikrogliya aktivasyonunda da önemli rolü bulunmaktadır (124).

2.4.7. Büyüme Faktörleri

Makrofajlardan salgılanan büyüme faktörleri hücre membranındaki reseptörlere bağlanarak etkilerini göstermektedirler. Fibrozisi oluşturan çeşitli biyolojik aktif ürünleri salgılanmaktadır. Proinflamatuvar enzimlerin, koagülasyon ve kompleman sistemi mediyatörlerinin, ROS'ların, AA metabolitlerinin ve sitokinlerin salgılanmasında rol almaktadırlar. Yara iyileşmesinde görev alan maddeler Tablo 5'te detaylı olarak verilmiştir (82, 86).

Tablo 5. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer moleküller

Büyüme faktörü	Büyüme faktörü kısaltması	Salgılandığı yer	İşlevi
Vasküler endotelial büyüme faktörü	VEGF	Endotelial Hücreler	Anjiyogenezisi artırır.
Fibroblast büyüme faktörü 2	FGF-2	Makrofaj, Mast Hücreleri, Endotelial Hücreler, T Lenfositler	Anjiyogenezisi artırır. Endotelial hücre göçü ve büyümesini uyarır.
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü	PDGF	Trombosit, Makrofaj, Endotelial Hücreler	Proteoglikan ve kollajen sentezini artırır, makrofaj ve fibroblastları toplar.
Keratinosit büyüme faktörü	KGF	Fibroblast	Keratinosit büyüme ve olgunlaşmasını kontrol eder. Diğer büyüme faktörlerinin salgılanmasını artırır.
Epidermal büyüme faktörü	EGF	Trombosit, Makrofaj	Fibroblastların kollajenez salgılanmasını uyarır.
Transforme edici büyüme faktörü β	TGF- β	Trombosit, Makrofaj, T ve B Lenfositler	Anjiyogenezisi artırır, Adezyon molekülü ekspresyonunu uyarır. Lökosit ve fibroblast göçünü uyaran proinflamatuvar molekülleri artırır. Proteaz aktivitesini inhibe eder. Kollajen ve proteoglikan sentezini artırarak ECM sentezini indükler.
Tümör nekroz faktör α	TNF- α	Makrofaj, T ve B Lenfositler, Natural Killer Hücreler	Kollajen sentezini artırır. PMN lökosit marjinasyon ve sitotoksitesini düzenler.
İnterferonlar	IFNs	Makrofaj, T ve B Lenfositler, Fibroblast, Epitelial Hücreler	Makrofajları aktive eder. Fibroblast proliferasyonunu inhibe eder.
İnterlökin-1	IL-1	Makrofaj, Keratinositler, Endotelial Hücreler, Lenfositler	Proinflamatuvar peptittir. PMN lökositlerin, fibroblastların, keratinositlerin, kemotaksisi indükler. PMN lökositleri aktive eder

2.4.8. Diğer Medyatörler

Nitrik oksit (NO): NO kısa yarı ömürlü, lipofilik L- arginin'den NADPH-bağımlı enzim olan NO sentetaz (NOS) tarafından sentezlenen bir moleküldür. NOS endotel hücrelerinde eNOS, nöronlarda cNOS ve indüklenebilir form olarak iNOS olmak üzere, üç tip izoform halde bulunmaktadır (82, 125). NO yara iyileşmesinde anjiogenezisin uyarılmasının yanında vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun baskılanması, bağışıklık sisteminin uyarılması, nörotransmisyon ve hücre içi sinyalleşmede önemli rollere sahiptir

(90, 126, 127). Hipoksik durumunun artması, endotelial hücreler, fibroblast, monosit ve lenfositler NO sentezini arttırmaktadır (42). NO sentezinde meydana gelen olumsuzluk yara iyileşmesini geciktirmektedir. NO'nın mast hücre aktivasyonunu engelleyici etkisi bulunmaktadır. Nitrik oksit fazla bulunması serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olmakta ayrıca kaspazların aktivasyonlarını engelleyerek apoptozisi inhibe etmektedir. Fazla NO ayrıca ornitin dekarboksilaz enzimini inhibe ederek ve birçok hücre tipinde sitotoksik etkiye neden olarak hücre proliferasyonunu azaltmaktadır (82, 128).

P maddesi ağrı iletiminde görevli nöropeptid sınıfı bir kimyasal maddedir (129). Kalpainler ise kalsiyum bağımlı sistein proteazlar olarak ifade edilen kalpainlerin hücre sinyal ileti yollarında rol aldıkları belirtilmektedir. En önemlileri, m kalpainler ve μ kalpainlerdir. Kalpainler sinyal iletiminde, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, apoptoziste, inflamasyonda ve diğer fizyolojik olaylarda görev almaktadırlar (82, 130).

Hem oksijenaz 1 (HO-1) hem de yıkımında karbonmonoksit (CO) hız sınırlayıcı enzimdir. CO üretimi guanilat siklaz tarafından düzenlenmektedir. HO-1 aktivitesi ile meydana gelen CO miktarı bu proteinin antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik görevlerine eşlik etmektedir. Enzimin ödemi azaltıcı etkisinin yanında, lökosit yapışmasını engelleyici etkisi de bulunmaktadır. Ayrıca diğer inflamatuvar sitokinlerin üretimini de inhibe etmektedir. HO-1 hücre içi ATP düzeylerini artırarak hücre bütünlüğünün korunmasında görev almaktadır (131-133).

Yüksek göçlü grup 1-protein olarak bilinen protein "High mobility group box-1 protein" olarak da adlandırılmaktadır. İnflamatuvar ve nekrotik hücrelerden salgılanmaktadır. Doku hasarını meydana geldiğinde uyarı oluşturan bu protein proinflamatuvar sitokinlerin verilmesini sağlamakta ve stem hücrelerinin işlevini düzenlemektedir. Bu protein ayrıca belirli DNA bölgelerine bağlanabilen bir DNA-bağlayıcı proteindir. DNA'nın yapısında meydana gelmiş yapı değişimlerini tanımaktadır (82, 134-136).

2.5. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

DNA ipliğinin kalıp olarak kullanılıp çoğaltılmasına DNA replikasyonu adı verilmektedir. Prokaryot hücrelerde replikasyon, replikasyon orijini adı verilen halkasal bakteri kromozomunda belirli bir noktadan başlamaktadır. DNA iki yönde ve eş hızda sentezlenerek kendini eşlemektedir. Ökaryotlarda ise DNA eşlemesi birçok bölgede aynı anda başlamakta ve her iki tarafa doğru komşu bölgeler bir araya gelene kadar devam

etmektedir. Replikasyon çatalında, DNA ipliğinin her ikisi de, yeni DNA sentezi için kalıp olarak görev yapmaktadır. Replikasyon, ipliğin birinde kesintisiz ilerlerken kesintili iplikte yeni kısa DNA parçaları (1000-2000 bazlık) şeklinde sentezlenmektedir. Bu parçalara “Okazaki fragmenti” adı verilmektedir. Eşleşmenin başlaması için primer olarak kısa bir RNA parçası kullanılmaktadır. RNA primeri daha sonra uzaklaştırılmakta, boş olan yer “Polimeraz I” ile nükleotitler tarafından doldurulmaktadır. Doldurulan bölgeler “DNA ligaz” enzimi ile birleştirilmektedir. Eşleşme sırasında meydana gelen hatalar karışık bir düzeltme mekanizmasıyla düzeltilmektedir (137, 138).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA eşleşmesinin bir kap içerisinde hızlı bir şekilde ard arda tekrarlanmasıyla milyonlarca DNA parçasının elde edildiği işlemidir. PCR işlemlerinde replikasyonu yapılacak kalıp DNA parçası, kısa tek zincirli oligonükleotid primerler, ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi ve Taq DNA polimerazın substratları kullanılmaktadır. Replikasyonun başlaması için kısa DNA dizilerinin sentezinde primerler kullanılırken DNA polimeraz, substratları olan dNTP’leri (ATP, GTP, TTP, CTP) kullanarak DNA zincirini uzatmaktadır. İşlemden Mg^{+2} iyonu kofaktör olarak kullanılmaktadır (138, 139).

RT-PCR; gen ekspresyonu tayinlerinin gerçekleştirildiği daha hızlı ve oldukça hassas bir yöntemdir. Hücrelerden elde edilen RNA’nın, retrovirüslerden elde edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA)’ya dönüştürülme esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle az miktarda RNA ile üretilen mesajlar saptanabilmekte ve ekspresyon miktarı tespit edilebilmektedir. Ayrıca, RT-PCR ürünlerinden cDNA kütüphaneleri oluşturulmaktadır. RNA hibridizasyonu, RNaz koruma yöntemleri ve in situ hibridizasyon yöntemleri gibi RNA analiz yöntemleri ile karşılaştırıldığında oldukça hassas, hızlı, güvenilir ve basit bir yöntem olduğu görülmektedir (138).

RT-PCR analizlerinde çoğalan parçaların görünmesini sağlayan floresan işaretli prob ve boyalar kullanılmaktadır. Prob ve boyaların oluşan çift zincirli DNA parçalarına bağlanarak oluşturduğu floresan, yeni oluşan DNA ile doğru orantılı olarak artmaktadır. RT-PCR, numunelerden alınan DNA’nın kopya sayısını sayısal verilere dönüştürmede ve mRNA’nın düzeyini sayısal olarak belirlemede sıklıkla başvuru yöntemleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, tek nokta mutasyonlarının belirlenmesi, patojenlerin belirlenmesi, DNA

hasarının belirlenmesi, metilasyon tespitinin analizi, Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP) analizi, kromozom bozukluklarının tayini gibi araştırmalarda kullanılmaktadır (138).

PCR' ın Uygulama Alanları (138).

1. Kalıtsal hastalıkların teşhis edilmesinde kullanılmaktadır. Çoğaltılan DNA dizileri üzerinde hasarlı gen analizleri yapılmaktadır.
2. Kanser çalışmalarında tümör genlerdeki mutasyonlar PCR yöntemi kullanılarak belirlenmektedir.
3. Babalık testi ya da suçlu kişilerin bulunması için test edilecek numuneler içindeki DNA dizileri PCR çalışmaları ile çoğaltılarak kişi tespit analizleri yapılmaktadır.
4. Rekombinant proteinlerin ve aşıların geliştirilmesi amacıyla yapılan biyoteknolojik çalışmalarda PCR sıklıkla kullanılmaktadır.
5. Hastalıkların teşhisi çalışmalarında bakteri ve virüslerin tespitinde PCR yöntemi kullanılmaktadır.

2.6. Antimikrobiyal Aktivite

Mikroorganizmalar vücutta, havada, cansız yapılarda uygun koşullar (ısı, nem, sıcaklık) sağlandığı zaman kolaylıkla üreyip çoğalabilen canlılardır (140).

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmaları öldüren, üremesini engelleyen ve hücrel işlevlerini bozan maddeler olarak ifade edilmektedir. Mikroorganizmaları öldürücü etkiye bakteriyosid; öldüren maddelere ise bakteriyosidal madde adı verilmektedir. Organizmanın büyümesini ve üremesini durduran etkiye bakteriostatik etki, bunu yapan maddeye ise bakteriyostatik madde denilmektedir (141). Antimikrobiyal maddeler sadece bakteri ya da mantara etki gösterebileceği gibi her iki canlıya da etkili olabilmektedirler (142).

Bitkilerin antimikrobiyal etki amacıyla kullanımı 2000 yıllık geçmişe dayanmaktadır. Eski Yunan ve Mısır uygarlıklarında küf mantarları ve bitki özütlerinin çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanımı belirtilmiştir (143). Geçmişten günümüze bilgiler aktarılarak bitkilerin antimikrobiyal etkileri yapılan çalışmalarla yıllardır araştırılmaktadır. Günümüz ilaçlarının dörtte biri bitkilerden elde edilmekte olup, WHO raporlarına göre; gelişmekte olan ülkelerde yaşayan insanların 4/5'i sağlık problemlerinde bitkisel kaynaklı ilaçlara yönelmektedirler. Ayrıca, günümüzde sentetik olarak üretilen

birçok ilacın etken maddeleri, doğal kaynaklı ilaç hammaddelerinden hazırlanmış ya da bu maddelerin yapı benzerleri olarak üretilmiştir (141).

Artan enfeksiyon hastalıklarıyla birlikte sentetik ilaçların kullanımının artması, hedefe yönelik yerine geniş spektrumlu ilaçların kullanılması, ilaç dozlarının ayarlanmasında meydana gelen sıkıntılar, hastanın ilaca uyumu problemleri gibi sıkıntılardan dolayı mikroorganizmaların ilaca direnç geliştirmesi sorunu günümüzün problemleri arasındadır. Bu sıkıntıdan yola çıkılarak tedavide bitkiye yönelim artmaktadır (143).

2.6.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Bir maddenin belli bir bakteri çeşidine karşı antimikrobiyal aktivitesini *in vitro* olarak ölçmek için başvurulan testlerdir.

Bu testlerde “difüzyon” ve “dilüsyon” olarak iki yöntem uygulanmaktadır.

2.6.1.1. Difüzyon Testleri

Disk Difüzyon Testi

Sıkça kullanılan bir yöntem olan disk difüzyon testleri, pahalı olmayan ve uygulaması kolay olan bir testtir. Bu testte, etkisine bakılacak ajan öncelikle kağıt disklere emdirilmektedir. Besiyerinde çoğaltılmış mikroorganizma üzerine bu diskler yerleştirilmekte ve mikroorganizmanın ajana duyarlılığı belirlenmektedir. Emdirilen disklerden ajanlar ağızla zamanla salınmakta ve mikroorganizmanın üremesine bakılmaktadır. Belirlenen inkübasyon süresini takiben diske emdirilen ajanın inhibitör konsantrasyonlarının etkisine göre diskin çevresinde mikroorganizma üremesi görülmemektedir. Diskin çevresinde meydana gelen inhibisyon zonunun genişliği mikroorganizmanın ilaca duyarlılığının ölçüsüdür. Zon ne kadar geniş ise mikroorganizma ilaca o kadar duyarlı olmaktadır. İnhibisyon zonunun çapı mm olarak hesaplanmaktadır. Belirli standart zon tabloları bulunmakta ve tablolara bakılarak ajanın duyarlılığı hesaplanmaktadır (144).

E-test

MIK (Minimum inhibitör konsantrasyon) değeri; bir mikroorganizmanın üremesini engelleyen en düşük madde konsantrasyonudur. Bu test katı besiyerinde difüzyon yoluyla MIK değerlerinin saptanmasını sağlayan bir testtir. Bu testte öncelikle test edilecek

mikroorganizmanın yoğunluğu 0.5 McFarland yoğunluğuna ayarlanmaktadır. Daha sonra Mueller-Hinton agar yüzeyine bir eküvyonla mikroorganizma yayılmaktadır. Test edilecek ilacı barındıran E-test şeritleri agar yüzeyine yerleştirilmektedir. Plaklar 35°C'de 18-24 saat süreyle inkübe edilmektedir. MİK değeri şerit etrafında meydana gelen inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta olarak belirlenmektedir (145).

2.6.1.2. Dilüsyon Testleri

Bu testler, ilacın mikroorganizmanın üremesini inhibe etmesi ya da öldürmesi amacıyla lazım olan minimum konsantrasyonunu ölçmek amacıyla uygulanmaktadır. Dilüsyon testleri “tüp dilüsyon” ve “agar dilüsyon” olmak üzere iki farklı yolla uygulanmaktadır (146).

Tüp Dilüsyon

Tüp dilüsyon testleri prensipleri aynı olan “makro” ve “mikro” olarak belirtilen 2 farklı yöntemle uygulanmaktadır. Aralarındaki fark; makrodilüsyon testlerinde test tüpleri kullanılırken, mikrodilüsyon testlerinde ise “U” ya da “V” tabanlı mikropleytler kullanılmaktadır. Testte besiyeri olarak kalsiyum ve magnezyum gibi katyon eklenmiş Mueller-Hinton agarı kullanılmaktadır. Test edilecek olan ilacın öncelikle özel çözücüler ile çözülerek sıvı besiyerinde iki kat azalan şekilde dilüsyonları hazırlanmaktadır. Mikroorganizmanın standart bir çözeltilisi (1×10^6 CFU/mL) hazırlanmaktadır. İlacın çeşitli konsantrasyonlarını bulunduran her bir tüpe aynı oranda eklenmektedir. Antibiyotik bulunmayan ve üremenin bir ölçütü olan kontrol tüpüne de mikroorganizma eklenerek karşılaştırma yapılmaktadır. Bakteri eklenmemiş sadece besiyeri konulmuş bir tüp de besiyeri kontrolü olarak hazırlanmaktadır. Tüpler 35°C'de bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra bakteri üremesini ifade eden bulanıklığın incelenmesi gerçekleştirilmektedir. Bakterinin çoğalmasını engelleyen ve gözle tesbit edilebilir bir bulanıklığın oluşmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu, MİK olarak değerlendirilmektedir (144-146).

Agar Dilüsyon

Bu yöntemde ilaç dilüsyonlarının agar içine verilmesi ve petri plaklarına dökülmesi dışında yöntemin prensibi tüp dilüsyon testlerinin prensibiyle aynıdır. Böylece her plakta ilacın farklı konsantrasyonları bulunmaktadır. Bu yöntemde genellikle besiyeri olarak Mueller-Hinton agar kullanılmaktadır. Deneyde öncelikle test edilecek mikroorganizmanın

yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmaktadır. Sonrasında 1:10 oranında dilüe edilerek 107 CFU/mL konsantrasyon elde edilmektedir. Bu stok bakteri solüsyonundan elle veya özel inokülatörler kullanılarak 1-2 mL inoküle edilerek agardaki bakteri miktarı ortalama 104 CFU/mL olarak ayarlanmaktadır. Bakteri ekilen plaklar 18-24 saat süre boyunca 35°C'de inkübe edilmektedir. MIK değeri hesaplanmaktadır (144-146).

2.6.2. Antimikrobiyal Aktivitede Kullanılan Mikroorganizmalar

Staphylococcus aureus: Staphylococcaceae ailesine ait olan *Staphylococcus aureus*, kok formunda olan hareketi olmayan Gram (+) bir bakteridir. Cilt, kemik, yumuşak doku gibi birçok dokuda enfeksiyona sebep olmaktadır (146).

Escherichia coli: Enterobacteriaceae ailesine ait olan *Escherichia coli* çubuk formunda olan fakültatif anaerob gram (-) bir bakteridir. Üriner sistem, kan dolaşımı ve cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına, menenjit, peritonit ve sepsisemiye sebep olan bakteri türüdür (146).

Yersinia pseudotuberculosis: *Yersinia pseudotuberculosis* Enterobacteriaceae familyasına ait nadir görülen bir *Yersinia* türüdür. *Y. pseudotuberculosis*, insanlarda gıda kaynaklı enfeksiyon ile ilişkilidir. *Yersinia psödötüberkülozu*, apandisit taklit eden kendini sınırlayan mezenterik lenfadenit ile karakterizedir. *Y. pseudotuberculosis* hücre içinde hayatta kalmaktadır. Primer virülans faktörü, artan invaziviteye neden olan plazmid ile kodlanmış bir proteindir. Postenfeksiyöz komplikasyonlar arasında reaktif artrit ve eritema nodosum bulunmaktadır. *Y. pseudotuberculosis* karın ağrısı, ateş ve döküntüye sebep olmaktadır. Nadiren sepsis oluşabilmektedir (147).

Pseudomonas aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa* sporsuz, kapsülsüz, oldukça hareketli, çubuk şeklinde olan aerob bakterilerdir. Kolay boyanan bu bakteriler Gram negatiftirler. Bu bakteriler idrar yolu, göz ve kulakta enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Ayrıca yanık ve yara enfeksiyonları, menenjit, bronşit gibi hastalıklara da sebebiyet vermektedir. Ayrıca bu bakteriyle enfekte olan yeni doğanlarda ve immun sistemi zayıflamış kişilerde ölüme sebebiyet verebilen ishale neden olmaktadır (148).

Enterococcus faecalis: Enterococcus cinsine ait olan *Enterococcus faecalis* Gram-pozitif, anaerob, coccus bir bakteridir (149). Bu bakteriler nozokomiyal bakteriyemi, cerrahi yara enfeksiyonu ve idrar yolu enfeksiyonu gibi hastalıklara sebep olmaktadır (150).

Bacillus cereus: *Bacillus cereus* sporlu, gram pozitif, hareketli, aerob bir bakteri olup suda, toprakta, çürüyen bitkilerde bulunmakta ve sporları gıdalara kontamine olabilmektedir. Bu bakteri ile enfekte olan kişilerde sulu ishal, kramp tarzında karın ağrısı, bulantı meydana gelmektedir (151).

Listeria monocytogenes: *Listeria monocytogenes* anaerop, sporsuz, katalaz pozitif, oksidaz negatif, gram pozitif basil olan bir bakteri olup kanlı agar besiyerinde kolayca üremektedir. Bakteri et, çiğ sebze, süt ve ürünleri ile bulaşabilmektedir. Bakterinin kişiye enfekte olması halinde ateş, bulantı, kusmayla birlikte merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonuna sebep olmaktadır. Hamile kişilerde enfekte veya ölü bebek doğumuna neden olabilmektedir (152).

Mycobacterium smegmatis: *Mycobacterium smegmatis* gram (+) bir bakteri olup toprakta, tozda ve suda bulunabilmektedir. *M. smegmatis*'in neden olduğu yayılmış enfeksiyonlar sıklıkla immünosupresyon ile ilişkilidir (153).

Saccharomyces cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*, gıda endüstrisinde bira, şarap ve ekmek yapımında kullanılan iyi bilinen bir mayadır. *S. cerevisiae*, insanlarda ve hayvanlarda inflamatuvar bağırsak hastalığı ve çeşitli ishal tiplerinin tedavisi gibi gastrointestinal sistem rahatsızlıklarına karşı düşük maliyetli ve etkili bir adjuvan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (154).

Candida albicans: Maya tipi bir mantar olan *Candida albicans* eşeyli çoğalan, beyaz renkli kolonileri olan bir bakteridir. İnsanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonları oluşturarak kandidiyazis enfeksiyonuna neden olmaktadır (146).

Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları şu şekilde gruplandırılabilir (146).

1. Bakteri hücre duvarının sentezini bozarak
2. Hücre zarının yapısını bozarak
3. Bakteri ribozomlarına etki edip protein sentezini engelleyerek
4. Nükleik asit (DNA ve RNA yapılarını) sentezini bozarak
5. Hücrelerin metabolik yollarına etki ederek işlevleri bozarak

2.7. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu

Deride, saçta, göz zarlarında, beynin bazı bölgelerinde bulunan melanin inflamasyon, güneşe maruz kalma ve diğer birçok faktörün etkisi ile oluşan derinin yapısal bir pigmentidir. Deride bulunan melanin geniş spektrumlu ultraviyole ışığı absorbe etmekte ve yansıtmaktadır. Melanin miktarı arttıkça deri rengi koyulaşmakta ve bu mekanizmaya bronzlaşma denmektedir. Yapısal melanin keratinositlerin çekirdeklerinin üzerine birikerek genetik materyalin korunmasını sağlamaktadır. Fakat güneşe ya da UV ışınlarla fazla maruz kalınmasında melanin solgunlaşarak koruyuculuğunu yitirmektedir. Deri dokusunun yapısında ve genetik materyalde hasarlar meydana gelmektedir. Deri rengi deri kanseri üzerinde etkilidir. Derinin çok açık renkte olması ya da aşırı bronzlaşma deri kanseri türlerinden biri olan melanoma yatkınlığı artırmaktadır (155).

Melanogenez, melanositler içinde karanlıkta melanin adı verilen makromoleküler pigmentlerin oluşumunu kapsayan reaksiyonlar dizisidir. Melanin, enzimatik katalizli ve kimyasal reaksiyonların bir kombinasyonu ile oluşmaktadır (156).

Melanogenezis (melanin oluşumu), tirozinaz enzimi ile tirozinin oksitlenerek dopakinona dönüşümünü ile başlamaktadır. Bu ilk basamak melanin sentezinde hız sınırlayıcı basamaktır. Sentezin geri kalan reaksiyonları fizyolojik pH'ta kendiliğinden ilerlemektedir (156, 157). Oluşan dopakinon, oto-oksidasyon yoluyla dopa ve dopakroma dönüştürülmektedir. Dopa ayrıca tirozinazın substratıdır ve yine enzim tarafından dopakinona oksitlenmektedir. Dopakinondan bir dizi reaksiyon sonrasında melanin oluşmaktadır. Meyve ve mantarlardaki esmerleşme fenomeni genellikle kavramsal olarak melanogenezise benzeyen oksidatif polimerizasyonla ilişkilidir. Melanin türevi allomelanin, yapısında ana monomerler olarak dopakinonlanmış yapılar içermemekte, bunun yerine diğer kuinoid yapılarını içermektedir (156, 158).

Melanogenezis, tirozinaz başta olmak üzere tirozinaz-bağı protein 1 (TRP1) ve tirozin-bağı protein 2 (TRP2) enzimleri ile düzenlenmektedir. Melanin sentezinde genetik faktörler, güneşe maruz kalma gibi fiziksel faktörler, hormon, endotelin-1, prostaglandinler ve katekolaminler gibi biyolojik faktörler rol oynamaktadır (159).

Melanin, esas olarak insan derisinde bir foto-koruyucu fonksiyona sahip olmasına rağmen, melaninin derinin farklı kısımlarında anormal miktarda birikmesi estetik bir problem haline gelebilmektedir (156, 158). Melanin fazla sentezlenmesine hiperpigmentasyon denmektedir ve birçok dermatolojik bozukluğa sebep olmaktadır.

Tirozinaz enziminin inhibisyonu ile melaninin proliferasyonu engellenebilmektedir. Tirozinaz enzimini inhibe eden ajanlar beyazlatıcı veya anti-hiperpigmentasyon maddeleri olarak kullanılmaktadır (160, 161).

Tirozinaz yapısında bakır bulunduran, mantarlarda, yüksek bitkilerde ve hayvanlarda bulunan, L-tirozinin monofenolaz ile hidroksilasyonu ve 3,4-dihidroksi-L-fenilalaninin (L-Dopa), difenolaz ile o-dopakinona oksidasyonunu katalizleyen bir enzimdir.

Tirozinaz inhibitörlerinin mekanizması farklı olabilmektedir: (156)

1. Askorbik asit gibi dopakinonun kimyasal olarak indirgenmesine neden olan maddelerin azaltılması ile dopanın dopakinona dönüşümünün engellenerek dopakrom ve melanin oluşumlarının önlenmesi.
2. Dopakinon ile tepkimeye giren tiyo içeren bileşikler sayesinde dopakinon seviyesinin azaltılması.
3. Dopa ile yarışan tirozinaz enzim substratları sayesinde dopakron oluşumunun engellenmesi.
4. Enzimi spesifik olarak bozan ve böylece aktivitesini inhibe eden asitler veya bazlar gibi spesifik olmayan enzim inaktivatörlerinin kullanılması.
5. İntihar substratları olarak da adlandırılan mekanizmaya dayalı inhibitörler gibi geri dönüşümsüz spesifik tirozinaz inaktivatörleri kullanılması.
6. Spesifik tirozinaz inhibitörleri olarak kullanılan bileşiklerin, tirozinaza tersine bağlanıp, enzimin katalitik kapasitesini azaltması.

Vitiligo ise melaninin sentezlenememesi veya az sentezlenmesi ile gelişen pigmentasyon bozukluğudur. Etiyolojisi henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte prevalansı %0.1-2 arasında değişmektedir (162-165). Oksidatif stres, genetik yatkınlık, otoimmünite gibi nedenler vitiligoya sebep olabilmektedir (162). Vitiligo yaşamı tehdit eden bir hastalık olmamakla birlikte kozmetik açıdan kişinin yaşam kalitesini etkileyen önemli bir hastalıktır. Vitiligo tedavisinde repigmentasyon amaçlanmış olup çeşitli tedaviler uygulanmaktadır. Hastalığın şiddetine, yayılımına, hastanın yaşına, psikolojik durumuna bağlı olarak steroidler, vitamin D analogları, kalsinörin inhibitörleri, fototerapi (UV kullanılarak yapılan tedavi) ve cerrahi tedaviler uygulanmaktadır (166-169).

2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

YBSK, özel bir kolon kromatografisi olup; bu yöntemden biyokimyada aktif bileşikler saptamak ve tanımlamak amacıyla sıklıkla yararlanılmaktadır (170, 171). YBSK, sabit fazı içeren bir kolon ve bu kolondan pompa yardımıyla geçen hareketli faz (fazları) ile moleküllerin kolonda tutulma sürelerini gösteren bir dedektör yardımıyla maddelerin analizi esasına dayanan bir yöntemdir. Moleküllerin tutulma süreleri, sabit faz, analiz edilen bileşikler ve kullanılan çözücü(ler) arasındaki etkileşimlere bağlı olarak değişmektedir (171, 172).

Hareketli fazda su, metanol, asetonitril, asetik asit gibi organik karışabilir çözücüler yaygın olarak kullanılmaktadır (171-173). Hareketli fazda bulunan çözücülerin zaman içinde değişen karışımdaki oranlarına göre moleküllerin polarlık özelliklerinden kaynaklı kolonda tutulma süreleri değişmektedir. Hareketli fazda zaman içinde değişen çözücülerin bu oranları, gradient sistemini oluşturmaktadır. Moleküllerin kolonda tutulma süreleri dedektör ile belirlenerek maddelerin analizi gerçekleştirilmektedir (171, 173).

