



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NERABAND (*SCORZONERA VERATRIFOLIA*) BİTKİSİNİN  
ANTIOKSİDAN VE YARA İYİLEŞTİRİCİ ÖZELLİKLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

MERT GEÇİM  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİMDALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ayfer Beceren

2018-İSTANBUL



## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  
Anabilim Dalı : Farmasotik Toksikoloji Anabilim Dalı  
Tez Sahibi : Mert Geçim  
Tez Başlığı : Neraband (*Scorzonera veratrifolia*) Bitkisinin Antioksidan ve Yara İyileştirici Özelliklerinin Araştırılması  
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Haydarpaşa Kampüsü  
Sınav Tarihi : 23/05/2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ayfer BECEREN

### Kurumu

Marmara Üniversitesi Eczacılık  
Fakültesi, Toksikoloji Anabilim  
Dalı

### İmza



### Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

İstinye Üniversitesi Eczacılık  
Fakültesi, Toksikoloji Anabilim  
Dalı



Prof. Dr. Levent KABASAKAL

Marmara Üniversitesi Eczacılık  
Fakültesi, Farmakoloji Anabilim  
Dalı



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 24/05/2018 tarih ve 32 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Göksel ŞENER  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



23.05.2018  
  
Mert GEÇİM

## I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, teorik ve pratik eğitimi dışında da her konuda desteğini gördüğüm, örnek aldığım ve bilim insanı adayları olarak beni yetiştiren çok değerli Danışman Hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayfer BECEREN'e;

Çalışmam esnasında ilgi, yardım ve desteklerini gördüğüm İstinye Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi çok değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ'a;

Tez sürecinde biyokimyasal analizlerde yardım ve desteğini esirgemeyen, çalışma hayatımda bana yol gösteren çok değerli bilim insanı Marmara Üniversitesi SHMYO Müdürü Sayın Doç. Dr. Meral Yüksel'e;

Tez sürecinde histolojik analizlerde yardım ve desteğini esirgemeyen ve her konuda yardımcı olan Marmara Üniversitesi SHMYO Müdür Sayın Yrd. Dr. Öğr. Üyesi Naziye Özkan'a;

Çalışmamda örneklerinde sitotoksik aktivitenin değerlendirilmesinde bana yardım ve desteğini esirgemeyen Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR'a;

Çalışma örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet DOĞAN'a;

Çalışmamda örneklerinde antioksidan aktivitenin değerlendirilmesinde bana yardım ve desteğini esirgemeyen Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Turgut TAŞKIN'a;

Tez sürecim boyunca her konuda benden yardımını esirgemeyen ve bilim insanı adayları olarak bu yolda bütün bilgilerini benimle paylaşan Marmara Üniversitesi SHMYO öğretim elemanı Sayın Arş. Gör. Dr. Sezgin AYDEMİR'e;

Daima yanımda olan ve beni her konuda destekleyen sevgili aileme,  
Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimle...

Mert GEÇİM

İstanbul-2018



Bu Yüksek Lisans Tezi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Başkanlığı (TÜBİTAK) tarafından "Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı" kapsamında 217S050 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## II. İÇİNDEKİLER

Sayfa No

I. TEŞEKKÜR	i
II. İÇİNDEKİLER	iii
III. KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	vii
IV. ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
V. RESİMLER LİSTESİ	xi
VI. TABLOLAR LİSTESİ	xiii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Deri	6
4.1.1. Epidermis	6
4.1.2. Dermis	7
4.1.3. Hipodermis	8
4.2. Yara	8
4.2.1. Yara çeşitleri	9
4.2.1.1. Akut yaralar	9
4.2.1.2. Kronik yaralar	10
4.2.2. Yara iyileşme fizyolojisi	10
4.2.2.1. Hemostaz	10
4.2.2.2. Enflamasyon-Epitelizasyon	11
4.2.2.3. Erken inflamatuvar aşaması	11
4.2.2.4. Geç inflamatuvar aşaması	12
4.2.2.5. Epitelizasyon	13
4.2.2.6. Proliferasyon	13
4.2.2.6.1. Fibroblast göçü	14
4.2.2.6.2. Kollajen sentezi	14
4.2.2.6.3. Anjiyogenez ve granülasyon dokusu	15
4.2.2.6.4. Yeniden modelleme	15
4.2. Yara ve Oksidatif Stres	16

4.3.1. Yara üzerinde ROS etkisi	18
<b>4.4. Antioksidan</b>	18
<b>4.5. Glutasyon</b>	20
<b>4.6. Malondialdehit</b>	21
<b>4.7. Myeloperoksidaz Aktivitesi</b>	21
<b>4.8. Kemilüminesans Yöntemle Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçülmesi</b>	22
<b>4.9. Sitokinler</b>	23
<b>4.10. Oksidatif DNA Hasarı ve Ölçüm Yöntemleri</b>	25
4.10.1. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) tekniği (Comet tekniği)	26
4.10.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin	27
<b>4.11. <i>Scorzonera veratrifolia</i> Bitkisi</b>	28
<b>5. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	31
<b>5.1. Kullanılan Kimyasallar</b>	31
<b>5.2. Kullanılan Cihazlar</b>	32
<b>5.3. Kullanılan Çözeltiler</b>	33
<b>5.4. Deneysel Çalışma</b>	38
5.4.1. Deney grupları	38
5.4.2. Kesi yarasının oluşturulması	39
5.4.3. Deneylerin sonlandırılması ve örneklerin toplanması	40
<b>5.5. <i>In Vivo</i> Yöntemler</b>	40
5.5.1. Kan örneklerinde DNA hasarının incelenmesi	40
5.5.1.1. Comet tekniği ile DNA hasarının incelenmesi	40
5.5.1.1.1. Mikroskopta değerlendirme	41
5.5.1.2. 8-OHdG düzeylerinin ölçümü	41
5.5.2. Dokularda biyokimyasal incelemeler	41
5.5.2.1. Malondialdehit ve glutasyon ölçümleri	41
5.5.2.2. Myeloperoksidaz aktivitesi tayini	42
5.5.2.3. Kemilüminesans ölçümleri	42
5.5.3. Antiinflamatuvar aktivite	43
5.5.3.1. TNF- $\alpha$ düzeyleri	43
5.5.3.2. IL1- $\beta$ düzeyleri	43
<b>5.6. <i>In Vitro</i> Yöntemler</b>	44



5.6.1. <i>In vitro</i> sitotoksik ve yara iyileştirici aktivitelerin tayini	44
5.6.1.1. Hücrelerin çözülmesi	44
5.6.1.2. Ekstrelerin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi	45
5.6.1.3. MTT yöntemi	45
5.6.1.4. <i>In vitro</i> yara iyileştirme aktivitesinin tayini	46
5.6.2. Antioksidan aktivite	47
5.6.2.1. DPPH radikali temizleme aktivitesi yöntemi	47
5.6.2.2. Folin-Ciocalteu yöntemi	48
5.6.2.3. Demir (III) indirgeme / FRAP yöntemi	48
5.6.3. Histolojik inceleme	48
5.6.3.1. Hematoksilen ve eozin boyaması	49
5.6.3.2. Gomori'nin tek aşamalı trikrom (GT) boyaması	49
5.6.4. İstatistiksel değerlendirme	50
<b>6. BULGULAR</b>	51
<b>6.1. DNA Üzerine Etkilerin İncelenmesi</b>	51
6.1.1. Alkali comet tekniği sonuçları	51
6.1.2. 8-OHdG düzeyleri	57
<b>6.2. Deri Dokusunda Biyokimyasal Bulgular</b>	58
6.2.1. Dokularda malodialdehit düzeyleri	58
6.2.2. Dokularda glutatyon düzeyleri	59
6.2.3. Dokularda miyeloperoksidaz aktivite sonuçları	60
6.2.4. Kemilüminesans ölçüm sonuçları	61
<b>6.3. Serum Örneklerinde Sitokin Düzeyleri</b>	63
6.3.1. İnterlökin 1 beta düzeyleri	63
6.3.2. Tümör nekroz faktör alfa düzeyleri	64
<b>6.4. <i>In Vitro</i> Sitotoksik Testler</b>	65
6.4.1. MTT yöntemi	65
6.4.2. <i>In vitro</i> hücre canlılığı testi	67
<b>6.5. Antioksidan Aktivite</b>	68
6.5.1. DPPH radikali temizleme aktivitesi yöntemi	68
6.5.2. Toplam fenolik madde tayini yöntemi (Folin-Ciocalteu yöntemi)	69
6.5.3. Demir (III) İndirgeme / FRAP Yöntemi	70

<b>6.6. Histolojik İnceleme</b>	71
<b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	79
<b>8. KAYNAKLAR</b>	89
<b>9. EKLER</b>	103
9.1. Etik kurul onayı	103
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>	104



### III. KISALTMALAR ve SİMGELER

CAT	Katalaz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GSH	Glutasyon
GT	Gomori'tek aşamalı trikrom boyası
H&E	Hematoksilen ve Eozin
HETAB	Hekzadesiltrimetilamonyum bromür
HE	Heptan Ekstre Grubu
HMA	High Melting Agarose (Yüksek kaynama noktalı agaroz)
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
K	Kontrol
KL	Kemilüminesans
LMA	Low Melting Agarose (Düşük kaynama noktalı agaroz)
ME	Metanollü Ekstre Grubu
MDA	Malondialdehit
MPO	Myeloperoksidaz
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NK	Negatif Kontrol
8-OHdG	8-hidroksideoksiguanozin

PBS Fosfat Tamponlu Saline

ROS Reaktif oksijen türleri

PK Pozitif Kontrol

*S. veratrifolia* *Scorzonera veratrifolia*

TBA Tiyobarbitürik asit

TCA Trikloro asetik asit



## IV. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Derinin yapısı

Şekil 2. Epidermisin yapısı

Şekil 3. Dermisin yapısı

Şekil 4. Yara iyileşme aşamaları

Şekil 5. Kalan hücre kalıntılarının fagositize edilmesi

Şekil 6. Lipid peroksidasyonu

Şekil 7. C vitamini yapısı

Şekil 8. E vitamini yapısı

Şekil 9. Glutatyon yapısı

Şekil 10. Luminol yapısı

Şekil 11. Comet görünümü

Şekil 12. *Compositae* (*Asteraceae*) ailesi

Şekil 13. Periferal kan lenfositlerinde %DNA<sub>T</sub> düzeyleri

Şekil 14. 8-OHdG düzeyleri

Şekil 15. MDA düzeyleri bulguları

Şekil 16. GSH düzeyleri bulguları

Şekil 17. MPO aktivitesi sonuçları

Şekil 18. Deri dokularında luminol düzeylerinin sonuçları

Şekil 19. Deri dokularında lusigenin düzeylerinin sonuçları

Şekil 20. Deri dokularında NO düzeylerinin sonuçları

Şekil 21. IL-1 $\beta$  düzeyleri

Şekil 22. TNF- $\alpha$  düzeyleri

Şekil 23. PC-3 hücrelerinde proliferasyon

Şekil 24. HeLa hücrelerinde proliferasyon

**Şekil 25.** HT-29 hücrelerinde proliferasyon

**Şekil 26.** A549 hücrelerinde proliferasyon

**Şekil 27.** DPPH radikal süpürücü aktivitesi

**Şekil 28.** Metanol ekstralarının fenolik içerikleri

**Şekil 29.** Metanol ekstralarının demir (III) indirgeme aktivitesi

**Şekil 30.** Histolojik Skorlama



## V. RESİMLER LİSTESİ

**Resim 1.** Granülasyon dokusu

**Resim 2.** Skar dokusu

**Resim 3.** *S. veratrifolia*

**Resim 4.** Kesi yarası oluşturulan sıçan

**Resim 5.** Kontrol grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 6.** Kontrol grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 7.** Negatif kontrol grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 8.** Negatif kontrol grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 9.** Pozitif kontrol grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 10.** Pozitif kontrol grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 11.** ME grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 12.** ME grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 13.** HE grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 14.** HE grubuna ait comet görüntüsü

**Resim 15.** *In vitro* hücre canlılığı kontrol grubu

**Resim 16.** *In vitro* hücre canlılığı kökten elde edilen ekstre

**Resim 17.** *In vitro* hücre canlılığı toprak üstü kısımdan elde edilen ekstre

**Resim 18a.** Kontrol grubuna ait H&E boyası ile yapılan histoloji sonucu

**Resim 18b.** Kontrol grubuna ait GT boyası ile yapılan histoloji sonucu

**Resim 19a.** NK grubuna ait H&E boyası ile yapılan histoloji sonucu

**Resim 19b.** NK grubuna ait GT boyası ile yapılan histoloji sonucu

**Resim 20a.** PK grubuna ait H&E boyası ile yapılan histoloji sonucu

**Resim 20b.** PK grubuna ait GT boyası ile yapılan histoloji sonucu

**Resim 21a.** HE grubuna ait H&E boyası ile yapılan histoloji sonucu

**Resim 21b.** HE grubuna ait GT boyası ile yapılan histoloji sonucu

**Resim 22a.** ME grubuna ait H&E boyası ile yapılan histoloji sonucu

**Resim 22b.** ME grubuna ait GT boyası ile yapılan histoloji sonucu





## VI. TABLOLAR LİSTESİ

**Tablo 1.** Kullanılan kimyasallar listesi

**Tablo 2.** Kullanılan cihazlar listesi

**Tablo 3.** Kullanılan çözeltiler

**Tablo 4.** Metanollü ve Heptanlı ekstrelerin %DNA<sub>T</sub> ve 8-OHdG düzeyleri üzerine etkileri

**Tablo 5.** Metanollü ve Heptanlı ekstrelerin GSH, MDA, MPO, Luminol, Lusigenin, NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  düzeyleri üzerine etkileri

**Tablo 6.** *S.veratrifolia* bitkisinden hazırlanan metanol ekstresinin fare fibroblast hüce (NIH 3T3) çoğalması üzerine etkisi (%)

**Tablo 7.** Bitkinin topraksütü ve kökünden hazırlanan metanol ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü aktivitesi

**Tablo 8.** Bitkinin topraksütü ve kökünden hazırlanan metanol ekstrelerinin fenolik içerikleri

**Tablo 9.** Bitkinin topraksütü ve kökünden hazırlanan metanol ekstrelerinin demir (III) indirgeme aktivitesi

**Tablo 10.** Histolojik inceleme skorlama puanları

# 1. ÖZET

## Neraband (*Scorzonera veratrifolia*) Bitkisinin Antioksidan ve Yara İyileştirici Özelliklerinin Araştırılması

Mert GEÇİM

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayfer BECEREN

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

**Amaç:** *Scorzonera veratrifolia* (*S. veratrifolia*) bitkisinin antioksidan, antiinflamatuvar, yara iyileştirici ve antikarsinojenik potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** *S. veratrifolia* bitkisinin metanollü ve heptanlı ekstrelerinin yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla wistar albino sıçanların sırtında doğrusal kesi yarası oluşturularak sıçanlar rasgele 5 gruba (n=6, kontrol, negatif kontrol, pozitif kontrol, Heptan ve metanollü ekstre) ayrıldı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmazken diğer gruplara 10 gün boyunca 0,5 gram preparat günde 2 kez uygulanarak ilgili tedavi yapıldı. Kanda Kuyruktaki DNA yüzdesi (%DNA<sub>T</sub>), 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri ve serumda İnterlökin-1β (IL-1β) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) düzeyleri ölçüldü. Deri dokularında glutasyon (GSH), malondialdehit (MDA) düzeyleri, myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, kemilüminesans ölçümler yapıldı. Her bir ekstrenin *in vitro* sitotoksik ve yara iyileştirici aktiviteleri NIH 3T3 fare fibroblast hücrelerinde ve çeşitli kanser hücre hatlarında MTT yöntemiyle tayin edildi. Histolojik değişiklikler ışık mikroskobu ile incelendi. Ayrıca her bir ekstrenin *in vitro* antioksidan aktivitesi DPPH ve FRAP yöntemleriyle incelendi ve içerdikleri fenolik madde miktarları FCR yöntemiyle tayin edildi.

**Bulgular:** 8-OHdG düzeyleri ve %DNA<sub>T</sub> sonuçları kontrol grubuna göre kıyaslandığında anlamlı bir fark (p>0.05) oluşmadığı belirlenirken diğer *in vitro* bulgular ekstrelerin kontrole kıyasla anlamlı düzeyde antioksidan ve yara iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. IL-1β, TNF-α, GSH, MDA, MPO, kemilüminesans ölçümler ile de benzer etkililik istatistiksel olarak belirlenmiştir. Histolojik incelemeler de anlamlı değişikliği desteklemektedir. Kanser hücre hatlarında ise ekstrelerin sitotoksik etkisi olmadığı ancak proliferatif etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuçlar:** *S. veratrifolia* bitkisinin yara iyileştirici özelliğe sahip olduğunu ve yapılacak çalışmalar ile desteklenerek klinikte kullanılabilecek bir ilaç olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** *Scorzonera veratrifolia*, yara iyileştirici, antioksidan aktivite, genotoksisite, sitotoksisite

## 2. SUMMARY

### **Evaluation of antioxidant and incision wound healing activities of Neraband (*Scorzonera veratrifolia*) plant**

Mert GEÇİM

Advisor: Assist. Prof. Dr. Ayfer BECEREN

Department of Pharmaceutical Toxicology

**Purpose:** The aim of this study is to investigate the possible antioxidant, wound healing, anti-inflammatory and anticarcinogen effects of *Scorzonera veratrifolia* plant.

**Materials and Methods:** Rats were randomly divided into 5 groups (n = 6, control, negative control, positive control, heptane and methanol extract) to determine the effect of methanol and heptane extracts of *S. veratrifolia* on wound healing. While no treatment was applied to the control group, the other groups were treated with 0.5 g twice a day for 10 days. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels and %DNA in tail (%DNA<sub>T</sub>) were measured in blood samples. Glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) levels, myeloperoxidase (MPO) activity, chemiluminescence measurements were performed in skin tissues. *In vitro* cytotoxic wound healing activities of each extract were determined in NIH 3T3 mouse fibroblast cells and in various cancer cell lines by MTT method. Histological changes were examined by light microscopy. *In vitro* antioxidant activity of each extract was examined by DPPH and FRAP methods and the amounts of phenolic contents in extracts were determined by FCR method.

**Results:** The results showed that 8-OHdG levels and % DNA<sub>T</sub> results were not significantly different (p> 0.05) compared to the control group, while other *in vitro* findings showed significant changes compared to control. Similar activity was determined with IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GSH, MDA, MPO, chemiluminescence measurements. Significant changes were supported by the histological examinations. Plant extracts were not cytotoxic in cancer cell lines but showed proliferative activity.

**Conclusion:** The results suggest that the *S. veratrifolia* has wound healing activity and is a potential drug candidate which needs to be verified by further studies.

**Keywords:** *Scorzonera veratrifolia*, wound healing, antioxidant activity, genotoxicity, cytotoxicity

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Asteraceae familyasında bulunan *Scorzonera* cinsi Türkiye florasında 39 tür ile temsil edilmekte ve bunlardan 17 tür endemiktir. *Scorzonera* türleri Anadolu'da yemlik, alabend, nalbant, neraband, yarasakızı otu olarak bilinmektedir (Acıkara ve ark., 2013; Doğan ve Tuzlacı, 2015). Bazı *Scorzonera* türleri geleneksel tıpta analjezik, antiromatizmal, antihelmintik, stomatik, diüretik olarak ve yara iyi edici, hipertansiyon, akciğer ödemi, böbrek rahatsızlıkları, şeker hastalığı ve diyare tedavilerinde kullanılmaktadır. Ayrıca Anadolu'da bazı *Scorzonera* türlerinin kökleri ve yeşil sürgünleri taze olarak veya pişirildikten sonra tüketilmektedir (Acıkara ve ark., 2013)

*Scorzonera* türlerinin dihidroisokumarin, bibenzil türevleri, flavonoidler, lignanlar, stilben türevleri, kuinik ve kafeik asit türevleri, seskiterpen, seskiterpen laktonlar ve triterpen bileşikleri içerdiği saptanmıştır (Sarı, 2010).

*Scorzonera alexandrina* bitkisi üzerinde yapılan çalışmada etanol ekstresinin kan şekerini düşürücü ve hepatoprotektif aktivite gösterdiği ve skopoletin, ksantotoksin, apigenin, luteolin, kersetin-7-O-ramnozid ve luteolin-7-O-glukozid bileşiklerini içerdiği saptanmıştır (Raheim ve Donia, 2013).

*Scorzonera undulata* ssp. *alexandrina* bitkisi üzerinde yapılan çalışmada bitkiden hazırlanan etil asetat ekstresinin lupeol, 3-O-(6-O-astil-B-D-glukopiranosil)B-sitosterol, daukosterol ve apigenin bileşiklerini içerdiği saptanmıştır (Benabdelaziz ve ark., 2014).

*Scorzonera tomentosa* bitkisinin topraküstü kısımları ve köklerinin klorojenik, kafeik, ferulik, rosmarinik ve p-kumarik asit gibi fenolik asit içerdiği ve major madde olarak da klorojenik asit içerdiği yapılan çalışma ile belirlenmiştir (Acıkara ve ark., 2013).

*Scorzonera cana* var. *alpine*, *Scorzonera cana* var. *jacquinianai* ve *Scorzonera cana* var. *radicosa*, *Scorzonera cinerea*, *Scorzonera eriophora*, *Scorzonera incisa*, *Scorzonera laciniata* ssp. *laciniata*, *S. parviflora* bitkilerinin antioksidan aktiviteleri süperoksit anyon radikaline karşı süpürücü etki modeli ile incelenmiş ve *S. parviflora* bitkisinin köklerinin en güçlü antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Bu bitkilerin HPLC ile fenolik içeriği analiz edilmiş ve klorojenik asit, rutin, hiperozit, luteolin ve apigenin içerdiği tespit edilmiştir (Acıkara ve ark., 2013).

*Scorzonera undulata* bitkisinin topraküstü ve köklerinden elde edilen metanol ekstresinin kumarin, flavonoid, tanen, antrakınon ve kardiyotonik glikozit içerdiği bulunmuş ve bu ekstrenin antibakteriyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca topraküstü kısımlarının laksatif etkili olduğu belirlenmiştir (Kargol ve ark., 2013).

*Scorzonera mongolica* bitkisinden 3 $\beta$ -dodekanoil eritrodiol ve 3 $\beta$ -tetradekanoil eritrodiol bileşikleri izole edilmiştir (Wang ve ark., 2009). *S. undulata* ssp. *deliciosa* bitkisinin köklerinden  $\beta$ -Amirin asetat, metil oleanat, metil ursolat, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, galangustin, kumarin-O- $\beta$ -glukozit ve akteosid bileşikleri izole edilmiştir (Harkati ve ark., 2010).

Yapılan literatür taramalarında *Scorzonera* türlerinin antioksidan, analjezik, antiinflamatuvar ve yara iyileştirici aktivite gösterdikleri bilimsel çalışmalar ile tespit edilmiştir (Tsevegsuren ve ark., 2007; Wang ve ark., 2009).

Ayrıca, bazı *Scorzonera* türleri geleneksel tıpta analjezik, antiromatizmal, antihelmintik, stomatik, diüretik, yara iyileştirici, hipertansiyon, akciğer ödemi, böbrek rahatsızlıkları, diyabet ve diyare tedavisinde kullanılmaktadır.

*Scorzonera veratrifolia* Fenzl bitkisi çok yıllık otsu bir bitkidir. Bu bitki Doğu Anadolu'da yayılış göstermekte ve kuru kayalık yamaçlarda yetişmektedir. Bu bitkinin kökleri ve lateksi yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır. Proje bitkimiz olan *Scorzonera veratrifolia* bitkisinin sadece kökünden benzilfithalid, skorzoveratrin, skorzoveratrozit, klorojenik asit, klorojenik asit metil ester, kriptoklorojenik asit, 4,5-dikaffeoilkuinik asit ve 3,5-dikaffeoilkuinik asit izole edilmiş ve bu kısımların antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir (Sarı ve ark., 2009; Sarı, 2010).

Bu çalışmaların dışında yapılan literatür taramasında proje bitkimiz üzerinde, antimikrobiyal aktivitesi dışında herhangi bir bilimsel çalışmaya (*in vivo* veya *in vitro* aktivite çalışması) rastlanılmamıştır.

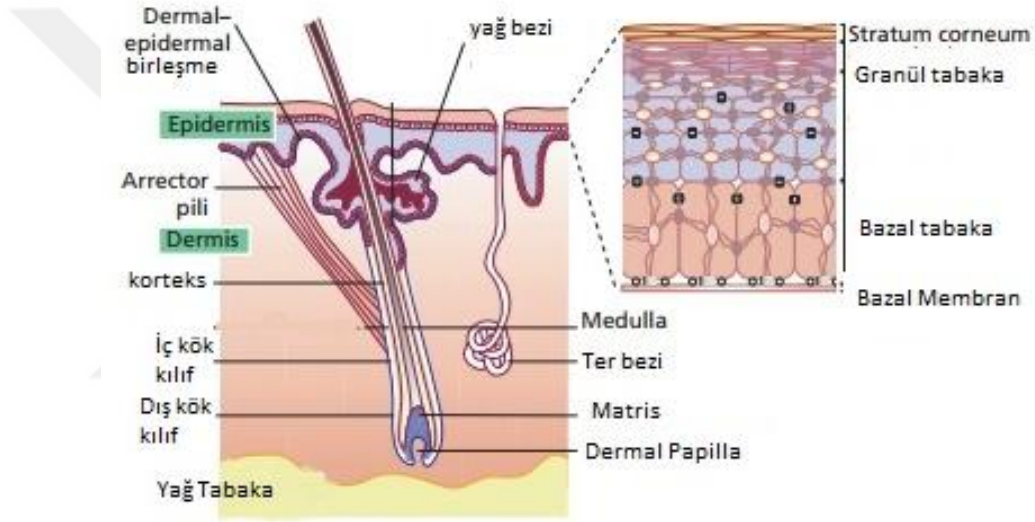
Bu sebeple de çalışmamızın hedeflerini temel olarak şu şekilde toplamak mümkündür;

- *Scorzonera veratrifolia* bitkisinin topraküstü kısımlarından ve köklerinden heptan ve metanol ile maserasyon yöntemi kullanılarak ekstreler elde edilmesi,
- Elde edilen her bir ekstrenin *in vitro* antioksidan aktivitesinin FRAP ve DPPH yöntemleri kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve ayrıca Folin-Ciocalteu kullanılarak ekstrelerin toplam fenolik ve alüminyum klorür renk ölçüm yöntemiyle de toplam flavonoid madde içeriği belirlenmesi, ekstrelerin antioksidan kapasiteleri ile fenolik madde miktarları arasındaki ilişki incelenmesi,
- Elde edilen her bir ekstrenin *in vitro* sitotoksik yara iyileştirici aktivitelerinin NIH 3T3 fare fibroblast hücrelerinde MTT yöntemi tayininin yapılması,
- Elde edilen her bir ekstrenin *in vitro* sitotoksik aktivitelerinin kolon kanser hücre hattı HT-29, insan akciğer kanser hücre hattı A549, insan servikal kanser hücre hattı HeLa ve insan prostat kanser hücre hattında PC-3 MTT yöntemi ile değerlendirilmesi,
- *Scorzonera veratrifolia* ekstrelerinin potansiyel genotoksik etkileri sıçanlardan alınan tam kanda Comet tekniği ile değerlendirilmesi ve serumda 8-hydroxy-2' - deoxyguanosine (8-OHdG) araştırılması,
- *Scorzonera veratrifolia* ekstrelerinin potansiyel koruyucu etkilerinin sıçanlardan alınan dokularda Oksidan-Antioksidan Aktivite Deneyleri ile araştırılması, (Malondialdehid (MDA), Glutasyon (GSH), Myeloperoksidaz (MPO) düzeylerinin ve Serbest Radikallerin Kemilüminometrik Ölçümü,
- *Scorzonera veratrifolia* ekstrelerinin yara iyileştirici etkisinin inflamatuvar sitokinler üzerinden olup olmadığının incelenmesi amacıyla TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeyleri ölçülmesi,
- *Scorzonera veratrifolia* ekstrelerinin potansiyel yara iyileştirici etkilerinin sıçanlardan alınan deri doku örneklerinin histolojik olarak incelenmesidir.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Deri

Yetişkin bir insan bedeninin yaklaşık %15'ini oluşturan deri, organlar arasında en geniş ve en büyüğüdür (kanitakis, 2002). Derinin temel görevi bir canlıyı kimyasal ve fiziksel zararlara karşı koruması aynı zamanda hem vücudu patojenlere karşı koruması hem de vücuttan su kaybını önlemek için bariyer görevi yapmasıdır (Proksch ve ark., 2008). Deri, epidermis, dermis ve hipodermis olarak 3 ana katmanı içerir (Şekil 1). (kanitakis, 2002)

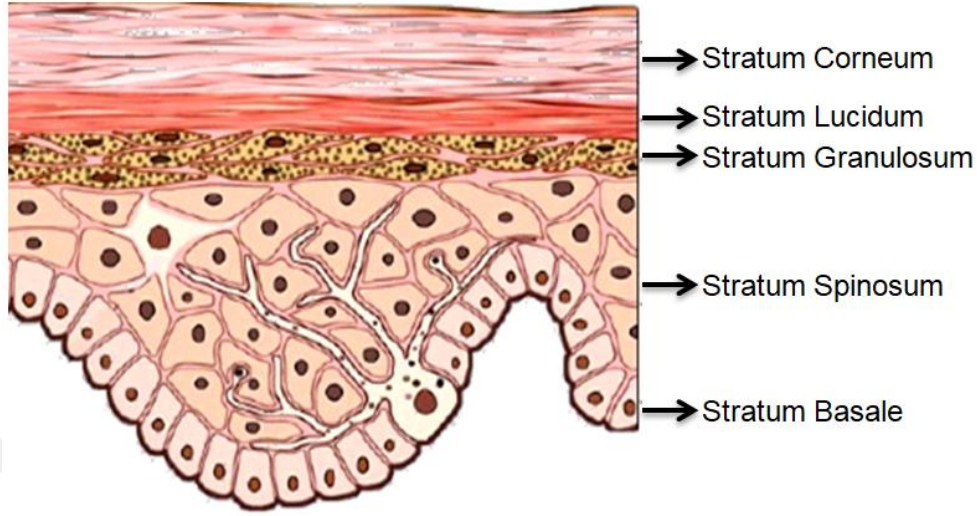


Şekil 1. Derinin yapısı (McGrath, 2008)

#### 4.1.1. Epidermis

Epidermis derinin en dış tabakasını oluşturur (Madison, 2003). Kan damarları bulunmayan bu tabaka derinin elastik yapısını ve bütünlüğünü koruyan bölgedir (Mahmud, 2009). Güneşten gelen UV ışınlarının sentezlendiği bu tabaka deriyi zararlı ışınlarla karşı da korumaktadır. Kıl kökleri ve ter bezleri gibi epidermal eklerin çoğu epidermal tabakadan türemiştir (Lai, 2009). Epidermis, stratum corneum ve stratum germinativum adlı iki tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2). Stratum corneum epidermisin en üst tabakasıdır ve ölü hücre tabakası olarak bilinir. Stratum

germinativum ise epidermisin en alt tabakasıdır ve mitoz bölünmenin hızlı gerçekleştiği, yeni hücrelerin oluştuğu yer olarak bilinir (Mahmud, 2009).

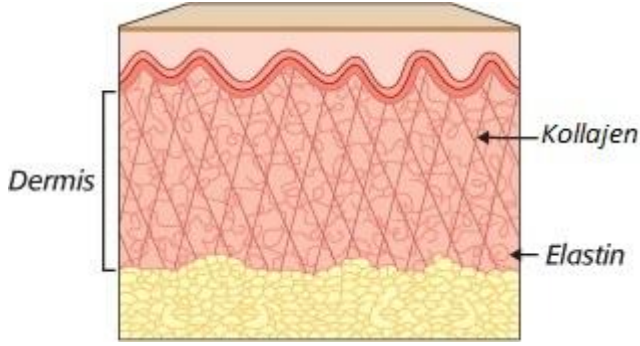


**Şekil 2.** Epidermisin yapısı (<https://socratic.org/questions/what-is-the-difference-between-epithelium-and-epidermis> Erişim tarihi: 2.04.2018).

#### 4.1.2. Dermis

İkinci tabaka tabaka olarak bilinen dermis, fibroblastlar, kan damarları, sinirler, kollajen lifi ve elastik lif gibi bağ biyomoleküllerinden oluşmaktadır (Yan ve Schsandrin, 2010). Dermis bölgesi gerilebilir bağ dokudan oluşur. Dermis, epidermiste yer alan keratinositlerin büyümesi ve çoğalmasını destekleyen bölgedir. Fibroblastlar, dermisteki ana hücre türüdür ve büyük miktarda su tutabilen ve böylece deriye gerginlik ve esneklik kazandıran bir ağ oluşturacak şekilde hücre dışı matrisi, başta tip I kollajeni üretebilirler (Lai, 2009). Dermis ve epidermis arasında bağlantı kuran ve pürüzlü bir tabakaya sahip olan papiller tabaka yer almaktadır. Bu tabaka aynı anda dermişi ve stratum germinativumu besleyen kılcal damarlar ile doludur (Mahmud, 2009). Dermisin yapısı Şekil 3'te verilmektedir.





**Şekil 3.** Dermisin yapısı (<https://www.safaribooksonline.com/library/view/your-body-the/9780596805456/ch01.html> Erişim tarihi:2.04.2018)

### 4.1.3. Hipodermis

En içteki katman ise yağ dokusunun bulunduğu hipodermistir (Yan ve Schsandrın, 2010). Bu tabaka, vücudumuzun iç kısımlarına yalıtımı sağlarken, gerekirse cilt hücrelerine hızlı bir besin kaynağı sağlar (Lai, 2009). Subkütan yağ tabakası olan hipodermis, olası bir durumda iltihap salgılama yeteneğine sahip olduğundan iltihaplı bir tabaka veya organ olarak da düşünülebilir (Mahmud, 2009).

### 4.2. Yara

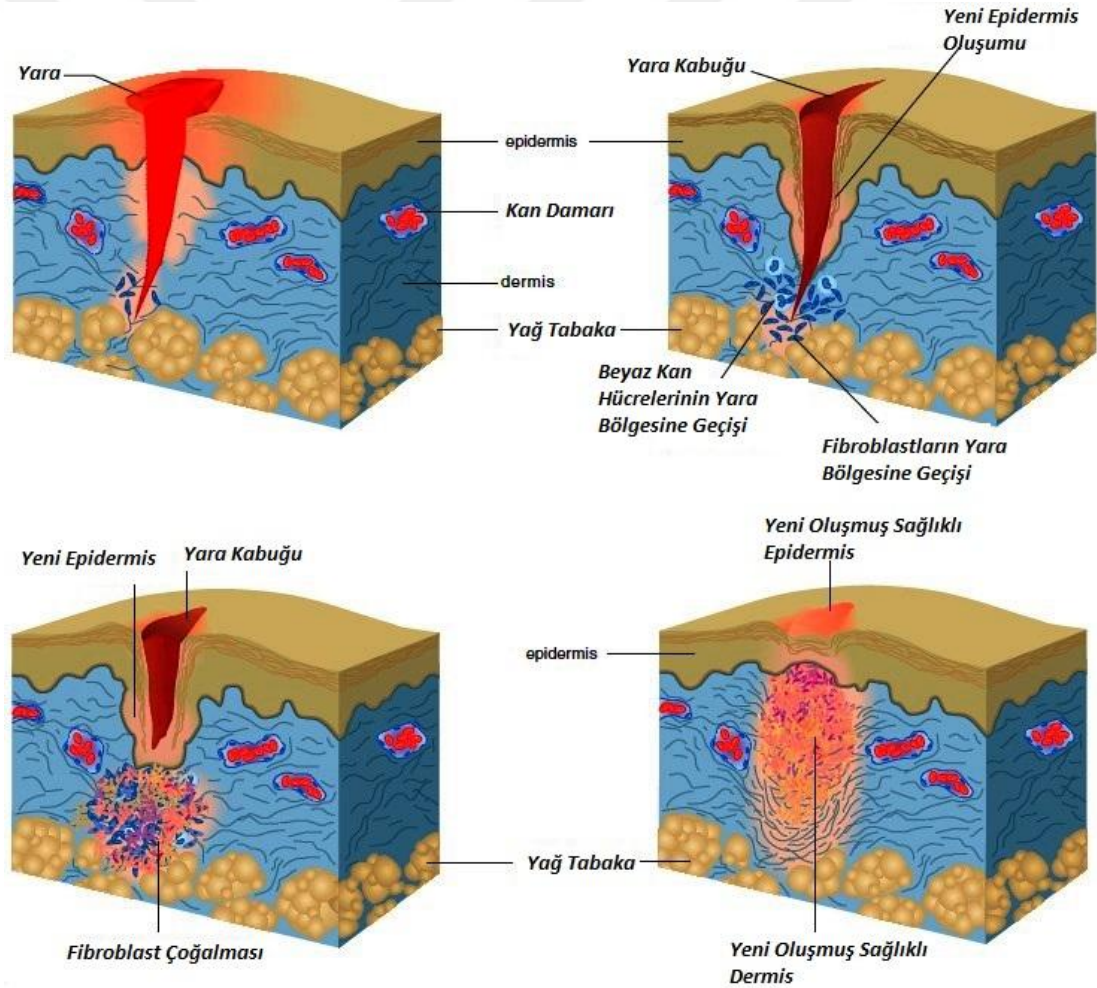
Yara, cildin epitel bütünlüğünde bir kopukluk olup altta yatan normal dokunun yapısını ve işlevinin bozulması sonucu oluşur. Bir yara, travma, yanma, cerrahi insizyon sonucu ciltte, organda ve hasarın olduğu bölgede oluşan hasar ile gerçekleşir. (Enoch ve Leaper, 2008). Yara oluşmamış ciltte, epidermis ve dermis, kararlı halde bulunur ve dış çevreye karşı koruyucu bir bariyer oluşturur. Koruyucu bariyer bozulduğunda, normal fizyolojik yara iyileşmesi süreci hızlı bir şekilde harekete geçer.(Nawaz ve Bentley, 2010).

#### 4.2.1. Yara çeşitleri

Yaraları genel olarak akut yaralar ve kronik yaralar olmak üzere iki başlık altında ayrılır.

##### 4.2.1.1. Akut yaralar

Akut yaralar epidermis bölgesinde ve dermişin bir kısmını içerecek şekilde yüzeysel yaralanmalar olarak tanımlanır. Kesi yaraları, termal yaralar ve aşınma akut yaralanmalara örnek verilebilir. (Dreifke ve ark., 2015). Akut yaralar ortalama üç hafta içerisinde iyileşme gösterebilen yara çeşitleridir. (Korting ve ark., 2011). Yara iyileşme aşamaları Şekil 4'te verilmektedir.



Şekil 4. Yara iyileşme aşamaları (<http://www.organicskincare.com/latest-news-about-wound-healing-process/> Erişim Tarihi: 2.04.2018)

#### **4.2.1.2. Kronik yaralar**

Kronik yaralar, uzun zamanda veya zor düzelen ya da hiç düzelmeyen yaralar olarak adlandırılır. Başka bir tabirle bir yaranın ortalama üç ay içinde tamamen iyileşmemiş olması durumu o yaranın kronik yara olduğunu işaret eder. Kronik yara olarak adlandırabileceğimiz yaralar ise diyabetik ayak yaraları, bası yaraları, venöz ülserler, iskemik ülserler, çeşitli vaskülitlere bağlı yaralardır (Aktaş Ş., 2012).

#### **4.2.2. Yara iyileşme fizyolojisi**

Yaralanma ve ardından gelen yara iyileşmesi, vücudun bütün dokularında ve organlarında meydana gelir. Yara iyileşmesi sırasında gerçekleştirilen işlemlerin çoğu bütün dokular için de geçerlidir ve iyileşme durmaksızın devam eder (Velnar ve Ark., 2009). Yara iyileşme fizyolojisini hemostaz, enflamasyon-epitelizasyon, proliferasyon ve yeniden modelleme başlıkları altında incelenir (Korting ve ark., 2011).

##### **4.2.2.1 Hemostaz**

Yaralanma gerçekleşir gerçekleşmez koagülasyon ve hemostaz yarada başlar. Bu mekanizmanın asıl amacı vasküler sistemi koruyarak kan kaybını önlemek ve hayati organların yaralanmaya rağmen işlevini bozmamaktır (Velnar ve ark., 2009). Yaradaki hasar görmüş olan endotel, von-Willebrand faktörü (vWF) ve doku tromboplastini serbest bırakır (Nawaz ve Bentley, 2010). Pıhtı oluşumu ve trombosit yığılması daha fazla kan kaybını önler. Trombositler salındıktan sonra alfa granüllerini hücre dışına serbest bir şekilde salar ve bunun sonucunda bir takım büyüme hormonları salgılanır (Enoch ve Leaper, 2008).

- Trombosit-türevi büyüme faktörü (PDGF)
- İnsulin benzeri büyüme faktörü (IGF)
- Epidermal büyüme faktörü (EGF)
- Dönüştürücü büyüme faktörü Beta (TGF-  $\beta$ )
- Trombosit faktör IV

Bu hormonlar vazodilatasyonu teşvik ederek yaralı bölgeye kan akışını hızlandırır ve keratinositler ile fibroblastların fonksiyonunu düzenler (Lai, 2009).

#### **4.2.2.2. Enflamasyon-Epitelizasyon**

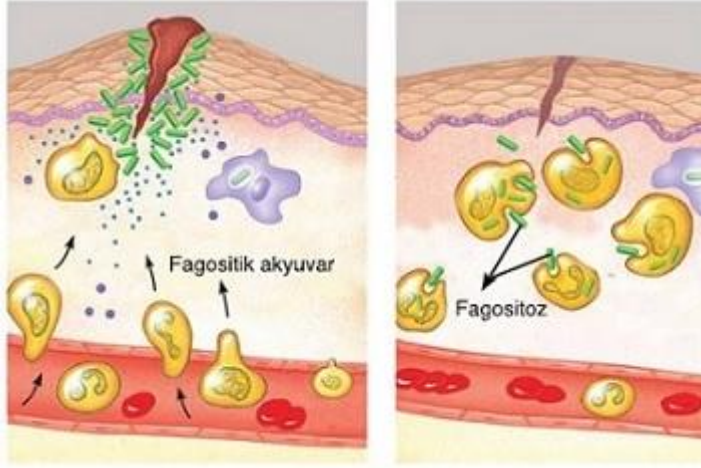
Enflamasyon, inflamatuvar hücrelerin yanıt süresine göre erken ve geç enflamasyon olmak üzere ikiye ayrılır (Enoch ve Leaper, 2008). Genel tanım olarak ise; inflamatuvar hücrelerin (nötrofiller ve makrofajlar) yara bölgesine ulaştığı aşama olarak tanımlanır (Valender, 2010).

#### **4.2.2.3. Erken inflamatuvar aşaması**

Bu aşama kompleman sisteminin klasik ve alternatif yollarının aktivasyonu ile başlar. Bu sistem yara oluşan bölgeye 24-48 saat içerisinde nötrofil ve granülositler ile infiltrasyona yol açar ve bazı kemoaktraktanların salınımını gerçekleştirir (Enoch ve Leaper, 2008).

- Ekstrasellüler matriks protein parçaları.
- TGF-  $\beta$
- Kompleman bileşenleri (c3a, c5a)
- Bakterilerden gelmiş formil-metionil bileşenleri.

Nötrofiller, kalıntıları ve bakterileri fagositleştirir ve ayrıca serbest radikalleri salarak bakterileri öldürürler. Hasar görmüş dokuları yok eden proteazlar salınır ve yara iyileşmeye başlar (Nawaz ve Bentley, 2010). Yüzey adezyon moleküllerinin düzenlenmesindeki değişiklikler nedeniyle nötrofiller yapışkan hale gelir ve nötrofil lökositlerin enflamasyon boyunca damar endotel hücrelerine yaklaşma ve yapışma süreci başlar. Endotel hücreleri tarafından salgılanan kemokinler daha kuvvetli bir adezyon sistemi kurarlar (Velnar ve ark., 2009). Süreç devam ederken, epidermis üzerindeki kesik bölgenin kenarlarında bazal hücreler çoğalmış ve mitotik aktivite başlamıştır ve 24-48 saat içerisinde bu hücreler hızlı bir şekilde ilerler ve iyileşme tamamlanır. (Enoch ve Leaper, 2008). Nötrofil aktivitesi, yaralanma sonucu oluşan bakterilerin hepsi temizlendikten sonra birkaç gün içinde yavaş yavaş değişir ve nötrofiller yaradan uzaklaştırılır. Kalan hücre kalıntıları ise fagositize edilir (Şekil 5) (Velnar ve ark., 2009)..



**Şekil 5.** Kalan hücre kalıntılarının fagositize edilmesi (<http://webders.net/dolasim-sistemi-ve-vucudun-savunulmasi-ders-20-367p2.html> Erişim tarihi: 2.04.2018)

#### 4.2.2.4. Geç inflamatuvar aşaması

Geç inflamatuvar aşaması yara olduktan sonra 2-3 gün sonra gerçekleşen aşamadır. Yaralanmadan 48 - 72 saat sonra aşamanın bir parçası olarak makrofajlar yarada görülür ve fagositoz sürecine devam eder. Makrofajlar temelinde kan monositleri olmasına rağmen fenotipik değişime uğrayarak bu hale gelir (Velnar ve ark., 2009). Monositler bir takım kemoatraktanların yaraya ilgisini çekmeyi sağlar (Enoch ve Leaper, 2008).

- Tamamlayıcılar, pıhtılaşma bileşenleri
- Immunoglobulin G parçaları
- Kollojen ve elastin ürünleri
- Sitokinler (örneğin lökotrin B4, trombosit faktör IV)

Geç inflamatuvar aşamasındaki anahtar rol makrofajlara aittir (Nawaz ve Bentley, 2010). Büyüme hormonlarının salınımının yanı sıra fibroblastları beslemek için yeni kan damarlarını oluşturur (Valender, 2010). Ayrıca düz kas hücrelerinin ve endotel hücrelerinin anjiogenezisini sağlar. Eğer monositler ve doku makrofajlarında azalmalar görülürse yara iyileşme sürecinde ciddi değişiklikler gerçekleşir. Örnek olarak yaranın zayıf debridmanına neden olur ya da yetersiz anjiyogenezise yol açar (Velnar ve ark., 2009). Geç inflamatuvar aşaması sırasında, kollajen lifleri oluşan

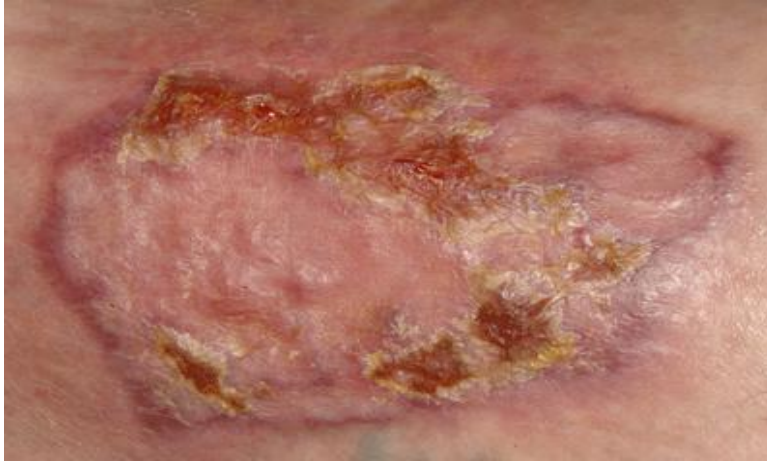
yaranın kenarlarında belirgindir. Epitel hücre proliferasyonu devam eder ve kalınlaşmış bir epidermal örtü tabakası verir (Enoch ve Leaper, 2008).

#### 4.2.2.5. Epitelizasyon

Yara bölgesinin kenarlarında bulunan bazal keratinositler ve kıl follikülleri, ter bezleri ve sebace bezler gibi dermal bölgeler, yara iyileşmesinin epitelizasyon aşamasından sorumlu ana hücrelerdir. Bazal büyüme faktörleri tarafından modüle edilen bazal epitel hücrelerinin mitotik aktivitesindeki artış, matriste migrasyonu teşvik eder ve tabakalı epitelin yeniden kurulmasına yol açar (Nawaz ve Bentley, 2010).

#### 4.2.2.6. Proliferasyon

Bu aşama yaralanma gerçekleşikten sonraki üçüncü günde başlar ve yaklaşık iki hafta sürer. Fibroblast göçü, hücre dışı matrisin çökmesi ve granülasyon dokusu oluşumu bu aşamada gerçekleşir (Enoch ve Leaper, 2008). Granülasyon dokusunun (Resim 1) bol miktarda olduğu bu aşama makroskopik seviyededir (Velnar ve ark., 2009). Bu aşamada gerçekleşen süreçlerden bahsederek;



**Resim 1.** Granülasyon dokusu

(<http://www.drwheatgrass.com.au/conditions/woundhealing/skingraft.htm> Erişim tarihi: 2.04.2018)

#### 4.2.2.6.1. Fibroblast göçü

Yara oluştuktan sonra ilk 3 gün boyunca çevre dokularda bulunan fibroblastlar ve miyofibroblastlar yara bölgesi için çoğalmaya teşvik edilir (Witte ve Barbul, 1997). Fibroblastlar birikimi üçüncü günde fenotipik modülasyona ihtiyaç duyarlar. Trombosit tarafından salınan TGF- $\beta$  ve PDGF gibi faktörlerin yanı sıra hyaluronan, fibronektin, proteoglikanlar ve tip1-tip3 prokollajen matris proteinleri yara bölgesinde bulunur (Velnar ve ark., 2009). Oluşan ve biriken bu bileşenler, hücrelerin daha çok gelişmesine yardımcı olan ve onarım süreci için olması gerekli olan yeni hücre dışı matrisin oluşturulmasına yardımcı olur (Enoch ve Leaper, 2008). Birinci hafta bitene kadar çok miktarda hücre dışı matris birikir (ECM), bu birikimin sonucunda hücre göçü çoğalır ve bu durum yara onarımı için zaruridir (Velnar ve ark., 2009). *ECM*: Yapısında kolajenler, elastin bulunan glikoproteinlerden oluşan bir hücreler arası matristen oluşur (Enoch ve Leaper, 2008).