2.8.1. YBSK Tipleri

YBSK tipleri genellikle işlemde kullanılan faz sistemine göre sınıflandırılmaktadır (171, 173, 174).

2.8.1.1. Normal Faz Kromatografisi (NP-YBSK)

Bu yöntemde ayırma polariteye dayanmaktadır. NP-YBSK'da polar bir sabit faz ve polar olmayan bir mobil faz kullanılmaktadır. Polar analit, polar sabit faz ile etkileşime girmekte ve onun tarafından tutulmaktadır. Analitin polaritesinin artmasıyla adsorpsiyon kuvveti artmaktadır. Polar analit ile polar sabit faz arasındaki etkileşim tutulma süresini etkilemektedir.

2.8.1.2. Ters Faz Kromatografisi (RP-YBSK/ RPC)

RP-YBSK'da, polar olmayan bir sabit faz ve sıvı polar bir mobil faz kullanılmaktadır. RP-YBSK, polar bir hareketli faz, daha polar olmayan analit ve polar olmayan sabit faz arasındaki itici güçlerden kaynaklanan hidrofobik etkileşimler ilkesi üzerinde çalışmaktadır. Analitin sabit faza bağlanması, sulu faz içindeki ligand ile bağlantılı olarak analit molekülünün polar olmayan bölümünün etrafındaki temas yüzey alanı ile orantılıdır.

2.8.1.3. Boyut Eleme Kromatografisi (SEC)

Jel geçirgenlik kromatografisi veya jel filtrasyon kromatografisi olarak da adlandırılan boyut eleme kromatografisi, esas olarak parçacıkların büyüklükleri temelinde ayırıştırma gerçekleştirmektedir. Proteinlerin ve amino asitlerin üçüncül ve dördüncül yapısını belirlemek amacıyla tercih edilmektedir. Ayrıca, polisakkaritlerin moleküler ağırlık tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.8.1.4. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, retansiyonun çözünen iyonlar ile sabit faza bağlı yüklü bölgeler arasındaki etkileşime dayanmaktadır. Bu kromatografi yöntemi, suyun arıtılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.8.1.5. Biyo-Afinite Kromatografisi

Ligandlarla proteinlerin spesifik geri dönüşümlü etkileşimlerine dayanan bir ayırma gerçekleştirmektedir. Ligandlar biyo-afinite matriksi üzerinde katı maddeye kovalent olarak bağlanmakta ve proteinleri kolon-bağı ligandlarla etkileşime girerek tutmaktadır.

Biyo-afinite sütununa bağlı proteinler iki yolla ayrılabilir:

- Biyospesifik elüsyon: kolon bağlı ligand ile yarışan elüsyon tamponundaki serbest ligandı içermektedir.
- Spesifik olmayan elüsyon: pH, tuz gibi değişimler yardımıyla substratın bağlı olduğu kolon ile proteinin etkileşimi zayıflatılmaktadır.

Etkileşimin özgüllüğünden dolayı, biyo-afinite kromatografisi, tek bir adımda (10-1000 kat) çok yüksek saflaştırma ile sonuçlanabilmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Çözücü, İlaç ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan kimyasal madde, çözücü, ilaç ve cihazlar Tablo 6-9'da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Temin Edilen Firma	Kullanılan Kimyasal Maddeler	Temin Edilen Firma
Glikol Sterarat	Tekkim	Sybr Green Master Mix	NZYTECH
1,2 Propilen Glikol	Tekkim	Tirozinaz	Sigma-Aldrich
Sıvı Parafin	Sigma-Aldrich	α -Kojik Asit	Sigma-Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich	L-DOPA	Sigma-Aldrich
Tiobarbitürik Asit (TBA)	Merck	Mueller Hinton Agar (MHA) ve Sıvı Besiyerleri (MHB)	Mueller Hinton Agar (MHA)
1,1,3,3- Tetraetoksi Propan	Sigma-Aldrich	Maya Ekstreli Sıvı Besiyeri (YEG)	Merck
Hidroksiprolin	Sigma-Aldrich	<i>p</i> -Hidroksi Benzoik Asit	Sigma-Aldrich
Sitrik Asit Monohidrat	Sigma-Aldrich	Vanilik Asit	Sigma-Aldrich
Sodyum Asetat Trihidrat	Sigma-Aldrich	Şiringaldehit	Sigma-Aldrich
Kloramin T	Sigma-Aldrich	<i>p</i> -Kumarik Asit	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldehit (<i>p</i> -Dab)	Sigma-Aldrich	Sinapik Asit	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma-Aldrich	Benzoik Asit	Sigma-Aldrich
Sığır Serum Albümin	Sigma-Aldrich	Kersetin	Sigma-Aldrich
Nükleaz içermeyen sıvı	GeneAll SYBR	Oligo Dt (Primer, A Kuyruğu	GeneAll,Hyperscript
D Ntps (Nükleotit Karışımı)	GeneAll,Hyperscript	Random (Primer)	GeneAll,Hyperscript
Rox	GeneAll SYBR	Rtaz Reaksiyon Tamponu	GeneAll,Hyperscript
Hyperscript Tm Reverse Transcriptase	GeneAll,Hyperscript		

Tablo 7. Kullanılan çözücüler

Kullanılan Çözücüler	Temin Edilen Firma
Metanol	Merck
N-Butanol	Merck
Asetik Asit	Merck
HCl	Sigma-Aldrich
1-Propanol	Merck
Piridin	Sigma-Aldrich
Perklorik Asit	Merck
Etanol	Merck
o-Fosforik Asit	Sigma-Aldrich
Formaldehit	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich

Tablo 8. Kullanılan ilaçlar

Kullanılan İlaçlar	Temin Edilen Firma
Madecassol	Bayer Consumer Care AG, İsviçre
Ketamin	Pfizer, New York, ABD
Ampisilin	Mustafa Nevzat
Streptomisin	I.E. Ulugay
Flukonazol	Phizer

Tablo 9. Kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Markası
pH metre	Ohaus
Manyetik karıştırıcı	Heidolph
Hassas terazi	OHAUS Pioneer
Biyogüvenlik kabini	Bilser
Santrifüj	Sigma
İnkübatör	Memmert
Vorteks	İsolab
Spektrofotometre cihazı (ELISA Cihazı)	UV-1800 Shimadzu
Karıştırıcılı su banyosu	Nüvest402
Evaporatör	Heidolph
Homojenizatör	Heidolph
Buzdolabı	Arçelik
Mikroskop	Olympus BX51; <i>Olympus</i> , Tokyo, Japan
Kamera ataçmanı	Olympus DP71; <i>Olympus</i> , Tokyo, Japan
Real Time PCR Cihazı	Applied Biosystems® StepOnePlus™
Thermal Cycler Cihazı	Proflex
YBSK	Shimadzu

3.1.2. Bitki Toplanması, Teşhisi, Kurutulması ve Öğütülmesi

Pilosella hoppeana subsp. *testimonialis*'in topraküstü bitki kısımları kuru ağırlığı yaklaşık 100 g olacak şekilde Mayıs-Haziran ayında Savaştepe ve Kepsut (Balıkesir) ilçelerinden (800-1000 m yükseklikten) toplanmıştır. Bitki toplanırken kimyasal içeriğini etkileyebilecek toprak, yükseklik, sıcaklık, yağış vb. parametreler dikkate alınmıştır. Teşhisli herbaryum örneği herbaryum tekniklerine göre hazırlanmıştır. Bitkilerin teşhisi için, başta “Türkiye Florası” olmak üzere, komşu ülke floraları ve yazılmış eserlerden yararlanılmıştır. Herbaryum örneği İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda (ISTE 115015) saklanmaktadır.

Bitkilerin çiçekli topraküstü kısımları gölgede ve hava akımı bulunan serin bir alanda kurutulmuştur. Kurutulmuş örnekler, değirmende öğütülmüş ve partikül büyüklüğü 250 µm (≤ 0.250 mm) olacak şekilde 60 nolu eleklerden elendikten sonra elde edilen toz ekstraksiyon işlemlerinde kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2. 1. *In vivo* Aktivite Deneyleri

3.2.1.1. Deney Hayvanları

Yara iyileştirici aktiviteyi belirlemek amacıyla yapmış olduğumuz *in vivo* deneylerde temininin kolay olması, maliyetinin düşük olması, beslenme açısından maliyetinin hesaplı olması ve yara iyileşme sürecinin insanlarla benzerlik göstermesi gibi avantajlardan dolayı sıçan tercih edilmiştir.

Bu çalışma için kullanılması planlanan sıçanlar Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Çalışma, veteriner kontrolü altında sağlıklı olduğu belirlenen ağırlıkları yaklaşık 180-250 gram arasında olan yetişkin 72 adet dişi Sprague Dawley üzerinde yapılmıştır. Sıçanlar, 12'şer saat sırayla aydınlık ve karanlık uygulaması sağlanacak şekilde oda ısısı $22 \pm 2^\circ\text{C}$ olan odada tutulmuş, serbest içme suyu ile beslenmeleri sağlanmıştır. Sıçanların ortama adapte olabilmeleri amacıyla deneye başlamadan önce laboratuvar şartlarında en az üç gün ayrı kafeslerde bekletilmiştir.

Sıçanlar 4., 7., 14. ve 21. günlerde ötenazi edilmek üzere 4 ana gruba ayrılmıştır. Birinci grup 4. gün, ikinci grup 7. gün, üçüncü grup 14. gün, dördüncü grup ise 21. gün ötenazi edilmiştir. Bu gruplar kendi içinde kontrol, pozitif ve ekstre grubu olmak üzere 3 alt gruba ayrılmış olup Tablo 10 ve Resim 4'te gösterilmiştir. Kontrol grubuna ilk gün yara

yapılmış ve daha sonraki günlerde herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Pozitif gruba yara yapılmasını takiben ötanazi gününe kadar her gün günde 1 defa 0,5 g Madecassol uygulanmıştır. Ekstre grubuna ise yara yapılmasını takiben ötanazi gününe kadar her gün günde 1 defa 0,5 g ekstreyi içeren merhem uygulanmıştır. Deneylerde her alt grupta 6 hayvan kullanılmış olup her sıçan ayrı kafeste bırakılmıştır.

Tablo 10. Dairesel eksizyon yara modeli deney grupları

Dairesel Eksizyon Yara Modeli				
Gruplar/Ötenazi Günleri	4.Gün	7.Gün	14.Gün	21.Gün
1.grup (3 alt grup) (Kontrol/Pozitif/ Ekstre)	6+6+6			
2.grup (3 alt grup) (Kontrol/Pozitif/ Ekstre)		6+6+6		
3.grup (3 alt grup) (Kontrol/Pozitif/ Ekstre)			6+6+6	
4.grup (3 alt grup) (Kontrol/Pozitif/ Ekstre)				6+6+6



Resim 4. Sıçanların barındırıldığı kafesler

3.2.1.2. Test Numunelerinin Hazırlanması

Bitkinin toz edilen topraküstü kısmından yaklaşık 50 g alınarak 200 mL metanol eklenmiştir. 30°C’de çalkalayıcıda 8 saat ve 3 tekrarlı olmak üzere ekstre edilmiş ve ekstreler birleştirilmiştir. Sonrasında, süzgeç kağıdından süzülüp, süzüntü 30°C’de

özücüsü tamamen uçana kadar evaporatörde yoğunlaştırılmıştır. Çalışma sonucunda 4,1 g kuru ekstre elde edilmiştir Bitki ekstresinden hazırlanan merhem (Resim 5); Madecassol® pomat'ın bazı olan glikol sterarat: 1,2 propilen glikol: sıvı parafin (3:6:1) kullanılarak %1 oranında ekstre/fraksiyon içerecek şekilde hazırlanmıştır (16).



Resim 5. *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* metanol ekstresinden hazırlanan merhem

3.2.1.3. Referans Madde

Yara iyileştirici aktivite deneylerinde sonuçların karşılaştırılması amacıyla, standart yara iyileştirici madde olarak; eczaneden temin edilen 0.5 g Madecassol® pomat (*Centella asiatica*) (Resim 6) haricen kullanılmıştır.



Resim 6. Pozitif kontrol olarak kullanılan merhem

3.2.1.4. Dairesel Eksizyon Yara Modeli

Eksizyon yara modeli yaranın iyileşme sürecinde oluşan kontraksiyonunu, epitelizasyonu ve biyokimyasal parametreleri incelemek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır

(2, 16). Bu modelde Sadaf ve ark. tarafından geliştirilen yöntem bazı modifiyeler yapılarak uygulanmıştır (175). Yara alanın küçülmesi; yaranın kontraksiyonu ve yara iyileşmenin göstergesidir. Yara alanlarındaki küçülmeler gün aşırı ölçülmüştür.

Sıçanlara 90 mg/kg dozunda Ketamin intraperitoneal verilerek anestezi sağlanmıştır. Sıçanların sırt bölgesi traş edilmiştir. Sıçanın sırt dorsal bölgesinde vertebral kolonda biyopsi punch ile birbirinden en az 1 cm uzaklıkta, 10 mm çapında 2 tane dairesel alan şeklinde yara oluşturulmuştur (Resim 7). Oluşan yara açık bırakılmıştır. Ötenazi gününe kadar grubuna göre 0.5 g madecassol ya da ekstre/fraksiyon içeren merhem formülasyonu haricen yaralara uygulanmıştır (Resim 8). Yara alanlarının ilk gün ve gün aşırı dijital fotoğraf makinesi ile resimleri çekilmiştir, AutoCAD programı ve milimetrik kağıtlar kullanılarak yara alanlarındaki küçülme hesaplanmıştır. Ötenazi gününde hayvanların abdominal aorttundan kan alınmıştır. Kan numunesi alındıktan hemen sonra kansızlaştırma yoluyla ötanazi sağlanmıştır. Oluşturulan 2 yaradan alınan doku örneklerinden biri antioksidan, antiinflamatuvar, hidroksiprolin tayini ve PCR çalışmaları; diğer doku örneği ise histolojik değerlendirmeler için kullanılmıştır.

Dairesel eksizyon yara modelinde, yara alanlarındaki küçülmelerin değerlendirildiği yüzde kontraksiyon oranları hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

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



Resim 7. Sıçanların derisinde oluşturulan yara



Resim 8. Sıçanların yaraları üzerine bitkiden hazırlanan merhemin uygulanışı

3.2.2. Biyolojik Aktivite Deneyleri

Yeni yara iyileştirici ajanların geliştirilmesi biyolojik aktivite çalışmalarında önemlidir. Doğal bitkisel ürünler kuvvetli anti-inflamatuar, antioksidan ve antikanser ajanlar olarak kullanılabilir. Antioksidan, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar aktiviteler, yara iyileşmesine ve cildin yenilenmesine katkıda bulunmaktadır. Antioksidan aktivite ile hücre hasarı önlenerek sağlıklı hücrelerin büyümesi sağlanmaktadır (176).

3.2.2.1. Antioksidan Aktivite Tayini

In vivo deneylerde sıçanlardan belirli günlerde alınan yara doku ve serum örnekleri üzerinde antioksidan analizler yapılmıştır. Doku örneği çıkartıldıktan sonra tartılmıştır. Deri dokusu 1 g/7 mL oranında fosfat tamponu (0.5 mM, pH= 7.4) ile buzlu bir kapta, mekanik uçlu bir homojenizatörde 16000 devir/dak hızda 30 sn boyunca homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4°C'ye ayarlı soğutmalı santrifüjde 3500 rpm'de 30 dk boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatantlar ependorf tüplerine alınmıştır. Süpernatantlar analiz edilecekleri zamana kadar -80°C'de saklanmıştır.

Katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) analizleri için doku ve serum örneklerinde KTÜ Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında Catalase Assay (Cayman, ABD) ve Superoxide Dismutase Assay (Elabscience, Çin) ticari kitleri kullanım kılavuzlarına göre çalışılmış ve ELISA cihazı'nda okuma yapılmıştır.

Doku ve serumdaki MDA seviyeleri Ohkawa ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem modifiye edilerek tayin edilmiştir (177). Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile parçalanması ve homojenatta bulunan MDA'nın tiobarbitürik asit (TBA) ile ortam pH'ın 3.5 olduğu şartlarda oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Öncelikle deneyde kullanılacak olan %8.1 sodyum dodesil sülfat (SDS), %0.8 tiobarbitürik asit (TBA), n-butanol/piridin

(15:1, v/v) ve %20 asetik asit reaktifleri hazırlanmıştır. Numune ve standart tüpler hazır edilmiştir. Numune tüpüne 50 µL numune ve standart 1, standart 2 ve standart 3 tüplerine sırasıyla 50 µL, 25 µL ve 12.5 µL standart çözeltisi eklenmiştir. Numune ve standart 1 tüpüne 150 µL, standart 2 tüpüne 175 µL ve standart 3 tüpüne 187,5 µL distile su eklenmiştir. Her tüpe 50 µL SDS, 375 µL TBA ve 375 µL asetik asit ilave edilmiştir. Tüpler 60 dakika, 95°C’de su banyosunda kaynatılmıştır. Sonrasında örnekler soğutulurak, 250 µL distile su ve 1250 µL n butanol/piridin eklenmiştir.

Daha sonra 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip üst faz 532 nm’de n-butanole karşı okutulmuştur. MDA standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksi propan kullanılarak standart grafik elde edilmiş ve örneklerin absorbans değerleri kullanılarak nmol/mL cinsinden MDA miktarı saptanmıştır. Çıkan sonuç homojenizasyon sırasındaki dilüsyon faktörü ile çarpılıp sonuçlar “nmol/mg protein” cinsinden belirlenmiştir.

3.2.2.2. Anti-inflamatuar Aktivite Tayini

In vivo deneylerde sıçanlardan belirli günlerde alınan yara doku ve serum örnekleri üzerinde anti-inflamatuar analizler yapılmıştır. Doku örneği çıkartıldıktan sonra tartılmıştır. Deri dokusu 1 g/7 mL oranında fosfat tamponu (0.5 mM, pH= 7.4) ile buzlu bir kapta, mekanik uçlu bir homojenizatörde 16000 devir/dak hızda 30 sn boyunca homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4°C’ye ayarlı soğutmalı santrifüjde 3500 rpm’de 30 dk boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatantlar ependorf tüplerine alınmıştır. Süpernatantlar analiz edilecekleri zamana kadar -80°C’de saklanmıştır.

IL-1β ve TNF-α için numuneler KTÜ Eczacılık Fakültesi Biyokimya laboratuvarında TNF-α (Elabscience, Çin) ve IL-1β (Elabscience, Çin) ticari kitleri kullanım kılavuzlarına göre çalışılmış ve ELISA cihazı’nda okuma yapılmıştır.

3.2.2.3. Kollajen Bağ Dokunun Saptanması

Hidroksiprolin Tayini

Kollajen ekstraselüler matriks elemanlarından biri olup, hücrelere destekleyici bir iskelet oluşturan ve yara iyileşmesinde rol oynayan yapısal bir proteindir. Kollajenin yapısında yer alan her üç aminoasitten birini oluşturan hidroksiprolinin ölçümü ile dokulardaki kollajen miktarı hesaplanmaktadır. Hidroksiprolinin oksidasyonu sonucu oluşan pirol bileşiğinin p-dimetilaminobenzaldehit ile verdiği renkli kompleksin 560 nm de verdiği absorbans kollajen metabolizmasının dolaylı bir göstergesidir. Hidroksiprolin

miktarının fazla olması dokuda kollajenin fazla olduğunu göstermektedir. Bu amaçla Woessner tarafından geliştirilen yöntem çeşitli modifikasyonlar yapılarak çalışılmıştır (2).

Hidroksiprolin standartının ölçümü için öncelikle stok çözelti hazırlanmıştır. Bunun için 5 mg hidroksiprolin 50 mL 0.001 N HCl'de çözülmüştür. Hazırlanan stok çözeltisinden 0.5 µg/mL; 1 µg/mL; 1.5 µg/mL; 2 µg/mL; 2.5 µg/mL ve 5 µg/mL olacak şekilde dilüsyon çözeltileri hazırlanmıştır.

Daha sonra ölçümü çalışılacak dokular tartılıp, kapakları olan pyrex tüplere konulmuştur. Üstüne 5 mL 6 N HCl eklenerek 130°C'de 3 saat boyunca hidroliz edilmiştir. İndikatör amaçlı bir iki damla metil kırmızısı (%0.02'lik) ilave edilmiştir. Çözeltinin rengi sarıya dönene kadar 2.5 N NaOH eklenmiştir.

Çözeltilerin hazırlanışı: Tampon (Buffer): Sitrik asit monohidrat (50 g), glasiyal asetik asit (12 mL), sodyum asetat trihidrat (120 g) ve sodyum hidroksit (34 g) öncelikle 250 mL 1-propanol ile çözülmüştür. Daha sonra, yaklaşık 600 mL distile su ilave edilmiştir. Kalibrasyonu yapılmış pH metre kullanılarak 1 N HCl veya 1 N NaOH ilave edilerek pH=6'ya ayarlanmıştır. Sonrasında çözelti distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Metil red indikatörü: 2 mg metil red, 100 mL distile suda çözdürülerek %0.02'lik solüsyon alüminyum folyo ile kapatılmış erleninde hazırlanmıştır. Buzdolabında saklanmıştır.

Kloramin T: 1.138 g kloramin T, 100 mL tampon solüsyonu ile çözülerek 0.05 M solüsyon elde edilmiştir. Solüsyon günlük hazırlanmıştır.

p-Dimetilaminobenzaldehit (*p*-dAB): 10 g *p*-dAB, 35 mL %60'lik perklorik asit içinde çözdürülüp izopropanol ile 100 mL'ye tamamlanması ile %10'luk solüsyon elde edilmiştir. Solüsyon günlük hazırlanmıştır.

Standart ve örnek çözeltilerden 2'şer mL tüplere alınmıştır. Tüplere 1 mL kloramin T eklenerek 20 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında tüplere 1 mL *p*-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi eklenerek oluşan tabakalanma giderilene kadar çalkalanmıştır. Ardından tüm tüpler su banyosunda (60°C) 20 dk boyunca bekletilmiştir. 5 dk musluk suyunda soğutulduktan sonra örneklerin absorbansı 557 nm'de ölçülmüştür.

3.2.2.4. Protein Miktarı Tayini

Çalışma Coomassie Blue G-250 boyası kullanılarak yapılmıştır. Coomassie Blue G-250, proteinlere oldukça sağlam bağlanan ve renkli bileşikler oluşturan aromatik boyar maddedir. Boya, kuvvetli bir asitte çözündüğünde protonlanarak kırmızı-kahverengi bir renk meydana gelmektedir. Bu boya çözeltisi 465 nm’de maksimum absorbands verirken (+) yüklü bir proteine bağlandığında ise metakromik cevap oluşmaktadır. Boya ve protein mavi renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Oluşan boya-protein kompleksi 595 nm’de absorpsiyon vermektedir (178).

Bradford Ayırıcının Hazırlanması

100 mg Coomassie Blue G- 250, 50 mL %96 (v/v) etanolde çözülmüş sonrasında 100 mL %85 (v/v) o-fosforik asit eklenmiştir. Çözelti distile su ile 1 L’ye tamamlanarak Whatman (No:1) süzgeç kâğıdından süzölmüştür. Koyu renkli cam bir şişede saklanmıştır.

Denevin Yapılışı

Hazırlanan eppendorf tüplerin hepsine öncelikle 2 mL Bradford ayıracı koyulmuştur. Üzerine protein miktarı tayin edilecek serum ve doku örnek çözeltilerinden 20 µL eklenmiştir. Köre 20 µL distile su ilave edilmiştir. Tüpler karıştırılmış ve ortaya çıkan mavi renkli çözeltinin absorbandsı 595 nm’de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçölmüştür. Sığır serum albümini (BSA) ile standart eğri grafiğı oluşturulmuştur. Ölçölen absorbands değeri standart grafiğıne uygulanarak örneklerin protein miktarı mg/mL konsantrasyonda hesaplanmıştır.

Protein Standart Eğrisinin Hazırlanması

Protein standardı için BSA kullanılmıştır. 0.2-1 mg/mL konsantrasyon aralığında dilösyonlar, hazırlanan stok BSA çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanmış ve elde edilen standart çalışma çözeltilerine Bradford metodu uygulanmıştır. Serum albümini regresyon denklemi, ölçölen absorbands değeri en küçük kareler metodu uygulanarak elde edilmiştir. Çizilen standart eğri örneklerin protein miktarlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.2.3. Histopatolojik İncelemeler

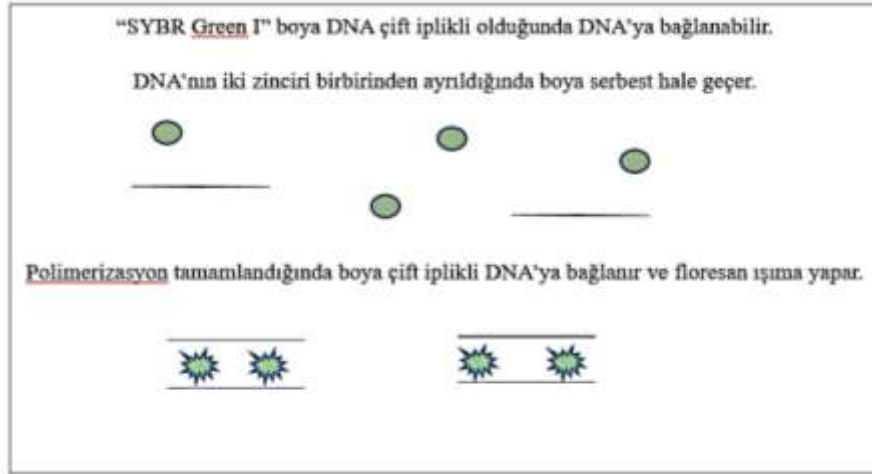
Ekstre, pozitif ve kontrol grubundan alınan yara dokuları histopatolojik olarak değeriendirilmiştir. Kollajen değeriendirilirken histokimyasal olarak Trikrom

reaksiyonundan yararlanılmıştır. Lezyonlara ait kesitler Hematoksilen-eozin ile boyanarak inflamasyon, fibroblast proliferasyonu, iltihabi granülasyon dokusu oluşumu ve şiddeti 0-3 arasında skorlanmıştır (51) (0: yok, 1: hafif şiddette, 2: orta, 3: şiddetli). Daha sonra gruplar ve aldıkları skorlar karşılaştırılmıştır.

Dokular ışık mikroskopik tayin için %10'luk formaldehit içinde 48 saat fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemini takiben akan çeşme suyunda 24 saat boyunca yıkanmıştır. Yükselen dereceli alkollerden (%80, %96, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildikten sonra ksilende şeffaflaştırılmış ve parafin bloklara gömülmüştür. Elde edilen parafin bloklardan tam otomatik mikrotom (Leica RM 2255, Tokyo, Japan) ile 5 µm'lik kesitler ışık mikroskopik yöntemler için lam üzerine alınmıştır. Kesitler, Hematoksilen-Eozin (H-E) boyası ile boyanmıştır. Dokulara ait preparatların değerlendirilmesinde Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) mikroskop kullanılmıştır. Elde edilen bulgular ışık mikroskobuna adapte kamera ataçmanı (Olympus DP71; Olympus, Tokyo, Japan) ile fotoğraflanmıştır. Bütün dijital görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Değerlendirme 40x ve 400x'lük büyütmede gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. RT-PCR Çalışmaları

Bu çalışmada DNA'nın çoğalımı görmek amacıyla sıklıkla kullanılan "SYBR Green I" yöntemi (Şekil 4) kullanılmıştır. Floresan boya DNA'nın çift zincirli yapısına bağlanmaktadır. Çoğalan DNA miktarındaki artışa orantılı olarak cihazda görünen floresan şiddeti de aynı oranda artmaktadır. Bağlı olmayan serbest haldeki DNA molekülü ise çok miktarda floresan ışıma yapmaktadır. SYBR Green I, DNA'nın çift zincirli yapısında küçük oluğa tutunan bir boya çeşidi olup 497 nm dalga boyunda yükseltgenmekte ve 520 nm dalga boyunda indirgenmektedir. Aktivitesinin %6'sını, 30 amplifikasyon döngüsü sonrası kaybetmektedir. Reaksiyona DNA molekülü, uygun primerler ve SYBR Green I boya eklenmesi ile başlanmaktadır. Primerler bağlanıp uzama başlamaktadır. DNA eşlendikçe uzamakta ve çift zincirli yapının arasına boya molekülü girmektedir. Böylece floresan yayılım başlamaktadır. Başlangıçta sinyaller zayıftır; fakat eşlenen DNA arttıkça floresan şiddeti de artmakta ve bu artış "RT-PCR" cihazının monitöründen kolaylıkla izlenebilmektedir (179).



Şekil 4. SYBR green I yöntemi

In vivo deneyler sırasında sıçanlardan alınan dokular toplanarak RNA later solüsyonu içerisinde analiz zamanına kadar -80°C 'de saklanmıştır. Hücrelerden RNA izolasyonu üreticinin direktifleri doğrultusunda hazır kit ile gerçekleştirilmiştir. Homojenize edilmiş dokulardan izole edilen RNA'dan RT-PCR yöntemi ile cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak ilgilenilen gen ürünlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemiyle saptanmıştır.

RT-PCR Protokolü

Dokuların RNA'sı hücrelerden izole edilmiştir. İlk dizi cDNA örnekleri, RNA örneklerinden HyperScript First-Strand Synthesis kit kullanılarak revers transkripsiyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA'larda RT-PCR yöntemi ile TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve MMP-9'un genlerinin ekspresyon düzeyleri saptanmıştır. Hazırlanan RNA örneklerinden cDNA sentezlendikten sonra RT-PCR analizi Applied Biosystems® StepOnePlus™ Real-Time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RT-PCR sonuçları incelenerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Real-time PCR analizi için bir internal house keeping gen (β -aktin) kullanılmıştır (Tablo 11). Bu geni kullanmamızın nedeni ekspresyonun değişmediği ve sürekli olan bu kontrol genlere göre araştırmak istediğimizi geni kıyaslamaktır.

Tablo 11. Genlerin primer dizileri

Gen	mRNA dizileri	Uzunluk	T _m (°C)	% GC
TNF-alpha- F:	CAAACCACCAAGCAGAGGAG	20	56	55
TNF-alpha-R:	CAGCCTTGTCCCTTGAAGAG	20	56	55
IL-1B-F:	CTTCAAATCTCACAGCAGCA	20	55	45
IL-1B-R:	GTCATCATCCCACGAGTCAC	20	54	55
IL10-F:	CTGGACAACATACTGCTGAC	20	53	50
IL10-R:	AAATCATTCTTCACCTGCTCC	21	53	43
MMP9-F:	ATGTCACCTTTCCTTCACCT	20	52	45
MMP9-R:	TTTCTGTCTGTGTCGTAAGTC	20	52	45
ACTB-F:	GGCACCACACTTTCTACAATGAG	23	57	48
ACTB-R:	GGCATACAGGGACAACACAG	20	54	55

F: Forward primer (5')

R: Reverse primer (3')

T_m: Erime sıcaklığı

GC: Guanin ve sitozin nükleotit içeriği

RT-PCR tamamlandıktan sonra sonuçlar PCR sistemi içerisindeki software ile comparative CT (ΔΔCT) metoduna göre analizi yapılmıştır (180). Örnekler, kontrol ile karşılaştırılarak logaritmik olarak gen ekspresyon artış azalış oranları hesaplanmıştır.

3.2.4.1. Dokudan RNA İzolasyonu

RT-PCR çalışması için öncelikle dokulardan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için -80°C'de saklanan dokular RNAaz'lerden arındırılmış bir çalışma ortamında kuru buz ile parçalanmıştır. Parçalanmış dokuların üzerine 400 µL lys tamponu eklenmiştir (400 µL lys + 40 µL β-merkaptoetanol). Oda ısısında 10 dk bekletilmiştir. Elde edilen lizat mini spin kolona aktarılmıştır. 3500 rpm'de 30 sn oda ısısında santrifüj edilmiştir. Toplama tüpleri değiştirilmiş ve üzerine 500 µL GW1 tamponu eklenmiştir. 3500 rpm'de 30 sn oda ısısında santrifüj edilmiştir. Toplama tüpleri değiştirilip üzerine 700 µL RNW tamponu eklenmiştir. 3500 rpm'de 30 sn oda ısısında santrifüj edilmiştir. Herhangi bir tamponun kolon içerisinde kalmaması için 3500 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edilmiştir. Kolonlar, etiketlenmiş steril 1.5 mL'lik eppendorflara alınıp üzerine 30 µL nükleaz içermeyen su eklenmiştir. 1 dk oda ısısında bekledikten sonra, 3500 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edilmiştir (Resim 9). Oluşan RNA -20°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Resim 9. RT-PCR analizinde çalışılan ependorflar

3.2.4.2. RNA'dan cDNA İzolasyonu

İki aşamada cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle steril 200 μ L'lik ependorf tüplere 8 μ L izole edilen RNA örnekleri, 1 μ L d NTPs (nükleotit karışımı), 0.8 μ L oligo dT (primer, A kuyruğu), 0.8 μ L random (primer) ve 3.4 μ L deiyonize su eklenmiştir. Bileşenler eklendikten sonra 65°C' de (Thermal cycler'da) (Resim 10) 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra buz üzerine alınmıştır ve ikinci aşamaya geçilmiştir. Bunun için 2 μ L RTaz reaksiyon tamponu, 2 μ L (0.1 M) DTT, 1 μ L (200 U/ μ L) HyperScript™ Ters Transkriptaz ve 1 μ L ZymoAll™ RNaz Inhibitor eklenmiştir. İkinci aşama da eklendikten sonra 55°C'de 1 saat, 85°C'de 5 dakika bekletildikten sonra -20°C'ye kaldırılmıştır.



Resim 10. Thermal cycler

3.2.4.3. RT-PCR Analizi

Applied Biosystem StepOnePlus cihazı ile çalışma yapılmıştır (Resim 11). Örnekler 2 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Pleyte aşağıdaki çözeltiler eklenip PCR koşullarına uygun olarak analiz gerçekleştirilmiştir (Tablo 12, 13).



Resim 11. Applied biosystem steponeplus RT-PCR cihazı

Tablo 12. PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	1x
SYBR Green Master Mix	10 µL
F(10 pmol)	0.8 µL
R(10 pmol)	0.8 µL
ROX	1 µL
cDNA	2 µL
Deiyonize su	5.4 µL
TOTAL	20 µL

ROX: Gereksiz ışımaları önleyen alternatif boyalı

F: Forward primer (5')

R: Reverse primer (3')

SYBR Green Master Mıx (Cat No:801-520, Lot no:QP116G25001)

Tablo 13. RT-PCR analiz koşulları

RT-PCR koşulları	Isı (°C)	Bekleme süresi (sn)
Denatürasyon	95	600
Amplifikasyon	95	10
	60	30
	72	1
Soğuma	40	60

3.2.5. Mekanizma Aydınlatma Çalışmaları

3.2.5.1. Hem Oksijenaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Fibroblast hücreleri (L9N29) 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum), 2 mM l-glutamin, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin içeren besiyeri içerisinde 37°C ve %5 CO₂ ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler %70-85 doygunluğa ulaşana kadar beklenmiştir. Hücre kültür flasklarında %85 doygunluğu ulaşan hücreler 96 kuyucuklu pleyte alınmıştır. Çalışma için 4 ana gruba ayrılmıştır. Birinci grup kontrol grubu, ikinci grup 4 saat boyunca H₂O₂ (150 µM) ile muamele olan grup, üçüncü grup 6 saat boyunca H₂O₂ (150 µM)'e maruz bırakıldıktan sonra 4 saat boyunca bitkinin toprak üstü metanol ekstresinin (12.5, 25, 50, 100, 250 µg/mL) konsantrasyonlarında tedavi edilen 5 alt grup, dördüncü grup ise pozitif grup olarak 6 saat boyunca H₂O₂ (150 µM)'e maruz bırakıldıktan sonra 4 saat boyunca kersetin (40 µg/mL) ile tedavi edilen gruptur. Bitkinin HO üretimine etkisi için kolorimetrik metodun uygulandığı human heme oxygenase 1 ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory, Çin) kullanım kılavuzuna göre çalışılmış ve ELISA cihazı'nda 450 nm'de okuma yapılmıştır.

3.2.5.2. Makrofajlarda Nitrik oksit Üretiminde Bitkinin Hücre Canlılığına Etkisi

Nitrik Oksit (NO) Tayini

NO oksidasyonun son ürünü olan nitrit üretimi, iNOS aktivitesinin bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Öncelikle hücre kültür flasklarında %85 doygunluğu ulaşan RAW 264.7 hücreleri 96 kuyucuklu pleyte alındıktan sonra 4 saat boyunca bitkinin topraküstü metanol ekstresinin farklı dozlarıyla (12.5, 25, 50, 100, 250 µg/mL) muamele edilmiştir. Bitkinin NO üretimine etkisi için kolorimetrik metodun uygulandığı NO assay kiti (Elabscience, Çin) kullanım kılavuzuna göre çalışılmış ve ELISA cihazı'nda 550 nm'de okuma yapılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak indometasin kullanılmıştır (181, 182).

Toplam Protein Tayini

Öncelikle hücre kültür flasklarında RAW 264.7 hücrelerin %85 doygunluğa ulaşması beklenmiştir. Daha sonra hücreler pleyte alınarak bitkinin topraküstü metanol ekstresinin farklı dozlarıyla (12.5, 25, 50, 100, 250 µg/mL) 4 saat boyunca muamele edilmiştir. Toplam protein tayini için kolorimetrik metodun uygulandığı total protein assay kit (Elabscience, Çin) kullanılarak ticari kitin kullanım kılavuzlarındaki bilgilere uygun

olarak çalışılmış, ELISA cihazı'nda 562 nm'de okuma yapılmış ve hesaplamalar yapılmıştır.

3.2.5.3. COX-2 İnhibitör Aktivite Tayini

Bitkinin inflammatuar yanıtta önemli olan COX-2 enzimine inhibitör etkisini ölçmek amacıyla deney gerçekleştirilmiştir. Bunun için fibroblast hücreleri (L9N29) 10% (v/v) FBS, 2 mM l-glutamin, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin içeren besiyeri içerisinde 37°C ve %5 CO₂ ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler %70-85 doyumluğa ulaşana kadar beklenmiştir. Hücre kültür flasklarında %85 doyumluğu ulaşan hücreler 96 kuyucuklu pleyte alındıktan sonra 4 saat boyunca bitkinin topraküstü metanol ekstresinin farklı dozlarıyla (12.5, 25, 50, 100, 250 µg/mL) muamele edilmiştir. Bitkinin COX-2 enzimine inhibitör etkisini değerlendirmek için kolorometrik metodun uygulandığı COX fluorescent activity assay kitin (Cayman, USA) kullanım kılavuzlarındaki bilgilere uygun olarak çalışılmış ve ELISA cihazı'nda 450 nm'de okuma yapılmıştır.

3.2.6. Tirozinaz Enzim İnhibitör Aktivite Çalışmaları

P. hoppeana subsp. *testimonialis* topraküstü kısmından 10 mg/mL olarak hazırlanan metanol ekstresinden potasyum fosfat tamponu (0.2 M, pH= 6.8) ile 25, 50, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde dilüsyonları hazırlanmıştır. Ekstrelerin tirozinaz inhibisyon kapasitesi, L-DOPA'nın (substrat) kullanıldığı yöntem ile spektrofotometrik olarak çalışılmıştır. Pozitif kontrol için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (25, 50, 100 ve 500 µg/mL) alfa-kojik asit kullanılmıştır. Örneklerin ölçümleri 96-kuyucuklu mikropak kullanılarak, ELISA okuyucusunda gerçekleştirilmiştir. Deney protokolü A, B, C ve D karışımları olarak hazırlanmıştır. A: 120 µL fosfat tamponu (pH 6.8), 40 µL tirozinaz solüsyonu (46 U/mL); B: 160 µL fosfat tamponu (pH 6.8); C: 80 µL fosfat tamponu (pH 6.8), 40 µL tirozinaz solüsyonu (46 U/mL), 40 µL örnek solüsyonu; D: 120 µL fosfat tamponu (pH 6.8), 40 µL örnek solüsyonu eklenmiş ve karışımlar 23°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra her bir karışıma 40 µL L-DOPA çözeltisi konularak tekrar 23°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında mikropaklar ELISA cihazına yerleştirilerek, örnekler ve kontrol numunesinin absorbansları 490 nm dalga boyunda okunmuş ve tirozinaz enzim inhibisyon değerleri IC₅₀ olarak verilmiştir (183).

3.2.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

3.2.7.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

P. hoppeana subsp. *testimonialis* bitkisinin topraküstü kısımlarının metanol ekstresinin antimikrobiyal aktivitesinin olup olmadığının belirlenmesinde ilk olarak agar kuyucuk difüzyon metodu kullanılmıştır (184).

Bakteriler için Mueller Hinton agar ve sıvı besiyerleri, mantarlar için maya ekstreli sıvı besiyeri (YEG) (Difco, Detriot, MI) ve Potato Dextrose agar (PDA) (Difco, Detriot, MI) kullanılmıştır. Test edilecek mikroorganizmaların 24 saat kültürlerinden bakterilerinden sıvı besiyeri içinde 10^6 kob/mL (koloni oluşturan birim = colony forming unit) şeklinde dilüsyonları yapılmıştır. Önceden hazırlanmış katı besiyerlerine ekimleri yapıp besiyerleri üzerinde, camdan steril bir boru yardımıyla 2 cm aralıklarda ve 5 mm çapında oyuklar açılmıştır. Her bir oyuklara test edilecek örneklerden 50 µL eklenmiştir. Bakteri ekilen petriler 24 saat, maya ekilen petriler 48 saat 36 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe işlemi tamamlandıktan sonra cetvel ile inhibisyon zonları ölçülmüştür. Standart olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), Streptomisin (10 µg), mantarlar için flukonazol (5 µg) kullanılmıştır. Ayrıca standart çözücü kontrolü de hazırlanmıştır.

3.2.7.2. Minimal İnhibisyon Yöntemi

Agar kuyucuk metodunda *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* bitkisinin topraküstü kısımlarının metanol ekstresi 250-500 µg/mL miktarlarının 5 mm ve üzeri zon çapı oluşturdıkları durumunda bu etkinliğin kantitatif etki değerinin belirlenmesi için sıvı besiyerlerinde mikrodilüsyon sıvı yöntemi uygulanarak, MİK değeri µg/mL olarak belirlenmiştir (185).

MIK yöntemi, “National Committee for Clinical Laboratory Standard” (NCCLS) standartlarının belirlediği kritere göre yapılmıştır (NCCLS document M24-A, NCCLS Document M7-A3). Bu amaçla kullanılan besiyerleri; bakteriler için Mueller-Hinton agar (MHA) ve sıvı (MHB) (pH.7.3) (Difco, Detroit, MI), maya mantarları için Yeast Nitrogen Base sıvı (YNBB, pH 7.0) (Difco, Detroit, MI) ve PDA (Difco, Detroit, MI) besiyerleri seçilmiştir. Kültürler 3-5 gün 35°C’de aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır (186).

Mikrodilüsyon test için ELISA pleytleri kullanılmıştır. Ekstrelerin 0.1 mL’si sıvı besiyerleri ile seri sulandırmaları yapılmıştır. İnoküle edilecek mikroorganizmaların bir

gecelik kültürlerinden McFarland 0.5 bulanıklılığında (1×10^8 kob/ml) sulandırım hazırlanıp 1:10 sulandırılmış ve her bir kuyucuğa 0.005 mL mikroorganizma (son test konsantrasyonu 5×10^4 kob/kuyucuk) konulmuştur. Pleytler 35°C'de 16-72 saat süre ile aerobik koşullarda etüvde beklemeye bırakılmıştır. MİK değeri, mikrodilüsyon oyuklardaki mikroorganizmanın üremesi tamamen durmuş ve gözle tespit edilebilen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu cinsinden ifade edilmiştir. Standart çözücü kontrolü yanında kontrol olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), Streptomisin (10 µg), mayalar için flukonazol (5 µg) kullanılmıştır.

Test Mikroorganizmaları:

Gram pozitif koklar; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,

Gram pozitif sporlu basiller; *Bacillus cereus* 702 Roma,

Gram pozitif sporsuz basiller; *Listeria monocytogenes* ATCC 43251

Gram negatif Koklar; Gram negatif enterik bakteriler (basiller); *Escherichia coli* ATCC 25922), *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911

Gram Negatif non fermentatif bakteri; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,

Gram yok; *Mycobacterium smegmatis* ATCC607

Mantar; *Candida albicans* ATCC 60193, *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251

3.2.8. YBSK ile Bitki Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Bitkinin kurutulmuş ve toz edilmiş çiçekli topraküstü kısımları (50 g) 250 mL metanol ile 30°C'lik su banyosunda çalkalayıcıda 3'er saat bekletilerek ekstre edilmiş ve süzölmüştür. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra süzöntüler birleştirilmiş evaporatör yardımıyla kuruluğa kadar uçurulmuştur. Elde edilen ham metanol ekstresi YBSK çalışmaları için kullanılmıştır.

Standart olarak; *p*-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit, *p*-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin fenolik bileşikleri standart olarak kullanılmıştır. Öncelikle her bir standart için konsantrasyonu 100 mg/L olacak şekilde YBSK saflıkta metanolla stok çözelti hazırlanmış ve 0.45 µm membran filtreden geçirilmiştir. Daha sonra 7 fenolik bileşiği karışım halinde içeren 100 mg/L stok çözelti hazırlanmıştır.

Kullanılan yöntemde 16 dakikada, 7 fenolik bileşiğin parmak izi kromatogramı elde edilmiştir (187).

YBSK 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)

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen değerler SPSS programı ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Elde edilen değerlerin çoklu grup karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile belirlenmiştir. İkili grup karşılaştırma için Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4. 1. *In vivo* Çalışmalar

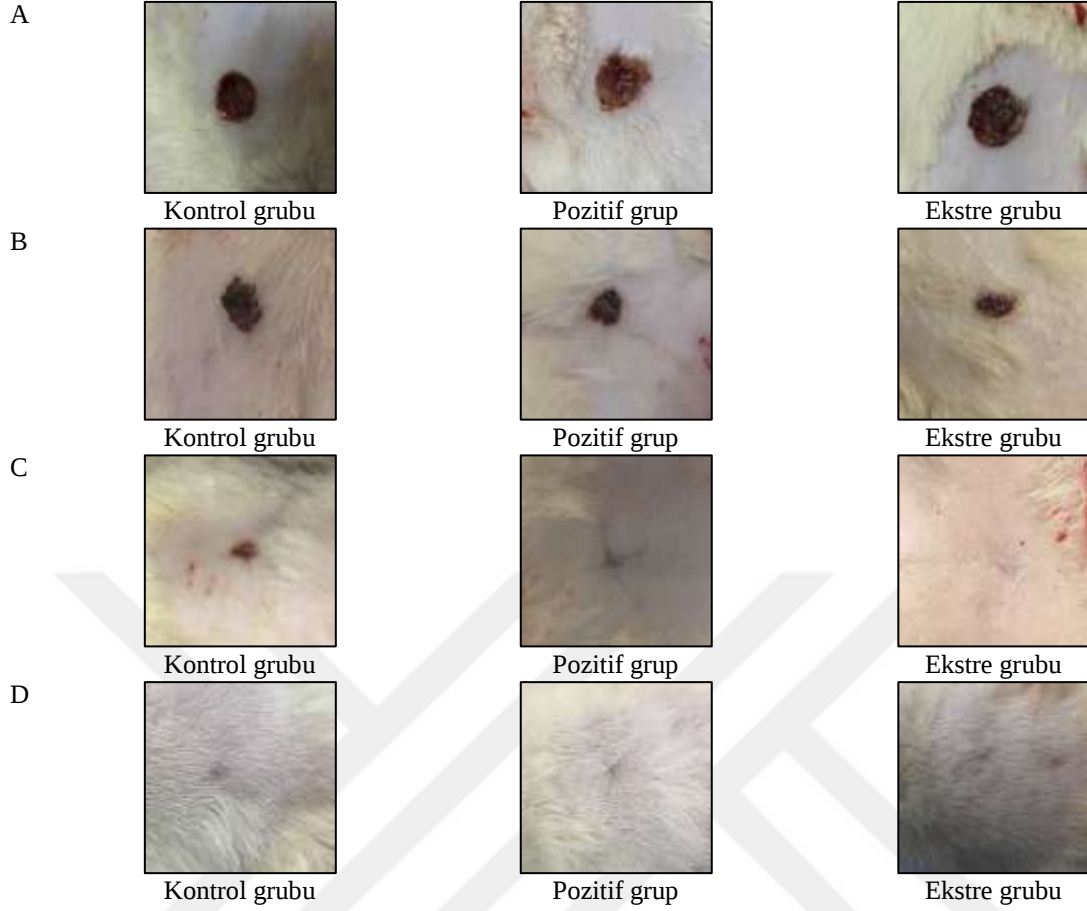
4.1.1. Dairesel Eksizyon Yara Modeli Deney Bulguları

Bu çalışmada, Balıkesir'de yara iyileşmesi olarak kullanan *P. hoppeana* subsp. *testimonialis*'in metanol ekstraktının etkisi sıçanlarda dairesele eksizyon yara modeliyle incelenmiştir. Yaralar her gün gözlenerek yaralı bölgedeki azalmanın yüzdesi hesaplanmıştır. Sıçanların 4. gün, 7. gün, 14. gün ve 21. günde yara iyileşmesi yüzdeleri Tablo 14 ve Resim 12'de gösterilmiştir.

Tablo 14. Dairesel eksizyon yara modeli deney sonuçları

Gruplar	Günler				
	Yara alanı (mm) ± standart sapma / Yaranın kapanma yüzdesi (%)				
	İlk gün	4. gün	7. gün	14. gün	21. gün
Kontrol grubu	10	8.84±0.26	4.85±0.14*	1.17±0.08*	0
	%0	% 11.6	% 51.5	% 88.3	% 100
<i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> (Ekstre grubu)	10	7.81±0.22*	3.07±0.21*	0	0
	%0	% 21.9	% 69.3	% 100	% 100
Madecassol® (Pozitif grup)	10	7.73±0.3*	3.93±0.29*	0	0
	%0	% 22.7	% 60.7	% 100	% 100

*p<0.05 Mann Whitney U test ile değerlendirilmiştir.



Resim 12. Tüm gruplar için 4., 7., 14. ve 21. günlerde iyileşmiş eksizyon yarası. A. 4. günde ötenazi edilen grup, B. 7. günde ötenazi edilen grup, C. 14. Günde ötenazi edilen grup, D. 21. günde ötenazi edilen grup

4.1.2. Yara Dokularının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

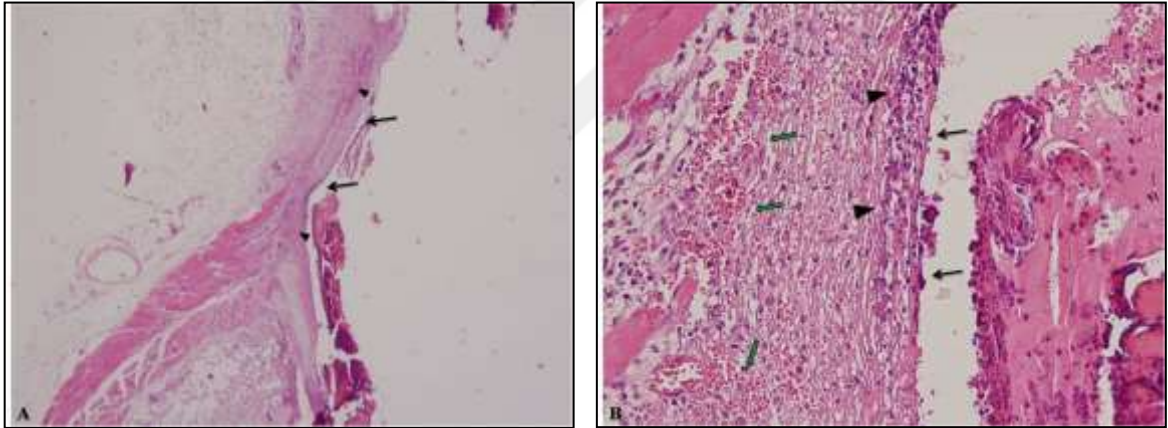
Sıçanlardan alınan yara dokusu örnekleri histolojik olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar aşağıdaki Tablo 15 ve Resim 13-24'te gösterilmiştir.

Tablo 15. Sıçanlardan alınan yara dokularının yara iyileşme skorları

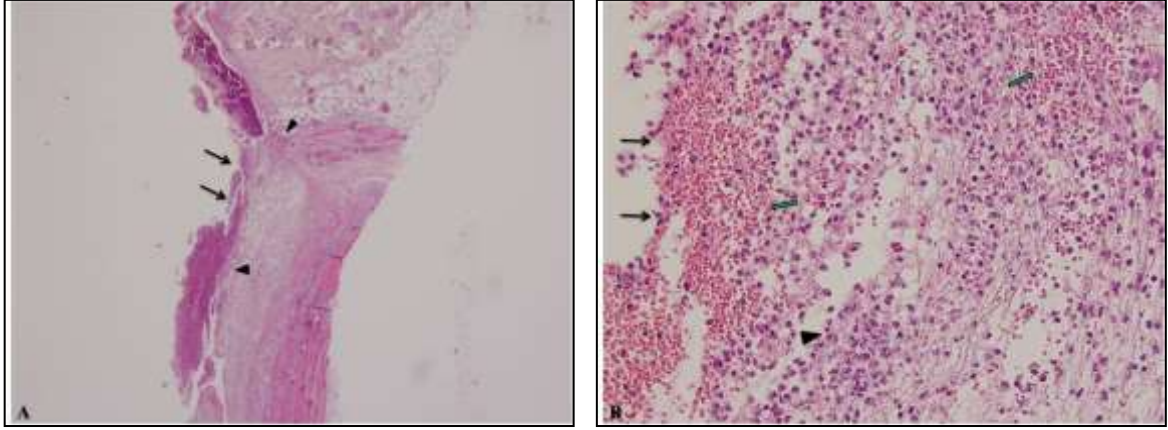
Gruplar		Yara İyileşme Skorları				
		E	A	F	I	H
4. gün ötenazi edilen grup	Kontrol grubu	-	++	+	+++	++
	Ekstre grubu	+	+	+	+++	++
	Pozitif grup	-	++	+	+++	+
7. gün ötenazi edilen grup	Kontrol grubu	+	+++	+++	++	++
	Ekstre grubu	+++	++	+++	++	+
	Pozitif grup	++	+++	+++	++	+
14. gün ötenazi edilen grup	Kontrol grubu	+++	++	+++	+	-
	Ekstre grubu	+++	+++	+++	+	-
	Pozitif grup	+++	+++	+++	+	-
21. gün ötenazi edilen grup	Kontrol grubu	+++	+++	+++	+	-
	Ekstre grubu	+++	+++	+++	+	-
	Pozitif grup	+++	+++	+++	+	-

Skorlar: yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++)

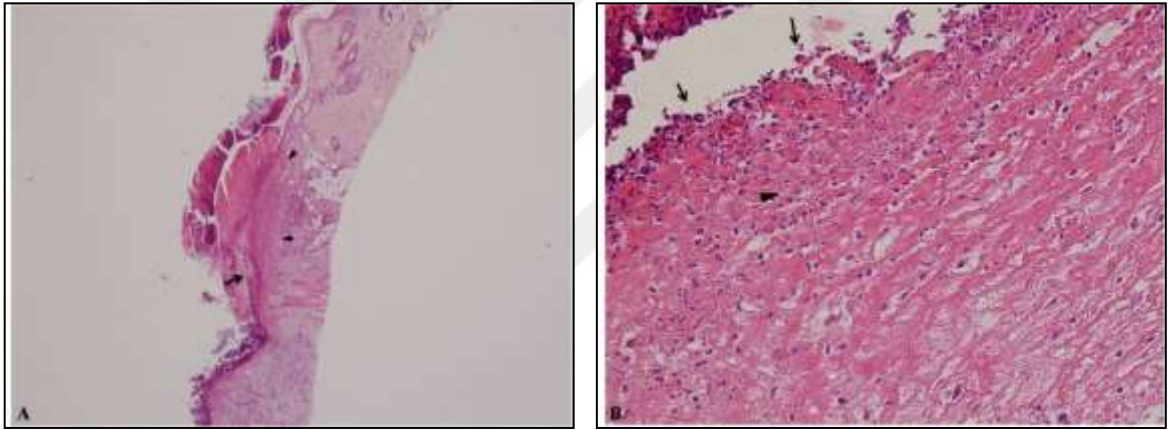
E: Epitelizasyon, A: Anjiyogenezis, F: Fibroplazi, I: İltihaplanma ve H: Kanama



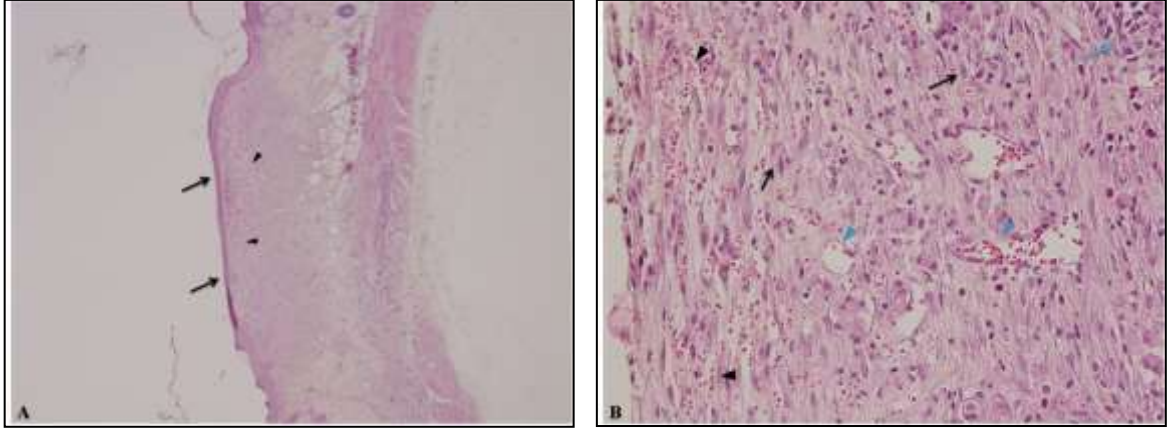
Resim 13. 4. Gün kontrol grubu hematoksilin-eozin boyama. A) oklar; hiç epitel tabakası yok, ok başları; inflamatuvar hücre infiltrasyonu (x4) B) siyah oklar; hiç epitel tabakası yok, ok başları; inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yeşil oklar; hemorajik alanlar (x40)