Fibroblastlar, yeni oluşmuş olan granülasyon dokusunu oluşturur ve bu sayede yaraya yapısal bütünlük ve kuvvet sağlayan mikrofibroblastların ana kaynağıdır (Darby ve Hewitson, 2007).

#### 4.2.2.6.2. Kollajen sentezi

Yara iyileşmesinin her noktasında kollajen önemli bir bileşendir. Proliferatif ve yeniden modelleme evrelerinde önemli rolü olan kollajenler fibroblastlardan sentezlenir ve bütün dokulara bütünlük ve sağlamlık katarlar (Velnar ve ark., 2009). Proliferatif ve yeniden modelleme aşamalarında kollajen sentezini uyaran birçok faktör vardır (Enoch ve Leaper, 2008).

- Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF)
- Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)
- Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ )
- İnterlökin-1
- Tümör nekroz faktörü (TNF)

Dermis bölgesi yara olmadığı zaman %80-90 arası tip I, %10-20 arası da tip III kollajenden oluşur. Yara esnasında ise oluşan granülasyon dokusunda tip III yaklaşık %30 seviyelerine yükselir (Lai, 2009).

#### **4.2.2.6.3. Anjiyogenez ve granülasyon dokusu**

Fibroblastların artması ile aynı anda (3.gün) gerçekleşir. Anjiyogenezis gerçekleşmek zorundadır; çünkü fibroblastların ve epitel hücrelerin aktivitesi oksijene ihtiyaç duyar. Hasar almamış kan damarlarının bir kısmında bulunan endotel hücrelerinin kök hücreleri, psödopodik hareketler ile ECM'yi hasar almış bölgeye iterek yeni kan damarları oluşturur (Nawaz ve Bentley, 2010). hemostatik aşama sırasında salgılanan birçok anjiyojenik etmen anjiyogenezisi teşvik eder (Velnar ve ark., 2009). Granülasyon dokusu 3-5 gün içerisinde gözle görülebilen pembe, yumuşak bir dokudur. Bu aşama anjiyogenez veya hasar almış bölgedeki mevcut damarlardan yeni kan damarları oluşumu ile karakterizedir (Enoch ve Leaper, 2008). Yara bölgesinde koşullara en dayanıklı bölge granülasyon bölgesidir. Eğer iyi bir granülasyon dokusu oluşmuş ise yaranın altındaki dokuların nekrozunun olmadığı görülür (Altındaş M., 2001).

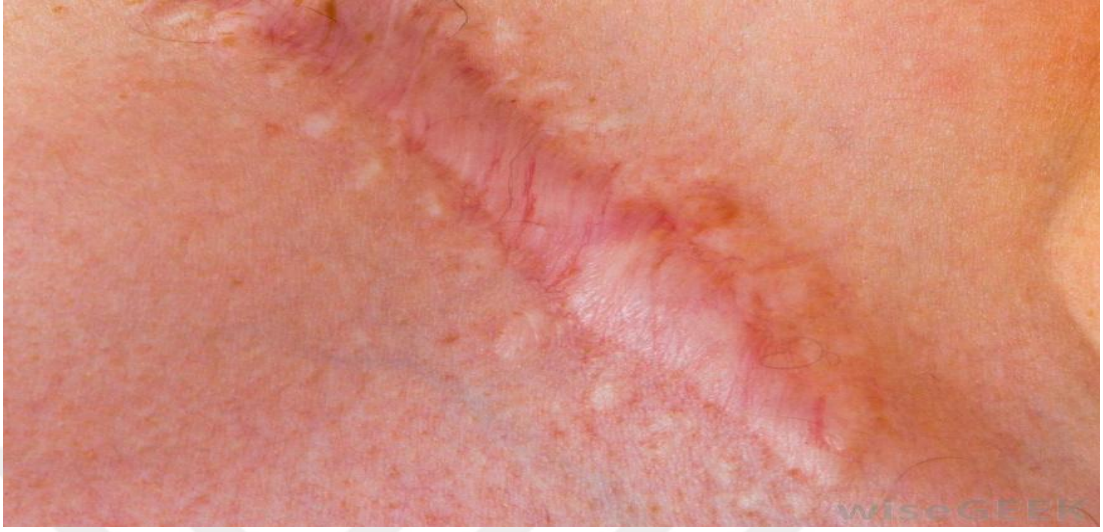
#### **4.2.2.7. Yeniden modelleme**

Yara iyileşmesi sürecinin son aşamasıdır. Yeni epitelin gelişimi ve nihai skar dokusunun olduğu aşamadır (Velnar ve ark., 2009). Bu aşamada yaraya ekstra sağlamlık veren gergin çizgiler yeniden düzenlenir ve işlevini yitirmiş hücreler çıkartılır. Bu süreç 6 aydan bir yıla kadar devam edebilen bir süreçtir (Velandar, 2010). ECM' in sentezi ile granülasyon dokusunun oluşmasıyla aynı zamanda başlar. Proliferasyon sırasında çok miktarda bulunan Tip III kollajen bu aşamada yavaş yavaş azalır ve daha kuvvetli tip I kollajen oluşumu gözlenir (Nawaz ve Bentley, 2010). Kollajen matrisin yeniden şekillenmesi, granülasyon aşamasından olgun skar dokusuna geçişi sırasında çeşitli matris metaloproteinazların (MMP) etkinlikleri ile gerçekleşir (Lai, 2009 ).

*Skar* dokusu geliştikçe fibronektin ve hiyalüronan parçalanır ve kollajen yapıları demetler halinde çoğalır (Resim 2). Bunun yanı sıra, oluşan kollajen demetleri cildin



yaralanmadan önceki mukavemetine kavuşamaz ve maksimum %80'lik bir kuvvete ulaşabilir (Enoch ve Leaper, 2008).

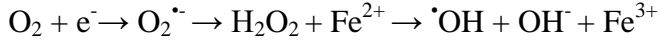


**Resim 2.** Skar dokusu (<http://images.wisegeek.com/scar-tissue.jpg> Erişim tarihi: 2.04.2018)

#### **4.3. Yara ve Oksidatif Stres**

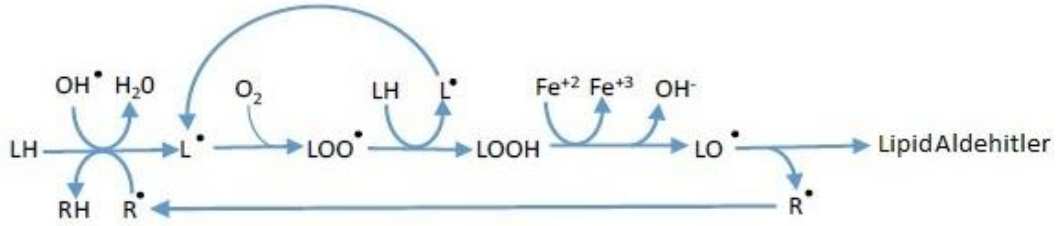
Oksijen, solunum metabolizması ve vücut için gerekli olan enerji üretimini sağlamış olsa dahi hücrelerimizde oluşan reaktif oksijen çeşitleri (ROS) yani serbest radikaller nükleik asitleri hasara uğratarak, proteinleri oksitleyerek ve lipid peroksidasyonuna neden olarak; Kanser, kardiyovasküler hastalık, Down sendromu, Friedreich ataksisi, romatoid artrit, otoimmün hastalık ve AIDS gibi birçok ölümcül hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Oksidatif hasarın mutajenez, tümörigenez, yaşlanmadan kaynaklı Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda da önemli bir etmen olduğu ortaya çıkmaktadır (Temple ve ark., 2005). Moleküler reaksiyonlar indirgenme-yükseltgenme (redoks) potansiyeli olarak bilinen, kimyasal reaksiyona elektron alması veya vermesi yeteneğine sahiptirler. Oksijen ( $O_2$ ) dört elektron kabul edebilir ve diğer elementlere göre reaksiyona girme açısından büyük bir potansiyele sahiptir. Oksijene bir elektron verilmesi durumundan süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) oluşur. Süperoksit radikali daha sonra hidrojen peroksite ( $H_2O_2$ ) dönüştürülebilir. Hidrojen peroksit ise fenton prosesi ile yüksek reaktif özelliğe sahip olan hidroksil radikalini ( $OH^{\cdot}$ ) oluşturmak için demir ( $Fe^{2+}$ ) ile reaksiyona girebilir. Bu üç türe reaktif oksijen çeşitleri (ROS) denmektedir (McCord, 2000).

*ROS reaksiyonları:*



Bu aşamalar ile meydana gelen ROS, proteinler, DNA ve lipitler gibi biyolojik makromoleküllere zarar verirler. Lipid peroksidasyonu, lipitlerde oluşan oksidatif hasarın bir göstergesidir.

*Lipid peroksidasyonu:* Lipid peroksidasyonu 3 aşamada gerçekleşir. İlk aşamada serbest radikallerin lipitlere saldırdığı ve sonucunda bir hidrojen atomu meydana getirerek lipit radikalleri (L<sup>\*</sup>) oluşturmaktadır. İkinci aşama ise lipit radikallerinin, lipoperoksil radikalleri (LOO<sup>\*</sup>) oluşturmak için oksijen atomlarıyla etkileşime girmesiyle gerçekleşir. Serbest radikaller lipit hidroperoksitler (LOOH) ve lipit kökleri (L<sup>\*</sup>) oluşturmak için lipit alt tabakalarına tekrar saldırırlar. Lipid hidroperoksitleri ayrıca alkil kökleri ve aldehitleri (örneğin malondialdehit veya MDA) üretmek üzere ayrışır. Alkil köklerinin işlemi baştan başlatma ihtimalleri vardır. Eğer lipit substrat tükendiğinde veya bir antioksidan, lipit radikaline elektron verdiğinde işlem başa dönmektedir ve bu zincirleme reaksiyonun bittiği anlamına gelir (Kohen ve Nyska, 2002) . Lipid peroksidasyonun şematize edilmiş hali Şekil 6'da verilmektedir.



**Şekil 6.** Lipid Peroksidasyonu

*Protein oksidasyonu:* proteinlerin yapı taşı olan aminoasitlerden bir hidrojen atomunun çıkarılması radikal oluşumuna yol açar ve bu radikal O<sub>2</sub> ile seri bir şekilde reaksiyona girerek alkilperoksiti oluşturur. Birkaç reaksiyonun sonucunda alkil, alkilperoksil ve alkoksil radikalleri olarak adlandırılan bu ara ürünler radikal oluşmuş proteinin diğer aminoasit kalıntılarıyla ya da başka proteinlerle yan reaksiyon oluşturarak yeni radikallerin oluşmasını tetikleyebilir. Bu reaksiyonların sonucunda

proteinin aminoasit yapısı bozulur ve protein karbonil türevleri oluşur (Berlett ve Stadtman, 1997; Dalle-Donne ve ark., 2003).

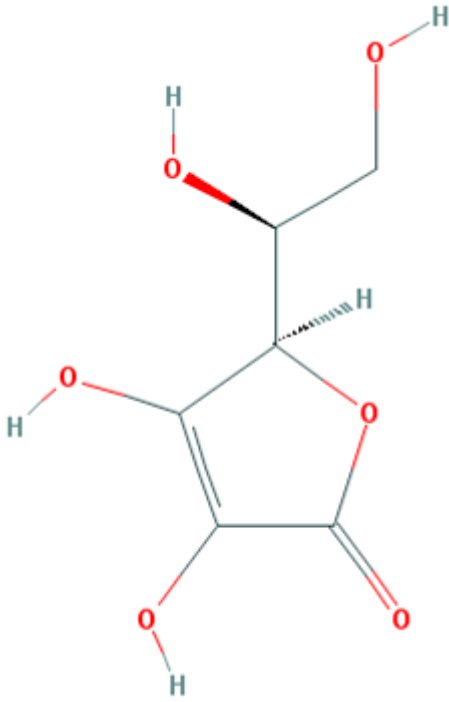
#### **4.3.1. Yara üzerinde ROS etkisi**

Yara iyileşme sürecinde büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonların rolü çok büyüktür; ancak son yapılan çalışmalarda ROS çeşidi olan nitrik oksidin yara iyileşme sürecinde kritik düzenleyicilerden biri olduğunu göstermiştir. Açık yara üzerinde olumsuz etkisi olan patojenlere karşı savunma için ROS gerekliliği ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda düşük ROS seviyeleri de hücre içi sinyalleşmede temel araçlar görevindedir. Örnek olarak yakın tarihli bir çalışmada düşük hidrojen peroksidin yara anjiyogenezisi üzerinde olumlu etkileri olduğunu saptamıştır (Schafer ve Werner, 2008). Yara oluşuktan sonra yaranın etrafında trombosit fonksiyonunu organize edecek miktarda oksidan bulunur. Ayrıca trombositlerin kendisi de serbest oksijen radikali üretirler ve yara etrafında beyaz kan hücrelerinin ürettiği farklı serbest radikallerle iç içe dururlar. Yeterli oksidan miktarıyla aktive olmuş trombositler doku faktörü sentezini artırır. Bunun sonucunda ROS üretimi ve NADPH oksidaz üretimi artar (Çavdar ve ark., 2012; Sen ve Roy, 2008 ).

#### **4.4. Antioksidan**

Protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi oksidasyona maruz kalabilecek yapıların oksidasyonunu engelleyen veya oksidasyon süresini geciktiren maddelere antioksidanlar denir (Çavdar ve ark., 2012). Antioksidanlar küçük moleküller, tiyol içeren peptidler ve enzimler olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Küçük moleküller olarak adlandırdığımız grupta sırasıyla C ve E vitamini olarak adlandırılan askorbik asit ve  $\alpha$ -tokoferol bulunmaktadır. C ve E vitamini olarak adlandırdığımız bu antioksidanlar bir elektronu serbest radikal vererek dengeli bir elektron çifti oluştururlar ve radikal reaksiyon zincirlerini bozarlar (Castro ve Freeman, 2001; Gewanther, 2011).

*C vitamini*, suda çözünebilir ve radikal reaksiyon zincirlerini kırabilme özelliğine sahip bir antioksidan olduğundan dolayı  $O_2^{\bullet-}$  ve  $OH^{\bullet}$  radikallerinin temizlenmesinde kritik bir role sahiptir (Şekil 7).

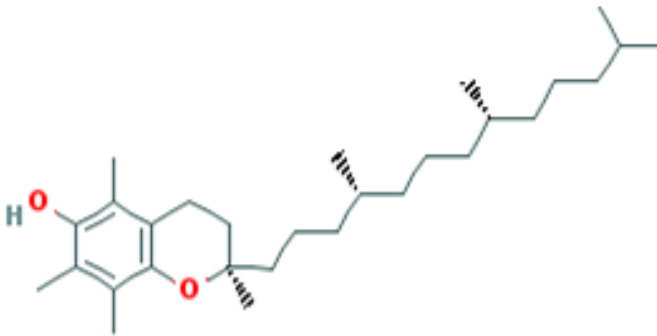


**Şekil 7.** C vitamini Yapısı

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54670067#section=2D-Structure>

Erişim Tarihi: 06.03.2018)

*E vitamini*, yağda çözünebilir esas antioksidandır ve bu özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan özelliği vardır (Şekil 8). Bu özellik membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunun ve hücre membranlarının hasar görmesini engellemektedir (Carr ve ark., 2000).



**Şekil 8.** E Vitamini Yapısı

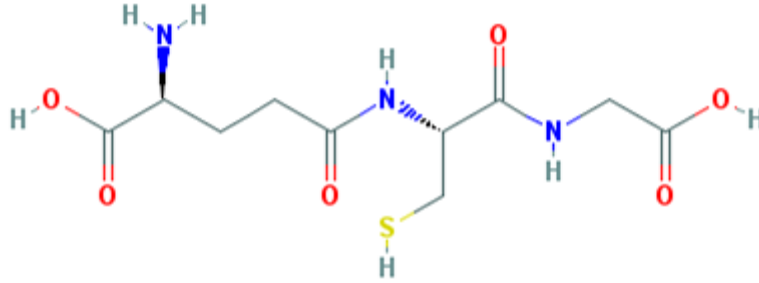
([https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=6560141&width=500&](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=6560141&width=500&height=500)

eight=500 Erişim tarihi: 2.04.2018)

Antioksidanların tiyol içeren peptidler grubunda glutatyon (GSH) ve sistein (CYS) bulunmaktadır. Bu peptidler, ROS ve oksitlenen makromoleküllere elektron veren tiyol gruplarını içerir (Gewanther, 2011; Jones ve ark., 2004). Antioksidanların son sınıfı ise, okside olmuş proteinleri, peptidleri veya ROS' u azaltan enzimleri içerir. Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksidin hidrojen peroksit haline dönüşmesini katalize eder ve daha sonra katalaz ile suya dönüştürülür. Tioeredoksin (Trx) hücrel proteinlerde okside tiyolleri azaltır. Glutatyon redüktaz (GR), GSSG redükte ederken, tioeredoksin redüktaz (TrxR), tioeredoksinin oksitlenmiş halini azaltır (Kalinina ve ark., 2008).

#### 4.5. Glutatyon

Glutatyon (GSH) canlı yapısında var olan önemli bir antioksidan moleküldür (Şekil 9). Hücrede hasar oluşturabilecek olan ROS'lar, serbest radikaller, peroksitler ve lipid peroksitleri gibi oksidan maddelerin aktivitesini durdurmakta önemli bir rol oynarlar. Glutatyonun yapısında glisin, sistein ve glutamik asit aminoasitleri bulunur (Pompella ve ark., 2003).



**Şekil 9.** Glutatyon Yapısı

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886#section=Top>)

Erişim tarihi: 2.04.2018)

GSH OH• radikalının giderilmesinde aktif bir rol üstlenmekte birlikte, hemoglobinin oksitlenmesi sonucu oluşan methemoglobinin engellenmesi ve proteinlerin oksidasyona uğrayan sülfidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak oksidasyona uğramasına karşı koruyucu bir role sahip antioksidandır(Liska, 1998).

Glutasyonun toksikoloji açısından önemi ise yapısında bulunan aminoasitlerden sistenin –SH grubunun nükleofilik özellik göstermesi ve asetaminofen molekülünün toksik metaboliti olan N-asetil-p-benzo-kinonimin ile sistein bağlantılı konjugat oluşturarak asetaminofen (parasetamol) zehirlenmesinin engellenmesindeki rolüdür. Doz miktarı yüksek asetaminofen alınması durumunda karaciğerde var olan GSH miktarı tükendiğinden dolayı toksik metabolit karaciğer hasarına yol açabilmektedir. Bu yüzden klinikte, GSH prekürsörü olan N-asetil-sistein ile tedavi yoluna gidilerek GSH sentezinin artması amaçlanır (Pompella ve ark., 2003; Hodgman ve Garrard, 2012).

#### **4.6. Malondialdehit**

Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonu sırasında ortaya çıkan son ürünlerden biridir ve lipit peroksidasyonunun varlığını ortaya koymak için kullanılan bir belirtidir. Üç ve üçten fazla çift bağ içeren veya uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda meydana gelir. (Ayala ve ark. 2014). MDA, yapısı gereği küçük moleküldür ve bu durumdan dolayı vücutta diğer bölgelere rahatlıkla girebilir. Reaktivite seviyesi yüksek olduğundan dolayı proteinlerle ve DNA ile etkileşime girerek çapraz bağlar meydana getirir ve proteinlerin ve DNA'nın işlevinde bazı bozukluklara yol açar. DNA'da meydana getirdiği adduktlar sebebiyle mutajenik özellik taşımaktadır (Marnett, 1999).

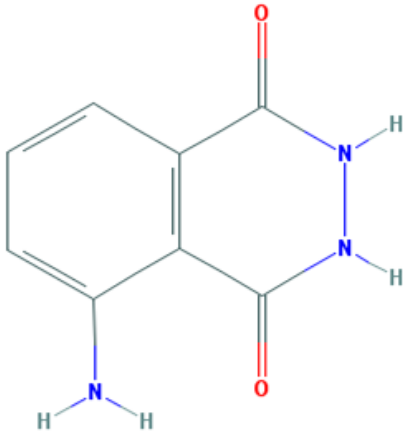
#### **4.7. Myeloperoksidaz Aktivitesi**

Bir peroksidaz enzimi olan myeloperoksidaz (MPO), memeli canlılarda nötrofillerin granüllerine yerleşmiştir. Bu enzimin görevi fagositoz gerçekleştiği aşamada mikroorganizmaların öldürülmesinde aktif bir rol oynamasıdır. Fagositoz sırasında reaktif oksijen türleri tarafından meydana getirilen  $H_2O_2$  ile vücut sıvılarında mevcut olan  $Cl^-$  iyonunu kullanarak hipokloröz asit (HOCl) sentezini sağlar. Meydana getirilen HOCl yüksek oranda antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Klebanoff, 2005). MPO seviyesinin artmasına bağlı olarak meydana gelen patolojik durumlarda durmadan gerçekleşen HOCl üretiminden dolayı dokularda istenmeyen durumlar meydana gelmektedir. Toksik bir madde olan HOCl oksidan özellik taşır ve lipitler, DNA ve proteinler ile etkileşime girerek oksidatif çapraz bağlanmalara sebep

olabilen halojenizasyon ve nitrasyon reaksiyonlarını getirebilir (Schuller-Levis ve Park, 2003).

#### 4.8. Kemilüminesans yöntemle reaktif oksijen türlerinin ölçülmesi

Kararsız durumda bulunan uyarılmış bir atom veya molekülün elektronu olması gereken enerji seviyesine inerken yüksek olan enerjisini ışık halinde uzaklaştırarak “lüminesans” olarak adlandırılan ışık yayılmasını meydana getirir. Ortaya çıkan ışık yayılması eğer bir kimyasal tepkime ile meydana geliyorsa bu duruma “kemilüminesans” (KL) adı verilir (Greenwald, 1985). KL yöntem, diğer yöntemlere göre büyük avantajlara sahiptir. Işık, sıcaklık, hücre konsantrasyonu, pH gibi etmenler KL yöntemini etkileyebilmektedir. ROS’lar yapılarından dolayı *in vivo* olarak miktarları hemen ölçülemez. Bundan dolayı biyolojik olarak ROS miktarını ölçebilmek için KL sinyalini arttırmak gereklidir. Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-fitalazin-dion) (Şekil 10) ve lusigenin (bis-N-metil akridinyum nitrat) problemleri kullanılarak ROS miktarları ölçülebilmektedir. (Lu ve ark., 2006).



Şekil 10. Luminol Yapısı

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10638#section=Top> Erişim tarihi: 02.04.2018)

#### 4.9. Sitokinler

Sitokinler, hücreler arasında etkileşim, iletişim gibi önemli konularda düzenleyici role sahip ufak proteinlerdir. Hücrenin büyümesi, iyileşmesi ve yaralanma durumunda gibi bağışıklık ve inflamatuvar yanıtların düzenleyici olan sitokinler, birçok uyarılara karşı özel hücreler tarafından üretilirler (Zhang ve An, 2007). Sitokinler aynı hormonlar gibi düşük konsantrasyonlarda aktif hale geçen glikoproteinlerdir ve hücre yüzey molekülüne bağlanarak etki gösterirler (Özoran ve ark., 1994). Parakrin ve otokrin etkileri vardır. Parakrin yakında bir hücrede salgılandığı zaman etki eden sitokinlerdir. Otokrin ise sitokinin salgılandığı aynı hücrede etki etmesidir (Zhang ve An, 2007). Herhangi bir sitokin diğer sitokinin etkisini başlatabilir veya bitirebilir. Hem kendilerinin hem de diğer sitokinlerin reseptör oluşumunu ekspresyonunu sağlayan sitokinler multipl yapıya sahip ve iç içe geçen biyolojik aktiviteye sahiptirler (Özoran ve ark., 1994).



Sitokinler işlevlerine göre 4 ana grupta incelenirler (Güner ve ark).

**1-İmmün sisteme eşlik eden sitokinler;**

- Tip 1 interferonlar (IFN)
- Tümör nekrotizan faktör (TNF),
- İnterlökin-1 (IL-1),
- İnterlökin-6 (IL-6)
- Kemokinler bu grupta yer alır.