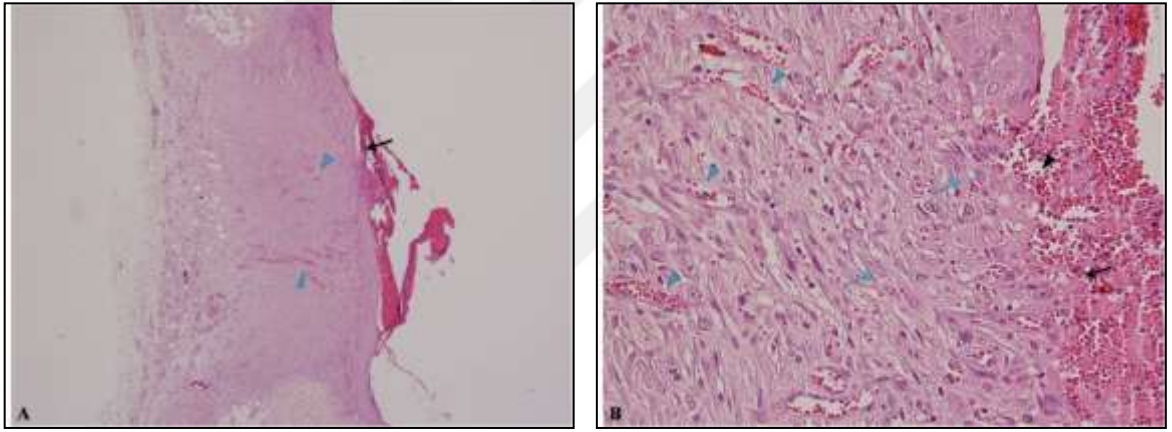
Resim 14. 4. Gün pozitif grup hematoksilin-eozin boyama. A) oklar; hiç epitel tabakası yok, ok başları; inflamatuvar hücre infiltrasyonu (x4) B) siyah oklar; hiç epitel tabakası yok, ok başları; inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yeşil oklar; hemorajik alanlar (x40)



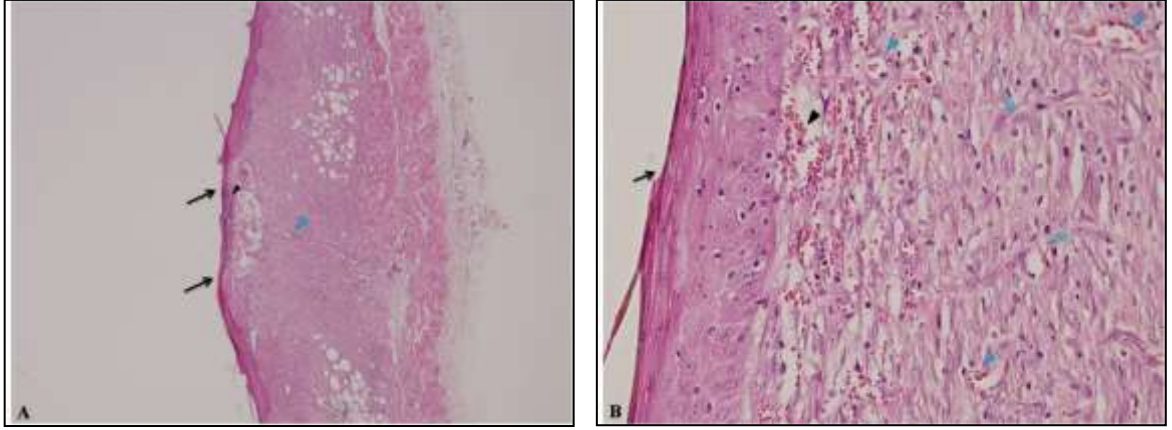
Resim 15. 4. Gün ekstre grubu hematoksilin-eozin boyama. A) oklar; hiç epitel tabakası yok, ok başları; inflamatuvar hücre infiltrasyonu (x4) B) siyah oklar; hiç epitel tabakası yok, ok başları; inflamatuvar hücre infiltrasyonu alanlar (x40)



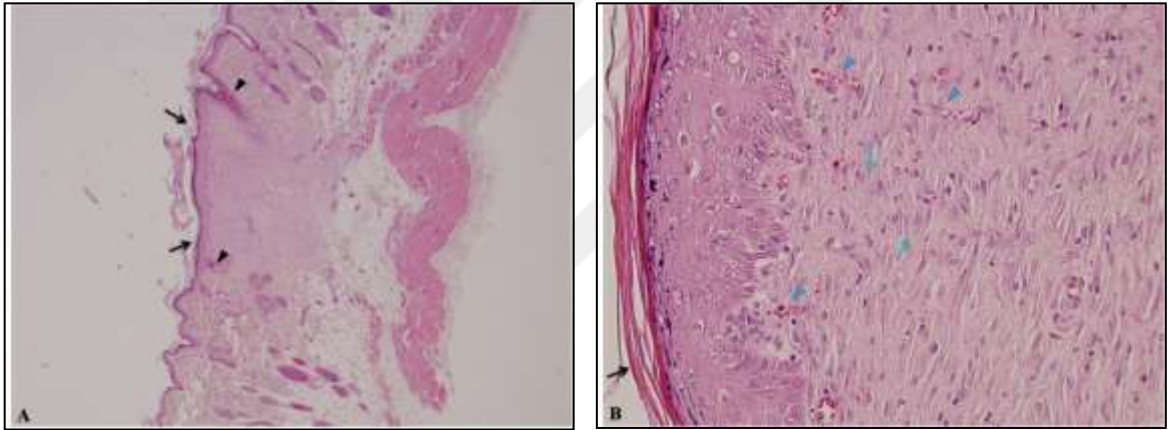
Resim 16. 7. Gün kontrol grubu hematoxilen-eozin boyama. A) oklar; kısmi epitel tabakası, ok başları; inflammatuar hücre infiltrasyonu (x4) B) siyah oklar; fibroblastlar, ok başları; hemorajik alanlar, mavi oklar; inflammatuar hücre infiltrasyonu (x40)



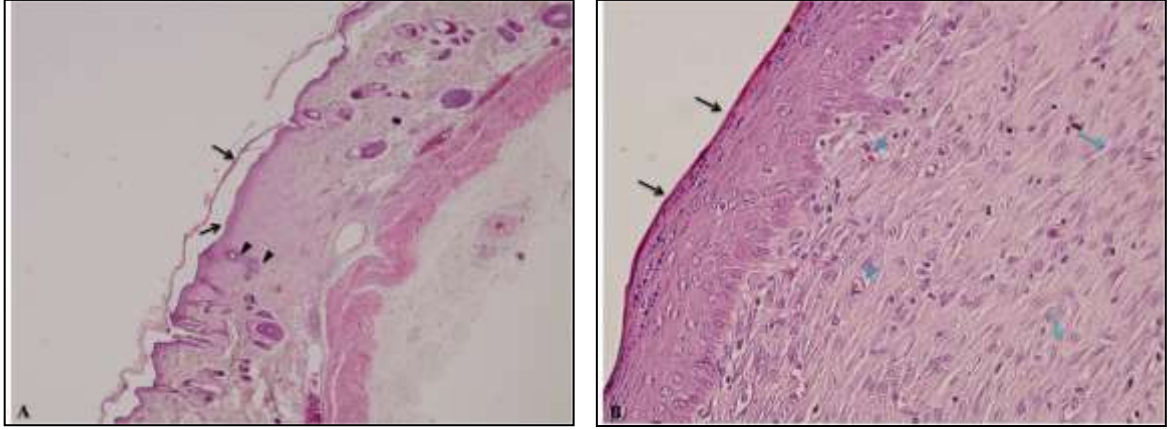
Resim 17. 7. Gün pozitif grup hematoxilen-eozin boyama. A) oklar; kısmi epitel tabakası, mavi ok başları; anjiogenezis (x4) B) siyah oklar; yara kenarlarından itibaren oluşmaya başlamış epitel tabakası, siyah ok başları; hemorajik alanlar, mavi oklar; fibroblastlar, mavi ok başları; anjiogenezis (x40)



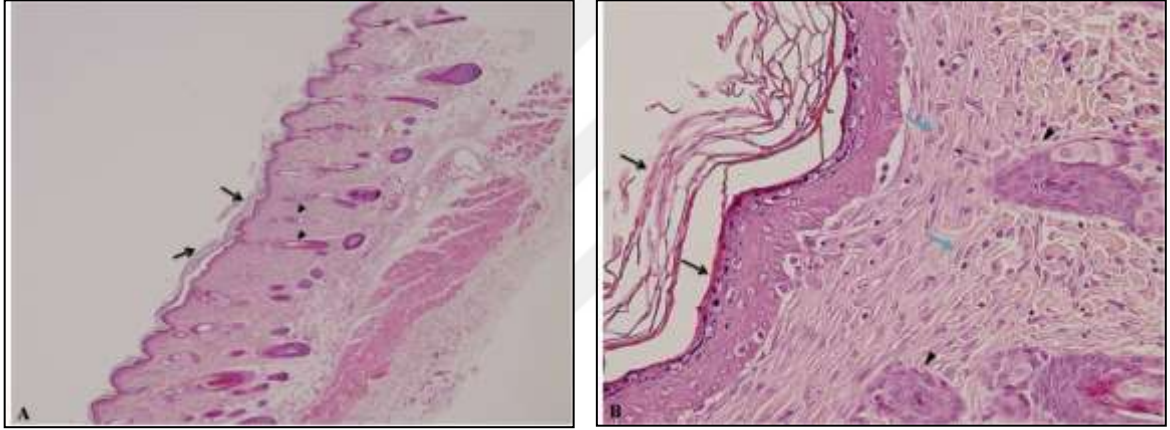
Resim 18. 7. Gün ekstre grubu hematoxilen-eozin boyama. A) oklar; tam/immatür epitel tabakası mavi ok başları; angiogenezis (x4) B) siyah ok; tam/matür epitel tabakası, siyah ok başı; hemorajik alan, mavi oklar; fibroblastlar, mavi ok başları; angiogenezis (x40)



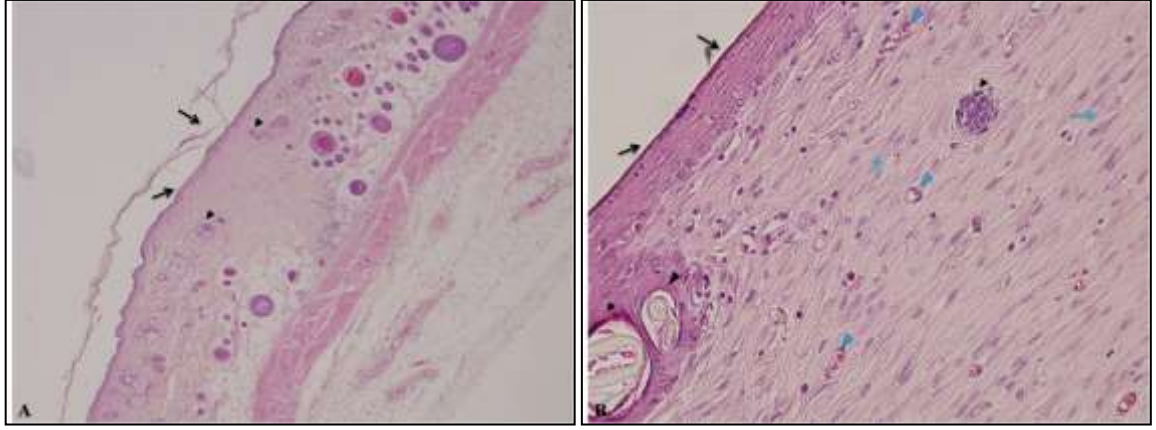
Resim 19. 14. Gün kontrol grubu hematoxilen-eozin boyama. A) oklar; tam/matür epitel tabakası, ok başları; kıl folikülleri (x4) B) siyah ok; tam/matür epitel tabakası, mavi ok başları; angiogenezis, mavi oklar; fibroblastlar (x40)



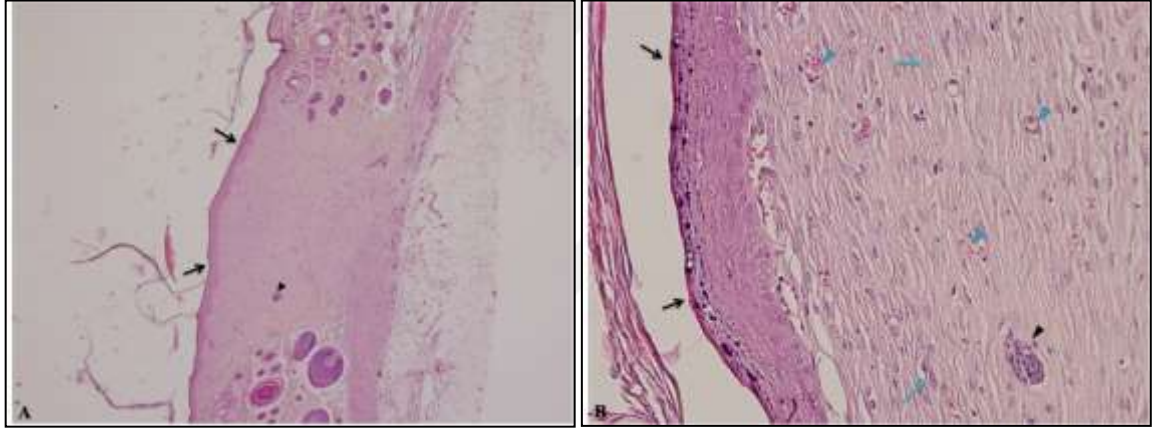
Resim 20. 14. Gün pozitif grup hematoksilen-eozin boyama. A) oklar; tam/matür epitel tabakası, siyah ok başları; kıl folikülleri (x4) B) siyah oklar; tam/matür epitel tabakası, mavi ok başları; anjiogenezis, mavi oklar; fibroblastlar (x40)



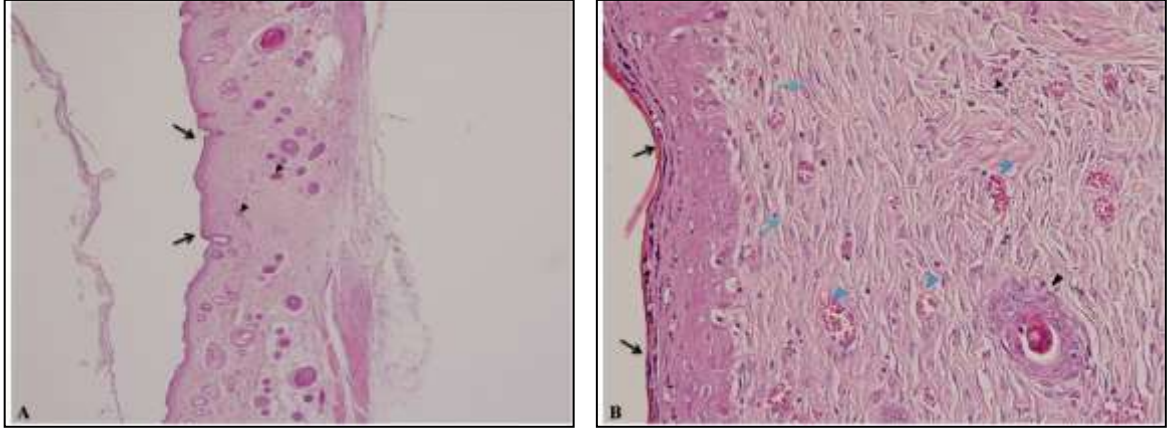
Resim 21. 14. Gün ekstre grubu hematoksilen-eozin boyama. A) oklar; tam/matür epitel tabakası, siyah ok başları; kıl folikülleri (x4) B) siyah oklar; tam/matür epitel tabakası, siyah ok başları; kıl folikülleri, mavi oklar; fibroblastlar (x40)



Resim 22. 21. Gün kontrol grubu hematoksilin-eozin boyama. A) oklar; tam/matür epitel tabakası, ok başları; kıl folikülleri (x4) B) siyah oklar; tam/matür epitel tabakası, mavi ok başları; anjiogenezis, mavi oklar; fibroblastlar (x40)



Resim 23. 21. Gün pozitif grup hematoksilin-eozin boyama. A) oklar; tam/matür epitel tabakası, siyah ok başları; kıl folikülleri (x4) B) siyah oklar; tam/matür epitel tabakası, mavi ok başları; anjiogenezis, mavi oklar; fibroblastlar, siyah ok başı; kıl folikülü (x40)

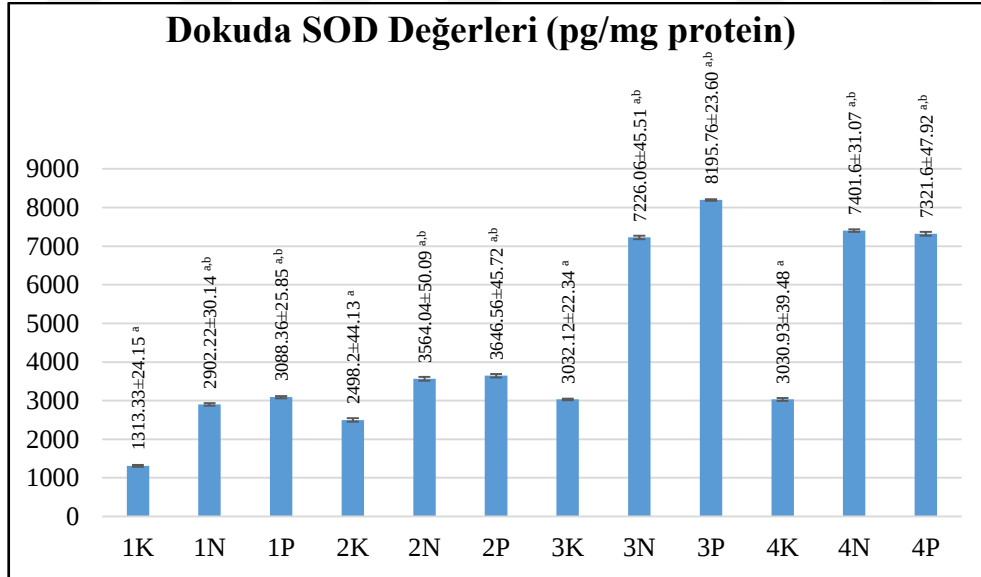


Resim 24. 21. Gün ekstre grubu hematoksilen-eozin boyama. A) oklar; tam/matür epitel tabakası, siyah ok başları; kıl folikülleri (x4) B) siyah oklar; tam/matür epitel tabakası, siyah ok başı; kıl folikülü, mavi oklar; fibroblastlar, mavi ok başları; anjiogenezis (x40)

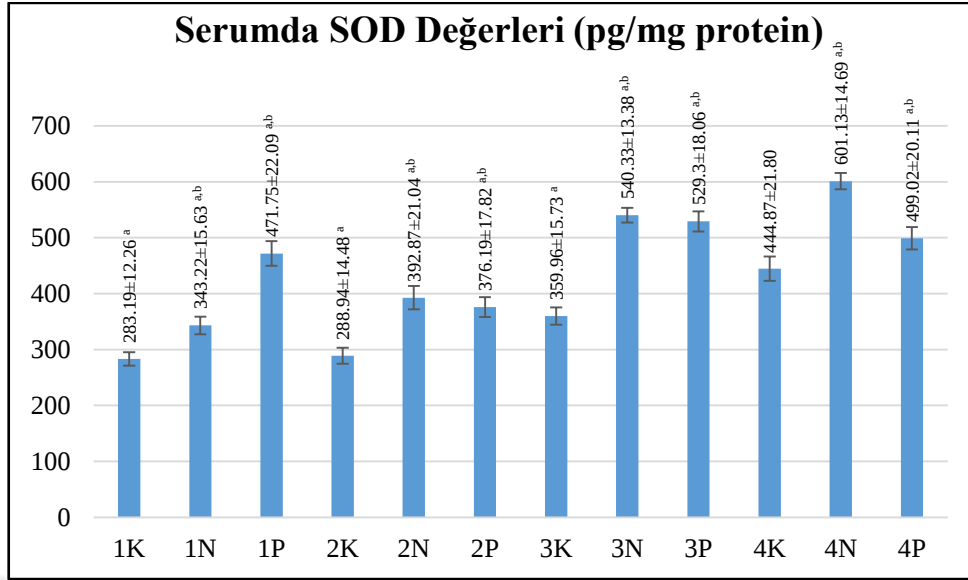
4.2. Biyolojik Aktivite Deney Bulguları

4.2.1. Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları

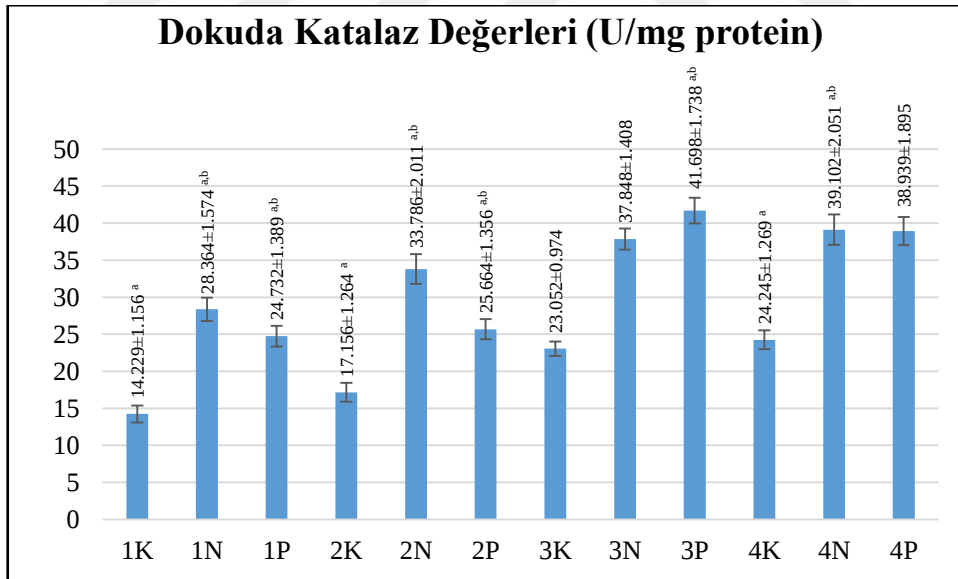
Yara dokusu ve serum üzerinde antioksidan sonuçları Şekil 5-11’de gösterilmiştir.



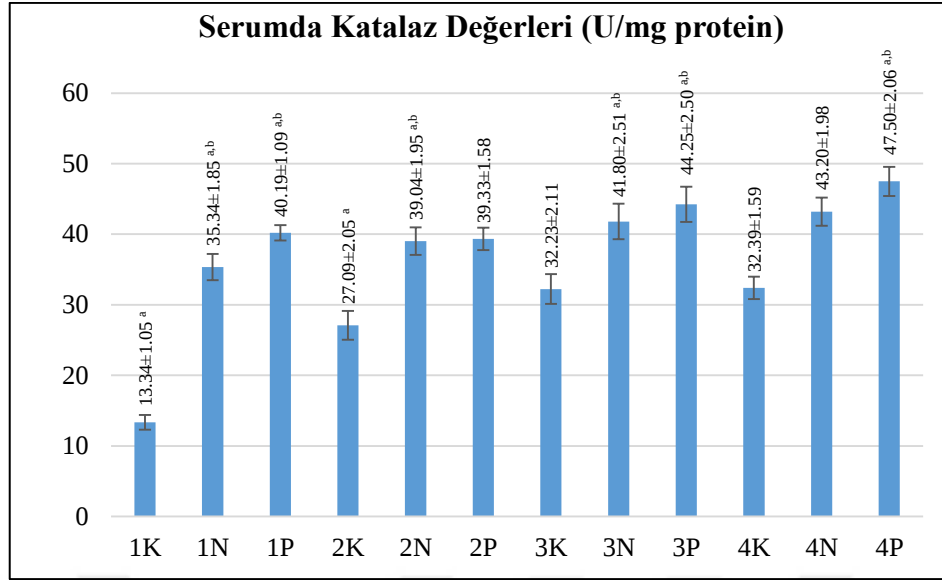
Şekil 5. Dokuda SOD analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a p<0.05 gruplar arasında, ^b p<0.05 kontrole göre anlamlı bulunmuştur.



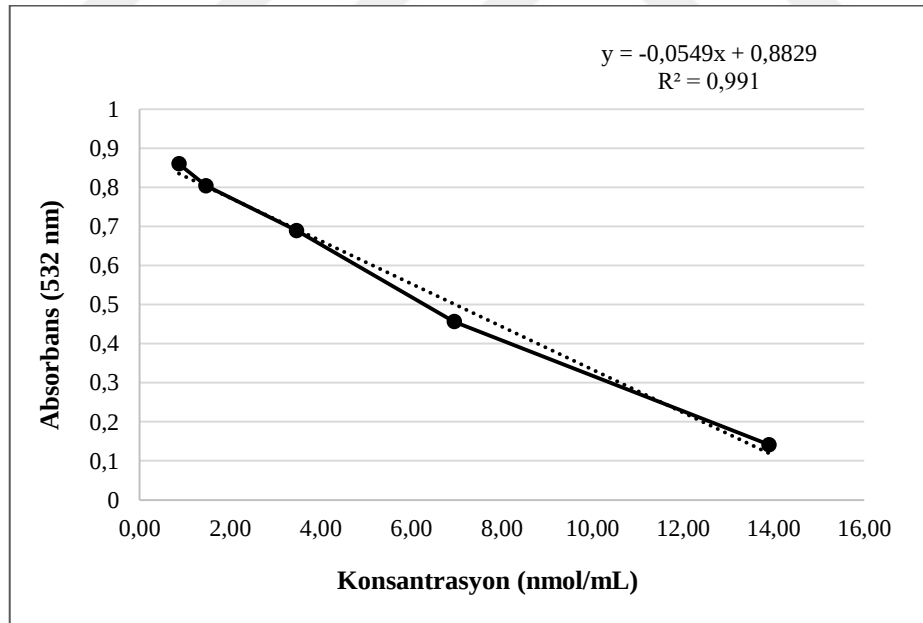
Şekil 6. Serumda SOD analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a p<0.05 gruplar arasında, ^b p<0.05 kontrole göre anlamlı bulunmuştur.



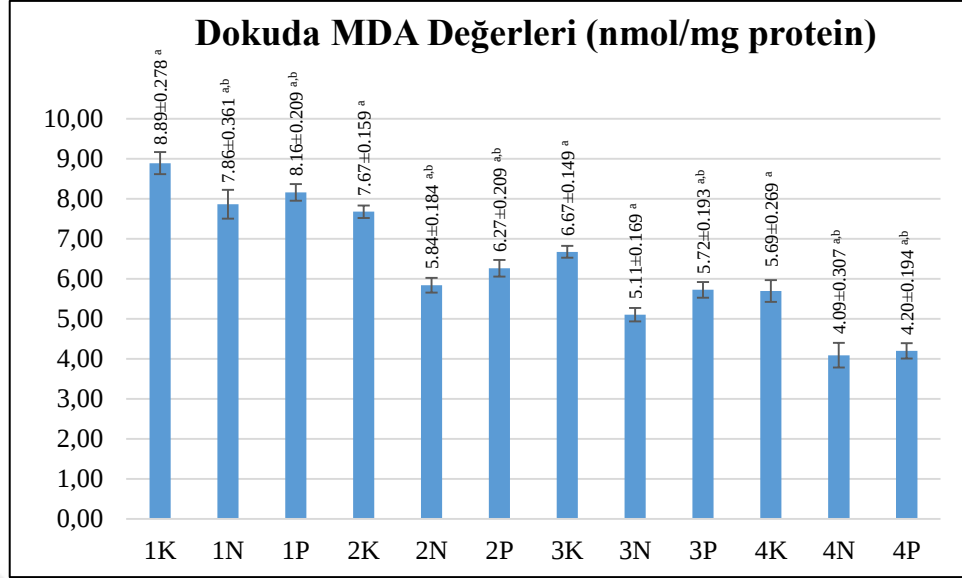
Şekil 7. Dokuda katalaz analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a p<0.05 gruplar arasında, ^b p<0.05 kontrole göre anlamlı bulunmuştur.



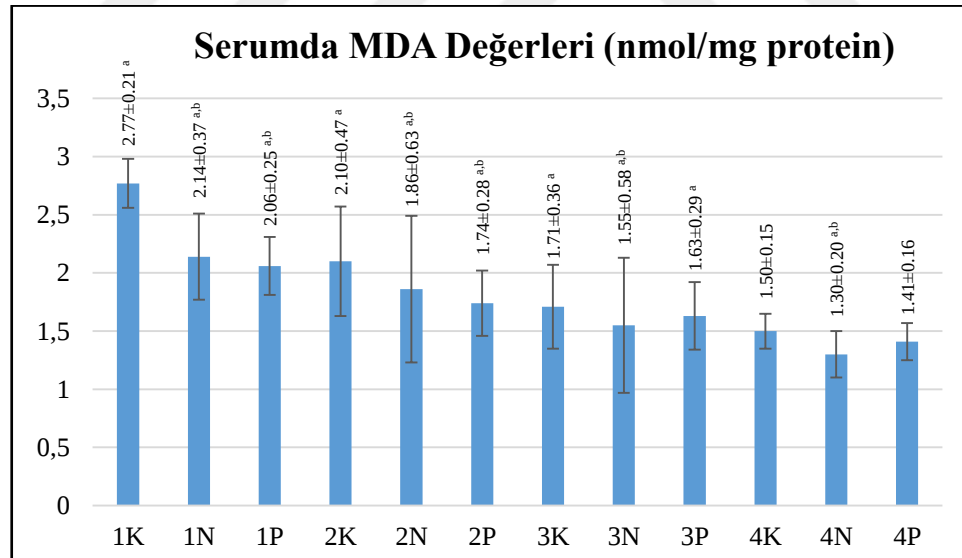
Şekil 8. Serumda katalaz analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a p<0.05 gruplar arasında, ^b p<0.05 kontrole göre anlamlı bulunmuştur.



Şekil 9. 1,1,3,3-Tetraetoksi propan standart grafiği



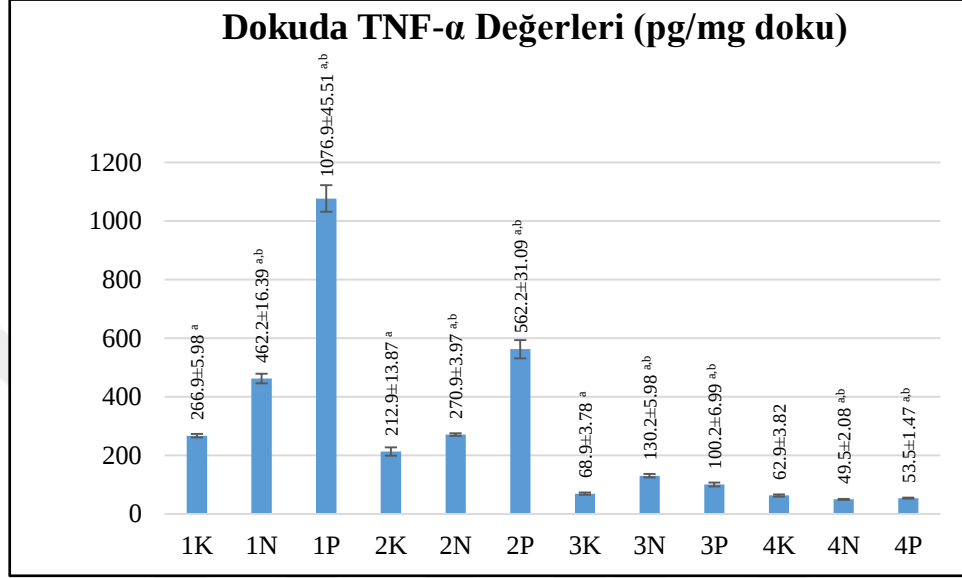
Şekil 10. Dokuda MDA analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a p<0.05 gruplar arasında, ^b p<0.05 kontrole göre anlamlı bulunmuştur.



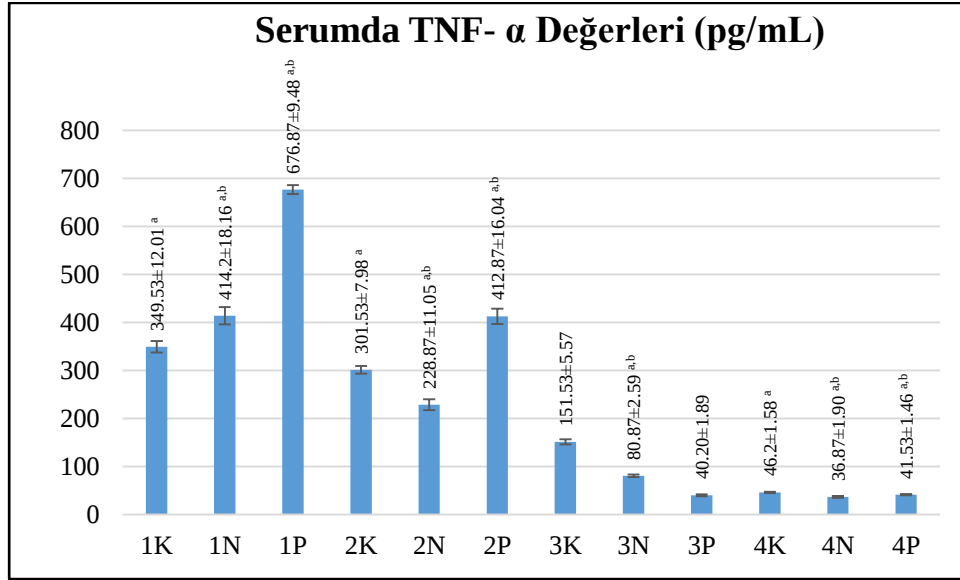
Şekil 11. Serumda MDA analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a p<0.05 gruplar arasında, ^b p<0.05 kontrole göre anlamlı bulunmuştur.

4.2.2. Anti-inflamatuar Aktivite Tayini Bulguları

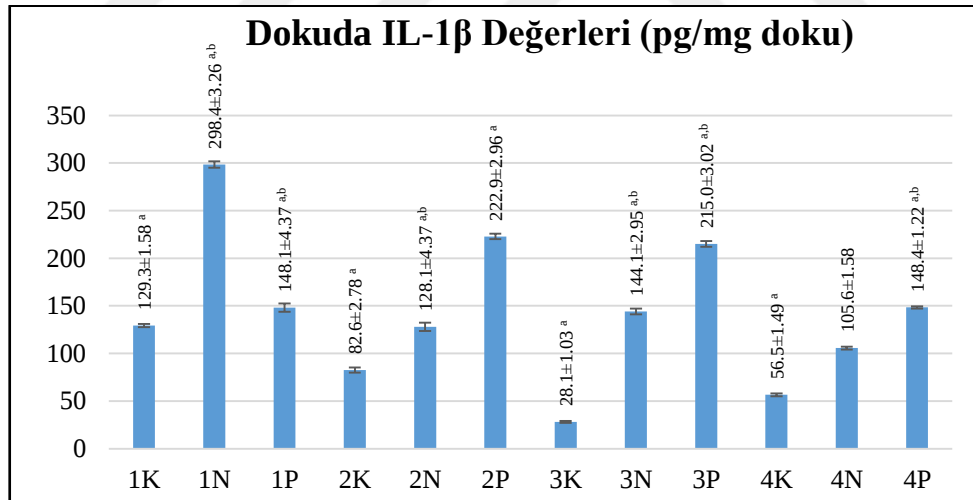
Sıçanlardan alınan yara dokusu ve serum üzerinde TNF- α ve IL-1 β miktar analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 12-15'te gösterilmiştir.



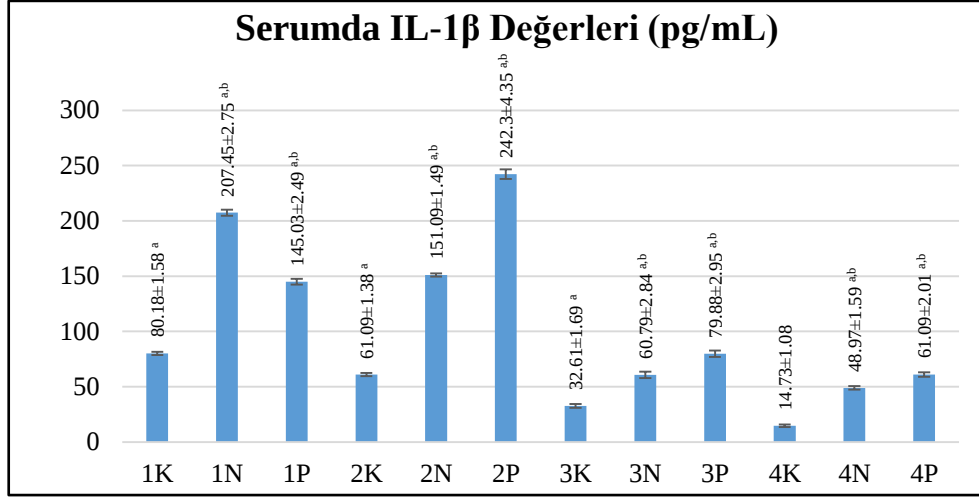
Şekil 12. Dokuda TNF- α analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a p<0.05 gruplar arasında, ^b p<0.05 kontrole göre anlamlı bulunmuştur.



Şekil 13. Serumda TNF- α analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a $p < 0.05$ gruplar arasında, ^b $p < 0.05$ kontrole göre anlamlı bulunmuştur.



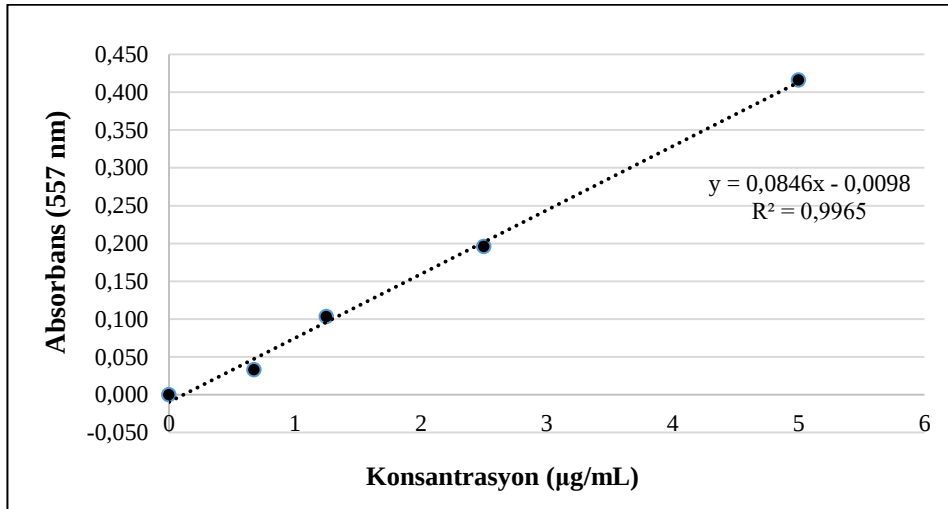
Şekil 14. Dokuda IL-1 β analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a $p < 0.05$ gruplar arasında, ^b $p < 0.05$ kontrole göre anlamlı bulunmuştur.



Şekil 15. Serumda IL-1 β analizi. 1K, 1N, 1P: 4. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 2K, 2N, 2P: 7. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 3K, 3N, 3P: 14. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; 4K, 4N, 4P: 21. gün ötenazi edilen kontrol, ekstre, pozitif grup; ^a p<0.05 gruplar arasında, ^b p<0.05 kontrole göre anlamlı bulunmuştur.

4.2.3. Hidroksiprolin Tayini Bulguları

Hidroksiprolin standart grafiği Şekil 16'da ve sıçanlardan alınan yara dokularının içerdiği hidroksiprolin miktarları Tablo 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. Hidroksiprolin standart grafiği

Tablo 16. Gruplardan alınan yara dokularında hidroksiprolin miktarları

Gruplar	Hidroksiprolin Miktarları (µg/mg doku)			
	4. gün	7. gün	14. gün	21.gün
Kontrol grubu	1.324±0.002	2.979±0.002	6.082±0.006	7.599±0.009
Ekstre grubu	3.166±0.003*	10.130±0.012*	14.789±0.012*	14.474±0.093*
Pozitif grup	2.927±0.001*	16.277±0.014	17.252±0.015*	16.700±0.018

*p<0.05 Mann Whitney U test ile değerlendirilmiştir.

4.3. RT-PCR Çalışma Bulguları

RT-PCR tamamlandıktan sonra sonuçlar PCR sistemi içerisindeki software ile comparative CT (ÄÄCT) metoduna göre hesaplanmıştır. TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve MMP-9 genlerinin ekspresyon düzeyleri β -aktine göre analiz edilmiştir. Örnekler, kontrol ile karşılaştırılarak logaritmik olarak gen ekspresyon artış azalış oranları belirlenmiş ve Tablo 17’de verilmiştir. SPSS analizleri yapılmış ve gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05).

Tablo 17. RT-PCR ile belirlenen gen ekspresyon oranları

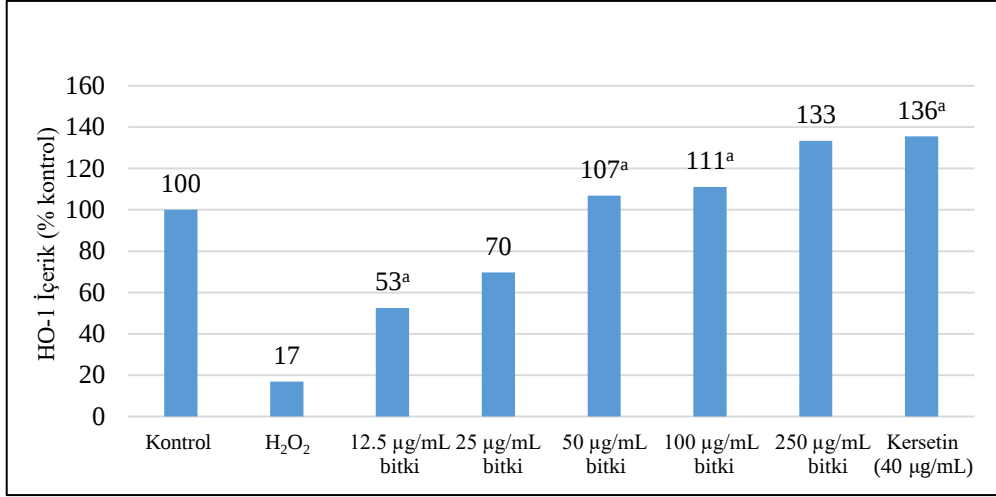
Gruplar		Gen ekspresyon oranları			
		TNF- α	IL-1 β	IL-10	MMP-9
4. gün ötenazi edilen grup	Pozitif grup	29.572	3.317 ^a	1.421 ^a	11.958 ^a
	Ekstre grubu	2.481 ^a	110.410	229.383 ^a	6.426 ^a
7. gün ötenazi edilen grup	Pozitif grup	4.072 ^a	355.081	59.690 ^a	5.012 ^a
	Ekstre grubu	1.742 ^a	97.816 ^a	25.534 ^a	4.741 ^a
14. gün ötenazi edilen grup	Pozitif grup	1.063 ^a	123.999 ^a	17.402 ^a	3.333 ^a
	Ekstre grubu	1.255 ^a	13.615 ^a	1.571 ^a	3.610 ^a
21. gün ötenazi edilen grup	Pozitif grup	0.928 ^a	29.689 ^a	10.537 ^a	1.728 ^a
	Ekstre grubu	1.140	8.616 ^a	0.865 ^a	1.674 ^a

^a p<0.05 Gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur.

4.4. Mekanizma Aydınlatma Çalışmaları

4.4.1. Hem Oksijenaz Aktivite Bulguları

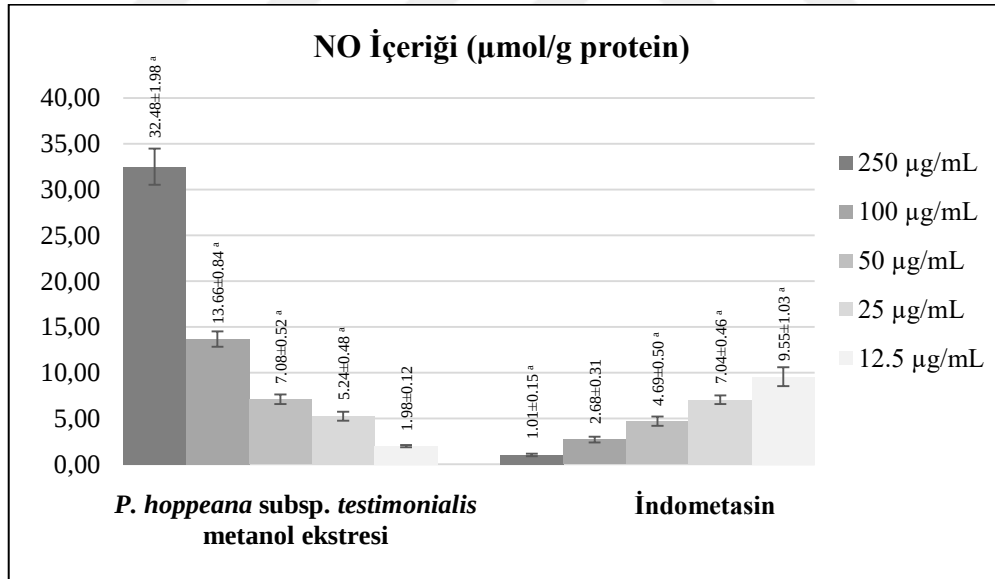
Hem oksijenaz aktivite çalışmasında uygulama sonrasında hücrelerde bulunan HO içerik Şekil 17’de gösterilmiştir.



Şekil 17. *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* metanol ekstresi ve kersetin uygulanan hücrelerde HO içeriği, ^a p<0.05 kontrole göre anlamlı bulunmuştur.

4.4.2. Nitrik Oksit İçeriği Bulguları

NO içerik çalışmasında hücrelerde bulunan NO Şekil 18’de gösterilmiştir.



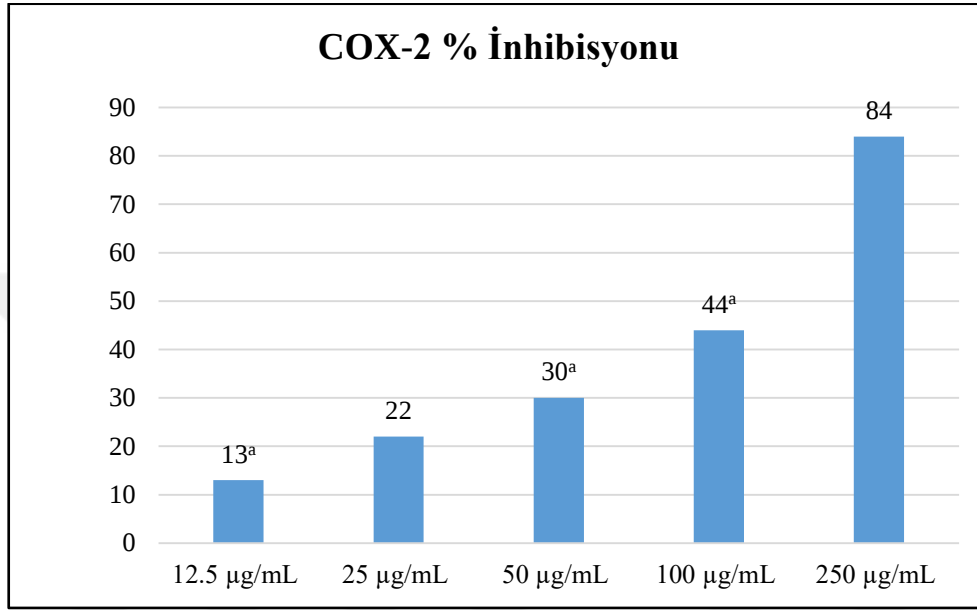
Şekil 18. *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* metanol ekstresi ve indometasin uygulanan hücrelerde NO içeriği, ^a p<0.05 gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur.

4.4.3. COX-2 İnhibitör Aktivite Bulguları

L9N29 hücreleri üzerinde yapılan COX-2 inhibitör aktivite çalışma sonuçları Tablo 18 ve Şekil 19’da gösterilmiştir.

Tablo 18. *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* metanol ekstresinin COX-2 enzimine inhibisyon etki sonuçları

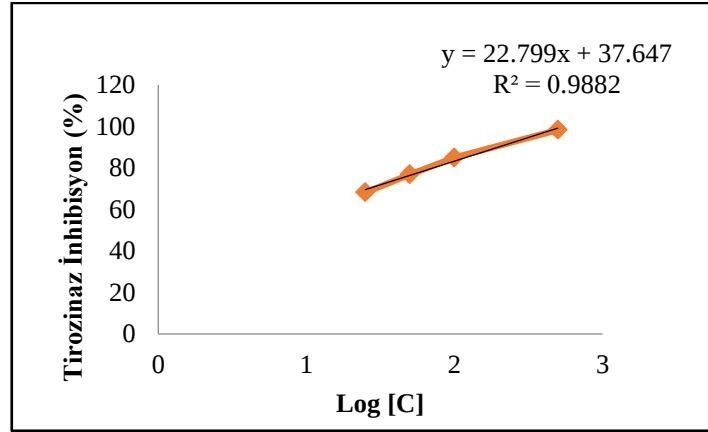
Örnek	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> metanol ekstresi	127.36



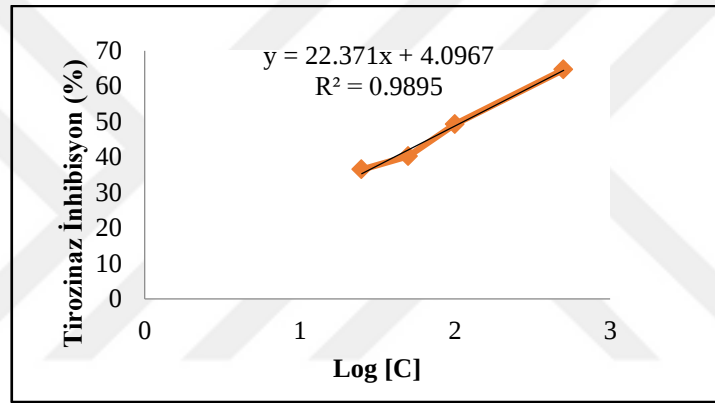
Şekil 19. *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* metanol ekstresi uygulanan hücrelerde COX-2 % inhibisyon, ^a p<0.05 gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur.

4.5. Tirozinaz Enzim İnhibitör Aktivite Çalışma Sonuçları

P. hoppeana subsp. *testimonialis* metanol ekstresinin tirozinaz enzimi üzerine inhibitör aktivitesi çalışılmıştır. Çalışmada standart olarak kullanılan kojik asitin IC₅₀ değeri 3.482 µg/mL, bitkinin IC₅₀ değeri ise 112.96 µg/mL olarak bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 20, 21 ve Tablo 19’da gösterilmiştir.



Şekil 20. Kojik asit tirozinaz inhibisyon grafiği



Şekil 21. *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* metanol ekstresi tirozinaz inhibisyon grafiği

Tablo 19. *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* metanol ekstresinin tirozinaz enzimine inhibisyon etki sonuçları

Örnek	IC ₅₀ (µg/mL)
Kojik asit	3.482
<i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> metanol ekstresi	112.696

4.6. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Bulguları

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında test mikroorganizmaları olarak 8 bakteri ve 2 mantar kullanılmış olup bitkinin 6 bakteri (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis*) ve 1 mantara (*Candida albicans*) karşı aktivite gösterdiği görülmüştür. *P.*

hoppeana subsp. *testimonialis* antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 20 ve 21’de gösterilmiştir.

Tablo 20. Mikroorganizma inhibisyon çapları bulguları

	Miktar (µg/mL)	Mikroorganizma ve İnhibisyon çapları (mm)									
		Gram- Negatif		Gram-Pozitif				Gram almayan		Mantar	
		<i>Ec</i>	<i>Yp</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Lm</i>	<i>Bc</i>	<i>Ms</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>
<i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> metanol ekstresi	10 000	14	-	12	12	-	7	6	10	8	-
Amp.	10	10	10	18	35	10	10	15			
Strep.	10								35		
Flu	5									25	25

Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922, **Yp:** *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, **Pa:** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, **Sa:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **Ef:** *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, **Lm:** *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, **Bc:** *Bacillus cereus* 702 Roma, **Ms:** *Mycobacterium smegmatis* ATCC607, **Ca:** *Candida albicans* ATCC 60193, **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251, **Amp.:** Ampisilin, **Str.:** Streptomisin, **Flu.:** Flukonazol, (—): aktivite yok

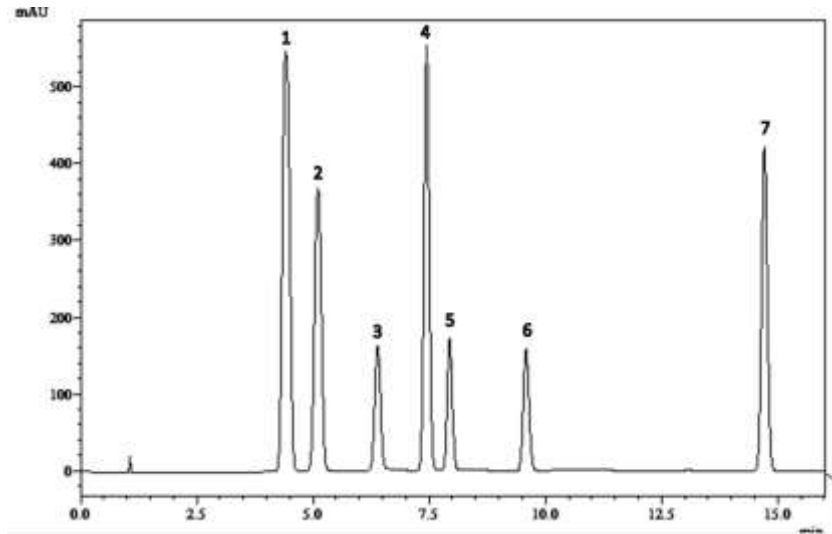
Tablo 21. Minimal inhibisyon konsantrasyon bulguları

	Miktar (µg/mL)	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MIK) (µg/mL)									
		Gram- Negatif		Gram-Pozitif				Gram almayan		Mantar	
		<i>Ec</i>	<i>Yp</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Lm</i>	<i>Bc</i>	<i>Ms</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>
<i>P. hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> metanol ekstresi	10 000	125	-	125	125	-	700	700	62.25	350	-
Amp.	10	10	18	>128	35	10	10	15			
Strep.	10								4		
Flu	5									<8	<8

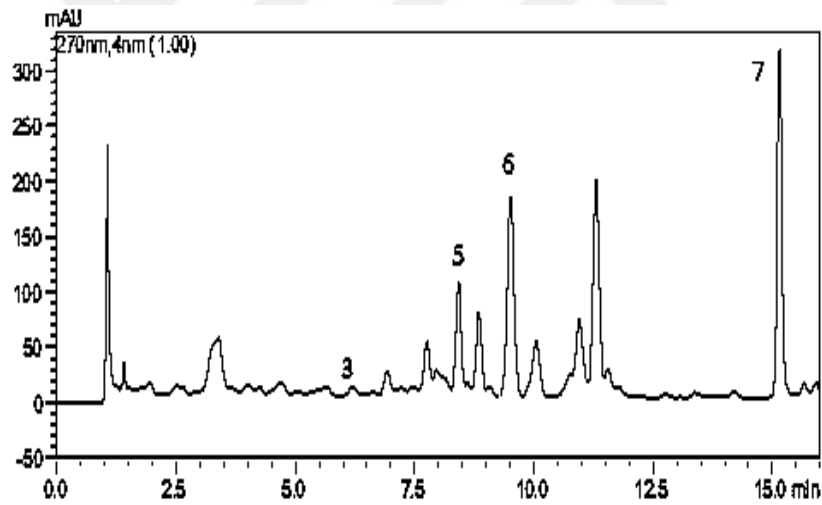
Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922, **Yp:** *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, **Pa:** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, **Sa:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **Ef:** *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, **Lm:** *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, **Bc:** *Bacillus cereus* 702 Roma, **Ms:** *Mycobacterium smegmatis* ATCC607, **Ca:** *Candida albicans* ATCC 60193, **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251, **Amp.:** Ampisilin, **Str.:** Streptomisin, **Flu.:** Flukonazol, (—): aktivite yok

4.7. YBSK Bulguları

P. hoppeana subsp. *testimonialis* bitkisinde bulunan bazı fenolik bileşikler belirli standartlar kullanılarak YBSK yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada 7 fenolik bileşik *p*-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit, *p*-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin standart olarak kullanılmıştır. 16 dakikalık metotta bitkinin içeriğinde şiringaldehit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin bulunmuştur. Şekil 22’de standartların kromatogramı, Şekil 23’te bitkinin kromatogramı ve Tablo 22’de bitkinin fenolik madde içeriği gösterilmektedir.