**2-Lenfosit aktivasyonu, büyüme ve T lenfositlerinin spesifik antijenlere karşı yanıtına etki eden sitokinler;**

- İnterlökin-2 (IL-2) (T-hücresi büyüme faktörü)
- İnterlökin-4 (IL-4) (IgE sentez regülatörü)
- Transforming büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ )

**3-Enflamasyonu düzenleyen sitokinler. Antijenle uyarılmış  $CD_4^+$  ve  $CD_8^+$  hücrelerinin T hücresi regülasyonuna girmesinin sağlarlar;**

- İnterferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Mononükleer fagositlerin birincil aktivatörü)
- Lenfotoksin (LT) (Nötrofil aktivatörü)
- İnterlökin-10 (IL-10) (Mononükleer fagositlerin negatif regülatörü)
- İnterlökin-5 (IL-5) (Eosinofil aktivatörü)
- İnterlökin-12 (IL-12) (Naturel Killer (NK)
- T hücre stimülatörü)

**4-İmmatür lökosit büyüme ve farklılaşmasına aracılık eden mediatörler;**

- C-kit-ligand
- İnterlökin-3 (Koloni stimüle eden faktör)
- Granulosit-makrofaj koloni simulatör faktör (GMCSF)
- Monosit-makrofaj koloni uyaran faktör (M-CSF)
- Granulosit koloni stimülatör faktör (G-CSF)
- İnterlökin-7 (IL-7)
- İnterlökin-9 (IL-9)
- İnterlökin-11 (IL-11)

Sitokin işlevlerine göre inflamasyonda IL-1 ve TNF- $\alpha$  en önemli iki sitokindir. Proinflamatuvar olarak adlandırılan bu iki sitokin, aktive makrofajlar, lenfosit ve bunların dışında kalan hücre çeşitleri tarafından oluşturulurlar. Kollajen sentezi ve fibroblast proliferasyonunu arttırarak fibroblastik etkilere sahiptirler.

Son yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın akut inflamasyonda ve antitümöral aktivitede en önemli sitokin olduğu belirlenmiştir. TNF- $\alpha$  genel olarak T hücreler, B hücreler, fibroblastlar, kupfer hücreleri, düz kas hücreleri gibi birçok hücre çeşidinden salgılanmaktadır. Bundan dolayı TNF- $\alpha$ 'nın yara iyileşmesinde önemli bir rolü vardır. TNF- $\alpha$ 'nın üretimi IL-10, TGF- $\beta$ , PGE, siklosporin A, deksametazon, ibuprofen, metilprednizolon ve pentoksifilin tarafından inhibe edilir (Kurulay ve Çavdar, 2006).

IL-1 biyolojik etkileri esas alındığında TNF- $\alpha$  ile benzer özelliklere sahiptir. Düşük yoğunlukta bölgesel inflamatuvar olaylara aracılık eder. IL-1, IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  olmak üzere iki farklı genden oluşan ancak biyolojik etkileri aynı olan 2 ana polipeptidten oluşmaktadır. Dolaşımdaki IL-1 aktivitesinin çoğu IL-1 $\beta$ 'dir (Güner ve ark., 1997). IL-1; romatoid artrit, septik şok, periodontitis, malignite, asbestoz, tüberküloz ve AIDS gibi önemli hastalıkların aktivitesinde ilişkisi vardır. Ayrıca radyasyonun ölümcül dozlarına karşı ve kanser hücrelerinin büyümesinin durdurulmasında tedavi amaçlı geliştirilmiştir (Kurulay ve Çavdar, 2006). Monositler ve makrofajlardan salınan IL-1 $\beta$ , bunların yanı sıra fibroblastlar ve endotel hücreler gibi immün sistem dışı hücrelerden salınarak hücre hasarı, enfeksiyon ve inflamasyona etki ederler (Zhang ve Jianxiong, 2007).

#### **4.10. Oksidatif DNA Hasarı ve Ölçüm Yöntemleri**

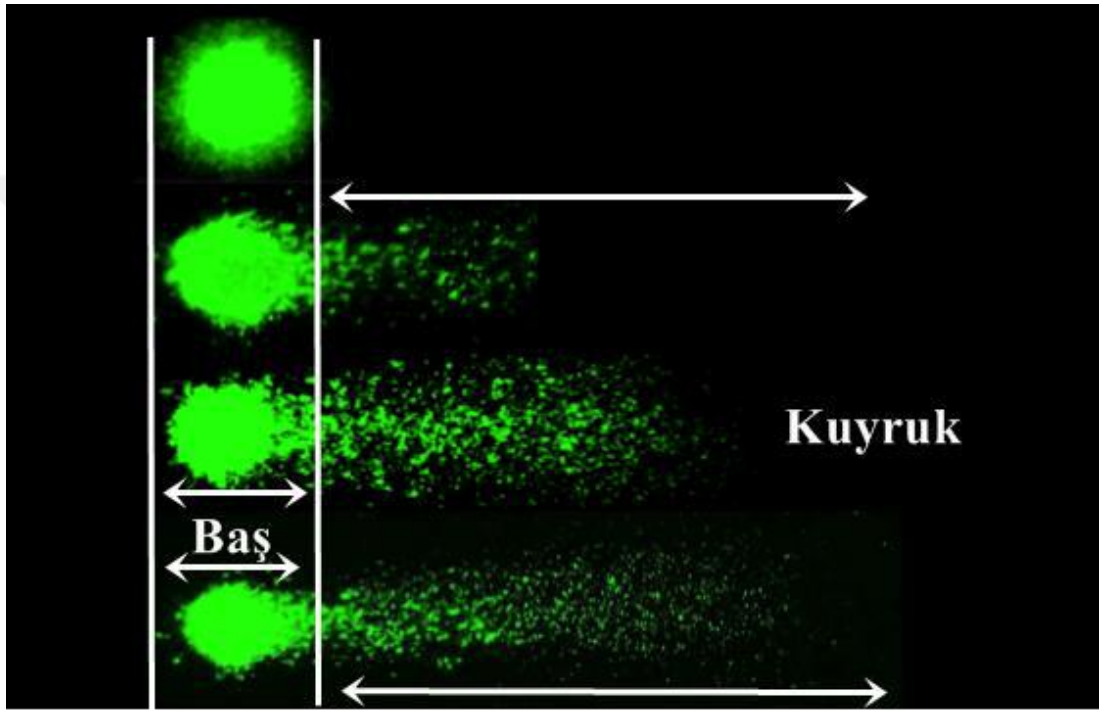
Oksidatif strese bağlı DNA hasarının birçok hastalığa neden olduğu bilinmektedir. Bunların en başında kanser olmakla birlikte nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve kalp yetmezliği gibi birçok hastalık gelmektedir. ROS'lar DNA yapısında bulunan bazların çift bağlarına H atomunun dahil olması veya 2-deoksiribozun C-H bağlarından ve metil gruplarından H atomu uzaklaştırılması yöntemiyle DNA molekülü ile etkileşimde bulunurlar. Sonuç olarak meydana gelen peroksil radikalleri indirgenerek timin glikol, 5-formilürosil ve hidroksihidroperoksit

gibi oksidasyon türleri oluşur. DNA baz mutasyonları içinde en çok bilineni 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG, 8-hidroksideoksiguanozin)'dir. 8-OHdG, OH• radikalının guanin bazının 8. pozisyonunda etkileşime girerek oluşmaktadır. 8-OHdG bunun yanında doku ve kanda tayini yapılabilen ve DNA hasarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır. (Henle ve ark., 1995; Goto ve ark., 2008). Guanin (G) bazının okside olmuş hali olan 8-OHdG, adenin (A) ve sitozin (C) ile baz çifti oluşturabilir ve A:T 'i C:C'e veya G:C'i T:A'e dönüşümüne yol açarak mutasyonlara sebep olabilir (T: timin). Baz çiftlerinde meydana gelen bu gibi mutasyonlar DNA polimeraz enzimi aracılığıyla baz eksizyon onarım mekanizması ile onarılmaktadır (Barzilai ve Yamamoto, 2004; Kohen ve Nyska, 2002; Kryston ve ark., 2011).

#### **4.10.1. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) tekniği (Comet tekniği)**

Tek hücre jel elektroforezi tekniği ya da comet tekniği ilk olarak Rydberg ve Johanson tarafından geliştirilerek birey hücrelerinin radyasyona uğramasından kaynaklı DNA sarmalında meydana gelen hasarın belirlenmesinde kullanılmıştır. Hücreleri lam üzerinde agarozaya yayarak orta derece alkali bir ortamda lizise uğratarak DNA sarmalının açılmasının hemen ardından akrinin oranj ile boyayıp mikroskop ile yorumlanmasıdır (Rydberg ve Johanson, 1978). Bu tekniğin yaygın olarak kullanılmasının sebebi, orta dereceli alkali şartlar altında hücrede var olan bütün proteinlerin alkali ortama geçmemesidir. "Mikrojel elektroforezi" olarak isimlendirilen teknikte ise aynı şekilde hücreler lam üzerinde agarozaya yayılır ve nötral deterjan solüsyonu ile lizis işleminin ardından nötral şartlar altında elektroforez yöntemi uygulandıktan sonra akrinin oranj ile boyayarak mikroskopta incelenmiştir (Ostling ve Johanson, 1984). DNA sarmalında kırık oluşması halinde elektroforez sırasında (-) yüklü DNA'da bulunan hasarlı bölgeler çekirdekten anoda doğru hareket ederler. Bu durumun Mikroskopta görünen hali ise kuyruklu yıldız gibidir. Bunun sebebi ise çekirdek merkez, baş ve göç eden kuyruk kısmının meydana gelmesidir. Oluşan Kuyruklu yıldız görüntüsünden dolayı bu yöntem "comet tekniği" adı verilmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA sarmalının her iki kolunda bulunan kırıklar belirlenebilir ancak tek kolda bulunan kırıklar belirlenemez.

Mikrojel elektroforezi yöntemini değişikliğe uğratan Singh ve ark., DNA tek kolda bulunan kırıkları belirlemeyi sağlamıştır (Singh ve ark., 1988). Elektroforez sırasında hasara uğramış DNA parçaları çekirdekten serbest hale geçer. DNA'nın hareket etme kabiliyeti ise hasarın büyüklüğüne ve hasar şiddetine bağlıdır. DNA çekirdekte gergin bir görünüm oluşturuyorsa hasar düzeyi düşük anlamına gelir. Eğer kuyruk ve baş ayrılıyorsa hasar düzeyi yüksek anlamına gelir (Şekil 11). (Fairbairn ve ark., 1995).



**Şekil 11.** Comet görünümü

DNA'daki hasar miktarının belirlenmesinde floresan mikroskopu ile gözle skorlama yapılır ve hücreler kuyruk uzunluklarına göre; hasarsız, az hasarlı, hasarlı ve çok hasarlı olarak sınıflara ayrılır. Görüntü analiz programları sayesinde kuyruk uzunluğu, kuyruk hareketi ve kuyrukta oluşan DNA yüzdesi (%DNA<sub>T</sub>) gibi birçok sonuç elde edilebilir. Bunun için floresan mikroskobuna eklenmiş bir kamera kullanılır (Collins, 2002).

#### **4.10.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin**

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG, 8-hidroksideoksiguanozin) düzeyi oksidatif stres esnasında meydana gelen DNA hasarının bir belirleyicisi olarak

çoğunlukla kullanılan bir göstergedir. İlk defa 1984 yılında Kasai ve ark. çalışmaları ile gıdalarda ısı sonucu meydana gelen mutajenlerin izolasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada ortaya çıkarılmıştır. (Kasai ve ark., 1984; Kasai ve Nishimura, 1984).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda 8-OHdG'nin önemi vurgulanmış ve birçok hastalıklarla bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Kanser, yaşlanma, Alzheimer, katarakt, tip II diyabet ve hipertansiyon gibi hastıklara sahip hastalarda 8-OHdG düzeylerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bir başka örnek ise sigara içiminden dolayı meydana gelen akciğer kanserinin potansiyel bir belirleyicisi olarak kabul edilmiştir. (Syslová ve ark., 2014). Ayrıca X-ışınları, asbest, benzen, parakuat, UV, ağır metaller gibi maddeler 8-OHdG oluşumunda rol oynayan ajanlara örneklerdir.

#### **4.11. *Scorzonera veratrifolia* Bitkisi**

*Compositae (Asteraceae)*: Yeryüzünde 1000'e yakın cins ve 20.000 kadar tür ile çiçekli bitkiler arasında en zengin familyaya sahip bitki *Compositae (Asteraceae)* familyasıdır (Şekil 12). Yurdumuzda bu familyaya ait 130'a yakın cins ve 1100'den fazla tür bulunmaktadır ve bu bitkilerin çoğu otsu yapıda olmakla beraber, çallı veya ağaç formunda olanların sayısı azdır. Bu Familyada bulunan bitkilerin içeriğinde uçucu yağ, inülin ve lateks en sık rastlanan bileşiklerdir. Ayrıca yapılan çalışmalar ile seskiterpenler, laktonlar, alkoloitler (Senecio), esterler (piretrinler), sapozonitler, kumarinler ve flavonollerin de bulunduğu saptanmıştır. İçerdikleri bileşikler nedeniyle bitkilerin çoğu eczacılıkta, gıda endüstrisinde ve lateksinden dolayı da diğer sanayi alanlarında kullanılmaktadır. Halk arasında tıbbi tedavide kullanılan bu bitkiler üzerine son yıllarda çok sayıda fitokimyasal araştırma yapılmış ve birçok yeni madde izole edilmiştir. Böylece bu familyaya ait antitümör etki ve antibakteriyel aktivite gösteren bitkilerin de bulunduğu ortaya çıkmıştır (Tanker ve ark., 1993). Bu familyaya ait olan *Scorzonera veratrifolia* bitkisi ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır.



Şekil 12. *Compositae* (*Asteraceae*) ailesi

*Scorzonera*: Kökeni Antik Akdeniz olan, Avrasya'nın kurak bölgelerine yayılan ve Kuzey Afrika'da da görülen *Compositae* familyasına ait *Scorzonera* cinsi bitkilerin dünyada yaklaşık 180 türü bulunmaktadır. Türkiye'de *Scorzonera* Chamberlain tarafından revize edilmiştir. Bu bitki Sistemi; türlerinin birbirlerine yakın olmasından dolayı ayrımı zordur. Yıllık, iki yıllık veya çok yıllık otsu, nadiren odunsu, kalın-silindirik bazen yumrulu olarak bulunmaktadırlar. Yaprakları direkt kökten gelir veya sap şeklinde sade (basit) ve bütündür. Doğrusal, geniş oval şeklinde veya saplı ve sapsız olabilmektedir. Çiçekleri sarımsı, mor veya çiçeği sarı sapı mor şeklinde bulunur. Akenleri silindirik, pürüzsüz ya da damarlı, bazen enine buruşuk yapraklı, tüylü veya tüysüz, bir sapa sahip ya da sapsızdırlar (Chamberlain, 1975). *Scorzonera* cinsinin ilk kapsamlı analizi de Candolle tarafından yapılmıştır. (Candolle, 1805).

*Scornozera veratrifolia* bitkisi 1600-2500 metre yükseklikte, kıraç kayalık tepe yamaçlarında yetişen bir bitki türüdür (Resim 3). Çiçek açma dönemi Haziran ayı içerisinde gerçekleşir. Türkiye'de kayıtlı olduğu iller Hakkari, Tunceli, Van olarak saptanmıştır. Bitki bulunduğu yörelerde Nalbant, Neraband, Yarasakızı otu olarak da

adlandırılmaktadır. Bitkinin haricen elde edilen sütü yöre halkı tarafından yara tedavisinde kullanılmaktadır. (Doğan A., 2014).



**Resim 3.** *Scornozera veratrifolia*

Yapılan literatür taramasında, *Scornozera veratrifolia* için hiçbir fitokimyasal çalışma tespit edilememiştir. (Sarı ve ark., 2011) yapılan çalışmada *Scornozera veratrifolia*'nın kökünden 2 yeni 3-benzilftalat (skorzoveratrin ve skorzoveratrozit) ve daha önce tanımlanmış 5 adet kuinik asit türevi bileşik (kolorojenik asit, kolorojenik asitin metil esteri, kriptokolorojenik asit, 4,5-dikaffeolkuinik asit ve 3,5-dikaffeolkuinik asit) izole etmiştir (Sarı A., 2010).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar.

Kimyasal Adı	Firma
Melatonin	Sigma-Aldrich
Ksilen	Merck
Etanol	Merck
Metanol	Merck
HCl	Merck
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma
o-dianizidin	Sigma-Aldrich
Sodyum Azid	Sigma-Aldrich
Hekzadesiltrimetilamonyum bromür	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA)	Sigma-Aldrich
Yüksek kaynama dereceli agaroz (HMA)	Sigma-Aldrich
RPMI	Sigma
Histopaque	Sigma
Sodyum klorür	Merck
Tris	Sigma
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik asit (TCA)	Sigma-Aldrich
5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma-Aldrich
Fosfat tamponu (PBS)	Sigma



## 5.2. Kullanılan Cihazlar

Yöntemlerde kullanılan cihazlar Tablo 2' de yer almaktadır.

**Tablo 2.** Yöntemlerde kullanılan cihazlar

<b>Cihaz</b>	<b>Marka</b>
Doku gömme cihazı	Mikrom-AP280, İngiltere
Doku su banyosu	FALC-B-1, İtalya
Doku takip cihazı	Thermo Scientific-Shandon Citadel 2000, ABD
Elektroforez tankı	Thermo EC 340, ABD
Etüv	Thermo, ABD
Floresan ataçmanlı mikroskop	Olympus-BX51, Japonya
Hassas terazi	Shimadzu-AX-120, Japonya
Luminometre	EG&G Berthold Junior LB 9509, Bad Widbad, Almanya
Işık Mikroskobu	Olympus-CX4IRF, Japonya
Mikrotom bıçağı	Feather, Japonya
pH metre	WTW İnoLab, Almanya
Rotari mikrotom	Leica RM2125 RTS
Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 320R, Almanya
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 73, ABD
Vorteks	Dragonlab MX-S, Çin

### 5.3.Kullanılan Çözeltiler

Yöntemlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 3’de yer almaktadır.

**Tablo 3.** Yöntemlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışları
<b><i>Toplam fenolik madde içeriğinin tayini için kullanılan çözeltiler</i></b>	
0,2 N Folin-Ciocalteu’s reaktifi	2N’lik hazır satın alınan çözeltiden saf su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanır
%7,5’lik sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) çözeltisi	7,5 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 100 ml distile suda çözülerek hazırlanır
Stok gallik asit çözeltisi	10 mg gallik asit 10 ml metanolde çözülür (1 mg/ml).
<b><i>Demir (III) indirgeme/antioksidan kuvvet (FRAP) tayininde kullanılan çözeltiler</i></b>	
Stok Troloks® çözeltisi	1000 $\mu\text{M}$ stok Troloks® etanolde hazırlanır
A: 150 ml 300 mM asetat tamponu (pH=3.6)	45 mM asetik asit (derişik) alınır, hacim saf su ile 40 ml’ ye tamamlanır ve üzerine 90 ml metanol ilave edilir. 0,5 M NaOH ile pH=3.6’ ya ayarlanır ve son hacim 150 ml’ye saf su ile tamamlanır.
B: 15 ml 10 mM [2,4,6-Tris(2-pridyl)-s-triazine (TPTZ)’nin 100 mM HCl’deki çözeltisi	0,0468 g TPTZ tartılır, 6 ml 100 mM HCl ve 9 ml metanol ile çözülür.
C: 15 ml 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0811 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6 ml distile suda çözülür ve üzerine 9 ml metanol ilave edilir.
FRAP reaktifi	A, B ve C çözeltileri taze hazırlandıktan sonra, A, B ve C çözeltileri karıştırılır.

***DPPH radikal temizleme aktivitesi tayini için kullanılan çözeltiler***

100 µM DPPH çözeltisi	100 µM DPPH çözeltisi metanolde hazırlanır
Stok Troloks® çözeltisi	200 µM DPPH çözeltisi etanolde hazırlanır
Stok askorbik asit (C vitamini)	100 µM stok askorbik asit çözeltisi distile su ile hazırlanır.

***Dokularda glutatyon (GSH) düzeylerinin ölçülmesi için kullanılan çözeltiler***

%10'luk TCA çözeltisi	10 ml TCA distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.
0,3 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,339 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 ml distile su içinde çözülür.
Ellman ayıracı (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit), DTNB)	0,010 g DTNB 25 ml metanol içinde çözülür.

***Dokularda malondialdehid (MDA) düzeylerinin ölçülmesi için kullanılan çözeltiler.***

%10'luk TCA çözeltisi	10 ml TCA distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.
%0,67'lik TBA çözeltisi	0,67 g TBA 100 ml distile su içinde çözülür.

***Dokularda myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçülmesi için kullanılan çözeltiler***

MPO 1. Çözelti	1 g %0,5 HETAB, 1,7418 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mM), 160 ml distile su karıştırılır ve pH 6'ya ayarlanır. Rengi parlak olana kadar karıştırıldıktan sonra 200 ml'ye tamamlanır.
MPO 2.Çözelti	1 g %0,5 HETAB 1,7418 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mM), 0,585 g EDTA (10 mM), 160 ml

	distile su ile karıştırılır ve pH 6'ya ayarlanır. Sonra 200 ml'ye tamamlanır.
MPO 3.Çözelti	1,7418 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mM) ile 160 ml distile su karıştırılır ve pH 6'ya ayarlanır. Sonra 200 ml'ye tamamlanır.
20 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 ml distile su ve 11,4 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%30'luk)
%2 Sodyum azid	100 mg sodyum azid, 5 ml distile su
O-dianizidin	50 mg o-dianizidin ve 2,5 ml distile su

***İnterlökin 1 beta (IL-1β) ve Tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) düzeylerinin ölçülmesi için kullanılan çözeltiler (Çözeltiler kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.)***

Yıkama solüsyonu	%1 Tween 20 içeren PBS
Biotin konjugatı	Biotin-konjuge anti-rat IL-1β poliklonal antikor ya da Biotin-konjuge anti-rat TNF-α poliklonal antikor
Durdurma solüsyonu	1 M fosforik asit
Substrat solüsyonu	Tetrametil benzidin (TMB)

***Alkali comet tekniği için kullanılan çözeltiler.***

10 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi	400 g NaOH'nin, 1000 ml distile sudaki çözeltisi hazırlanır ve +4 °C' de saklanır.
0,2 M M etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi	37,2 g EDTA'nın 500 ml distile sudaki çözeltisi hazırlanır ve +4 °C' de saklanır.
5 N hidroklorik asit (HCl) çözeltisi	91,25 ml HCl distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.
100 µg/mL etidyum bromür (EB) çözeltisi	5 mg EB'nin 50 ml distile sudaki çözeltisi hazırlanır. +4 °C' de saklanır.

	Lamlar boyanacağı zaman bu stok çözelti, 1:4 oranında distile su ile seyreltilip kullanılır
Stok lizis çözeltisi	146,1 g 2,5 M NaCl; 37,2 g 100 mM EDTA; 1,2 g 10 mM Tris'in 1000 ml distile sudaki çözeltisi hazırlanır. Çözeltinin pH'sı NaOH (5M) ile 10'a ayarlanır. Hazırlanan stok lizis oda sıcaklığında saklanır.
Lizis Çözeltisi	53,4 ml stok lizis çözeltisine 6 ml DMSO ve 0,6 ml triton-X 100 ilave edilerek lizis çözeltisi hazırlanır.
Düşük kaynama dereceli agar (LMA) (%0,65)	650 mg LMA tartılır, üzerine 100 ml PBS ilave edilip çözülene kadar ısıtılır.
Yüksek kaynama dereceli agar (HMA) (%0,65)	650 mg HMA tartılır, üzerine 100 ml distile su ilave edilip çözünene kadar ısıtılır.
Elektroforez çözeltisi	37,5 ml NaOH (10 M) çözeltisi; 6,75 ml EDTA (0,2 M) çözeltisi ve 1250 ml distile su kullanılarak hazırlanır. Elektroforez çözeltisi taze olmalıdır. Hazırlanan çözelti kullanılabildiği kadar +4 °C'de saklanır.
Nötralizasyon tamponu	48,5 g Tris (0,4 M)'in 1000 ml distile sudaki çözeltisi hazırlanır ve HCl (5 N) ile pH 7,5'e ayarlanır. +4°C'de saklanır.

### ***MTT yönteminde kullanılan çözeltiler***

Hücre kültür medyumunu	%10 FBS (İnvitrogen), %1 streptomisin/penisilin (Hyclone) ve 2 mM glutamin (Hyclone) içeren düşük glukozlu DMEM (İnvitrogen) içerisinde
------------------------	---

---

	hazırlandı.
Stok MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolyum bromür) çözeltisi	Kit içerisinde bulunan 1 vial MTT üzerine 1 ml steril PBS eklenerek 12 mM stok çözelti hazırlandı.

---



## 5.4. Deneysel Çalışma

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 07.03.2016 tarihli ve 035.2016.mar numaralı onayı alınarak gerçekleştirildi.

Çalışmada, eşit sayıda yetişkin erkek ve dişi Wistar albino sıçanlar (250-300 g) kullanıldı ve sıçanlar Marmara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAMER) temin edildi. Sıçanlar, deney öncesi iki haftalık sürede laboratuvar koşullarına alıştırdı (12 saat aydınlık/karanlık periyodunda ve 20°C±2). Sıçanlar, standart yem ve çeşme suyu (*ad libitum*) ile beslendi.

### 5.4.1. Deneysel Grupları

Çalışmada rastgele seçilen 30 sıçan, her biri 6 sıçandan oluşan 5 gruba ayrıldı. Sıçanlara intraperitoneal olarak ketamin (100 mg/kg) enjeksiyonu ile genel anestezi yapıldı. Sıçanların sırt kısımları tıraşlanarak, traşlı bölge batikon ile dezenfekte edildi. Sırtın orta bölgesinden 1,5 cm uzaklıkta bistüri ile tam cilt kalınlıklı iki adet 5 cm'lik çizgi şeklinde kesi yarası oluşturuldu. Oluşturulan yaralara cerrahi ipek iplikle eşit aralıklarla dikiş atıldı. 10. gün sonunda hayvanlar dekapite edilerek kan ve deri örnekleri alındı. Deneysel süresince ölen ya da hastalanan hayvan olmadı.