Şekil 22. Standartların (25 µM) YBSK Kromatogramı (270 nm, DAD, RP-C18 column (4.6×150 mm, 5 µm), 1.5 mL/dk. Pik tanımlaması: (1) *p*- hidroksi benzoik asit, (2) vanilik asit, (3) şiringaldehit, (4) *p*-kumarik asit, (5) sinapik asit, (6) benzoik asit, (7) kersetin



Şekil 23. Bitkide bulunan fenolik bileşiklerin YBSK kromatogramı (270 nm, DAD). Pik tanımlaması: (3) şiringaldehit, (5) sinapik asit, (6) benzoik asit, (7) kersetin

Tablo 22. Bitkide bulunan fenolik bileşikler

	Bileşen	Alıkonma zamanı	Konsantrasyon (mg/g)
1	<i>p</i> - hidroksi benzoik asit	-	-
2	Vanilik asit	-	-
3	Şiringaldehit	6.201	1.4248
4	<i>p</i> -Kumarik asit	-	-
5	Sinapik asit	7.949	3.7634
6	Benzoik asit	9.503	13.7561
7	Kersetin	15.136	5.9945

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yara, çeşitli sebeplerden dolayı epitel dokunun normal anatomik yapısının ve fonksiyonunun hasarlanması veya bozulmasıdır. Yara iyileşmesi ise hasarlanmış bu dokunun yerini yeni doku oluşumunun alması olarak tanımlanmaktadır (33). Yara iyileşmesinin gecikmesi, ya da iyileşmenin gerçekleşmemesi kişinin yaşam kalitesini önemli ölçüde olumsuz yönde etkilemekle birlikte tedavi edilmediği zaman çeşitli kronik hastalıkların yolunu da açmaktadır. Bu durum kişiyi sadece bedensel olarak değil ruhsal açıdan da olumsuz yönde etkilemektedir. Günümüzde yara iyileşmesinin tedavisinde sentetik ilaçların kullanımı yaygındır. Sentetik ilaçlar, iyileşmede etkili olmakla birlikte çeşitli yan etkilerinin ortaya çıkması sebebiyle araştırmacılar doğal kaynaklı ilaçlara yönelmeye başlamışlardır. Çok eski yıllardan bu yana halkımız tecrübeleri sayesinde çevresinde yetişen bitkilerden karışımlar hazırlayarak ya da bitkiyi tek başına kullanarak yaralar üzerinde etkili ürünler hazırlamışlardır. Bu bitkiler üzerinde çalışmalar yapılarak etkisi kanıtlanmış, yan etkisi az, doğal kaynaklı bitkisel ürünler hazırlamak günümüz araştırmacıların önem verdiği konulardır.

Cins bakımından oldukça zengin bir aile olan Asteraceae familyası halk ilacı olarak kullanılan önemli bitkileri barındırmaktadır. Bu familyanın önemli cinslerinden biri olan ve 15 tür ile temsil edilen *Pilosella* Hill. cinsi fenolik bileşikler bakımından oldukça zengin bir cinstir. Cinsten yer alan bitkiler zengin içeriği sayesinde halk arasında sistit, nefrit, ürolityazis, öksürük, diyare, diyabet ve yara solunum yolu iltihapları ve kanamalarının tedavisinde kullanılmakta olup; bitkilerin ayrıca diüretik, astrenjan, antiseptik ve iltihap azaltıcı etkileri bulunmaktadır (21-24).

Balıkesir bölgesinde *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* bitkisinin toprak üstü kısmından infüzyon yoluyla hazırlanan ekstre, yaraları iyi etmek amacıyla uzun yıllardır halk tarafından kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında halk arasında yıllar boyunca bu kadar yaygın kullanılıp etkisinin görüldüğü bu bitki üzerinde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yaparak yara iyileştirici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Nath ve arkadaşlarının yapmış olduğu etnobotanik bir çalışmada bitkinin toprak üstünden infüzyon ile hazırlanan çözeltilinin halk tarafından uzun yıllardır yaraları iyi etmek amaçlı kullanıldığı rapor edilmiştir (8). Bitkinin yaralar üzerinde iyileştirici etkisinin gözlemek üzere ratlar üzerinde *Dairesel Eksizyon Yara Modelini* uygulayarak yaptığımız *in vivo* çalışmada *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* bitkisinin sıçanlar üzerinde yaraları

etkili bir şekilde iyileştirdiği her gün çekilen yaraların fotoğrafı ve yara bölgesinin ölçülmesiyle yapılan hesaplamalar sonucunda belirlenmiştir. Yara alanın küçülmesinin; yaranın kontraksiyonu ve yara iyileşmenin göstergesi olduğu bu modelde dördüncü günde kontrol grubu, ekstre grubu ve pozitif grupta yara kapanma yüzdeleri sırasıyla % 11.6, % 21.9 ve % 22.7 olarak hesaplanmıştır. 7. gündeki yara kapanma yüzdesi kontrol grubu, ekstre grubu ve pozitif grup için sırasıyla % 51.5, % 69.3 ve % 60.7 olarak bulunmuştur. 7. güne kadar elde edilen bu verilerde ekstre grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ekstrenin yaralar üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür. 14. günde ise ekstre grubu ile pozitif grubundaki sıçanların yaraları tamamen kapanmış olup, kontrol grubundaki sıçanların yaraları 21. güne kadar tamamen kapanmıştır. Bulunan verilerin histolojik verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Yapılan bu *in vivo* çalışma sonucunda bitkinin yaralar üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Fenolik bileşikler yara iyileşmesinde oldukça etkilidir. Yaptığımız YBSK çalışmalarında ve literatür araştırmalarında bitkinin içeriğinde fenolik bileşiklerden şiringaldehit, sinapik asit, benzoik asit, kersetin, klorojenik asit, apigenin, luteolin, izotin, sinarin ve dikafeoilkuinik asit bulunduğu belirtilmiştir (6, 7). Kersetinin yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda kersetinin yara iyileşmesini hızlandığı rapor edilmiştir (188, 189). Klorojenik asitin yara iyileşmesinin proliferasyon ve yeniden şekillenme fazlarını hızlandığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (190). Ayrıca luteolin ile yapılan çalışmalarda luteolinin yaralar üzerine oldukça etkili olduğu görülmüştür (191, 192). Bitkinin yara iyileşmesine katkısının içerdiği fenolik bileşikler sayesinde olduğunu düşünmekteyiz.

Histolojik olarak dokular incelendiğinde yara iyileşmesinin 4. gününde hematoksilin-eozin ile boyanan kesitlerde pozitif ve kontrol grubunda epitelizasyonun henüz gelişmediği, ekstre grubunda ise hafif düzeyde epitelizasyonun geliştiği görülmektedir. Yaptığımız hidroksiprolin çalışmalarında da ekstre grubunu diğer gruplarla kıyasladığımızda hidroksiprolin miktarı açısından en yüksek gruptur. Bu sonuçlar 4. günde ekstre grubunda bağ yapısının oluşmaya başladığını göstermektedir. Tüm gruplarda hafif-orta düzeyde anjiogenezis gelişirken, hafif düzeyde fibroplazi gözlemlenmiştir. Grupların tamamında yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve hemorajik alanlar bulunmaktadır. Deri ekleri (kıl folikülleri, ter bezleri, yağ bezleri) hiçbir grupta görülmemiştir. İyileşmenin 7. gününde kontrol grubuna kıyasla pozitif ve ekstre gruplarında epitelizasyonun kısmen daha iyi geliştiği gözlenmiştir. Bu gruplarda daha çok tam matür/immatür epitel görülürken kontrol grubunda kısmi epitel yapısı gözlenmiştir. Tüm gruplarda orta-ileri düzeyde

anjiogenezis gelişirken ileri düzeyde fibroplazi gözlemlenmiştir. Grupların tamamında orta düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülürken, kontrol grubuna kıyasla ekstre grubunda çok daha az hemorajik alanlar bulunmaktadır. Yara iyileşmesinin 14. gününde epitelizasyon tüm gruplarda tam matür yapıdadır. Tüm gruplarda ileri düzeyde anjiogenezis ve fibroplazi gözlemlenmiştir. 14. günde grupların tamamında inflamatuvar hücrelerin yerini fibroblastlara bırakarak inflamasyonun minimum düzeye indiği görülmüştür. Hemorajik alanların ise tamamen kaybolduğu ve deri eklerinin gelişmeye başladığı görülmüştür. 21. günde tüm gruplarda tam kat matür epitel tabakası, dermis tabakasında yeni damarlar ve bol fibroblast hücreleri bulunmaktadır. Grupların hepsinde minimal inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmüştür. Hemorajik alan hiç gözlenmemiştir. Deri ekleri grupların tamamında çoğunlukla bulunmaktadır. Yara iyileşmesinde histolojik çalışmalar oldukça önemlidir. Histolojik veriler incelendiğinde ekstrenin yara iyileşmesi üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür. Histolojik veriler ile biyolojik çalışma verileri uyumluluk göstermiştir. Bitki ekstresinin yaraları hızla iyileştirdiği gözle ve mikroskopik olarak gözlemlenmiştir. Bitkinin içeriğinde yer alan fenolik bileşiklerin yara iyileşme fazlarına etki ederek yaraları hızlı iyileştirdiğini düşünmekteyiz. Literatürde bu bitkiyle yapılan başka histolojik çalışma bulunmamaktadır.

In vivo çalışmalar sonucunda gruptaki ratlardan alınan deri örnekleri ve serum üzerinde biyolojik çalışmalar yapılmıştır. Antioksidan aktivite çalışmalarında SOD, Katalaz ve MDA düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda bitkiyle hazırlanan merhem uygulandığı sıçanların yara dokusunda ve serumda SOD ve Katalaz enzim düzeylerinin arttığı; MDA düzeylerinin ise düştüğü görülmüştür.

Çalışmamızda 4. günde ötenazi edilen gruplar birbiri ile kıyaslandığında pozitif grubun (3088.36 ± 25.85 pg/mg protein) dokusunun en yüksek SOD aktivitesine sahip olduğu, bunu ekstre grubunun (2902.22 ± 30.14 pg/mg protein) takip ettiği görülmektedir. Serum düzeylerine bakıldığında da en yüksek SOD değeri pozitif grupta (471.75 ± 22.09 pg/mg protein) görülmektedir. Ekstre 4. günde SOD değerini dokuda serumdan daha fazla yükseltmiştir. 7. günde ötenazi edilen gruplara bakıldığında pozitif ve ekstre grubunun dokudaki ve serumdaki SOD seviyesinin kontrol grubuna göre oldukça yükseldiği görülmektedir. 14. gün dokuda SOD değerlerine bakıldığında pozitif grubun en yüksek değere (8195.76 ± 23.60 pg/mg protein) sahip olduğu görülmektedir. Serum düzeylerindeki SOD değerleri incelendiğinde ise ekstrenin SOD değerini (540.33 ± 13.38 pg/mg protein) en

fazla attırdığı görülmektedir. 21. günde ise ekstre grubu hem dokuda (7401.60 ± 31.07 pg/mg protein) hem de serumda (601.13 ± 14.69 pg/mg protein) en yüksek SOD değerlerine sahiptir. Doku ve serumdaki SOD değerleri incelendiğinde ekstre ve Madecassol'un SOD aktivitesi üzerine etkili oldukları açıkça görülmektedir.

Diğer bir antioksidan parametresi olan Katalaz düzeyleri incelendiğinde ilk günlerden itibaren ekstre ve pozitif grubun Katalaz düzeylerini kontrol grubuna kıyasla oldukça arttırdığı görülmektedir. 4, 7, 14 ve 21. günler ekstre grubu açısından birbirleri ile kıyaslandığında, ekstre grubunun dokuda ve serumda Katalaz düzeylerini günler geçtikçe arttırdığı görülmektedir. Aynı durum Madecassol için de geçerlidir. Dokuda 14. günden sonra pozitif grupta Katalaz düzeylerinde hafif azalma görülmüştür. Kontrol grubunda ise iyileşme üzerine herhangi bir müdahale yapılmamasına rağmen zamanla fizyolojik bakımdan doku iyileşmesine bağlı olarak dokuda ve serumda Katalaz düzeylerinde artış gözlenmiştir.

MDA düzeyleri incelendiğinde ilk günlerde doku hasarına bağlı olarak dokuda ve serumda tüm gruplarda MDA düzeyleri yüksek çıkmıştır. Günler ilerledikçe ekstre grubunda dokuda ve serumda MDA düzeyleri giderek azalmıştır. Dokuda ekstre grubu; pozitif ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bakılan her gün için aralarındaki en düşük MDA seviyesine sahip gruptur. Serumda ise pozitif grup 4. ve 7. günlerde diğer gruplara kıyasla en düşük MDA seviyesine sahip olan grup niteliğini taşımaktadır. Kontrol grubunda günler geçtikçe serumda ve dokuda MDA düzeyleri azalmakla birlikte diğer gruplarla kıyaslandığında MDA seviyesi en yüksek grup olmaktadır.

Sonuçlar incelendiğinde bitkinin antioksidan etkisinin yara iyileşmesini hızlandırdığı düşünülmektedir. Bakar ve arkadaşları bitkinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla bitkinin kök ve toprak üstü kısmından metanol/su (80:20) ekstresi hazırlanmış, *in vitro* testler ile DPPH ve MDA düzeylerini ölçmüşlerdir. Testler sonucunda bitkinin DPPH analizinde kök ve toprak üstü kısmı için SC_{50} değerleri sırasıyla 0.231, 0.864 mg/mL olarak bulunmuştur. MDA düzeyleri ise sırasıyla 3.91, 53.16 nmol/mL olarak hesaplanmıştır. Yapılan *in vitro* antioksidan analiz sonucunda bitkinin güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür (7). Stanojevic ve arkadaşlarının *H. pilosella* bitkisinin antioksidan aktivitesini belirlemek üzere yaptığı DPPH analizinde bitkinin metanol ekstresinin SC_{50} değeri 0.012 mg/mL olarak bulunmuştur (193). *H. pilosella* üzerine yapılan başka bir DPPH analizi çalışmasında ise bitkinin su, etanol ve

metanol ekstreleri çalışılmış ve bitkinin 0.30 mg/mL konsantrasyonunda DPPH sonuçları sırasıyla %56.35, 58.73 ve 54.35 olarak bulunmuştur. Bitkinin toplam fenolik içeriği ve 239.59-244.16 mg GAE/g kuru ekstre olarak bulunmuştur (194). *P. officinarum* (*H. pilosella*) bitkisinin antioksidan aktivitesini ölçmek amacıyla DPPH analizleri yapılmış, bitkinin farklı konsantrasyonda hidrometanolik ekstreleri hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerin troloks eşdeğerleri 12-22.5 mg arasında değişmektedir. Araştırmacılar bitkinin antioksidan aktivitesinin içerdiği fenolik bileşiklerle yüksek oranda bağlantılı olduğunu beyan etmişlerdir (20). Serbest radikaller yara bölgesinde doku hasarına yol açarak iyileşmeyi geciktirebilmektedirler. Derinin önemli bileşenlerinden kollajen yapısında bulunan hidroksiprolin ve prolin bu serbest radikallerden etkilenerek parçalanabilmekte, keratinositlerin göçü inhibe edilmekte ve sonucunda yara iyileşme fazında önemli olan fibroblastların adezyon ve proliferasyonunu etkileyebilmektedirler. Ayrıca serbest radikaller sitotoksositeye sebep olarak iyileşmeyi engellemektedirler (176, 195). Serbest radikallerin bu olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılıp yara iyileşmesini sağlamak amacıyla antioksidanlar iyileşmede başrolü paylaşan önemli etmenlerdir. Fenolik bileşikler güçlü antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerdir (102). Yaptığımız YBSK ve literatür çalışmalarında bitkinin şiringaldehit, sinapik asit, benzoik asit, kersetin, klorojenik asit, apigenin, luteolin, izotin gibi fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olduğu görülmüştür. Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada kersetinin uygun dozlarda kullanıldığında dokudaki antioksidan parametrelerini arttırdığı rapor edilmiştir (188). Apigenin, luteolin ve kersetin üzerine yapılan bir çalışmada bu fenoliklerin antioksidan etkili oldukları belirtilmiştir (196). Luteolinin HT-29 hücre hatları üzerinde yapılan antioksidan çalışmasında, luteolinin hücrelerde SOD ve Katalaz düzeylerini arttırdığı rapor edilmiştir (197). Bitkimizin bu antioksidan etkisini içerdiği fenolik bileşikler üzerinden gösterdiğini düşünmekteyiz. Bitkinin antioksidan etkisinin bulunması yara iyileşmesinin hızlanmasında, sağlıklı hücrelerin büyümesinde ve cildin yenilenmesinde önemli bir faktör olmaktadır.

Ayrıca yapılan antiinflamatuvar çalışmalar sonucunda bitkinin TNF- α ve IL-1 β düzeylerine etkileri de incelenmiştir. Bitkinin kullanıldığı grupta kontrol grubuna kıyasla yara iyileşmesi için önemli olan TNF- α ve IL-1 β parametrelerinin yüksek olduğu görülmektedir.

Anti-inflamatuar sonuçlar incelendiğinde 4. günde ötenazi edilen grupların üçünde de diğer günlere oranla TNF- α değerleri oldukça yüksek çıkmıştır. Bu yara iyileşmesinin fazlarından biri olan inflamasyon fazının başlamış olduğunu göstermektedir. 4. günde grupları birbirleriyle kıyasladığımızda hem dokuda hem de serumda en yüksek değerlerin pozitif grupta olduğunu görmekteyiz. Daha sonrasında ekstre grubu gelmektedir. Bu gündeki sonuçlar bize ekstrenin ve Madecassol'un inflamasyonu arttırdığını göstermektedir. Takip eden günlerde ekstrenin dokuda ve serumdaki TNF- α düzeylerinin kontrole göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu da içerdiği bileşenlerden kaynaklı inflamasyon fazını takiben yara iyileşmesinin diğer fazlarına geçişin olduğunu ve bitkinin bu fazlara geçişte de etkili olduğunu düşündürmektedir. Pozitif grupta da TNF- α düzeyleri ekstrede olduğu gibi zamanla azalmaktadır. Kontrol grubuna baktığımızda hiçbir uygulama yapılmamasına rağmen iyileşmenin fizyolojik aşamalarına bağlı olarak TNF- α düzeyleri zamanla azalmaktadır.

Dokuda ve serumda IL-1 β düzeyleri incelendiğinde ekstre grubunda ve pozitif grupta kontrol grubuna kıyasla düzeyin yüksek olduğu görülmektedir. Ekstre grubunda doku IL-1 β seviyesinde günler ilerledikçe dalgalanma olduğu görülmektedir. 4. günden sonra düzeyin azaldığı fakat 7. günden sonra değer tekrar arttığı ve 14. günden sonra değer tekrar azaldığı görülmektedir. Bu durumun dokuda oluşan fizyolojik şartlardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ekstre grubunda serum düzeyleri incelendiğinde ise IL-1 β düzeyinin zamanla azaldığı görülmektedir. Kontrol grubu incelendiğinde dokudaki IL-1 β düzeyinin en yüksek 4. günde olduğu, 14. güne kadar azalış gösterdiği ve sonrasında tekrar yükselişe geçtiği görülmektedir. Kontrol grubunun serum düzeylerine bakıldığında ise IL-1 β değerinin zamanla azaldığı görülmektedir. Pozitif grup günler açısından kendi içerisinde kıyaslandığında dokuda ve serumda IL-1 β değerinin en yüksek değerlerine 7. günde ulaştığı görülmektedir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde bitkinin TNF- α ve IL-1 β parametrelerinin sentezlenmesini arttırarak yara iyileşmesinin bir fazı olan inflamasyon fazının hızla başlamasını sağladığı ve diğer fazlara geçişin daha önce olduğu; böylece yara iyileşmesinin hızlandığı tespit edilmiştir. Bitki ile ilgili yapılan literatür çalışmalarında bitkinin bu sitokinler üzerine etkisi ile ilgili yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bitkinin içerdiği luteolin, kersetin ve sinapik asit gibi fenolik bileşikler üzerinde yapılan literatür çalışmalarında bu bileşiklerin antiinflamatuvar etkili oldukları rapor edilmiştir.

(198-201). Fakat bitkinin çeşitli ekstrelerinin antiinflamatuvar etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız, bu etki üzerine yapılan ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır.

Kollajen, deri, kıkırdak, kemik ve tüm canlı dokuların başlıca yapı proteini olup yara iyileşmesini gösteren parametrelerden en önemlisidir. Hidroksiprolin kollajen molekülünün yaklaşık %11'ini oluşturmaktadır. α zincirler üçlü helezon meydana getirerek tropokollajen moleküllerini oluşturmaktadırlar (100). Yara iyileşmesinde önemli olan bu parametre incelendiğinde dördüncü günde hidroksiprolin düzeyleri ekstre grubunda (3.166 ± 0.003 $\mu\text{g}/\text{mg}$ doku) ve pozitif grupta (2.927 ± 0.001 $\mu\text{g}/\text{mg}$ doku) kontrol grubuna (1.324 ± 0.002 $\mu\text{g}/\text{mg}$ doku) kıyasla oldukça artmıştır. İlerleyen günlerde de ekstre grubunda ve pozitif grupta hidroksiprolin miktarları kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar ekstre ve pozitif grupta yer alan sıçanların yaralarının daha erken kapanmasının nedenlerinden biri olarak hidroksiprolin seviyelerindeki artış olduğunu göstermektedir.

İnflamatuvar yanıtta önemli olan sitokinlerden en önemlileri interlökinler ve TNF- α olarak belirtilmektedir. IL-1 ve TNF- α , aktive makrofajlar ve lenfosit gibi hücreler tarafından oluşturulmakta ve “proinflamatuvar sitokinler” olarak adlandırılmaktadırlar. TNF- α , inflamatuvar reaksiyonlarda parakrin ve otokrin düzenleyici olup lokal etkilidir. Fibroblastların ve endotel hücrelerinin proliferasyonunda interlökinler ve TNF- α ’ların önemi büyüktür (82). MMP’lar ise doku yenilenmesi, morfogenezis, yara iyileşmesi gibi durumlarda önemli rol oynamaktadırlar. MMP’lar yara iyileşmesinde yaralı bölgede reepitelizasyonun gerçekleşmesi için keratinosit göçünü sağlamaktadır (98).

Bitki ile yaptığımız *in vivo* çalışma sonucunda aldığımız yara dokusu örnekleri üzerinde yara iyileşme fazlarında bu kadar aktif rol alan TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve MMP-9 genlerin düzeylerinin belirlenmesi ve mekanizmanın aydınlatılması amacıyla RT-PCR çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve MMP-9 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri PCR sistemi içerisindeki software ile comparative CT (ÄÄCT) metoduna göre analiz edilerek logaritmik olarak incelenmiştir. Madecassol ile tedavi edilen pozitif grup ve bitki ile tedavi edilen ekstre grubu, kontrol grubuna oranlanarak sonuçlar hesaplanmıştır.

4 ve 7. günlerde ötenazi edilen grupların dokularındaki TNF- α geninin mRNA ekspresyon düzeyleri incelendiğinde en yüksek değerin pozitif grupta olduğu görülmektedir.

Yaptığımız anti-inflamatuar çalışmasında aldığımız sonuçlarla benzerlik göstermiştir. 14. güne geldiğimizde gen ekspresyon düzeyinin ekstre grubunda daha yüksek olduğu görülmektedir. Bitkinin bu günlerde TNF- α düzeylerini arttırdığı görülmektedir. 21. güne bakıldığında ise ekstre grubunun TNF- α gen ekspresyonunu artırdığı görülmektedir. Yaptığımız kit çalışmasında ise dokudaki TNF- α düzeyinin ekstre grubunda kontrol grubundan daha düşük çıktığı görülmektedir. Bitkinin, TNF- α 'nın gen ekspresyonunu artırdığı halde dokuda düzeyinin kontrole kıyasla daha düşük çıkması dokuda meydana gelen fizyolojik olaylardan kaynaklı başka etmenlerin düzeyi etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir.

IL-1 β gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde ise 4. günde ekstre grubunun IL-1 β gen ekspresyonunu (110.410) pozitif gruba göre (3.317) daha fazla arttırdığı görülmektedir. 7., 14 ve 21. günlere baktığımızda ise IL-1 β gen ekspresyon oranının pozitif grupta daha yüksek oranda olduğu görülmektedir. Sonuçlar anti-inflamatuar deneylerde IL-1 β düzeylerini ölçmek için yaptığımız kit çalışmalarıyla uyumluluk göstermektedir.

IL-10 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde ise ekstre grubunun 4. gün gen ekspresyonunu oldukça arttırdığı görülmektedir. Günler ilerledikçe ekspresyon oranının giderek azaldığı görülmektedir. Pozitif grupta ise 7. güne kadar ekspresyon düzeylerinde artış 7. günden sonra ise azalış görülmektedir.

MMP-9 gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında ise pozitif grup kendi içinde diğer günlerle kıyaslandığında 4. günde en yüksek orana (11.958) sahip olup günler ilerledikçe oranı azalmaktadır. Ekstre grubunda da pozitif grupta olduğu gibi en yüksek gen ekspresyon değerinin 4. günde olduğu (6.426) zaman ilerledikçe ekspresyon oranının azaldığı görülmektedir. İstatistik çalışmalarında gruplar arasındaki değişim birbirleriyle anlamlı bulunmuştur.

Gen ekspresyon sonuçlarına bakıldığında bitkinin, yara iyileşmesinde önemli rolleri bulunan TNF- α , IL-1 β , IL-10 ve MMP-9 genlerinin mRNA ekspresyonunu oldukça artırdığı ve iyileşmeyi hızlandırarak etkisini gösterdiği görülmüştür.

Yara iyileşmesinde, yara iyileşmesini sağlayan faktörlerin dışında yabancı madde bulunması iyileşmeyi geciktirebilir, hatta önleyebilir. Özellikle mikroorganizma bulunduran bir yaranın iyileşmesi mümkün değildir. Yara iyileşme fazında biyolojik faktörler bir yandan iyileşmeyi sağlamaya çalışırken bir yandan da mikroorganizmalarla savaşmak zorunda kalmaktadır. Bu durumda antimikrobiyal bir ajanın kullanılması

gerekliliği doğmaktadır. Sentetik ilaçların yıllardır kontrolsüz bir şekilde kullanımı mikroorganizmanın ilaca karşı direnç geliştirmesini sağlamış ve ilacı etkisiz hale getirmiştir. Bundan yola çıkılarak tedavide kullanılabilecek bitkilere rağbet olmuş ve doğal kaynaklı antimikrobiyal ajanlar tedavide kullanılmaya başlanmıştır. *P. hoppeana* subsp. *testimonialis*'in yara iyileşmesi üzerine etkisini incelerken iyileşmenin kontrol grubuna göre daha hızlı olduğu görülmüş ve bunun üzerine iyileşmeye katkısının olup olmadığını belirlemek amacıyla bitkinin antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Bitkiyle yapılan antimikrobiyal çalışmalarda *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *M. smegmatis* bakterilerine karşı aktivite gözlemlenmiş olup inhibisyon çapları sırasıyla 14, 12, 12, 7, 6 ve 10 mm olarak bulunmuştur. MIK değerleri ise sırasıyla 125, 125, 125, 700, 700 ve 62.25 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bitkinin *C. albicans* mantarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüş, inhibisyon çapı 8 mm ve MIK değeri 350 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bakterilere bakıldığında özellikle *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. smegmatis* ve *C. albicans* mikroorganizmalarının birçok dokuda enfeksiyona sebep olduğu göz önüne alınırsa bitkinin bu mikroorganizmalara karşı etkili olduğunun belirlenmesiyle sahip olduğu antimikrobiyal etkisinin yara iyileşmesine katkı sağladığı sonucuna varılmaktadır.

Normal koşullarda ve yara oluşumunu takiben iyileşme fazlarında meydana gelen pigmentasyon sürecinde tirozinaz enzimi aktif rol almaktadır (156). Pigmentasyon sürecinde bitkinin tirozinaz enzimine etkisi yönünden araştırılması amacıyla tirozinaz enzim inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda bitkinin tirozinaz enzimi üzerine anlamlı bir inhibisyon (IC₅₀ değeri 112.696 µg/mL) göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuca göre bitkinin tirozinaz enzimi üzerine olumsuz bir etki oluşturmadığı ve böylece yara iyileşme fazlarının sorunsuz devam ettiği düşünülmektedir.

Bitkilerin yapısında bulunan maddelerin belirlenmesi amacıyla YBSK çalışmaları günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Bitkinin yara iyileşmesi etkisinin belirlenmesi üzerine bitkinin içeriğini belirlemek amacıyla belirli standartlar kullanılarak YBSK çalışması gerçekleştirilmiştir. Kullandığımız 16 dakikalık metotta bitkinin içeriğinde fenolik bileşiklerden şiringaldehit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin bulunmuştur. Yapılan başka çalışmalarda *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* bitkisinin içeriğinde fenolik bileşiklerden klorojenik asit, apigenin 4-O-β-D-glukuronit, luteolin 7-O-β-D-glukopiranozit, luteolin 7-O-β-D-glukuronit, luteolin 4-O-β-D-glukopiranozit, izotin 4-O-

β -D-glukuronit, sinarin, 3,5-dikafeoilkuinik asit, 4,5-dikafeoilkuinik asit bulunduğu belirtilmiştir (6, 7). Ayrıca *Pilosella* cinsine ait başka bir tür olan *P. officinarum* bitkisinde luteolin-7-glukopiranozit, umbelliferon, luteolin, klorojenik asit ve izotin 4'-O- β -D-glukopiranozit bulunduğu belirtilmiştir (21). Fenolik bileşikler güçlü antioksidan etki göstermektedir (202). Antioksidan bileşikler ise yara bölgesinde serbest radikallere etki ederek bölgenin radikallerden temizlenmesi, iyileşme fazlarının düzgün ve hızlı bir şekilde tamamlanıp iyileşmenin sağlanması bakımından önemlilik arz etmektedirler. Bu bakımdan bitki ile yapılan, tezde ve literatürde belirtilen YBSK çalışmalarında bitkinin içeriğinde bulunan bu fenolik bileşikler sayesinde de bitkinin yara iyileşmesine katkı sağladığını düşünmekteyiz.

HO-1 antioksidatif, lipoprotektif enzimlerden biridir. Oksidatif stres, ağır metal, sitokinler gibi çeşitli uyarınlarca indüklenmektedir. HO-1 ekspresyonu oksidan ile indüklenen hücre ölümünü azaltmaktadır (131-133). Bitki ile yaptığımız HO-1 konsantrasyon tayini çalışmalarında H₂O₂ uygulanan hücrelerde kontrole göre HO içeriğin oldukça azaldığı belirlenmiştir. Bitki ekstresinin uygulandığı gruplarda bitki konsantrasyonunun artmasıyla hücrelerde HO içeriğin arttığı görölmüştür. Ayrıca kersetin uygulanan hücrelerde HO içeriğin arttığı gözlenmiştir. Bu verilere dayanılarak yara iyileşmesinde bitkinin etkili bulunmasının sebeplerinden biri olarak bitki ekstresinin hücrelerde HO miktarını artırması gösterilebilmektedir. *P. hoppeana* subsp. *testimonialis* bitkisinin luteolin heteroziti içerdiği literatür araştırmalarında; kersetin içerdiği ise yaptığımız YBSK çalışmalarında bulunmuştu. HO aktivite ile aldığımız sonuçlara bakarsak, bitkinin içeriğindeki kersetin ve luteolinin bu aktiviteye katkı sağladığını düşünmekteyiz. Bitkilerin zengin bileşik içeriğini düşünürsek bu etkiye kersetin ve luteolin yanında başka bileşiklerin de katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Sun ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada H9C2 hücrelerinde luteolinle indüklenen HO-1 ekspresyonunun spektrofotometrik ile ölçümü sonucunda arttığı görölmüştür. Ayrıca luteolinle birlikte artan HO-1 aktivitesindeki artışın H₂O₂'nin sebep olduğu oksidatif hücre ölümüne karşı koruyucu olup olmadığını anlamak için HO-1 aktivitesinin inhibitörü olan ZnPP kullanılmış, H₂O₂ uygulanmasından 2 saat önce hücrelere ZnPP verilmiş ve luteolin aracılı koruyucu etkinin azaldığı gözlenmiştir. Luteolin ile ön tedavi ile ortaya çıkan sitoprotektif etkinin HO-1 ekspresyonunun indüksiyonu yoluyla olduğunu göstermektedir. Çalışma sonucunda luteolinin HO-1 ekspresyonundaki artış aracılığıyla koruyucu etkisini sağladığını göstermiştir (203). Kersetinin, p38 Mitojenle-Etkinleşen Protein Kinaz

(MAPK) yoluyla HO-1 ekspresyonunu kısmen de olsa indüklediği çalışmalarda rapor edilmiştir (204). Kersetinin HO-1 üzerine etkisi ile yapılan başka bir çalışmada sıçan hepatositleri ile çalışılmış ve etanol ile oksidatif stres indüklenmiştir. Çalışma sonucunda kersetinin, HO-1 ekspresyonunu mRNA ve protein seviyelerinde önemli ölçüde uyardığını görülmüştür (205).

NO, bağışıklık tepkilerinde, inflamatuvar yanıtta ve beyin için nöronal iletimde önemli rol oynayan bir iletim molekülüdür. Yaygın ve tipik non-steroidal anti-inflamatuvar ajan olan indometasin ise inflamasyonun tedavisinde kullanılmaktadır. RAW 264.7 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada indometasinin NO sekresyonunu önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (182). Bitki ekstresinin çeşitli dozları, NO sekresyonunun ortaya çıktığı RAW 264.7 hücreleri üzerinde test edilmiştir. İndometasin, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda indometasinin NO miktarını doza bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüştür. Test ettiğimiz bitki ekstrelerinde ise indometasinin aksine konsantrasyon arttıkça NO miktarının da arttığı görülmüştür. Bitkinin NO konsantrasyonunu azaltmadığı aksine miktarını arttırdığı gözlemlenmiştir. Bitkinin içerdiği bazı bileşiklerin NO üretimine etkisi ile ilgili yapılan literatür çalışmalara baktığımızda Yun ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada sinapik asitin, doza bağımlı bir şekilde lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen NO seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir (198). Cho ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kersetinin, LPS tarafından aktive edilen RAW246.7 hücrelerinde iNOS'dan türetilen NO üretimini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (199). Luteolin ile yapılan bir çalışmada luteolinin, makrofajlarda LPS ile indüklenen NO üretimini baskıladığı rapor edilmiştir (200). Bitkinin içeriğinde yer alan sinapik asit, kersetin ve luteolin heterozitinin tek başlarına uygulandığında nitrik oksit sentezini inhibe etmesiyle ilgili çalışmaların bulunmasına rağmen bitkinin metanol ekstresi ile yaptığımız bu çalışmada, *P. hoppeana* subsp. *testimonialis*'in NO konsantrasyonunun arttırdığının görülmesi bize bitkinin içeriğinde yer alan diğer bileşiklerin bu etkiye sebep olabileceğini düşündürmüştür. NO'nın yara iyileşmesinde anjiogenezi uyarmasının yanında vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun baskılanması ile de etkili olduğu bilinmektedir (90, 126, 127). Bitkinin NO konsantrasyonunu artırıcı etkisi ile yara iyileşmesinin bu evrelerinde yara iyileşmesine katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda bitkinin COX-2 enzimine karşı inhibisyon etkisi ticari kit ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bitki grupları kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında bitkinin dozu arttırıldıkça hücrelerde COX-2 % inhibisyonun arttığı belirlenmiştir. Bitkinin COX-2 enzimi inhibe edici etkisi ile de yara iyileşmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Harris ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada RAW 264.7 makrofaj hücrelerin 25, 50 ve 100 µmol/L luteolin konsantrasyonları ile ön tedavisinin, LPS ile indüklenen COX-2 protein ekspresyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (201). Yapılan başka bir çalışmada kersetinin, mikrogial aktivasyonun neden olduğu apoptotik nöronal hücre ölümünü azaltarak, LPS ile indüklenen COX-2'nin mRNA seviyelerini inhibe edebileceği bulunmuştur (206). Yun ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada sinapik asitin, doza bağımlı bir şekilde LPS ile indüklenen COX-2 seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir (198). Sonuç olarak YBSK çalışmalarıyla bitkinin içeriğinde belirlenmiş olan sinapik asitin, kersetinin ve luteolin heterozitinin COX-2 seviyesine etki ederek bitkinin inflamatuvar yanıtta etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, uzun yıllar boyunca geleneksel olarak yara iyileşmesi için kullanılan *P. hoppeana* subsp. *testimonialis*'in yaptığımız *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucunda yara iyileşmesi üzerinde oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda herhangi bir toksik ya da yan etkiye rastlanmamıştır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda da bitkinin yara iyileşmesine katkısının mekanizması aydınlatılmıştır. Yan etkisi az, doğal kaynaklı, yara iyileştirici bir ilacın geliştirilmesinde bu bitkinin kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bitkinin yetiştiği yerde üretimi artırılarak ve etken madde olarak kullanılması ile de ileri aşamalarda ilaç geliştirilip patent alınmasının önü açılacaktır. Doğal olarak kullanılan bu bitkiden ileri aşamalarda ilaç geliştirilmesi durumunda ithal ilacın alımı azalıp yerli ilaç üretiminin artışının oluşabilmesi ve ulusal ekonomiye katkı sağlanabilmesi açısından bu tez çalışması özgün bir çalışma niteliği taşımaktadır.

Ayrıca yaptığımız literatür çalışmalarında bitkiyle yara iyileşmesi üzerine yapılan ilk *in vivo*, mekanizma aydınlatma, RT-PCR, tirozinaz enzim inhibisyon ve antimikrobiyal çalışmalar olması bakımından da tez çalışması özgünlüğünü göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu Univ Orman Fak Derg 11(1): 52-67.
2. Eruygur N (2014). Türkiye’de yetişen bazı *Echium* türlerinin yara iyileştirici aktivitesinin araştırılması. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara.
3. Dal OH, Karadoğan M, Sezer AD (2015). Biyobenzerler: Kavramlar ve ruhsatlandırma süreçleri. Marmara Pharmaceutical Journal 19: 252-258.
4. Davis PH (1965-1988). Flora of Turkey and the East Aegean Island. At the University Press. Vol. 1-10. Edinburg.
5. Şengönül K, Kara Ö, Palta Ş, Şensoy H (2009). Bartın Uluyayla yöresindeki mera vejetasyonunun bazı kantitatif özelliklerinin saptanması ve ekolojik yapının belirlenmesi. Bartın Orman Fakültesi Dergisi 11: 81-94.
6. Zidorn C, Gottschlich G, Stuppner H (2002). Chemosystematic investigations on phenolics from flowerheads of Central European taxa of *Hieracium sensu lato* (Asteraceae). Plant Syst Evol 231(1-4): 39-58.
7. Bakar F, Acıkara ÖB, Ergene B, Nebioğlu S, Çitoğlu GS (2015). Antioxidant activity and phytochemical screening of some Asteraceae plants. Turk J Pharm Sci 12: 123-132.
8. Nath E (2016). Savaştepe ve kepsut (Balıkesir) yörelerinde etnobotanik araştırmalar. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İstanbul.
9. Özkorkmaz EG, Yusuf ÖZ (2009). Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinde kullanılan bazı bitkiler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2: 63-67.
10. Mathieu D, Linke J-C, Wattel F (2006). Non-healing wounds. In: Handbook on hyperbaric medicine (Ed: Mathieu DE). Netherlands: Springer, 401-427.
11. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF (2007). Impaired wound healing. Clin Dermatol 25: 19-25.
12. Guo SA, DiPietro LA (2010). Factors affecting wound healing. J Dent Res 89(3): 219-229.

13. 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*). *J Ethnopharmacol* 109: 104–112.
14. Kurşat M, Civelek Ş (2011). Türkiye’de doğal olarak yetişen *Artemisia* L. (Asteraceae) cinsine ait üç türün morfolojik özellikleri bakımından incelenmesi. *AÇÜ Orman Fak Derg* 12(19): 15-25.
15. Metcalfe CR, Chalk L (1979). *Anatomy of Dicotyledons*. Second edition. I. London: Oxford University Press, London.
16. 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.
17. Sepet H (2017). A Morphological, anatomical and caryological study on endemic *Pilosella hoppeana* subsp. *lydia* taxa (Bornm. & Zahn) Sell & West (Asteraceae). *AÇÜ Orman Fak Derg* 18(2): 168-175.
18. Sennikov AN (2011). A new hybrid in *Pilosella* (Asteraceae) from the Tambov region, European Russia. *Ann Bot Fennici* 48(1): 69-73.
19. Brautigam S, Greuter W (2018). A new treatment of *Pilosella* for the Euro-Mediterranean flora. *Willdenowia* 37(1): 123-137.
20. Becker L, Zaiter A, Petit J, Karam MC, Sudol M, Baudelaire E, Dicko A (2017). How do grinding and sieving impact on physicochemical properties, polyphenol content, and antioxidant activity of *Hieracium pilosella* L. powders?. *J Funct Foods* 35: 666-672.
21. Gawronska-Grzywacz M, Krzaczek T, Nowak R, Los R, Malm A, Cyranka M, Rzeski W (2011). Biological activity of new flavonoid from *Hieracium pilosella* L. *Open Life Sci* 6(3): 397-404.
22. Austin D (2004). *Florida Ethnobotany*. CRC Press, ABD.
23. Pieroni A (2014). *Ethnobotany and biocultural diversities in the Balkans*. Springer New York Heidelberg Dordrecht, London.
24. Dombrowicz E, Swiatek L, Kopycki W (1992). Phenolic acids in Inflorescentia *Helichrysi* and Herba *Hieracii pilosellae*. *Pharmazie* 47: 469-470.

25. Beaux D, Fleurentin J, Mortier F (1999). Effect of extracts of *Orthosiphon stamineus* benth, *Hieracium pilosella* L., *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) spreng in rats. *Phytother Res* 13(3): 222-225.
26. Erbenli T (1985). Özel Histoloji. Beta Basım Yayım Dağıtım, İstanbul.
27. Altun M (2016). Ketamin ve tiyopental sodyum anestezisinin sıçanlarda yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmiş genlerin mRNA profilleri üzerindeki rolünün değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
28. Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M (2001). Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol* 116: 633-640.
29. Sezgin S (2010). Hemostatik ajan Ankaferd'in yara iyileşmesi üzerine etkileri. Uzmanlık tezi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı, Malatya.
30. Yüksel E (2009). Sistemik meperidin uygulamasının ratlarda kutanöz yara iyileşmesi üzerine etkileri. Tıpta uzmanlık tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri.
31. Gantwerker EA, Hom DB (2012). Skin: Histology and physiology of wound healing. *Clin Plastic Surg* 39: 85-97.
32. Gray H (2005). Gray's Anatomy: The anatomical basis of clinical practice. 39th press. (Ed: Standring S). London, 931-933.
33. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 37(5): 1528-1542.
34. Mathieu D, Linke J-C, Wattel F (2006). Non-healing wounds: In: Handbook on hyperbaric medicine. Ed. Mathieu DE: Netherlands, Springer, 401-427.
35. Robson MC, Steed DL, Franz MG (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 38: 72-140.
36. Labler L, Mica L, Harter L, Trentz O, Keel M (2006). Influence of V.A.C.-therapy on cytokines and growth factors in traumatic wounds. *Zentralbl Chir* 131: 62-67.

37. Krizek TJ, Harries RHC (1997). Biology and tissue injury and repair: Georgiade Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery. 3rd ed. Georgiade GS: Williams and Wilkins, 1-9.
38. Broughton George II, Janis JE, Attinger CE (2006). The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117: 12-34.
39. Komarcevic A (2000). The modern approach to wound treatment. *Med Pregl* 53: 363-368.
40. Degreef H (1998). How to heal a wound fast. *Dermatol Clin* 16: 365-375.
41. Attinger CE, Janis JE, Steinberg J, Schwartz J, Al-Attar A, Couch K (2006). Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *Plast Reconstr Surg* 117(7): 72-109.
42. Witte MB, Barbul A (1997). General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 77: 509-28
43. Lorenz HP, Longaker MT (2006). Wound healing: Repair biology and wound and scar treatment: Mathes Plastic Surgery. 2nd ed. Mathes SJ: Saunder Elseiver, 1: 209-234.
44. Rook JM, McCarson KE (2007). Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. *Biochem Pharmacol* 74: 752-757.
45. Glat PM, Longaker MT (1997). Wound healing: Grabb and Smith's plastic surgery. 5th ed. Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM: Lippincott-Raven Publishers, 3-12.
46. Krishan P (2006). The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. *Curr Anaest* 17(1-2): 21-27.
47. Shasrabudhe A, Deodhar M (2010). Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of *Garcinia indica*. *Int J Bot* 6(3): 299-303.
48. Süntar İ, Balemir A, Coşkun M, Keleş H, Akkol E (2011). Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *J Ethnopharmacol* 135(1): 63–70.
49. Chah KF, Eze CA, Emurlosi CE, Esimone CO (2006). Antibacterial and wound-healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 104: 164-167.

50. Khanna S, Venojarvi M, Roy S, Sharma N, Trikha P, Bagchi D (2002). Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Rad Biol Med* 33: 1089-1096.
51. Kim M, Lee HJ, Randy A, Yun JH, Oh SR, Nho CW (2017). *S tellera chamaejasme* and its constituents induce cutaneous wound healing and anti-inflammatory activities. *Sci Rep* 7(1): 1-12.
52. Zwaldo-Klarwasser G, Görlitz K, Hafemann B, Klee D, Klosterhalfen B (2001). The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *J Materials Sci* 12(3): 195-199.
53. Baie SH, Sheik KH (2000). The wound healing properties of *Channa striatus*-cetrimide cream-tensile strength measurement. *J Ethnopharmacol* 71: 93-100.
54. Nithya M, Suguna L, Rosa C (2003). The effect of nevre growth factor on the early responses during the process of wound healing. *Biochim Biophys Acta* 1620: 25-31.
55. Sumitra M, Manikandan P, Suguna L (2005). Efficacy of *Butea monosperma* on dermal wound healing in rats. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 566-573.
56. Karukonda SR, Flynn TC, Boh EE, McBurney EI, Russo GG, Millikan LE (2000). The effects of drugs on wound healing: part 1. *Int J Dermatol* 39: 250-257.
57. Kumar V, Cotran R, Robbins S (2000). Robbins Temel Patoloji. 6. Baskı. Çeviren: Çevikbaş U, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
58. Seymen G (2013). Tıbbi bir bitki ekstresi olan Ankaferd Blood Stopper uygulamasının sekonder yara iyileşmesi üzerine etkisinin histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji Anabilim Dalı, Ankara.
59. Bishop A (2008). Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care* 17: 399-402.
60. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg* 34: 1159-1169.
61. Canda MŞ, Canda T (1982). Temel Patoloji. Bornova Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
62. Şenol M (1995). Yara İyileşmesi. *T Klin J* 5: 49-53.

63. Deodhar AK, Rana RE (1997). Surgical physiology of wound healing: a review. *J Postgrad Med* 43: 52-56.
64. Özbek N, Guneren E, Yildiz L, Meydan D, Cakir S, Coskun M (2005). The effect of pre-operative conventional and hyperfractionated radiotherapy schedules on wound healing and tensile strength in rats: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34: 185-192.
65. Tahsinoğlu M, Çöloğlu AS, Erseven G (1984). Genel Patoloji. İstanbul Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Yayınları, İstanbul.
66. Gosain A, DiPietro LA (2004). Aging and wound healing. *World J Surg* 28: 321-326.
67. Thompson C, Fuhrman MP (2005). Nutrients and wound healing: still searching for the magic bullet. *Nutr Clin Pract* 20: 331-347.
68. Stechmiller JK (2010). Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutr Clin Pract* 25: 61-68.
69. Langemo D, Anderson J, Hanson D, Hunter S, Thompson P, Posthauer ME (2006). Nutritional considerations in wound care. *Adv Skin Wound Care* 19: 297-303.
70. Lansdown AB, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Agren MS (2007). Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen* 15: 2-16.
71. Campos AC, Groth AK, Branco AB (2008). Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11: 281-288.
72. Kim JE, Shklar G (1983). The effect of vitamin E on the healing of gingival wounds in rats. *J Periodontol* 54: 305-308.
73. Sharp A, Clark J (2011). Diabetes and its effects on wound healing. *Nurs Stand* 25: 41-47.
74. Anstead GM (1998). Steroids, retinoids, and wound healing. *Adv Wound Care* 11: 277- 285.
75. Hardman MJ, Ashcroft GS (2008). Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biol* 9: 80.

76. Gilliver SC, Ashworth JJ, Ashcroft GS (2007). The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 25: 56-62.
77. Gentilello LM, Cobean RA, Walker AP, Moore EE, Wertz MJ, Dellinger EP (1993). Acute ethanol intoxication increases the risk of infection following penetrating abdominal trauma. *J Trauma* 34: 669-674.
78. Szabo G, Mandrekar P (2009). A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* 33: 220-232.
79. Arslan MK (2003). Yara iyileşmesi ve iyileşmeyi etkileyen faktörler: Akut ve kronik yara bakımı. 1st ed. Kurt N: Nobel Tıp Kitabevleri, 9-33.
80. Hunt TK, Knighton D, Goodson WH (1985). Yara iyileşmesi. Çağdas cerrahi tanı ve tedavi. Çeviren: Olcay I, Türkiye Klinikleri, 125-137.
81. David M, Young P, Stephen J (1998). Wound healing. In: *Modern surgical Care* 1: 1237-1247.
82. Kuralay F, Çavdar Z (2006). İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg* 16(3): 143-152.
83. Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE (2000). Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J Immunol* 165: 435-441.
84. Mosser DM, Edwards JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
85. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA (2001). Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol* 117: 1027-1035.
86. Park EJ, Barbul A (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American J Surgery* 187: 11-16.
87. Jameson J, Havran WL (2007). Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* 215: 114-122.
88. Mills RE, Taylor KR, Podshivalova K, McKay DB, Jameson JM (2008). Defects in skin gamma delta T cell function contribute to delayed wound repair in rapamycin-treated mice. *J Immunol* 181: 3974-3983.

89. Akhavani MA, Sivakumar B, Palelog EM, Kang N (2008). Angiogenesis and plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 61: 1425-1437.
90. Luo JD, Chen AF (2005). Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin* 26: 259-264.
91. Browder W, Williams D, Lucore P (1998). Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery* 104: 224-229.
92. Clark RAF (1993). Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin* 11: 647-666.
93. Mauch C, Krieg T, Bauer EA (1994). Role of the extracellular matrix in the degradation of connective tissue. *Arch Dermatol Res* 287: 107-114.
94. Harding KG, Morris HL, Patel GK (2002). Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. *BMJ* 324: 160-163.
95. Shetty V, Bertolami CN (2004). Wound healing: Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery. 2nd ed. Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite PD: BC Decker Inc, 3-15.
96. Monaco JL, Lawrence WT (2003). Acute wound healing. *Clin Plastic Surgery* 30: 1-12.
97. Schultz GS, Mast BA (1999). Molecular analysis of the environments of healing and chronic wounds: Cytokines, proteases and growth factors. *Primary Intention* 7: 7-15.
98. Öztürk ÖG (2013). Matriks metalloproteinaz enzim ailesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 22(2): 209-218.
99. Graham MF, Blomquist P, Zederfeldt B (1992). The alimentary canal: wound healing: biochemical and clinical aspects. Ed. Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ: WB Saunders Company, 433-449.
100. Champe PC (1997). Biochemistry Lippicott's illustrated Reviews. Çeviren: Tokullugil A, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 25-38.
101. Leong M, Phillips LG (2004). Wound Healing: Sabiston Textbook of Surgery. 17th Edition. Elsevier, USA; 183-208.

102. Caroch M, Ferreira IC (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 51: 15-25.
103. Lü J, Lin PH, Yao Q, Chen C (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mod Med* 14: 840-860.
104. Rahman K (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin Interv Aging* 2: 219-236.
105. Lobo V, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4: 118-126.
106. Singh PP, Chandra A, Mahdi F, Ray A, Sharma P (2010). Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in Human health and disease. *Ind J Clin Biochem* 25: 225-243.
107. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N (2013). Potential applications of antioxidants—A review. *J Pharm Pharm Sci* 7(9): 828-835.
108. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Antioksidanlar. *Vet Fak Derg* 1: 65-76.
109. Kasnak C, Palamutoğlu R (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *TURJAF* 3(5): 226-234.
110. Ahmed AU (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Front Biol* 6(4): 274.
111. Medzhitov R (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203): 428-435.
112. Bienvenu J (1995). Exploration of cytokines in biological fluids. *CR Seances Soc Biol Fil* 189: 545-555.
113. Takabayashi T, Vannier E, Clark BD (1996). A new biologic role for C 3a and C3a des Arg: Regulation of TNF- α and IL-1 β synthesis. *J Immunol* 156: 570-583.
114. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bulletin* 49: 481-493.

115. Deniz G, Saygı Ş (2000). The clinical importance of selective inhibitors of COX-2 and new antiinflammatory agents without gastrointestinal toxicity. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 20(2): 102-112.
116. Haeggstrom JZ, Kull F, Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM (2002). Leukotriene A4 hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68: 495-510.
117. Aghabeigi B (1992). The pathophysiology of the pain. *Br Dent J* 173: 91-97.
118. Onat T, Emerk K, Sözmen E (2002). İnsan Biyokimyası. Birinci baskı. Palme Yayıncılık, Ankara; 557-569.
119. Kılıçturgay K (2003). Sitokinler. *İmmünoloji* 10: 113-145.
120. Aydınтуğ O (1997). Sitokinler: Klinik İmmünoloji. Ed: G. Tokgöz: Antıp Yayınları, Ankara; 85-100.
121. Kohno K, Kurimoto M (1998). IL-18, a cytokine resembles IL-1 structurally and IL-12 functionally but exerts its effect indepently of both. *Clin Immunol Immunopathol* 86: 11-15.
122. Dinarello CA (1996). Biologic basis for IL-1 in disease. *Blood* 87: 2095-2147.
123. Pantoni L, Sarti C, Inzitari D (1998). Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arteriseler Thromb Vasc Biol* 18: 503-513.
124. Touzani O, Boutin H, Chuget J, Rothwell N (1999). Potential mechanisms of IL-1 involvement in cerebral ischemia. *J Neuroimmunol* 100: 203-215.
125. Rizk M, Witte M, Barbul A (2004). Nitric oxide and wound healing. *World J Surg* 28: 301-306.
126. Witte MB, Barbul A (2002). Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg* 183: 406-412.
127. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR (2002). Nitric oxide and wound repair: role of cytokines. *Nitric Oxide* 7: 1-10.
128. Wang X, Zalcenstein A, Oren M (2003). Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ* 10: 468-476.

129. Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F (2004). The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 201: 167-180.
130. Baud L, Fouqueray B, Bellocq A, Peltier J (2003). Calpains participate in inflammatory reaction development. *D Med Sci* 9: 71-76.
131. Alcaraz MJ, Fernandez P, Guillen MI (2003). Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *D Curr Pharm Des* 9: 2541-2551.
132. Zhuang H, Littleton-Kearney MT, Dore S (2005). Characterization of heme oxygenase in adult rodent platelets. *Curr Neurovasc Res* 2: 163-168.
133. Tsui TY, Siu YT, Schlitt H J, Fan ST (2005). Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide stimulates adenosine triphosphate generation in human hepatocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 28: 898-902.
134. Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ (2002). HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol* 72: 1084-1091.
135. Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger AC, Palmblad K, Yang H, Tracey KC, Andersson U, Erlandsson Harris H (2003). Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum* 48: 2052-2058.
136. Wang H, Yang H, Tracey KJ (2004). Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 255: 320-331.
137. Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6(10): 995-1001.
138. Okutucu B, Pehlivan S (2003). Reverz-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve uygulama alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 12(2): 138-148.
139. Wright J (2000). *Color Atlas of Genetics*. Nobel Tıp Kitapevi, Türkiye; 38.
140. Süpüren G, Ahmet Çay Y, Kanat ZE, Tarakçıoğlu I (2006). Antimikrobiyal lifler. *Tekstil ve Konfeksiyon* 16(2): 80-89.

141. Ayan Ö (2015). Kastamonu Yöresinde Etnobotanik Açısından Yenilebilen Bazı Bitki Taksonlarının Gıda Patojeni Olan Mikroorganizmalar Üzerine Antimikrobiyal Etkileri. Yüksek lisans tezi, Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, Kastamonu.
142. Toroğlu S, Çenet M (2006). Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 9(2): 12-19.
143. Alahmer N (2017). Verbascum cinsine ait bazı türlerin antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kastamonu.
144. Courvalin P, Leclercq R, Bingen E (2006). AntibioGramme. Edition ESKA, Paris.
145. Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J (1985). L'AntibioGramme. Edition MPC, Brüksel.
146. Courvalin P, Drugeon H, Flandrois JP, Goldstein F (1990). Bactericidie: Aspects Theorique et Therapeutiques. Edisyon Maloine, Paris.
147. Tsugo K, Nakamura SI, Yamanaka H, Une Y (2017). A study on the efficacy of the recombinant *Yersinia adhesin A* vaccine against yersiniosis in the early phase. J Vet Med Sci 79(5): 855-863.
148. Şen A, Halkman AK (2006). Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 4(2): 2-13.
149. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006). Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 32(2): 93-98.
150. Xuedong Z, Yuqing L (2015). Subgingival microbes. Atlas of Oral Microbiology 4: 67-93.
151. İncili G, Dikici A, Çalıcıoğlu M (2015). Bacillus cereus. Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics 1(3): 87-91.
152. Evirgen Ö (2005). Listeria monocytogenes enfeksiyonu; kliniği, tanı ve tedavi özellikleri. Van Tıp Dergisi 12(1): 32-35.

153. Best CA, Best TJ (2009). *Mycobacterium smegmatis* infection of the hand. *Hand* 4(2): 165-166.
154. Munoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Perez MJ, Sanchez-Somolinos M, Pelaez T (2005). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis* 40(11): 1625-1634.
155. Elçin G, Karadağ AS, Yılmaz E (2015). *Fotodermatoloji*. Galenos Yayınevi, İstanbul.
156. Chang TS (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10(6): 2440-2475.
157. Halaban R, Patton RS, Cheng E, Svedine S, Trombetta ES, Wahl ML, Ariyan S, Hebert DN (2002). Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 277: 14821-14828.
158. Artes F, Castaner M, Gil MI (1998). Review: enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *J Agric Food Chem* 4: 377-389.
159. Algın Yapar E (2017). Cilt beyazlatıcılara genel bakış. *Marmara Pharm J* 21: 48-53.
160. Matsuura R, Ukeda H, Sawamura M (2006). Tyrosinase inhibitory activity of Citrus essential oils. *J Agric Food Chem* 54: 2309-2313.
161. Chan EWC, Lim YY, Wong LF, Lianto FS, Wong SK, Lim KK, Joe CE, Lim TY (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem* 109: 477-483.
162. Halder RM, Taliaferro SJ (2008). Vitiligo. In: Wolf K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ (eds). *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*, 7th ed. New York: Mc Graw- Hill Book Company, 616-622.
163. Denli Y, Acar MA, Sönmezoğlu Maraklı S, Yücel A (2008). Vitiligo. Tüzün Y, Gürer MA, Serdaroğlu S, Oğuz O, Aksungur VL (ed.ler). *Dermatoloji*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1465-1490.
164. Braun-Falco O, Plewing G, Wolff HH, Burgdorf WHC (2000). *Dermatology*. 2nd ed. Berlin: Springer Verlag, 1033-1042.