**GRUP 1: Kontrol (K) Grubu:** Bu gruptaki sıçanlarda kesi yarası oluşturulup dikiş atıldıktan sonra hiçbir tedavi uygulanmadı.

**GRUP 2: Negatif Kontrol (NK) Grubu:** Madecassol® pomadın bazı olan glikol stearat: 1,2 propilen glikol: sıvı parafin (3:6:1) uygulandı. Bu amaçla, 3 g sıvı parafin, 9 g glikol stearat, 18 g 1,2 propilen glikol karıştırılarak 30 g baz elde edildi ve bu gruptaki sıçanlara elde edilen 30 g bazdan her bir hayvana 0,5 g olacak şekilde 10 gün boyunca günde 2 kez uygulandı.

**GRUP 3: Pozitif Kontrol (PK) Grubu:** Madecassol® pomad her bir hayvana 0,5 g olacak şekilde 10 gün boyunca günde 2 kez uygulandı.

**GRUP 4: Tedavi Heptan Ekstresi (HE) Grubu:** *S.veratrifolia* bitkisinin *in vitro* deney sonucunda elde edilen konsantrasyona bağlı olarak hazırlandı. Heptan ekstesini içeren 0,5 g baz merhem uygulandı. Bu amaçla, 2,97 g sıvı parafin, 8,91 g glikol stearat, 17,82 g 1,2-propilen glikol karıştırılarak 29,7 g baz elde edildi. Bu

baza 0,3 g heptan ekstresi ilave edilerek 30 g merhem elde edildi. Bu gruptaki sıçanlara elde edilen 30 g merhemden her bir hayvana 0,5 g olacak şekilde 10 gün boyunca günde 2 kez uygulandı.

**GRUP 5: Tedavi Metanollü Ekstresi (ME) Grubu:** *S.veratrifolia* bitkisinin *in vitro* deney sonucunda elde edilen konsantrasyona bağlı olarak hazırlandı; metanollü Ekstre içeren 0,5 g baz merhem uygulandı. Bu amaçla, 2,97 g sıvı parafin, 8,91 g glikol stearat, 17,82 g 1,2-propilen glikol karıştırılarak 29,7 g baz elde edildi. Bu baza 0,3 g metanol ekstresi ilave edilerek 30 g merhem elde edildi. Bu gruptaki sıçanlara elde edilen 30 g merhemden her bir hayvana 0,5 g olacak şekilde 10 gün boyunca günde 2 kez uygulandı.

#### 5.4.2. Kesi yarasının oluşturulması

Sıçanlara intraperitoneal olarak ketamin (100 mg/kg) enjeksiyonu ile genel anestezi yapıldı. Sıçanların sırt kısımları tıraşlanarak, traşlı bölge batikon ile dezenfekte edildi. Sırtın orta bölgesinden 1,5 cm uzaklıkta bistüri ile tam cilt kalınlıklı iki adet 5 cm'lik çizgi şeklinde kesi yarası oluşturuldu (Resim 4). Oluşturulan kesi yaralarına cerrahi ipek ile dikiş atıldı.



**Resim 4.** Kesi yarası oluşturulan sıçan



### **5.4.3. DeneYlerin sonlandırılması ve örneklerinin toplanması**

Deney gruplarında yer alan sıçanlar 10. gün sonunda giyotinle dekapite edilerek çalışma sonlandırıldı. Kan ve deri örnekleri toplandı. Kan örnekleri ikiye ayrılarak, ilk kısımda taze kan ile comet tekniğı çalışıldı. İkinci kısımdan ise kan serum örnekleri ayrılarak aynı gün ticari ELİSA kit kullanılarak TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 8-OHdG ölçümleri yapıldı. Doku örnekleri biyokimyasal parametreler çalışılana kadar -20°C'de saklandı. Işık mikroskobu çalışmaları için ise %10 nötral tamponlu formaline alındı.

## **5.5. In Vivo Yöntemler**

### **5.5.1. Kan örneklerinde DNA hasarının incelenmesi**

#### **5.5.1.1. Comet tekniğı ile DNA hasarının incelenmesi**

Alkali comet tekniğı protokolü Singh ve ark.'nın yönteminden minör modifikasyonlarla uygulanmıştır (Singh ve ark., 1988). Her örnek için iki lam çalışıldı. Her lam için bir endorf tüpüne 1'er mL PBS konuldu (+4°C). 100  $\mu$ l kan, tüplerdeki PBS (+4°C) üzerine eklendi. Karıştırıldı ve 10-15 *dk.* bekletildi. 100  $\mu$ l histopak tüpün dibine eklendi. 1640 rpm, +4°C'de 5 *dk.* santrifüj edildi. Comet yöntemi uygulanırken Tripan mavisini canlılık testi ile izole edilen periferik lenfositlerde en az % 95 canlılık tespit edilen örneklere comet tekniğı uygulanmıştır. İzole edilen periferik lenfositlerde %0,65'lik LMA ile karıştırılarak her bir örnek için iki lam olacak şekilde önceden HMA ile kaplanmış lamlara yayıldı ve lamel ile kapatıldı. Sonrasında lamalar +4°C'de donmaya bırakıldı. Lameller dikkatlice uzaklaştırılarak lamalar lizis çözeltisine alınarak (alüminyum folyo ile sarılı cam şalede) +4°C'de 1,5 saat bekletildi. Lizis işlemi tamamlanınca lamalar elektroforez tankına yerleştirildi. Lamalar tank içinde 20 *dk.* bekletildi. Güç kaynağı 300 mA ve 15 V'a ayarlanarak 20 *dk.* elektroforezde bırakıldı. Elektroforez sonrasında lamalar dikkatlice tanktan alınarak cam şale içerisinde ve +4°C'de 3x5 *dk.* olacak şekilde nötralizasyon özeltisinden geçirilerek nötralizasyon işlemine tabi tutuldu. Son olarak lamalar, her birinde 5 *dk.* tutularak, sırasıyla %50, 75 ve absöü alkol ile fikse edilerek

oda sıcaklığında ve karanlıkta kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamalar serin karanlık ortamda saklandı.

#### **5.5.1.1.1. Mikroskopta değerlendirme**

Görüntü analizi için hazırlanan her bir lam, floresan renk vermesi için önceden hazırlanan, 50 µL Et-Br ile boyandı ve lamelle kapatıldı. Her bir lamdan rastgele 50 (gruptaki her bir sıçan için toplam 100) lenfosit seçilerek X40 büyütme, 546 nm eksitasyon filtrelili ve 590 nm bariyer filtrelili kamera ataçmanlı floresan mikroskobu (Olympus, BX51) ile incelendi. Kamera ataçmanı ile çekilen görüntüler BAB Bs200Pro görüntü analiz programı kullanılarak hasar durumları değerlendirildi ve sonuçlar kuyruktaki DNA yüzdesi, %DNA<sub>T</sub>, olarak verildi.

#### **5.5.1.2. 8-OHdG düzeylerinin ölçümü**

Serum 8-OHdG düzeyleri ELISA kiti (Katalog No: E-EL-0028, ELABSCIENCE, Universal 8-OHdG(8-Hydroxydeoxyguanosine) ELISA Kit 96 test) ile ölçüldü. Yöntem, üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı. Yöntemin temeli 8-OHdG için spesifik bir antikora karşı biyotin işaretli 8-OHdG ile işaretli 8-OHdG (örnek ve standart) arasındaki yarışmalı inhibisyona dayanmaktadır. Serum 8-OHdG düzeyleri png/ml olarak ifade edildi.

#### **5.5.2. Dokularda biyokimyasal incelemeler**

##### **5.5.2.1. Malondialdehit ve glutatyon ölçümleri**

250-300 mg tartılan dokuların üzerine 10 katı hacimde %10 triklorasetik asit (TCA) eklenerek homojenize edilerek santrifüjlendi (3000 rpm, 15 dk.). Süpernatantlar alınarak eşit hacimde %0,67 tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de 20 dk. kaynatıldı. Süre sonunda tüpler soğutulularak spektrofotometrede 532nm'de ölçümler yapıldı. Sonuçlar nmol/g doku olarak ifade edildi (Yagi, 1984). Dokularda GSH düzeylerinin belirlenmesi için Ellman ayırıcı kullanıldı. Süpernatantların üzerine 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ile ditiyobis nitro benzoik asit içeren Ellman ayırıcı ilave edildi. Karanlıkta 15 dk. inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 412 nm'de ölçülerek sonuçlar µmol/ g doku olarak ifade edildi (Boyne ve Ellman, 1972).

### 5.5.2.2. Myeloperoksidaz aktivitesi tayini

Deri dokularında MPO aktivitesi tayini için spektrofotometrik yöntem kullanıldı (Hillegas ve ark., 1990). 0,25-0,30 g doku örneği ağırlığının 10 katı kadar (%w/v) çözelti I içerisinde buzda homojenize edildi. Elde edilen homojenattan 1,5 ml alınarak +4°C'de 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantlar atılarak üzerine 1,5 ml çözelti II eklendi ve vorteksenerek buz içerisinde bekletildi. İçerisinde 2900 µl çözelti III bulunan 37°C'deki tüplere 30 µl o-dianizidin ve 60 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi. Üst fazdan 50 µl örnek alınarak tüplere eklendi. 3 dk. sonra reaksiyonu durdurmak için %2'lik sodyum azid eklendi ve 460 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçüldü. Sonuçlar U/g doku olarak ifade edildi.

### 5.5.2.3. Kemilüminesans ölçümleri

Kemilüminesans ölçümleri luminol ve lusigenin problrarı kullanılarak luminometre (EG&G Berthold Junior LB 9509, Bad Widbad, Almanya) ile yapıldı ve sonuçlar rölatif ışık birimi (relative light unit-rlu) olarak ifade edildi. 10-30 mg'lık dokular kesilerek 2 ml PBS+HEPES (0,50 M fosfat tamponlu salin ve 20 mM HEPES) tamponu içeren sayım tüplerine alındı.

Luminol aracılı ölçüm ile hidroksil, hidrojen peroksit, hipoklorit ve hidroperoksil radikalleri tespit edilirken, lusigenin aracılı ölçüm ile süperoksit radikali tespit edilir. 0,2 M luminol veya lusigenin eklenen sayım tüpleri luminometrede 1 dk.'lık aralıklarla ve 5 dk. süre ile okutularak ölçümler alındı. Elde edilen ölçümler zamana karşı grafiğe geçirilerek 'eğri altı alan' hesaplandı ve AUC rlu/g doku olarak ifade edildi.

Nitrik oksit ölçümleri için saflaştırılmış luminol-hidrojen peroksit sistemi kullanıldı. Sayım tüpüne alınan dokuların üzerine sırasıyla 0,4 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 60 µM desferal, 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 3,6 µM saflaştırılmış luminol ilave edilerek luminometre ile sayım yapıldı (Kikuchi ve ark., 1993).

Kemilüminesans ölçümlerinin değerlendirilmesinde kullanılan 'eğri altı alan' (Area Under Curve, AUC) hesaplaması, luminometre ile elde edilen sayımların zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile yapılır. Elde edilen grafikten ölçüm noktalarının integrali alınarak AUC değeri hesaplanmaktadır (Kikuchi ve ark., 1993; Davies ve

ark., 1992; Haklar ve ark., 2002). Alan hesaplamada kullanılan formül aşağıda yer almaktadır.

$$\text{Alan} = \Delta t [(y_1/2) + y_2 + y_3 + \dots + y_{n-1} + (y_n/2)]$$

$\Delta t$ : Zaman aralığı.

n: Ölçüm noktası sayısı.

$y_1, y_2, \dots, y_n$ : Ölçümleri ifade eder.

### **5.5.3. Antiinflamatuvar aktivite**

#### **5.5.3.1. TNF- $\alpha$ düzeyleri**

Hücrel inflamasyonda son ürün olarak kabul edilen tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) üzerine *S.veratrifolia* ekstralarının etkinliği, deri dokularından elde edilen süpernatantlara TNF- $\alpha$  ELISA test kiti (BMS622, EBIOSCIENCE, Rat TNF-alpha Platinum ELISA 96 tests) uygulamasıyla belirlendi. Yöntem üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı. Elde edilen tüm doku örneklerinde TNF- $\alpha$  OD (optik dansite) değerleri mikrolaka okuyucu ile 495nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Test kitinin içerdiği standarttan elde edilen kalibrasyon grafiği ile hesaplamalar yapıldı. Sonuçlar pg/ml cinsinden ifade edildi.

#### **5.5.3.2. IL1- $\beta$ düzeyleri**

Serum örneklerinde IL1- $\beta$  düzeyleri ELISA test kiti (BMS630, EBIOSCIENCE, RAT IL-1 Beta Platinum Elisa Kit 96 test) ile kit protokolünde yer alan talimatlar doğrultusunda çalışıldı. Ölçümler mikrolaka üzerinde 495nm'de spektrofotometrik olarak ölçülecek ve standarttan elde edilen kalibrasyon grafiği ile örneklerin içerdiği IL1- $\beta$  Optik Dansite düzeyleri hesaplanacaktır. Sonuçlar pg/ml cinsinden ifade edildi.

## 5.6. *In Vitro* Yöntemler

### 5.6.1. *In vitro* sitotoksik ve yara iyileştirici aktivitelerinin tayini

NIH 3T3 fare fibroblast hücrelerinin çoğaltılması için % 10 fetal sığır serumu, 100 mM L-Glutamin ve % 1 Penisilin-Streptomisin içeren Dulbecco's modifiye Eagle medium (DMEM) kullanıldı. Hücrelerin üretilmesi ve çoğaltılması aşamaları "tissue culture" 25 cm<sup>2</sup> flasklarında, deney protokolü ve MTT test çalışmaları ise 24 kuyucuklu kültür plakalarında gerçekleştirildi. M.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda daha önceki projelerden temin edilmiş ve dondurulmuş olan hücreler çözüldükten sonra kültür medyumunda kültüre edilerek minimum 3. pasajdan sonra deneye alındı.

#### 5.6.1.1. Hücrelerin çözülmesi

Kültür işlemleri için -80 °C'den çıkarılan hücreler çok hızlı bir şekilde 37 °C'lik su banyosunda inkübe edildikten sonra, içerisinde PBS bulunan 15 ml'lik Falcon tüpüne aktarıldı ve yavaş bir biçimde süspanse edilip 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre sayımı yapıldı ve canlılıkları tripan mavisini ile kontrol edildi.

Hücrelerin canlılığının belirlenmesi: Tripan mavisini ölü hücrelerin membranlarından geçerek onları maviye boyayan bir diazo boyasıdır. NIH 3T3 fare fibroblast hücrelerinin canlılığını tayin etmek için, % 0,1 tripan mavisini kullanılarak mikroskop altında incelendi. (Kodama ve ark., 2001) Kültür kabında bulunan hücreler 15 ml'lik Falcon tüpüne alınarak 1300 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Üst faz atılarak, tüpün dibinde bulunan hücre çökeltisine 1 ml kültür medyumundan eklenecek ve pipet yardımıyla hücreler iyice süspanse edildi. İçerisinden 50 µL alınarak eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 50 µL Tripan mavisini eklenerek karıştırıldı. Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında, lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucunu dayayarak, tam orta noktasından yavaşça 50 µL hücre süspanسیونu pipetlendi. Thoma lamı mikroskopun tablasına yerleştirilerek mikroskop objektifi 40x'e ayarlanarak sayma alanı bulundu. Thoma lamında 16 büyük kare ve her karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400

kare vardır. 16 büyük karede bulunan canlı hücreler tek tek sayılarak not edilerek aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı belirlendi;

Hücre sayısı x Dilüsyon oranı x 10.000

### **5.6.1.2. Ekstrelerin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi**

Çalışmada insan akciğer kanseri A549 (ATCC, CCL-185), insan prostat kanseri PC-3 (ATCC, CRL-1435), insan kolon kanseri HT-29 (ATCC, HTB-38) ve insan serviks kanseri HeLa (ATT, CCL-2) hücre hatları kullanıldı. Kanser hücrelerinin çoğaltılması için % 10 fetal sığır serumu, 100mM L-Glutamin ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren Dulbecco's modifiye Eagle medium (DMEM) kullanıldı. MTT çalışmaları, Vybrant™ MTT hücre proliferasyon kiti (İnvitrogen) kullanılarak 96 kuyucuklu doku kültür kaplarında gerçekleştirildi. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheniltetrazolium bromid), hücre proliferasyonunu, canlılığını ve sitotoksiteyi ölçmede kullanılan kantitatif bir yöntemdir. Direkt olarak kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini ve buna bağlı olarak yaşayan hücre sayısının tespitini sağlar.

### **5.6.1.3. MTT yöntemi**

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheniltetrazolium bromid), hücre proliferasyonunu, canlılığını ve sitotoksiteyi ölçmede kullanılan kantitatif bir yöntemdir. Bu yöntem, mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanmaktadır ve hücre büyümesi ile ksenobiyotik sitotoksiteyi yansıtır. Tetrazolium tuzları (MTT, XTT, WST-1), genelde substrat olarak renksiz, canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi sonucu renkli ürünler veren maddelerdir. MTT bu amaçla kullanılan bir tetrazolium tuzudur ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Formazan tuzları, DMSO, izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünürler. Solventte çözünen materyalin optik dansitesi, çözülmüş olan formazan kristallerinin konsantrasyonunun verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçülen değer direkt olarak

kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini verir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir.

Hücreler çözüldükten sonra kültür medyumunda kültüre edildiler. 3. Pasajdan sonra hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırıldılar. Daha sonra 15 ml'lik Falcon tüpe alınarak 2000 rpm'de 5 dk. santrifüjleldiler. Santrifüj sonrası tüp içerisinde bulunan üst faz döküldü. Hücre pelleti 1 ml kültür medyumunu ile süspanse edildikten sonra hücre sayımı yapıldı. Bunun için %1'lik Tripan mavisi kullanıldı. Hücre sayımından sonra her bir kuyucuğa  $1 \times 10^4$  hücre ekildi ve 37°C'de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saat inkübasyona tabi tutuldular. Bu sürenin bitiminde, ekstreler 10, 50, 100, 200 µg/mL konsantrasyonlarda eklenerek 37°C'lik inkübatöre kaldırıldılar. Kültürün 48. Saatinde kültür kabında bulunan medyum çıkarıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl taze kültür medyumunu konulduktan sonra 10 µl MTT boyası (5 mg/ml) eklenerek hücreler 37°C'de 4 saat daha inkübe edildiler. İnkübasyon sonunda, canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 100 µl solubilizasyon çözeltisi eklendi 37°C'de 12 saat bekletildi. Kültür plağı mikroparka okuyucusuna konularak absorbans değerleri 540 nm dalga boyunda okutuldu. Referans dalga boyu olarak 630 nm dalga boyu kullanıldı. Hiçbir madde eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer % 100 kabul edildi. Ekstreleri içeren kültürlerden elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve hücrelerin canlılık oranları % olarak ifade edildi.

#### **5.6.1.4. *In vitro* yara iyileştirme aktivitesinin tayini**

NIH 3T3 fare fibroblast hücreleri sayılarak ertesi gün besi ortamında % 80-90 yoğunlukta olacak şekilde petri kaplarına ekilerek hücrelerin petri kabını tek tabaka halinde kaplamaları sağlandı. Petri kabına hücreler arasında eşit genişlikte boşluk olmasına özen gösterilerek 100 µL'lik pipet ucu yardımıyla çizikler atıldı. Başlangıçta, 24, 48 ve 72. saatte her bir çizik hattı 4 kez fotoğraflandı. Her zaman noktasındaki fotoğraflarda hücreler arasındaki boşluk ölçülerek ortalamaları alınarak farklı grupların zaman içerisinde boşluğu doldurma yüzdeleri hesaplandı.

### 5.6.3. Antioksidan aktivite

*S.veratrifolia* ekstralarının antioksidan kapasiteleri; serbest radikal yakalayıcı temizleyici aktivitenin belirlenmesinin yanı sıra total fenol miktarının saptanması esasına dayanan testler ile belirlendi. Bu amaçla DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi testi, Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi ve Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi (Folin-Ciocalteu Yöntemi) uygulandı.

#### 5.6.3.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi yöntemi

Ekstrelerin serbest radikal yakalama etkinliği 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak tayin edildi (Fu ve ark., 2010). 0,5-5 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan Ekstrelerden ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltilerden (askorbik asit ve BHT) 0,1'er ml alınarak, 3,9 ml 0,1 mM DPPH çözeltisi ilave edildi. DPPH çözeltisi ilave edilen ekstralar ve standart çözeltiler 1 dk. vortekslendikten sonra oda koşullarında ve karanlıkta 30 dk. bekletildi. Absorbansları 517 nm'de UV-spektrofotometrede (Shimadzu 1800) referansa karşı ölçüldü. Örnek ve standart madde yerine 0,1 ml metanol kullanılarak aynı şartlarda kontrol hazırlandı. Kontrolün absorbansı günlük ölçüldü. Deney üç kez tekrarlanarak ortalaması alındı. IC<sub>50</sub> değeri hesaplanmadan önce % DPPH radikali giderme kapasitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\% \text{ DPPH radikali giderme kapasitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 ]$$

A<sub>0</sub> : Kontrol çözeltisinin absorbansı,

A<sub>1</sub> : Bitki ekstraları ve standart çözeltilerin absorbansı

Başlangıç DPPH' derişiminde % 50 azalmaya neden olan ekstre ve standart madde konsantrasyonu IC<sub>50</sub> olarak tanımlanır. Bu değer çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar IC<sub>50</sub> = mg/ml olarak verildi.



### 5.6.3.2. Toplam fenolik madde tayini yöntemi (Folin-Ciocalteu yöntemi)

1-5 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden 0,1'er ml tüplere alınarak hacimleri 4,6 ml olacak şekilde distile su ilave edildi. 0,1 ml Folin-Ciocalteu ayırıcı (distile su ile 1/3 oranında seyreltilir) ve 0,3 ml %2 lik sodyum karbonat çözeltisinden ilave edilerek, oda koşullarında 2 saat çalkantılı su banyosunda tutulduktan sonra meydana gelen mavi rengin absorbansı ekstrenin yerine 0,1 ml distile su içeren referansa karşı 760 nm'de ölçüldü. 0,05-0,4 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit çözeltilerine Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam fenolik madde tayini uygulandı. Ölçülen absorbanslara karşı konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlandı ve doğru denklemi elde edildi [(Absorbans = 75,63 gallik asit (mg) – 0,04429 (R<sup>2</sup>: 0,9963)]. Elde edilen bu doğru denklemden, örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/mg ekstre) eşdeğeri şeklinde hesaplandı. Deney üç kez tekrarlanarak ortalaması alındı (Taşkın ve ak., 2016).

### 5.6.3.3. Demir (III) indirgeme / Antioksidan güç (FRAP) yöntemi

FRAP ayırıcı, 25 ml 300 mM asetat tamponu (pH 3,6), 2,5 ml TPTZ çözeltisi (10 mM TPTZ'nin 40 mM HCl'deki çözeltisi) ve 2,5 mL 20 mM FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O'nin karıştırılması ile hazırlandı ve 37 °C de 30 dk. bekletildi. FRAP ayırıcınının 3,8 ml'si 0,2 ml ekstre ile karıştırılarak, ekstre yerine distile su konularak hazırlanan referansa karşı absorbans artışı 4. dakikada 593 nm'de ölçüldü. ekstrelerin 593 nm'deki absorbans değerleri, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ile hazırlanan kalibrasyon grafiğine [Absorbans = 0,8226 FeSO<sub>4</sub> (mM) - 0,03374 (R<sup>2</sup>: 0,9940)] ait değerlerle karşılaştırılmak suretiyle, FRAP değeri mM FeSO<sub>4</sub>/mg ekstre olarak ifade edildi.

### 5.6.4. Histolojik inceleme

Çalışma sonunda hayvanlardan alınan deri doku örnekleri histolojik çalışma için %10 nötral tamponlu formaline alındı. Işık mikroskobu çalışması için %10 nötral tamponlu formaline alınan dokular, doku takip cihazında takip edilerek parafine gömüldü. Mikrotomda yapılan kesit çalışması sonrasında dokulara Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyası ve Gamori'nin tek aşamalı trikrom boyası uygulandı.

#### **5.6.4.1. Hematoksilen ve eozin boyaması**

Lamlara alınan kesitler etüvde 60°C'de 1 saat bekletildi. Lamlar iki ayrı ksilende 10'ar *dk.* bekletilerek deparafinize edildi. Sırasıyla %96, 80 ve 70'lik etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek hidrate edildi. Akan su altında yıkama yapıldı. Gill Hematoksilen'de 3 *dk.* bekletildi. Akan su altında 5 *dk.* yıkanarak nükleuslar morartıldı. %1'lik sulu Eozin'de 30 saniye bekletildi. Akan su altında yıkandı. Sırasıyla %70, 80 ve 96'lık etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek dehidrate edildi. Lamlar kurumaya bırakıldı ve kapama maddesi ile kapatıldı.