165. Spielvogel RL, Kantor GR (1997). Pigmentary Disorders of the Skin. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnsons B (eds). *Lever's Histopathology of the Skin*, 8th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 617-623.
166. Karıncaoğlu Y, Doğan G (2001). Vitiligo: Etiyopatogenez, klinik ve tedavi. *T Klin Tıp Bilimleri* 21: 200-209.
167. Gawkrödger DJ, Ormerod AD, Shaw L, Mauri-Sole I, Whitton ME, Watts MJ, Anstey AV, Ingham J, Young K (2008). Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. *Br J Dermatol* 159(5): 1051-1076.
168. Sehgal VN, Srivastava G (2006). Vitiligo treatment options: an evolving scenario. *J Dermatolog Treat* 17(5): 262-275.
169. Antoniou C, Katsambas A (1992). Guidelines for the treatment of vitiligo. *Drugs* 43: 490-498.
170. Martin M, Guiochon G (2005). Effects of high pressures in liquid chromatography. *J Chromatogr* 7(1-2): 16-38.
171. Bansal V (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *JGPT* 2(5): 22-26.
172. Liu Y, Lee ML (2006). Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *J Chromatogr* 1104(1-2): 198–202.
173. Abidi SL (1991). High-performance liquid chromatography of phosphatidic acids and related polar lipids. *J Chromatogr* 587: 193-203.
174. Hearn MTW (1980). Ion-pair chromatography on normal and reversed-phase systems. *Adv Chromatogr* 18: 59-100.
175. 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. *J Ethnopharmacol* 107: 161-163.
176. Tosun A, Süntar İ, Keleş H, Kiremit H, Asakawa Y, Akkol E (2016). Wound healing potential of selected Liverworts growing in Turkey. *Turk J Pharm Sci* 13(3): 285-291.

177. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
178. Pekyardımcı Ş (2009). Protein saflaştırma yöntemleri: Protein analitiği. Ed. Telefoncu A: Ege Üniversitesi Yayınları, 65-85.
179. Günel T (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 27(5): 763-767.
180. Iwasa K, Hayashi S, Fujishiro T, Kanzaki N, Hashimoto S, Sakata S, Chinzei N, Nishiyama T, Kuroda R, Kurosaka M (2014). PTEN regulates matrix synthesis in adult human chondrocytes under oxidative stress. *J Orthop Res* 32(2): 231-237.
181. Mai N, Cuc N, Anh H, Nhiem N, Tai B, Yen P, Quang T, Minh C, Kim K (2017). Two new guaiane sesquiterpenes from *Datura metel* L. with anti-inflammatory activity. *Phytochem Lett* 19: 231-236.
182. Cheng J, Yi X, Wang Y, Huang X, He X (2017). Phenolics from the roots of hairy fig (*Ficus hirta* Vahl.) exert prominent anti-inflammatory activity. *J Funct Foods* 31: 79-88.
183. 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 *Garcinia elliptica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 197-201.
184. Perez C, Pauli M, Bazerque P (1990). An antibiotic assay by the well agar method. *Acta Biologia et Medicine Experimentalis* 15: 113-115.
185. 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.
186. Cuendet M, Hostettman K, Potterat O, Dyatmiko W (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* 80: 1144-1152.
187. Korkmaz N, Şener SÖ, Kanbolat Ş, Badem M, Aliyazicioğlu R, Abudayyak M, et al. (2019). Investigation of antioxidant, cytotoxic, tyrosinase inhibitory activities, and phenolic profiles of green, white, and black teas. *Turk J Biochem* 44: 50-50.

188. Kant V, Jangir BL, Nigam A, Kumar V, Sharma S (2017). Dose regulated cutaneous wound healing potential of quercetin in male rats. *Wound Medicine* 19: 82-87.
189. Taskan MM, Yuce HB, Karatas O, Gevrek F (2019). Topical quercetin gel application improved wound healing in wistar rats. *Ann Med Res* 26(10): 2397-2404.
190. Moghadam SE, Ebrahimi SN, Salehi P, Moridi Farimani M, Hamburger M, Jabbarzadeh E (2017). Wound healing potential of chlorogenic acid and myricetin-3-*O*- β -rhamnoside isolated from *Parrotia persica*. *Molecules* 22(9): 1501-1516.
191. Lodhi S, Singhai AK (2013). Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med* 6(4): 253-259.
192. Bayrami Z, Khalighi-Sigaroodi F, Rahimi R, Farzaei MH, Hodjat M, Baeeri M, Abdollahi M (2017). *In vitro* wound healing activity of luteolin. *RJP* 4: 7-7.
193. Stanojevic L, Stankovic M, Nikolic V, Nikolic L, Ristic D, Canadanovic J, Tumbas V (2009). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. *Sensors* 9: 5702-5714.
194. Stanojevic L, Stankovic M, Nikolic V (2008). Anti-oksидative and antimicrobial activities of *Hieracium pilosella* L. extracts. *J Serb Chem Soc* 73(5): 531-540.
195. Aksoy H, Bingöl Özakpınar Ö (2014). Yara iyileşmesi ve oksidatif stres. *Marmara Pharm* 18: 153-158.
196. Romanova D, Vachalkova A, Cipak L, Ovesna Z, Rauko P (2001). Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma* 48(2): 104-107.
197. Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, Hyun YJ, Park JE, Shilnikova K, Hyun JW (2017). Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 51(4): 1169-1178.
198. 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. *J Agric Food Chem* 56(21): 10265-10272.

199. Cho YJ, Kim SJ (2013). Effect of quercetin on the production of nitric oxide in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*. J Periodontal Implant Sci 43(4): 191-197.
200. Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. Curr Cancer Drug Targets 8(7): 634-646.
201. 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. Int J Nutr 136(6): 1517-1521.
202. Sadh PK, Chawla P, Duhan JS (2018). Fermentation approach on phenolic, antioxidants and functional properties of peanut press cake. Food Biosci 22: 113-120.
203. 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. Toxicol Appl Pharmacol 265(2): 229-240.
204. Lin HC, Cheng TH, Chen YC, Juan SH (2004). Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by quercetin in rat aortic smooth muscle cells. Pharmacology 71(2): 107-112.
205. 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. Toxicol in Vitro 26(1): 74-80.
206. Gutierrez-Venegas G, Torras-Ceballos A, Gomez-Mora JA, Fernandez-Rojas B (2017). Luteolin, quercetin, genistein and quercetagenin inhibit the effects of lipopolysaccharide obtained from *Porphyromonas gingivalis* in H9c2 cardiomyoblasts. Cell Mol Biol Lett 22(1): 19.



EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Sayı : 53488718 - 273
Konu: Onay Belgesi

03/05/2017

Sayın, Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU
Temel Eczacılık Bölümü Biyokimya ABD. Öğretim Üyesi,

"Sıçanlarda Oluşturulan Yara Modelinde *Pilosella hoppeana* subsp. *Testimonialis* Bitki Ekstresinin Biyolojik Aktivitesi" başlık ve 2017/10 protokol numaralı çalışma önerisi Kurulumuzca incelenmiş olup; yürürlükteki etik ilke ve kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Ahmet AYAR
Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

61080 - Trabzon / TÜRKİYE

Tel: +90 (462) 377 5403

Faks: +90 (462) 325 2270

Elektronik Ağ: www.ktu.edu.tr

Aynı adı Bilgi İçin İletici
Serafetin YILMAZ
e posta:
serafetinyilmaz@ktu.edu.tr

Ek 1. (Devam)

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 61080 /Trabzon
	TELEFON	0462- 3775853—0462-3775403
	FAKS, E- posta	0462- 3252270 – etikhd@ktu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ETİK KURUL DOSYA NO:		2017 / 10
	ÇALIŞMANIN ADI		"Sıçanlarda Oluşturulan Yara Modelinde <i>Pilosella hoppeana</i> subsp. <i>Testimontalis</i> Bitki Ekstresinin Biyolojik Aktivitesi"
	SORUMLU ARAŞTIRMACI	ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU
		UZMANLIK ALANI	Eczacılık Fakültesi- Biyokimya
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, ÜNVANI/ADI/SOYADI		Arş.Gör.Nuriye KORKMAZ, Arş.Gör.Sıla Özlem ŞENER, Arş.Gör.Ebru Özdemir NATH, Prof.Dr.Engin YENİLMEZ, Arş.Gör.Dr.Tuğba ZENGİN, Prof.Dr.Ufuk ÖZGEN
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ		TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2	Tarih: 02/05/2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na incelenmiş; yapılan inceleme sonucunda araştırmanın KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Yönergesi'ne uygun bulunarak onaylanmasına ve araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.	
	ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYILARI	Sıçan -72 Adet
	BAŞLANGIÇ Tarihi ve ETİK KURUL İZİN SÜRESİ:	

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı Etik Kurul Üyeligi	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile ilişkisi (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ahmet AYAR Başkan	Fizyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Ahmet ALVER Başkan Yrd.	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Ali CANSU Üye	Pediyatri	KTÜ Tıp Fakültesi Pediyatri ABD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ Üye	Histoloji ve Embriyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	E	☒ E ☐ H	☐ E ☐ H	OYLAMAYA KATILMADI
Doç.Dr.Zerrin PULATHAN Üye	Kalp ve Damar Cerrahisi	KTÜ Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi ABD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Cenal ÇANDIRLI Üye	Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi	KTÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr.Rezzan ALİYAZICIOĞLU Üye	Temel Eczacılık Bilimleri Biyokimya	KTÜ Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri ABD.	K	☒ E ☐ H	☐ E ☐ H	OYLAMAYA KATILMADI
Doç.Dr.Nadir BAŞÇINAR Üye	Balıkçılık Teknolojisi	KTÜ Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Serdar TÜRKİYILMAZ Üye	Genel Cerrahi	KTÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Y.Doç.Dr.Emel ÇAKIR Üye	Tabii Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Sait AL Üye	Veteriner Hekim	KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Uzm.Dr.Nuran AYDIN Üye	Nöroloji	Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Bölümü	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI
Ecz.Nuran EYÜPOĞLU Üye	Eczacı		K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : KORKMAZ, Nuriye
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 10.03.1989 Konya
Telefon (İş) : 0506 869 01 35
E-Posta : nuriye.dertli@hotmail.com
Yazışma adresi (İş) : KTÜ Eczacılık Fakültesi Eczacılıkta Biyokimya
Anabilim Dalı Ortahisar/Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	KTÜ Eczacılık Fakültesi Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı	2015-
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı Fitoterapi	2012-2015
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2007-2012
Lise	Konya Atatürk Anadolu Öğretmen Lisesi	2007

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Eczacı	Ankara Başkent Hastanesi	2013-2013
Eczacı	Bülent Ecevit Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2013-2015
Araştırma Görevlisi	KTÜ Eczacılık Fakültesi Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı	2015-

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Biyokimya, Fitoterapi

YAYINLAR

1. Korkmaz N, Şener SO, Kanbolat Ş, Badem M, Aliyazicioğlu R, Abudayyak M, Ozgen U (2019). Investigation of antioxidant, cytotoxic, tyrosinase inhibitory activities, and phenolic profiles of green, white, and black teas. *Turk J Biochem* 44(3): 278-288.
2. Aliyazicioğlu R, Demir S, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N, Ayazoglu Demir E (2017). Antioxidant, antigenotoxic, antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Dianthus carmelitarum*. *Rec Nat Prod* 11: 270-284.
3. Korkmaz N, Sener SO, Balturk N, Kanbolat S, Badem M, Aliyazicioglu R, Ozgen U, Kandemir A, Karaoglu SA (2019). Determination of phenolic contents by HPLC, and antioxidant, antimicrobial, antityrosinase, and anticholinesterase activities of *Psephellus huber-morathii*. *J Pharm Res Int* 26: 1-10.
4. Kanbolat S, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Ulaş Çolak N, Abudayyak M, Aliyazicioglu R, Ozgen U, Kandemir A, Karaoglu SA (2018). Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, anticholinesterase, antityrosinase activities and characterisation of volatile compounds of *Verbascum oocarpum* by SPME and GC-FID/MS. *J Pharm Res Int* 24: 1-12.
5. Badem M, Korkmaz N, Sener SO, Kanbolat S, Ozgen U, Sevgi S, Aliyazicioğlu R, Coskun M (2018). Biological screening of traditional medicinal plants from villages of Akkuş (Ordu) in Turkey on the effects of tyrosinase. *J Pharm Res Int* 25: 1-10.
6. Şener SÖ, Korkmaz N, Kanbolat Ş, Badem M, Aliyazicioğlu R, Özgen U, Alpay Karaoğlu Ş (2018). *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* ekstresinin antioksidan, antimikrobial, tirozinaz inhibitor aktiviteleri ve RP-HPLC ile fenolik bileşiklerinin araştırılması. *GUFBED* 8: 230-238.
7. Aliyazicioğlu R, Akkaya S, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Özgen U, Alpay Karaoğlu Ş (2017). *Onobrychis oxyodonta*'nın topraküstü kısmında antioksidan, antimikrobiyal ve tirozinaz inhibitör aktivitesi. *Fırat Tıp Dergisi* 31: 25-31.
8. Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Akkaya Ş, Şener SÖ, Badem M, Alpay Karaoğlu Ş, Eyüboğlu OE (2016). Phenolic components, antioxidant and antimicrobial activities of *Centranthus longiflorus* L. *IJARBS* 3: 80-87.

9. Akkaya S, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N, Aliyazicioğlu R (2016). Antioxidant activity and phenolic profiles with HPLC of *Consolida orientalis*. IJCR 8: 43735-43738.

KİTAP BÖLÜMÜ

1. Badem M, Şener SÖ, Kanbolat Ş, Korkmaz N, Ulaş Çolak N, Özgen U, et al (2018). Examination of *Echium plantagineum* of essential oil content and antimicrobial properties. In: Duran N (Eds.) Current Academic Studies in Pharmacy Sciences. IVPE, Cetinje, Pages: 9-14.
2. Korkmaz N, Kanbolat Ş, Şener SÖ, Badem M, Aliyazicioğlu R, Özgen U (2018). Evaluation of tyrosinase and cholinesterase inhibitor activities of *Lallemantia canescens* growing in Erzincan. In: Duran N (Eds.) Current Academic Studies in Pharmacy Sciences. IVPE, Cetinje, Pages: 15-20.

BİLDİRİLER

1. Aliyazicioğlu R, Özgen U, Korkmaz N, Kanbolat Ş, Şener SÖ, Badem M, Ulaş Colak N, Alpay Karaoglu Ş (2018). A study on volatiles, *in vitro* anticholinesterase inhibitor and antimicrobial activity of endemic *Allium tuncelianum*. International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, İzmir, 3-4 Ekim 2018, 214-218.
2. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Badem M, Korkmaz N, Kanbolat Ş, Emiroglu Ş (2018). Phytochemical studies of *Cirsium trachylepis* and antioxidant and cytotoxic activity of isolated compounds. International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, İzmir, 3-4 Ekim 2018, 106-106.
3. Şener SÖ, Özgen U, Saltan HG, Korkmaz N, Kanbolat Ş, Badem M, Dirmenci T, Arabacı T, Aliyazicioğlu R (2018). Antiobesity activity of some *Cirsium* species. 15th Annual European Pharma Congress, Frankfurt, 7-9 Mayıs 2018, 55-55.
4. Korkmaz N, Şener SÖ, Kanbolat Ş, Badem M, Aliyazicioğlu R, Özdemir Nath E, Özgen U, Zengin T, Yenilmez E, Alpay Karaoglu Ş (2018). The wound healing activity of *Pilosella hoppeana* subsp. *testimonialis* in rat. 15th Annual European Pharma Congress, Frankfurt, 7-9 Mayıs 2018, 54-54.

5. Badem M, Özgen U, Şener SÖ, Korkmaz N, Sevgi S, Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Coşkun M (2017). Ethnobotanical and ethnomedicinal studies on the villages of Akkuş District (Ordu, Turkey). 3rd International Conference on Natural Products Utilization, Bansko, 18-21 Ekim 2017, 100-100.
6. Kaynar K, Aliyazıcıoğlu R, Yenilmez E, Korkmaz N, Keskin O, Akkaya S, Sener SO, Ozgen U, Can G, Al S. (2019). *Hypericum perforatum*: A friend or a foe for amikacin induced nephropathy. 56th ERA-EDTA Congress, Budapest, Hungary.
7. Aliyazicioğlu R, Kanbolat Ş, Özgen U, Şener SÖ, Badem M, Korkmaz N, Alpay Karaoglu Ş (2018). Cholinesterase inhibition and antimicrobial activity of *Hesperis matronalis* subsp. *matronalis*. International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, İzmir, 3-4 Ekim 2018, 353-353.
8. Kanbolat S, Şener SÖ, Badem M, Ulaş Çolak N, Korkmaz N, Özgen U, Aliyazicioğlu R, Alpay Karaoglu Ş, Yaşar A (2018). Investigation of tyrosinase inhibitory activity, antimicrobial capacity and volatile compounds of *Origanum vulgare*. International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, İzmir, 3-4 Ekim 2018, 358-358.
9. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Badem M, Korkmaz N, Kanbolat S, Şener SÖ, Alpay Karaoglu Ş (2018). Investigation of cholinesterase inhibition and antimicrobial activity of *Vicia cracca* subsp. *cracca*. International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, İzmir, 3-4 Ekim 2018, 357-357.
10. Badem M, Korkmaz N, Ulaş Çolak N, Kanbolat Ş, Şener SÖ, Aliyazicioğlu R, Özgen U, Alpay Karaoglu Ş (2018). Investigation of acetylcholinesterase inhibitor activity, antimicrobial capacity and volatile compounds of *Alcea calvertii*. International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, İzmir, 3-4 Ekim 2018, 356-35.
11. Kanbolat Ş, Badem M, Korkmaz N, Şener SÖ, Ulaş Çolak N, Özgen U, Aliyazicioğlu R, Yaşar A (2018). Evaluation of anticholinesterase inhibitory activity and volatile compound of *Jurinea brevicaulis*. International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, İzmir, 3-4 Ekim 2018, 355-355.
12. Ulaş Çolak N, Korkmaz N, Kanbolat Ş, Şener SÖ, Badem M, Aliyazicioğlu R, Özgen U, Alpay Karaoglu Ş, Yaşar A (2018). Determination of antimicrobial, antityrosinase activities, and volatile compounds of *Hypericum scabrum*. International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, İzmir, 3-4 Ekim 2018, 354-354.

13. Şener SÖ, Badem M, Korkmaz N, Kanbolat Ş, Aliyazicioğlu R, Özgen U (2018). A novel high performance liquid chromatography method to obtain the fingerprint chromatogram of *Pilosella hoppeana*. International Congress on Applied Biological Science, Eskişehir, 3-5 Mayıs 2018, 50-50.
14. Korkmaz N, Kanbolat Ş, Şener SÖ, Badem M, Ulaş Çolak N, Aliyazicioğlu R, Özgen U, Nath Özdemir E, Yaşar A (2018). Determination of tyrosinase inhibitory activity and volatile compounds of *Pilosella hoppeana*. 7th International Congress on Molecular Biology and Biotechnology, Konya, 25-27 Nisan 2018, 214-214.
15. Korkmaz N, Akkaya Ş, Şener SÖ, Badem M, Aliyazicioğlu R, Özgen U (2017). Investigation of antioxidant activity and tyrosinase, cholinesterase inhibition of *Capparis ovata*. 28. Ulusal Biyokimya Kongresi International Biochemistry Congress-2017 /28 th National Biochemistry Congress, Erzurum, 19-23 Eylül 2017, 320-320.
16. Aliyazicioğlu R, Özgen U, Akkaya Ş, Şener SÖ, Korkmaz N, Badem M (2017). Examination of antioxidant and tyrosinase inhibitor activities of *Euphorbia rigida*. İVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 26-29 Nisan 2017, 468-468.
17. Aliyazicioğlu R, Özgen U, Şener SÖ, Korkmaz N, Akkaya Ş, Badem M, KAndemir A (2017). Antioxidant capacity of aerial parts of *Isatis cappadocica*. İVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 29 Nisan 2017, 475-475.
18. Şener SÖ, Akkaya Ş, Korkmaz N, Özgen U, Aliyazicioğlu R, Badem M (2017). Investigation of antioxidant and tyrosinase inhibitor activities of *Scutellaria orientalis*. İVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 29 Nisan 2017, 486-486.
19. Korkmaz N, Şener SÖ, Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Özgen U, Badem M (2017). Evaluation of the antioxidant activity of *Primula vulgaris* water extract on the kidney of methotrexate-induced testicular damaged in rats. İVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 29 Nisan 2017, 478-478.

20. Badem M, Korkmaz N, Şener SÖ, Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Özgen U, Kandemir A (2017). Antioxidant activity studies of aerial parts of three *Barbarea* species. İVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 29 Nisan 2017, 479-479.
21. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Akkaya Ş, Şener SÖ, Korkmaz N, Badem M (2017). Determination of antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of the aerial part of *Myosotis alpestris*. İVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 29 Nisan 2017, 485-485.
22. Akkaya Ş, Şener SÖ, Korkmaz N, Özgen U, Aliyazicioğlu R, Badem M (2017). The antioxidant effects of *Primula vulgaris* L. on the liver of methotrexate-induced testicular damaged in rats. İVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 29 Nisan 2017, 481-481.
23. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Akkaya Ş, Şener SÖ, Badem M (2017). Evaluation of antioxidant and tyrosinase inhibitor activity of *Chamaecytisus hirsutus*. İVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 29 Nisan 2017, 483-483.
24. Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N, Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Özgen U (2017). Investigation of cholinesterase enzyme inhibition activity of 3 *Barbarea* species. 3rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development - DRD 2017, Erzurum, 5-7 Ekim 2017, 85-85.
25. Şener SÖ, Badem M, Akkaya Ş, Korkmaz N, Özgen U, Aliyazicioğlu R (2017). Examination of inhibition of anticholinesterase enzyme of *Calystagia* growing in two different regions. 3rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development - DRD 2017, Erzurum, 5-7 Ekim 2017, 138-138.
26. Şener SÖ, Özgen U, Badem M, Korkmaz N, Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R (2017). Antidiabetic and antioxidant effect of the aerial parts of *Lysimachia verticillaris* and its isolated phenolic compounds in streptozotocin-induced diabetic rats. 3rd International Conference on Natural Products Utilization, Bansko, 18-21 Ekim 2017, 306-306.

27. Özgen U, Emiroğlu Ş, Korkmaz N, Akkaya Ş, Şener SÖ, Badem M (2017). Phytochemical studies on the aerial parts of *Cirsium dirmilense*. 3rd International Conference on Natural Products Utilization, Bansko, 18-21 Ekim 2017, 275-275.
28. Badem M, Akkaya Ş, Korkmaz N, Şener SÖ, Özgen U, Aliyazicioğlu R, Kandemir A (2017). Tyrosinase inhibitor activity of aerial parts of *Psephellus hubar-morathii*. Uluslararası Tıbbi, Aromatik ve Boya Bitkileri Sempozyumu, Malatya, 5-7 Ekim 2017, 562-562.
29. Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Özgen U, Kandemir A (2017). The effect of tyrosinase inhibitor of aerial parts of *Verbascum oocarpum*. Uluslararası Tıbbi, Aromatik ve Boya Bitkileri Sempozyumu, Malatya, 5-7 Ekim 2017, 273-273.
30. Şener SÖ, Badem M, Akkaya Ş, Korkmaz N, Özgen U, Aliyazicioğlu R, Kandemir A (2017). Antioxidant activity of aerial parts of *Verbascum oocarpum*. Uluslararası Tıbbi, Aromatik ve Boya Bitkileri Sempozyumu, Malatya, 5-7 Ekim 2017, 499-499.
31. Akkaya Ş, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Aliyazicioğlu R, Özgen U, Kandemir A (2017). The assessment in terms of antioxidant capacity of *Psephellus hubar-morathii*, Uluslararası Tıbbi, Aromatik ve Boya Bitkileri Sempozyumu, Malatya, 5-7 Ekim 2017, 248-248.
32. Aliyazicioğlu R, Lermi M, Abudayyak M, Şener SÖ, Korkmaz N, Akkaya Ş, Kandemir A (2017). Evulation the cytotoxicity of aerial parts of *Isatis cappadocica* subsp. *alyssifolia*. Uluslararası Tıbbi, Aromatik ve Boya Bitkileri Sempozyumu, Malatya, 5-7 Ekim 2017, 499-499.
33. Akkaya Ş, Korkmaz N, Badem M, Şener SÖ, Özgen U, Aliyazicioğlu R (2017). Akkuş'da yetişen Polygonaceae familyasına ait 3 türün tirozinaz enzimine etkisinin incelenmesi. 28. Ulusal Biyokimya Kongresi International Biochemistry Congress – 2017 /28th National Biochemistry Congress, Erzurum, 19-23 Eylül 2017, 321-321.
34. Aliyazicioğlu R, Özgen U, Akkaya Ş, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N (2017). The effects on tyrosinase enzyme of three Rosaceae species growing in Akkuş (Ordu). 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), Ankara, 11-13 Ekim 2017, 344-344.

35. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Akkaya Ş (2017). The effects on tyrosinase enzyme of three Asteraceae species growing in Akkuş (Ordu). 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), Ankara, 11-13 Ekim 2017, 343-343.
36. Badem M, Aliyazicioğlu R, Akkaya Ş, Korkmaz N, Şener SÖ, Özgen U (2016). HPLC profiles of phenolic compounds, and antioxidant activity on the aerial parts of *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica*. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, Makedonya 311-311.
37. Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Akkaya Ş, Badem M, Şener SÖ, Özgen U (2016). Biological activity of the aerial parts of *Euphorbia seguieriana*. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 291-291.
38. Korkmaz N, Aliyazicioğlu R, Akkaya Ş, Badem M, Şener SÖ, Özgen U (2016). Antioxidant and tyrosinase inhibitor activities of *Melilotus officinalis*. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 308-308.
39. Badem M, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Akkaya Ş, Korkmaz N, Özgen U (2016). Antioxidant activities of the aerial parts and roots of *Cirsium trachylepis*. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 309-309.
40. Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Özgen U (2016). Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of green coffee. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 314-314.
41. Şener SÖ, Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Akkaya Ş, Badem M, Özgen U (2016). The effects of tyrosinase activation of aerial parts of *Calystegia silvatica*. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 316-316.

42. Şener SÖ, Aliyazicioğlu R, Badem M, Akkaya Ş, Korkmaz N, Özgen U (2016). HPLC profiles of phenolic compounds, volatile compounds by GC-MS, antioxidant activity studies on the aerial parts of *Centhranthus longgiflorus* subsp *longiflorus*. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 15-315.
43. Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Badem M, Şener SÖ, Alpay Karaoglu Ş (2016). Phenolic compounds of *Ornithogalum pyrenaicum* together with microbial and antioxidant studies. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 314-314.
44. Akkaya Ş, Aliyazicioğlu R, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N, Özgen U (2016). Antioxidant and tyrosinase inhibitor activities of the aerial parts of *Salvia verticillata*. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 313-313.
45. Şener SÖ, Aliyazicioğlu R, Akkaya Ş, Korkmaz N, Badem M (2016). Biological and chromatographic studies on *Hypericum perforatum* L. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 317-317.
46. Korkmaz N, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Badem M, Akkaya Ş, Özgen U (2016). Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of Turkish coffee. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 307-307.
47. Korkmaz N, Aliyazicioğlu R, Badem M, Şener SÖ, Akkaya Ş (2016). Phenolic composition and antioxidant activity of black tea. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 306-306.
48. Aliyazicioğlu R, Akkaya Ş, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M (2016). HPLC profiles and antioxidant activity of white tea. 2th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Skopje, 26-30 Ekim 2016, 292-292.

49. Aliyazicioğlu R, Korkmaz N, Badem M, Şener SÖ, Akkaya Ş, Özgen U (2016). The assessment of *Centaurea carduiiformis* in terms of phenolic compounds and antioxidant capacity. 4th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, İstanbul, 13-15 Ekim 2016, 231-231.
50. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Badem M, Şener SÖ, Akkaya Ş, Korkmaz N (2016). Antimicrobial and tyrosinase inhibitor activity of *Consolida orientalis* (Gay) Schrod. 4th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, İstanbul, 13-15 Ekim 2016, 254-254.
51. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Badem M, Korkmaz N, Akkaya Ş (2016). Antioxidant activity of aerial parts of *Parantucellia latifolia*. 4th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, İstanbul, 13-15 Ekim 2016, 255-255.
52. Emiroğlu Ş, Geniş H, Özgen U, Şener SÖ, Korkmaz N, Badem M (2016). *Cirsium dirmilense* üzerinde fitokimyasal çalışmalar ve tirozinaz inhibitör aktivite çalışmaları. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon, 31 Ağustos-5 Eylül 2016, 236-236.
53. Şener SÖ, Badem M, Korkmaz N, Özgen U, Dirmenci T (2016). Bazi endemik *Cirsium* türlerinin tirozinaz enzimi üzerine etkileri. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon, 31 Ağustos-5 Eylül 2016, 238-238.
54. Seçkin G, Babadağ D, Özgen U, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N (2016). *Cirsium aytatchii* üzerinde fitokimyasal çalışmalar ve tirozinaz enzimine etkileri. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon, 31 Ağustos-5 Eylül 2016, 237-237.
55. Abanoz ME, Tuğcu Ö, Özgen U, Korkmaz N, Badem M, Şener SÖ (2016). *Cirsium polunii* üzerinde fitokimyasal çalışmalar ve tirozinaz enzimine etkileri. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon, 31 Ağustos-5 Eylül 2016, 235-235.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. TÜBİTAK BİDEB Bursu

HOBİLER

Doğa Gezileri, Halk Oyunları, Müzik, Tiyatro