#### **5.6.4.2. Gomori'nin tek aşamalı trikrom (GT) boyaması**

Lamlara alınan kesitler etüvde 60°C'de 1 saat bekletildi. Lamlar iki ayrı ksilende 10'ar *dk.* bekletilerek deparafinize edildi. Sırasıyla %96, 80 ve 70'lik etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek hidrate edildi. Distile sudan geçirildi. Kesitler Bouin's solüsyonunda 56°C'de 1 saat bekletildi. Sarı renk gidene kadar musluk suyu altında yıkandı. Weigert Hematoksilen'de 10 *dk.* bekletildi. Musluk suyu altında 10 *dk.* yıkandı. Gomori One Step Trikrom solüsyonunda 20 *dk.* bekletildi. %0,5'lik asitik asit ile hızla diferansiye edildi. Distile sudan geçirildi. Sırasıyla %70, 80 ve 96'lık etanol serilerinden 10'ar dip geçirilerek dehidrate edildi. Lamlar kurumaya bırakıldı ve kapama maddesi ile kapatıldı.

### 5.6.5. İstatistiksel değerlendirme

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için Graph-Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Grup verilerinin karşılaştırılmasında tek-yönlü varyans analizini (one-way ANOVA) takiben Tukey's çoklu karşılaştırma testi uygulandı.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 6. BULGULAR

### 6.1. DNA Üzerine Etkilerin İncelenmesi

**Tablo 4.** Metanollü ve Heptanlı ekstrelerin %DNA<sub>T</sub> ve 8-OHdG düzeyleri üzerine etkileri

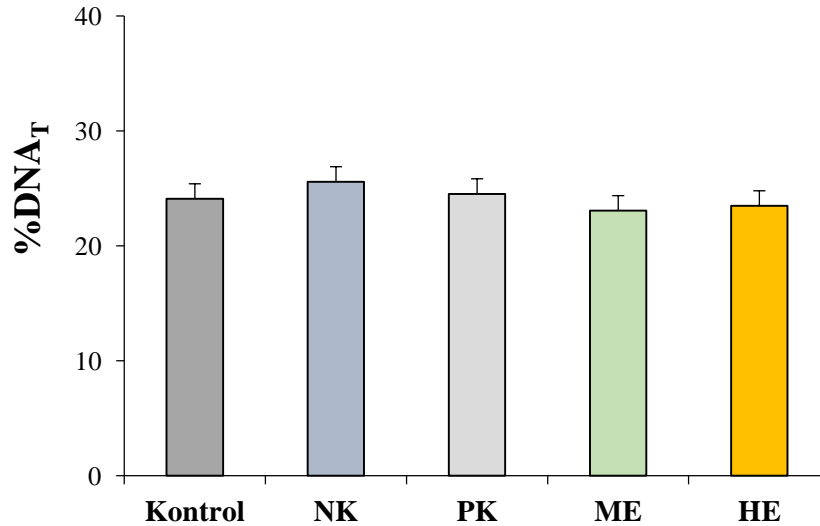
	<b>K</b>	<b>NK</b>	<b>PK</b>	<b>ME</b>	<b>HE</b>
<b>%DNA<sub>T</sub></b>	24,08±0,68	25,56±0,72	24,51±1,35	23,05±1,11	23,47±1,18
<b>8-OHdG</b>	9,65±7,46	11,70±8,16	11,14±7,65	9,56±9,75	8,84±4,62

p>0.05 kontrol grubu ile kıyaslandığında, p>0.05 pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında (n=6). Veriler ortalama ± ortalamanın standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

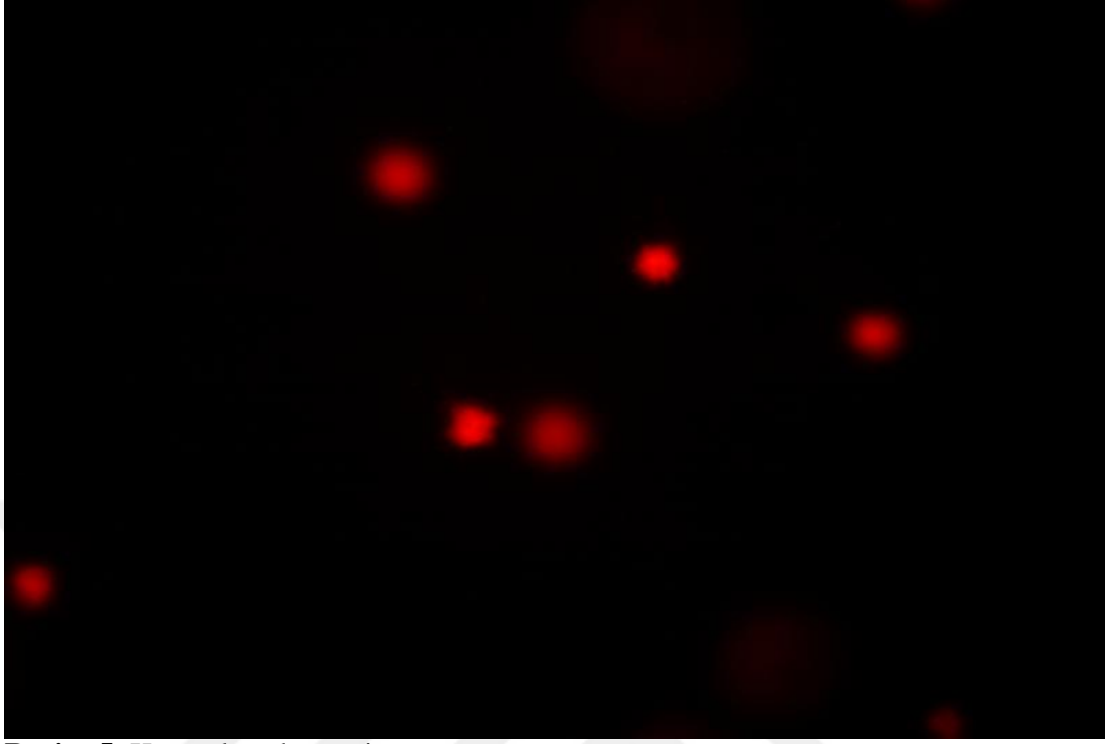
K: Kontrol NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre, %DNA<sub>T</sub>: Kuyruktaki DNA yüzdesi, 8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

#### 6.1.1. Alkali comet tekniği sonuçları

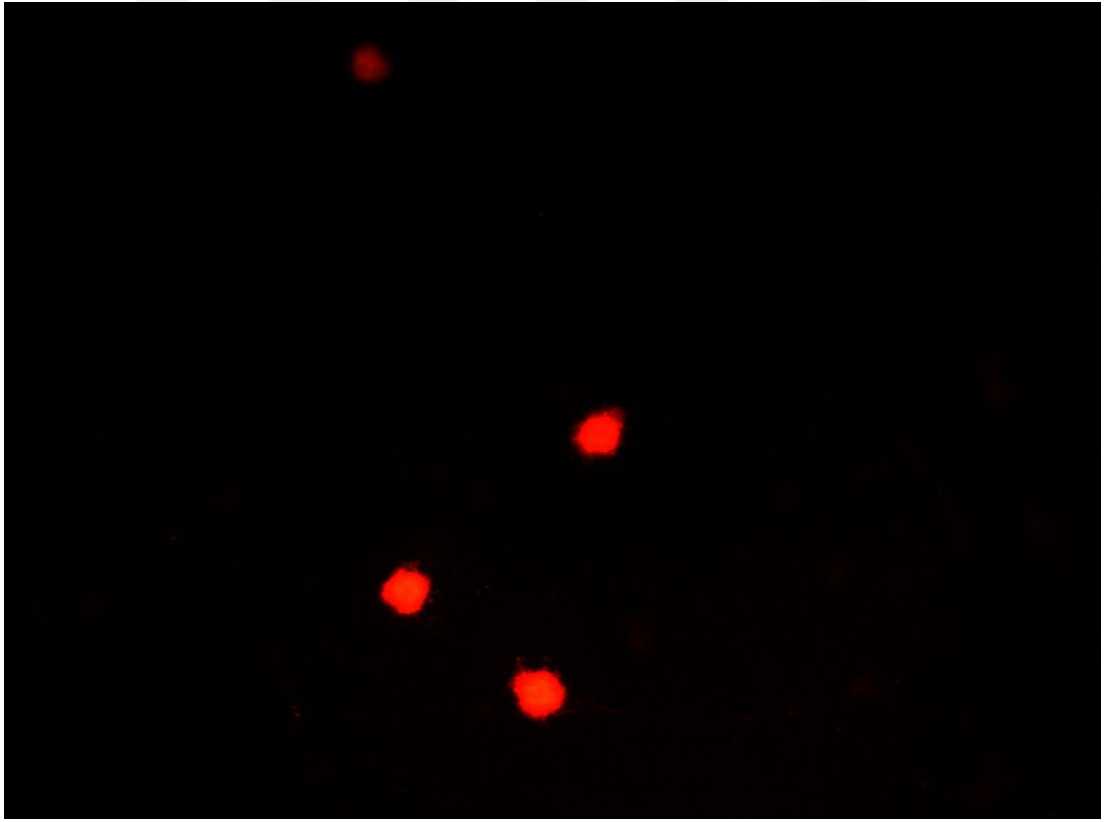
Lenfosit hücrelerinin %DNA<sub>T</sub> düzeyleri ölçüğünde kontrol grubu 24,08±0,68 olarak ölçülürken ve ME, HE ve PK grupları sırasıyla (23,05±1,11), (23,47±1,18) ve (24,51±1,35) olarak ölçülerek kontrol veya negatif kontrol grubuna göre kıyaslandığında anlamlı bir fark oluşturmadığı (p> 0.05) istatistiksel olarak tespit edildi (Şekil 13, Resim 5-14).



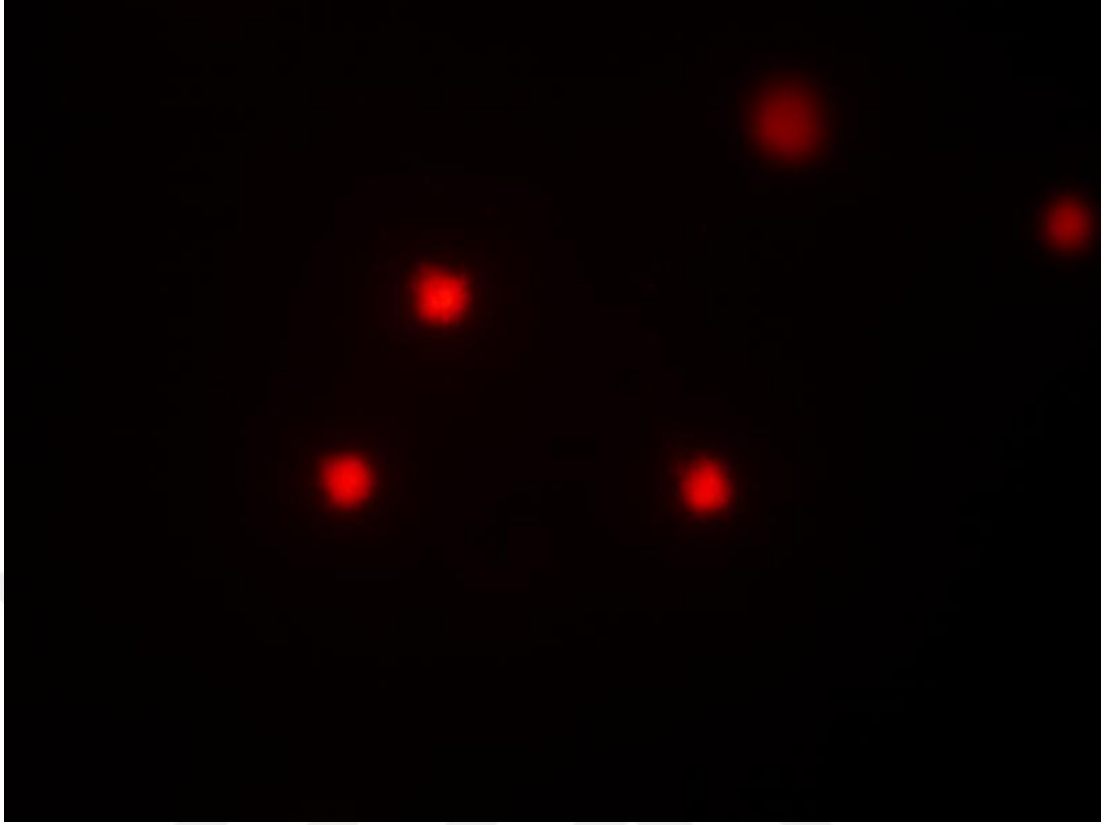
**Şekil 13.** Periferik kan lenfositlerinde %DNA<sub>T</sub> düzeyleri. NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre



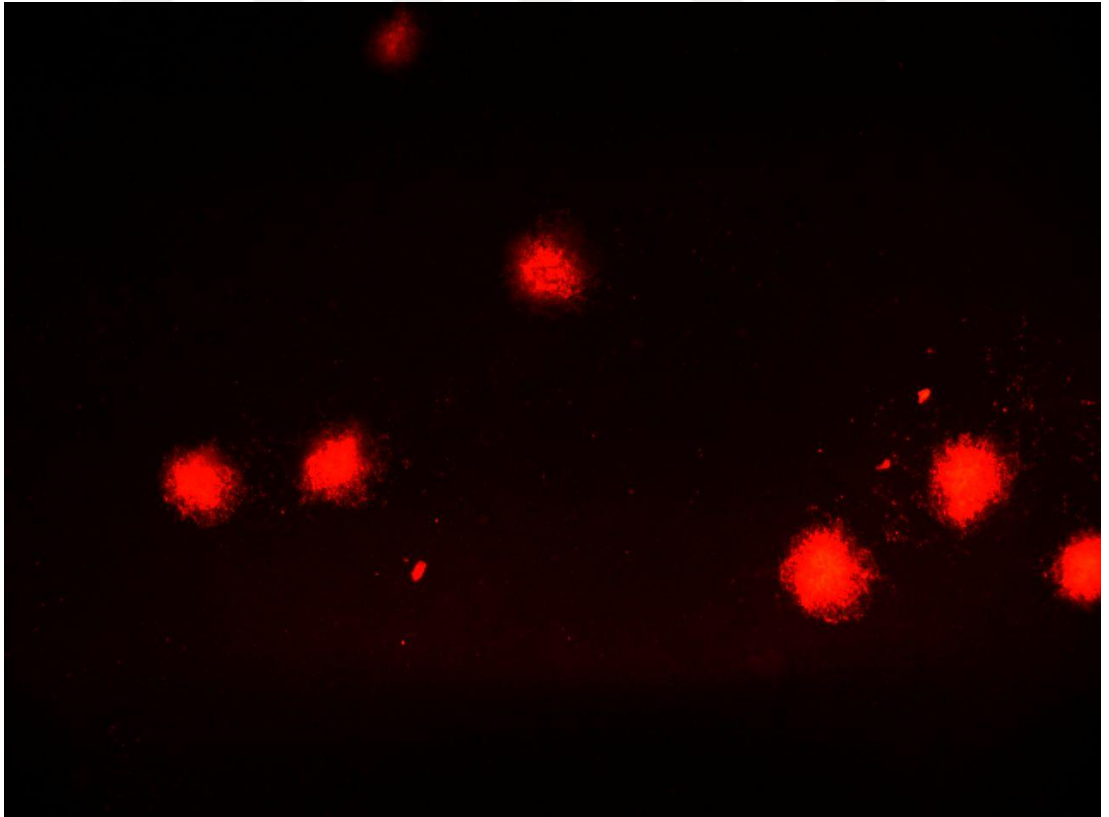
**Resim 5.** Kontrol grubuna ait comet görüntüsü



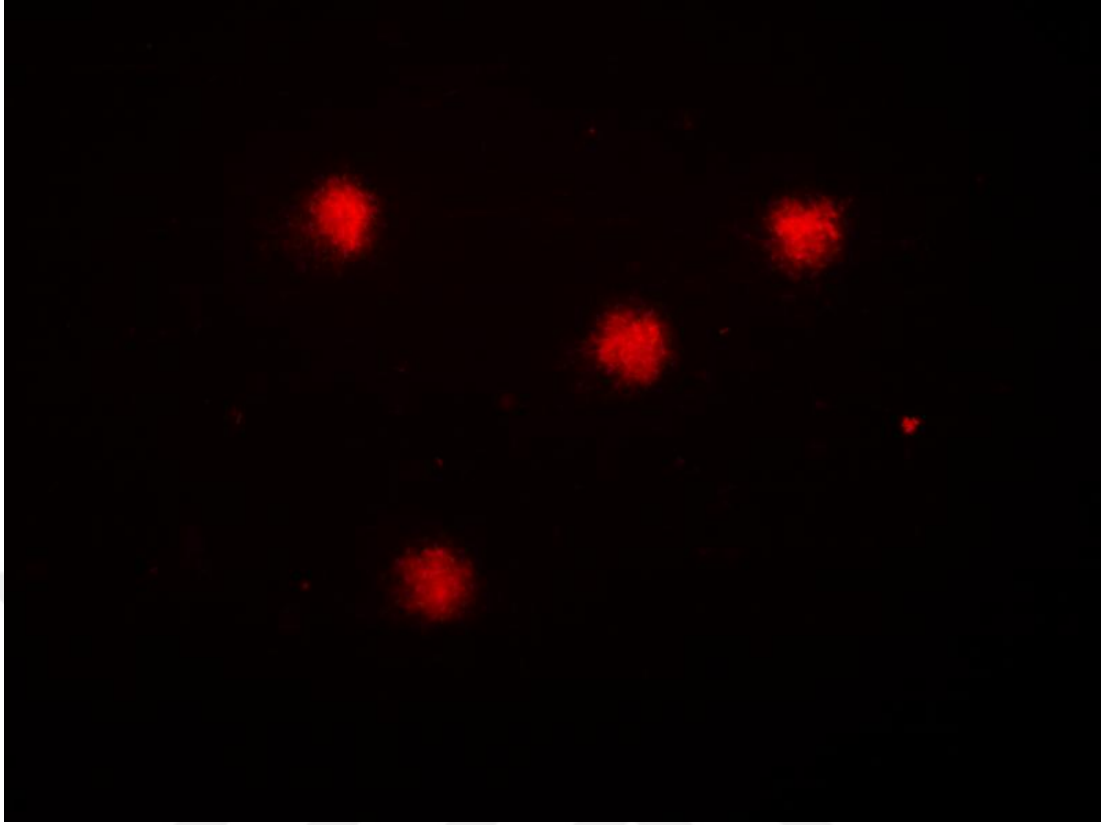
**Resim 6.** Kontrol grubuna ait comet görüntüsü



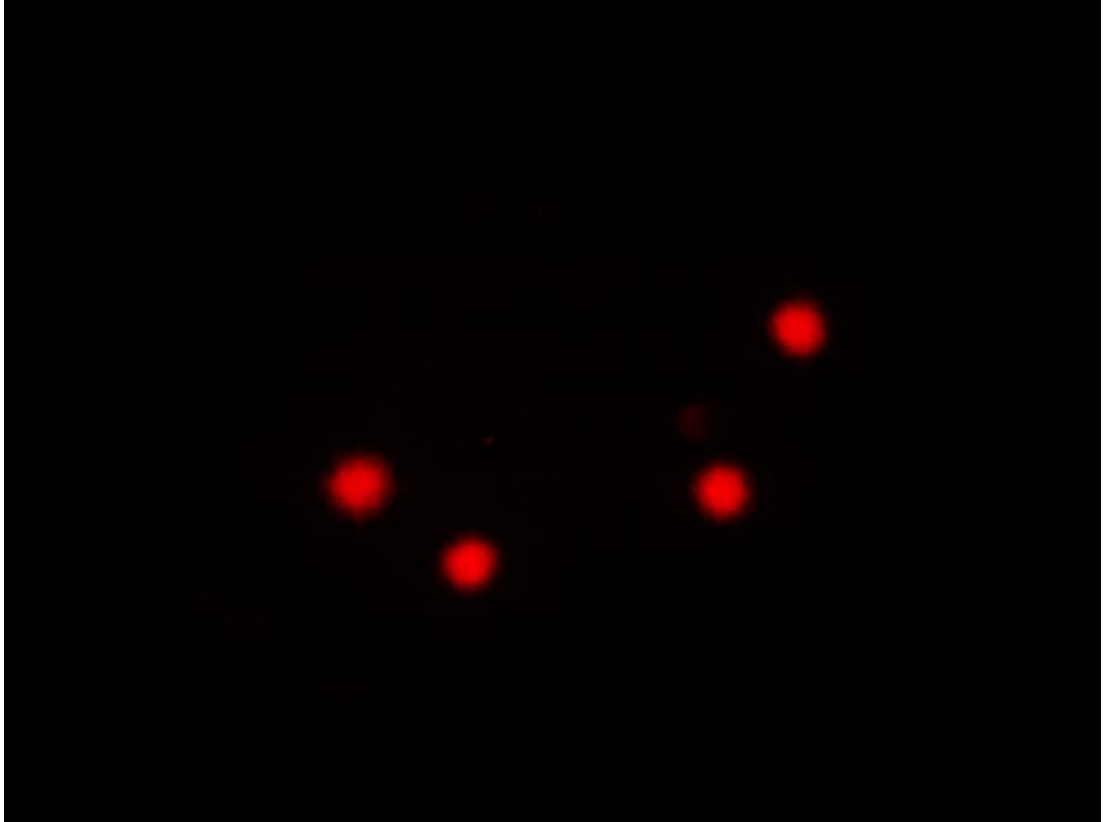
**Resim 7.** Negatif kontrol grubuna ait comet görüntüsü



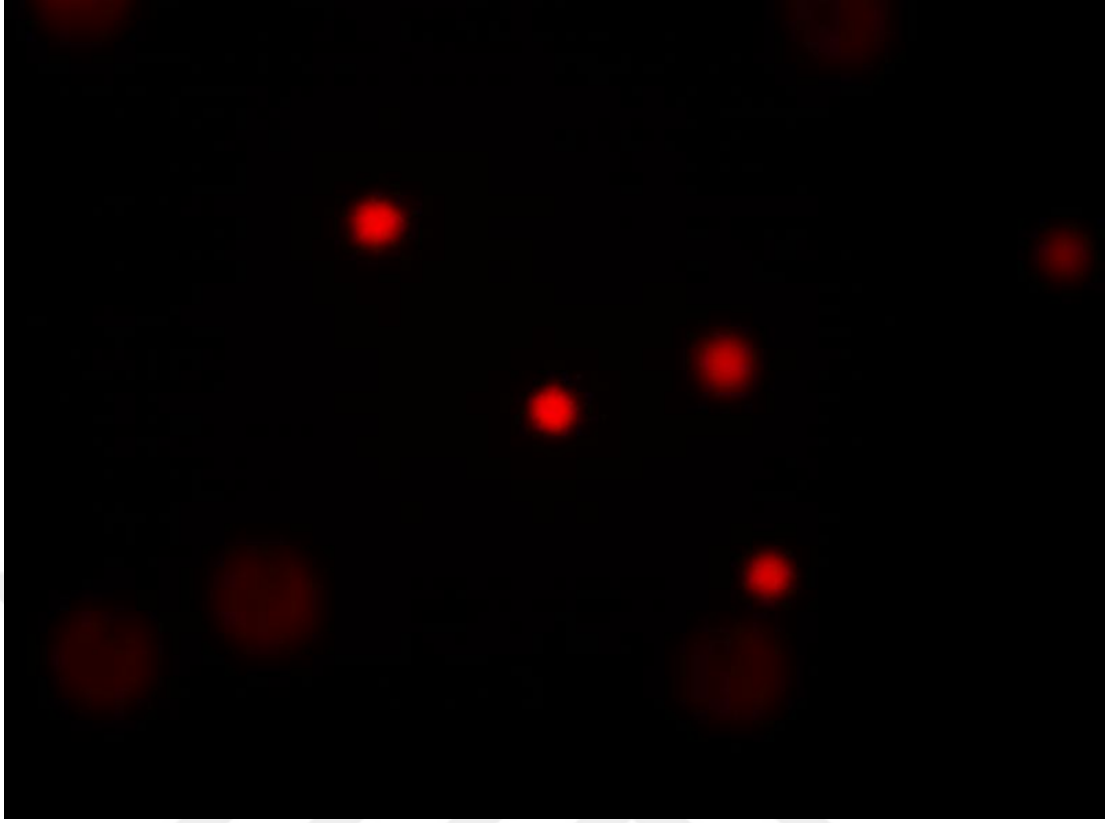
**Resim 8.** Negatif kontrol grubuna ait comet görüntüsü



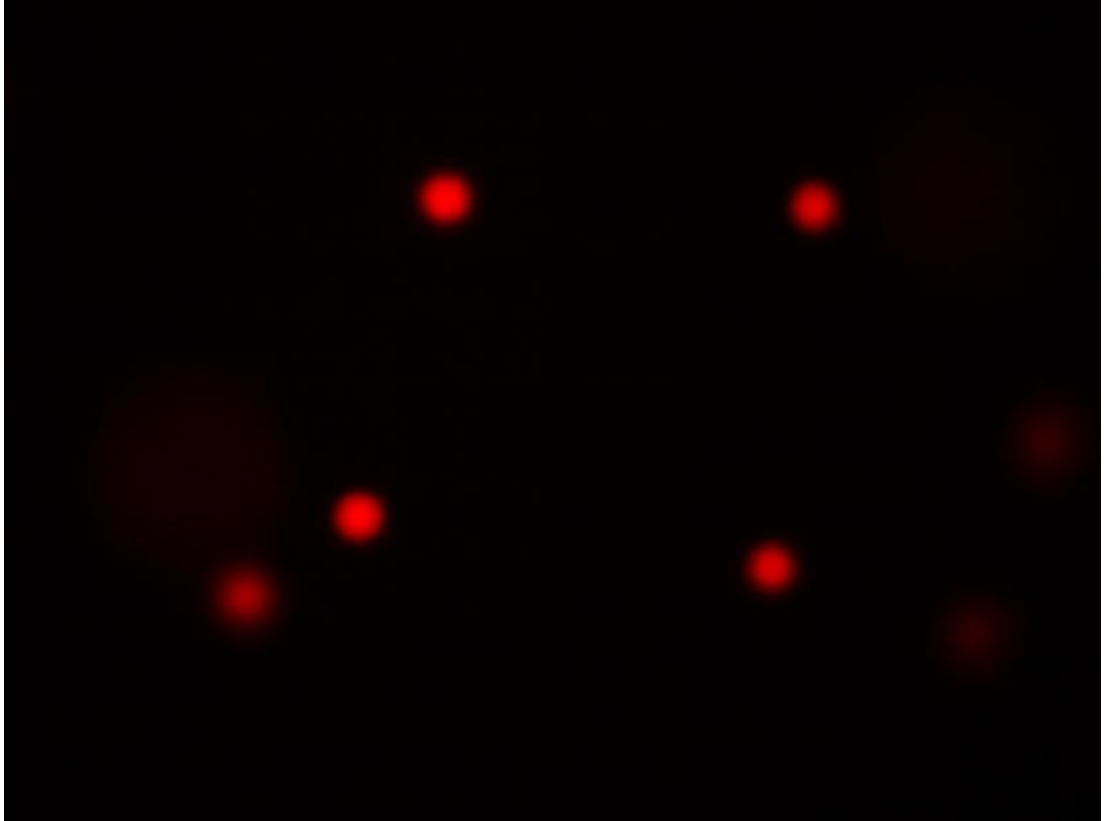
**Resim 9.** Pozitif kontrol grubuna ait comet görüntüsü



**Resim 10.** Pozitif kontrol grubuna ait comet görüntüsü

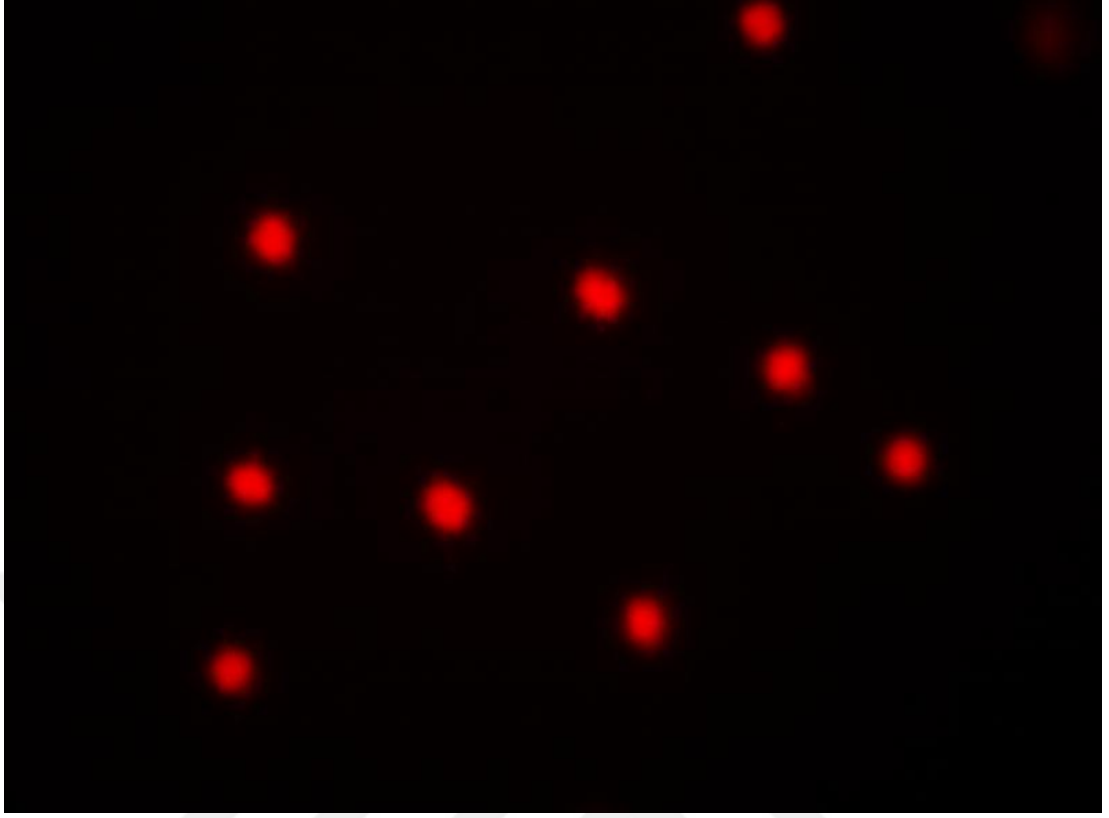


**Resim 11.** Metanollü Ekstre (ME) grubuna ait comet görüntüsü

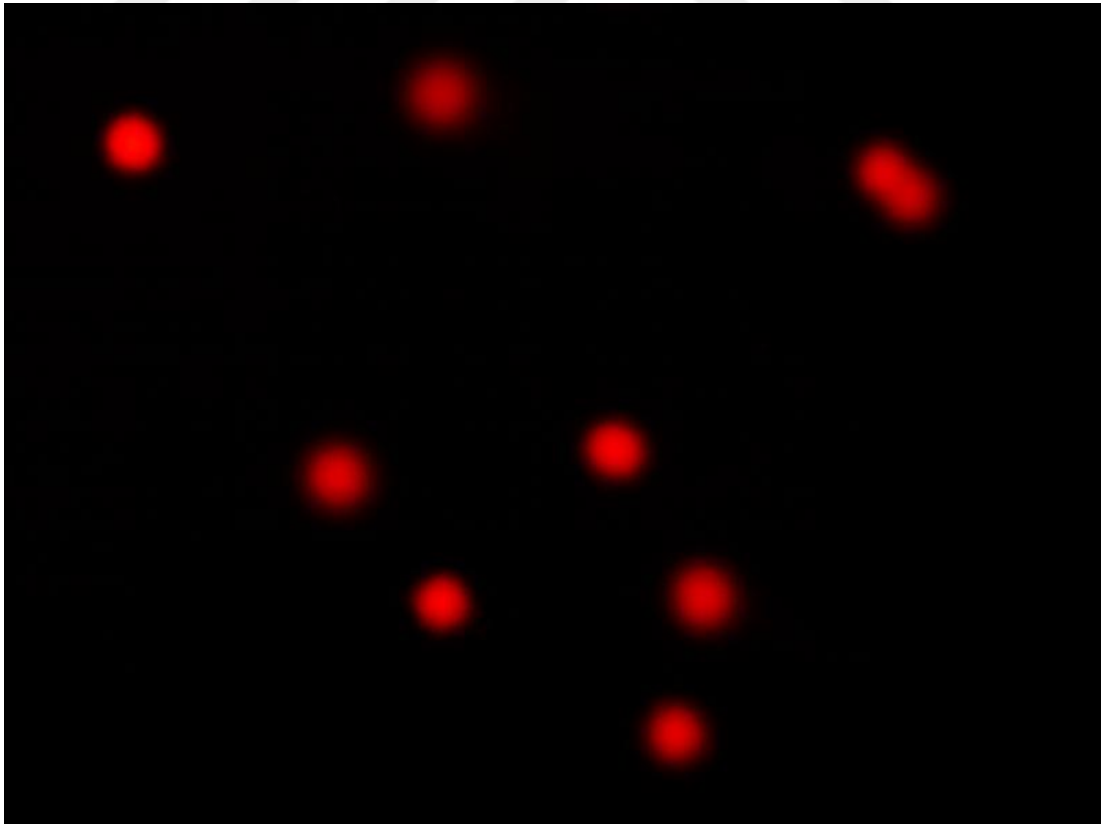


**Resim 12.** Metanollü Ekstre (ME) grubuna ait comet görüntüsü





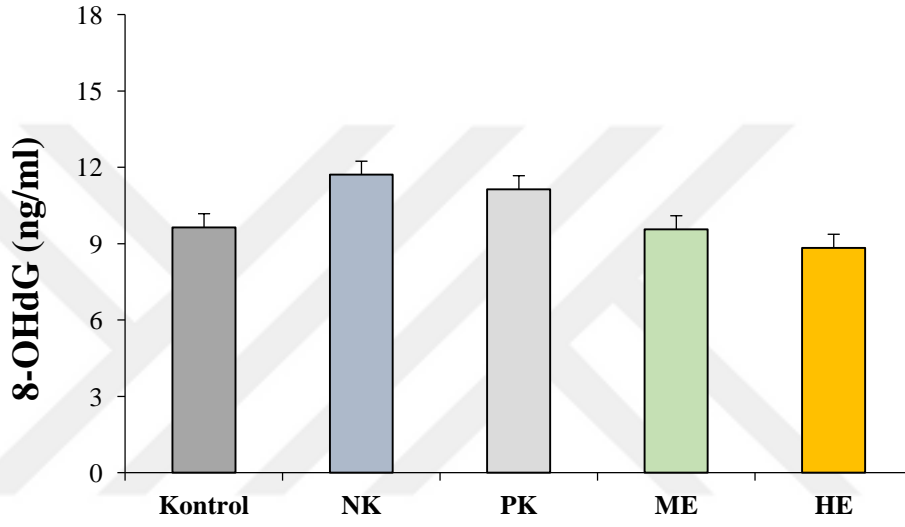
**Resim 13.** Heptan Ekstre (HE) grubuna ait comet görüntüsü



**Resim 14.** Heptan Ekstre (HE) grubuna ait comet görüntüsü

### 6.1.2. 8-OHdG düzeyleri

K grubuna ait serum örneklerine bakıldığında 8-OHdG düzeyi ( $9,65 \pm 7,46$  ng/ml) olarak bulundu. ME ve HE gruplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ( $p > 0,05$ ) tespit edildi. ME ve HE gruplarına ait serum örneklerinin 8-OHdG düzeyleri ise sırasıyla;  $9,56 \pm 9,75$  ng/ml ve  $8,84 \pm 4,62$  olarak tespit edildi (Şekil 14).



Şekil 14. Serum örneklerinde 8-OHdG düzeyleri.

K grubuna ait serum örnekleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ( $p > 0,05$ ). NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre

## 6.2. Deri Dokusunda Biyokimyasal Bulgular

**Tablo 5.** Metanollü ve Heptanlı ekstrelerin GSH, MDA, MPO, Luminol, Lusigenin, NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  düzeyleri üzerine etkileri.

	K	NK	PK	ME	HE
<b>GSH</b> ( $\mu$ mol/g doku)	9,19 $\pm$ 1,60	11,32 $\pm$ 2,43	12,02 $\pm$ 1,78	16,58 $\pm$ 3,9 <sup>##,+,***</sup>	15,05 $\pm$ 0,97 <sup>***</sup>
<b>MDA</b> (nmol/g doku)	28,37 $\pm$ 3,74	24,61 $\pm$ 5,42	11,79 $\pm$ 1,73 <sup>+++,*</sup>	12,99 $\pm$ 2,34 <sup>+++,*</sup>	16,17 $\pm$ 2,56 <sup>+++,*</sup>
<b>MPO</b> (U/g doku)	39,58 $\pm$ 7,50	36,06 $\pm$ 9,69	26,59 $\pm$ 7,71	20,58 $\pm$ 4,16 <sup>+,***</sup>	25,28 $\pm$ 4,46 <sup>**</sup>
<b>Luminol</b> (rlu/mg doku)	13,1 $\pm$ 2,5	13,6 $\pm$ 2,2	6,1 $\pm$ 1,2 <sup>***,+++</sup>	5,6 $\pm$ 1,6 <sup>***,+++</sup>	5,8 $\pm$ 1,7 <sup>***,+++</sup>
<b>Lusigenin</b> (rlu/mg doku)	13,1 $\pm$ 1,8	13,0 $\pm$ 3,3	7,1 $\pm$ 1,6 <sup>***,+++</sup>	6,8 $\pm$ 1,4 <sup>***,+++</sup>	5,7 $\pm$ 2,0 <sup>***,+++</sup>
<b>NO</b> (rlu/mg doku)	29,6 $\pm$ 10,7	38,1 $\pm$ 20,4	13,0 $\pm$ 4,5 <sup>***,+++</sup>	8,7 $\pm$ 2,6 <sup>***,+++</sup>	9,9 $\pm$ 4,1 <sup>***,+++</sup>
<b>IL1-<math>\beta</math></b> (pg/mL)	7,47 $\pm$ 3,70	6,11 $\pm$ 2,73	2,96 $\pm$ 1,49 <sup>*</sup>	2,53 $\pm$ 1,79 <sup>**</sup>	2,72 $\pm$ 3,10 <sup>**</sup>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/mL)	10,91 $\pm$ 8,15	8,68 $\pm$ 3,69	4,61 $\pm$ 2,22 <sup>*</sup>	4,30 $\pm$ 2 <sup>*</sup>	3,38 $\pm$ 2,11 <sup>*</sup>

\*\*\*p <0.001 kontrol ve +++p <0.001 NK gruplarına göre kıyaslandığında (n=6).

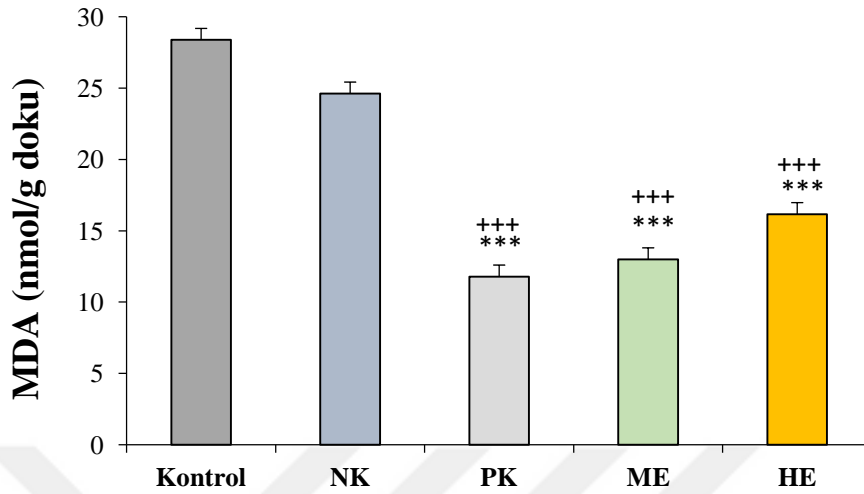
Veriler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

K: Kontrol, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre, GSH: Glutatyon; MDA: Malondialdehit; MPO: Miyeloperoksidaz; NO: Nitrik oksit; IL-1 $\beta$ : İnterlökin-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktör alfa

### 6.2.1. Dokularda malondialdehit düzeyleri

Deri dokusuna ait MDA düzeyleri şekil 15’de verilmiştir. Kontrol grubunun ortalama MDA değeri 28,37 $\pm$ 3,74 nmol/g doku olarak bulundu. ME ve HE grupları kontrol grubuna göre kıyaslandığında MDA düzeylerinin düşük olduğu tespit edildi. ME ve HE gruplarının MDA düzeyleri sırasıyla; 12,99 $\pm$ 2,34 ve 16,17 $\pm$ 2,56 (p<0.001) olarak tespit edildi. NK grubunun ortalama MDA değeri 24,61 $\pm$ 5,42 nmol/g doku olarak bulundu. ME ve HE grupları NK grubuna göre kıyaslandığında MDA düzeylerinin düşük olduğu tespit edildi. PK grubunun ortalama MDA değeri

11,79±1,73 nmol/g doku olarak bulundu. ME ve HE grupları PK grubuna göre kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (P>0.05).

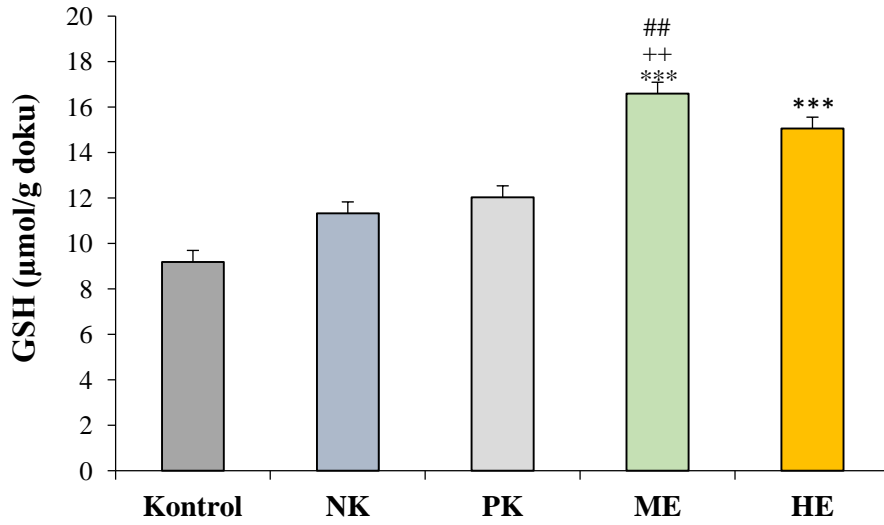


Şekil 15. Sıçanların Deri dokusunda MDA düzeyleri.

ME ve HE grupları \*\*\*p <0.001 kontrol ve +++p <0.001 NK gruplarına göre kıyaslandığında. NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre

### 6.2.2. Dokularda glutatyon düzeyleri

Deri dokusuna ait GSH düzeyleri Şekil 16'da verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama GSH düzeyi 9,19±1,60 µmol/g doku olarak bulundu. ME ve HE grupları kontrol grubuna göre kıyaslandığında GSH düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. ME ve HE gruplarının GSH düzeyleri sırasıyla; 16,58±3,9 ve 15,05±0,97 µmol/g doku (\*\*p<0.001) olarak tespit edildi. NK grubunun ortalama GSH düzeyi 11,32±2,43 µmol/g doku olarak bulundu. ME ve HE grupları NK grubuna göre kıyaslandığında ME grubunun yüksek olduğu (++p<0.01) HE grubuna kıyasla ise anlamlı bir fark olmadığı (p>0.05) tespit edildi. PK grubunun ortalama GSH değeri 12,02±1,78 µmol/g doku olarak bulundu. ME ve HE grupları PK grubuna göre kıyaslandığında ME grubunun yüksek olduğu (\*\*p<0.01) HE grubuna kıyasla ise anlamlı bir fark olmadığı (p>0.05) tespit edildi.



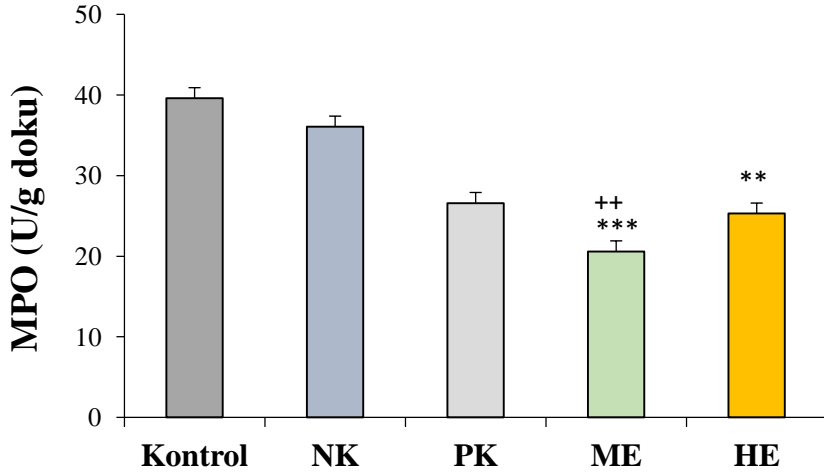
**Şekil 16.** Sıçanların deri dokusunun GSH düzeyleri.

ME ve HE grupları \*\*\*p <0.001 kontrol grubuna göre kıyaslandığında, ++p<0.01 NK grubuna göre kıyaslandığında, ##p<0.01 PK grubuna göre kıyaslandığında.

NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre

### 6.2.3. Dokularda miyeloperoksidaz aktivitesi sonuçları

Kontrol grubunda ortalama MPO düzeyi  $39,58 \pm 7,50$  U/g doku olarak bulundu. ME ve HE grupları kontrol grubuna göre kıyaslandığında MPO düzeylerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. ME ve HE gruplarının MPO düzeyleri sırasıyla;  $20,58 \pm 4,16$  ( $p < 0.001$ ) ve  $25,28 \pm 4,46$  ( $p < 0.01$ ) olarak tespit edildi. NK grubuna ait MPO düzeyi  $36,06 \pm 9,69$  U/g doku olarak bulundu. ME ve HE grupları NK grubuna göre kıyaslandığında ME grubunun düşük olduğu ( $++p < 0.01$ ) HE grubuna kıyasla ise anlamlı bir fark olmadığı ( $p > 0.05$ ) tespit edildi. PK grubuna ait MPO düzeyi  $26,59 \pm 7,71$  U/g doku olarak bulundu. ME ve HE grupları PK grubuna göre kıyaslandığında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ( $P > 0.05$ ). Deri dokusuna ait MPO düzeyleri Şekil 17’de verilmiştir.



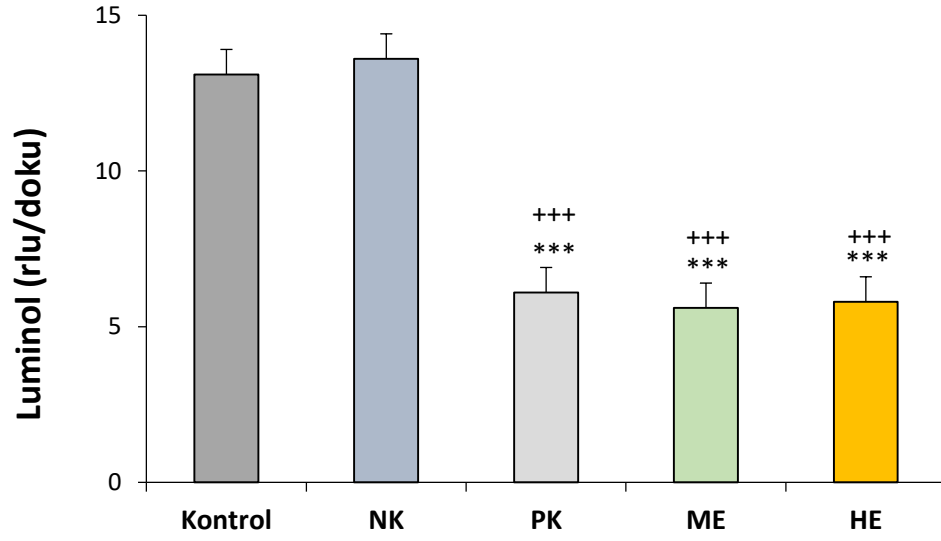
**Şekil 17.** Sıçanların deri dokusunda MPO düzeyleri.

ME ve HE grupları \*\*\*p <0,001 ve \*\*p<0,01 kontrol grubuna göre kıyaslandığında. ME grubu NK grubuna göre kıyaslandığında ++p<0,01

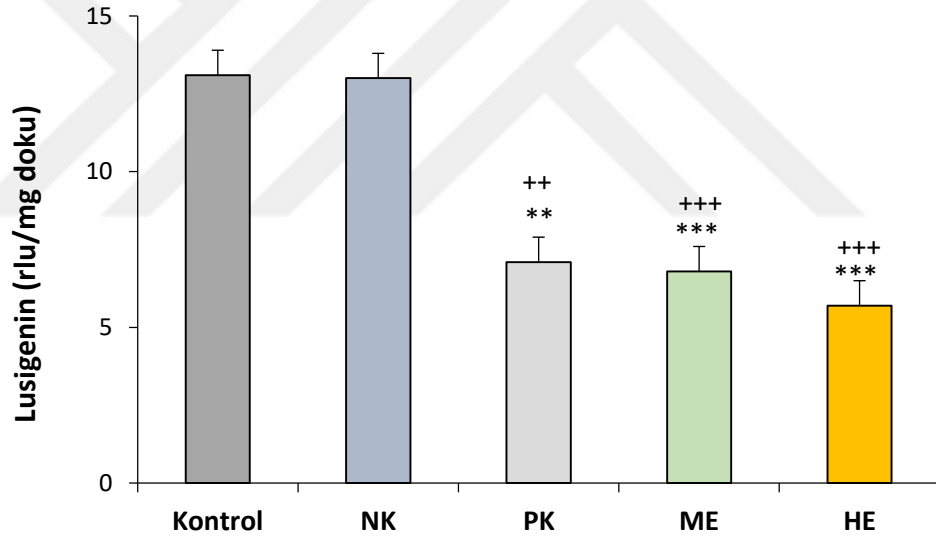
NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre

#### 6.2.4. Kemilüminesans ölçüm sonuçları

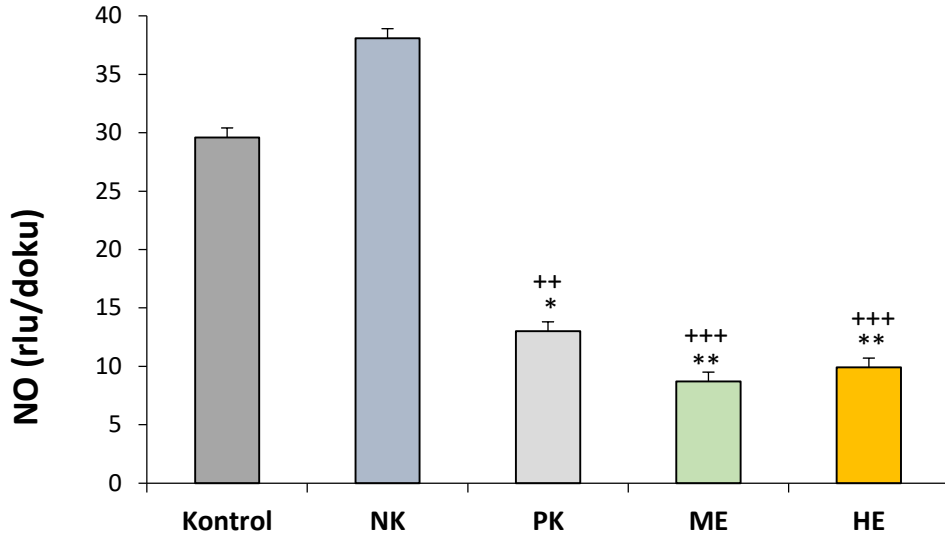
Luminol düzeyleri kontrol grubuna ( $26,8 \pm 6,8$  rlu/mg) göre kıyaslandığı zaman ME ( $14,6 \pm 3,4$  rlu/mg) ve HE ( $11,6 \pm 2,8$  rlu/mg) gruplarının anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü ( $P < 0,001$ ) (Şekil 18). Lusigenin düzeyleri kontrol grubuna ( $18,4 \pm 5,4$  rlu/mg) göre kıyaslandığı zaman ME ( $10,4 \pm 2,6$  rlu/mg) ve HE ( $8,6 \pm 3,1$  rlu/mg) gruplarının anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü ( $p < 0,001$ ) (Şekil 19). NO düzeyleri kontrol grubuna göre ( $42,1 \pm 12,4$ ) göre kıyaslandığı zaman ME ( $12,8 \pm 8,1$ ) ve HE ( $13,4 \pm 4,2$ ) gruplarının anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü ( $p < 0,001$ ) (Şekil 20)



**Şekil 18.** Deri dokularında luminol düzeylerinin sonuçları  
 \*\*\*p <0,001 kontrol grubuna göre kıyaslandığında. +++p<0.001 NK grubuna göre kıyaslandığında.  
 NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre



**Şekil 19.** Deri dokularında lusigenin düzeylerinin sonuçları  
 \*\*p <0.01 ve \*\*\*p <0.001 kontrol grubuna göre kıyaslandığında. ++p<0.01 ve +++p<0.001 NK grubuna göre kıyaslandığında.  
 NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre



**Şekil 20.** Deri dokularında NO düzeylerinin sonuçları

\*p <0.005,\*\*p <0.01 kontrol grubuna göre. ++p<0.01 ve+++p<0.001 NK grubuna göre kıyaslandığında

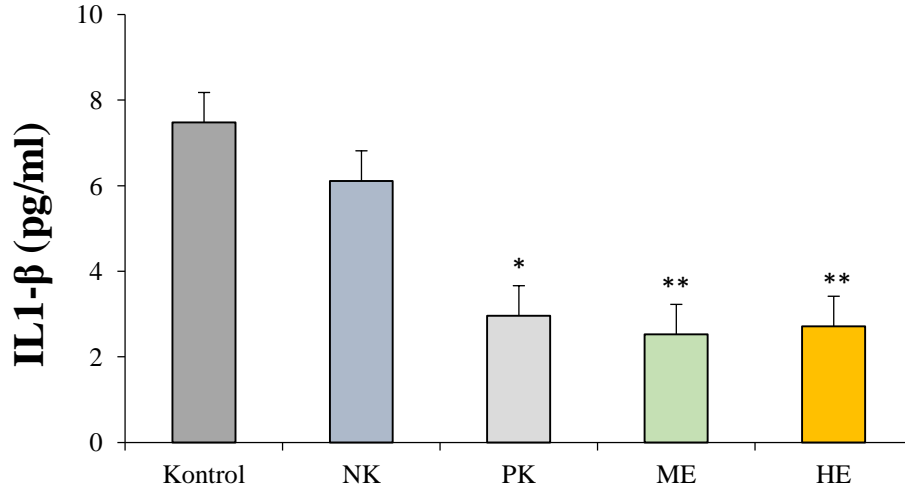
NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre

### 6.3. Serum Örneklerinde Sitokin Düzeyleri

#### 6.3.1 İnterlökin 1 beta düzeyleri

K grubuna ait sıçanların serum örneklerine bakıldığında ortalama IL-1 $\beta$  düzeyleri 7,47 $\pm$ 3,70 pg/ml olarak bulundu. PK grubunun ortalama IL-1 $\beta$  düzeyi 2,96 $\pm$ 1,49 pg/ml olarak bulunurken kontrole kıyasla anlamlı düzeyde düşük bulundu (p<0.05). NK grubunun ortalama IL-1 $\beta$  düzeyi 6,11 $\pm$ 2,73 pg/ml olarak bulunurken kontrole kıyasla anlamlı farklılık görülmedi (p>0.05). ME ve HE grupları K grubuna göre kıyaslandığında anlamlı bir azalma tespit edildi. ME ve HE gruplarının IL-1 $\beta$  düzeyleri sırasıyla; 2,53 $\pm$ 1,79 pg/ml (p<0,01) ve 2,72 $\pm$ 3,10 pg/ml (p<0,01) olarak bulundu (Şekil 18).



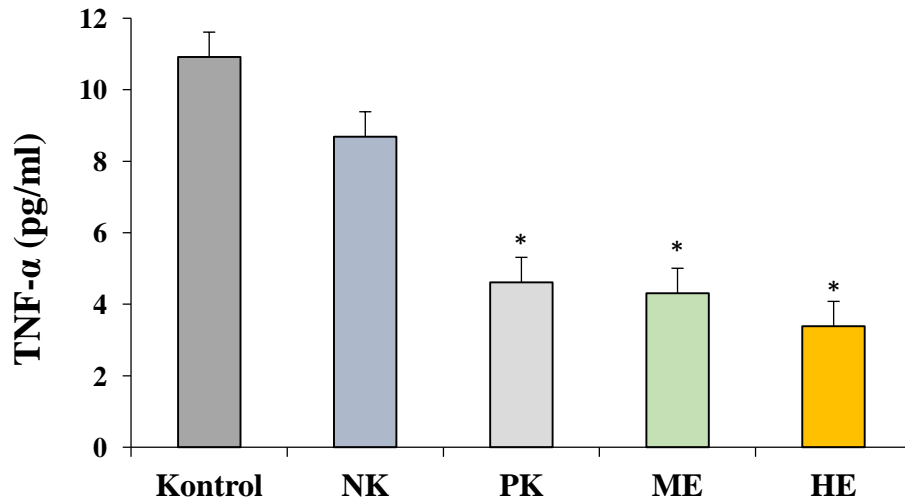


**Şekil 21.** Serum örnekleri IL1-β düzeyleri.

ME ve HE grupları \*p<0,05, \*\*p<0,01 ve \*\*\*p <0,001 kontrol grubuna göre kıyaslandığında. NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre

### 6.3.2. Tümör nekroz alfa (TNF-α) düzeyleri

K grubuna ait sıçanların serum örneklerine bakıldığında ortalama TNF-α düzeyleri 10,9131±8,15 pg/ml olarak bulundu. ME ve HE grupları K grubuna göre kıyaslandığında anlamlı bir azalma tespit edildi. ME ve HE gruplarının TNF-α düzeyleri sırasıyla; 4,3096±2,00 pg/ml (p<0.05) ve 3,3834±2,11 pg/ml (p<0.05) olarak bulundu (Şekil 19).



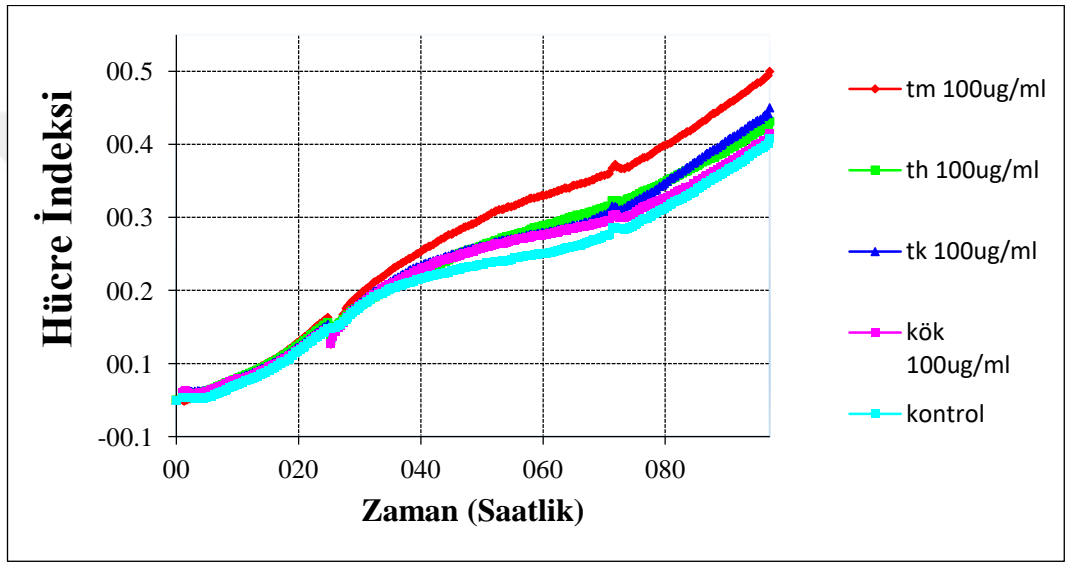
**Şekil 22.** Serum örnekleri TNF-α düzeyleri.

ME ve HE grupları \*p<0,05, \*\*p<0,01 ve \*\*\*p <0,001 kontrol grubuna göre kıyaslandığında. NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre

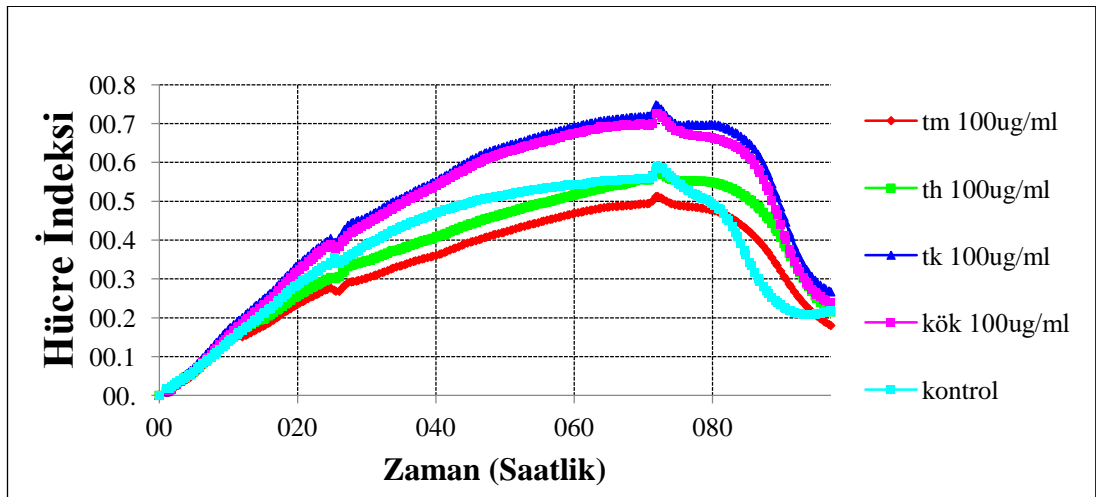
## 6.4. In Vitro Sitotoksik Testler

### 6.4.1. MTT yöntemi

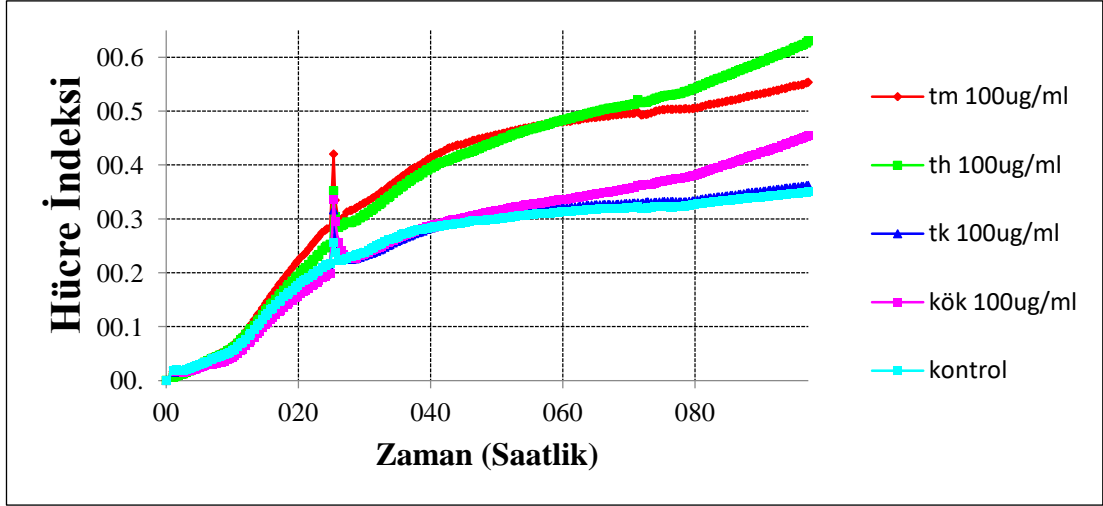
Elde edilen sonuçlara göre *S.veratrifolia* bitkisinin gövdesinden elde edilen heptan ve metanol Ekstreleri ve kökten elde edilen metanol ekstraktının MTT yöntemine göre herhangi bir sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir (Tablo 4). Ayrıca kanser hücrelerinin proliferasyonunda herhangi bir inhibisyonun olmadığı, aksine kanser hücrelerinin çoğaldığı tespit edildi (Şekil 20-23).



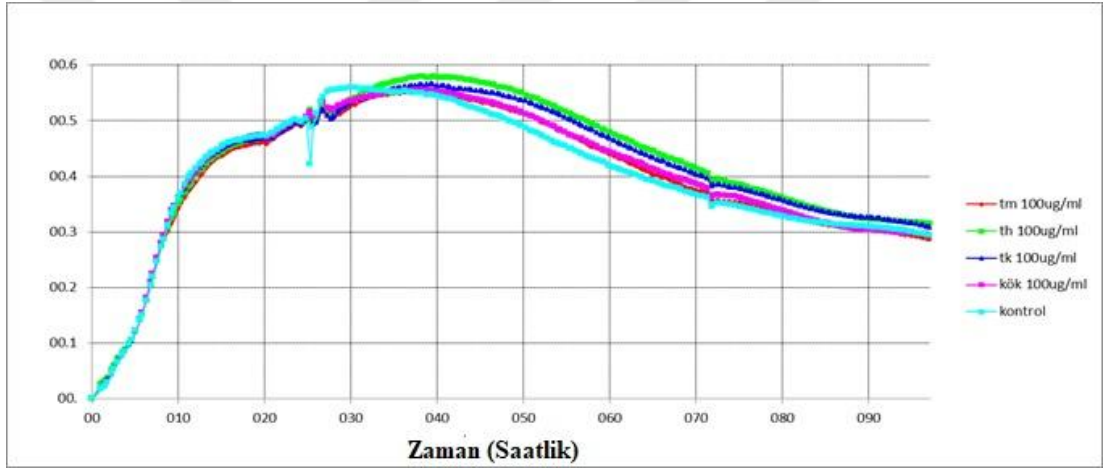
Şekil 23. PC-3 hücrelerinde proliferasyon



Şekil 24. HeLa hücrelerinde proliferasyon.



Şekil 25. HT-29 hücrelerinde proliferasyon.



Şekil 26. A549 hücrelerinde proliferasyon.

**Tablo 6.** *S.veratrifolia* bitkisinden hazırlanan metanol ekstresinin fare fibroblast hüce (NIH 3T3) çoğalması üzerine etkisi (%)

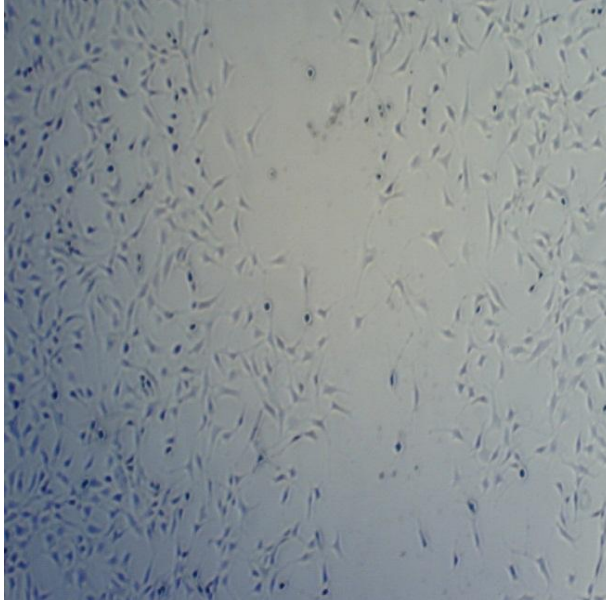
Konsantrasyon	Topraküstü metanol ekstresi	Kök metanol ekstresi
100 µg/ml	102,54	121,52
50 µg/ml	112,82	119,7

#### 6.4.2. *In vitro* hücre canlılığı testi

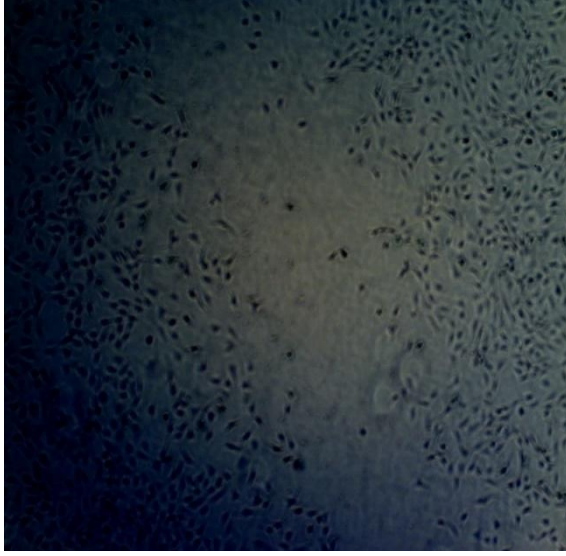
Bu çalışmaya göre, *S.veratrifolia* kök kısmından elde edilen metanol ekstresi, toprak üstü kısımdan elde edilen metanol ekstresine göre daha yüksek yara iyileştirme aktivitesi sergilemiştir (Resim 15-17).



**Resim 15.** 24 saat sonra kontrol grubu



**Resim 16.** 24 saat sonra Kökten elde edilen ekstre grubu



**Resim 17.** 24 saat sonra toprak üstü kısımdan elde edilen ekstre grubu

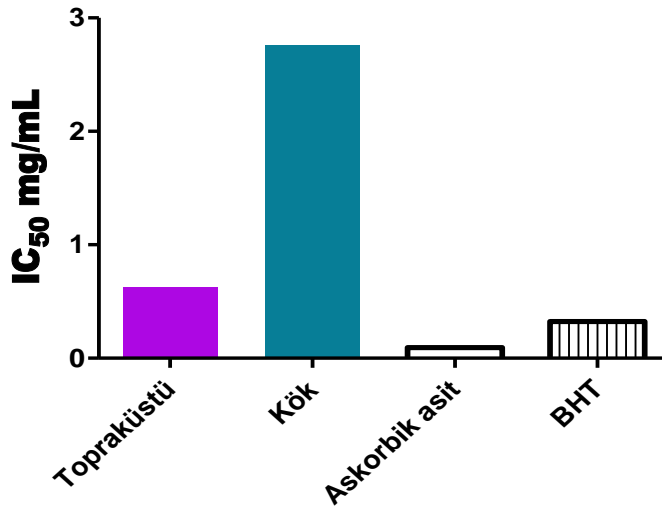
## 6.5. Antioksidan Aktivite

### 6.5.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi yöntemi

Elde edilen sonuçlara göre, bitkinin topraküstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresi kökünden elde edilen ekstresinden daha güçlü DPPH radikal süpürücü aktivite gösterdiği tespit edildi. Standart olarak kullandığımız askorbik asit ve BHT ile karşılaştırdığımızda her iki ekstrenin standartlardan daha düşük aktivite gösterdiği saptandı. (Tablo 5, Şekil 24)

**Tablo 7.** Bitkinin topraksütü ve kökünden hazırlanan metanol ekstralarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi

<b>Ekstreler</b>	<b>DPPH (IC<sub>50</sub>: mg/mL)</b>
Topraküstü ekstresi	0.62±0.6
Kök ekstresi	2.76±0.28
BHT	0.323 ± 0.03
Askorbik asit	0.093 ± 0.006



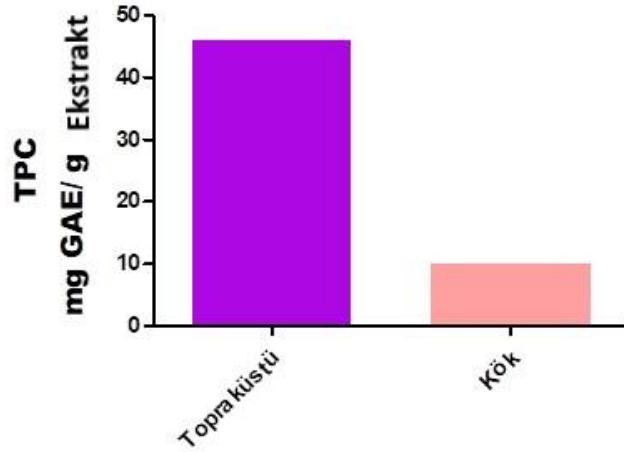
**Şekil 27.** Bitkinin topraküstü ve kökünden hazırlanan metanol ekstralarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi

#### 6.5.2. Toplam fenolik madde tayini yöntemi (Folin-Ciocalteu yöntemi)

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde bitkinin topraküstü kısımlarının kökünden daha yüksek miktarda fenolik madde içerdiği saptandı (Tablo 6, Şekil 25).

**Tablo 8.** Bitkinin topraküstü ve kökünden hazırlanan metanol ekstralarının fenolik içerikleri

Ekstreler	Total fenolik (mgGAE/g ekstre)
Topraküstü ekstresi	46 ± 0.005
Kök ekstresi	10 ± 0.004



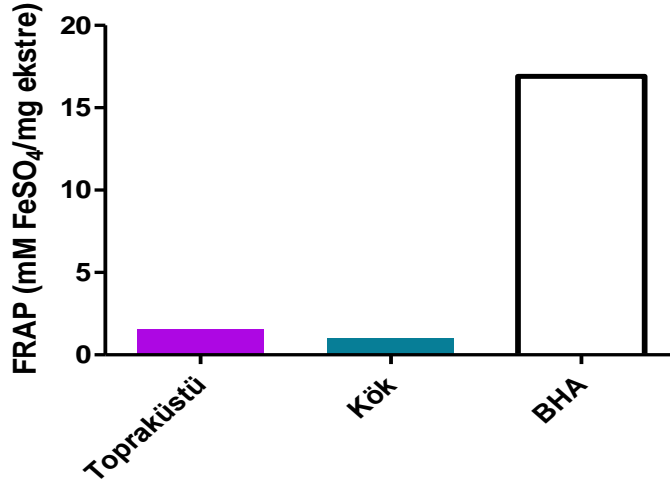
**Şekil 28.** Bitkinin topraksütü ve kökünden hazırlanan metanol ekstralarının fenolik içerikleri

### 6.5.3. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan güç (FRAP) yöntemi

Bu çalışmada bitkinin kök ve topraküstü kısımları karşılaştırıldığında topraküstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinin, kökünden hazırlana metanol ekstresinden daha güçlü demir (III) indirgeme gücü gösterdiği tespit edildi. Her iki ekstre standart olarak kullanılan BHA bileşiğinden daha düşük aktivite gösterdiği saptandı (Tablo 7, Şekil 26).

**Tablo 9.** Bitkinin topraksütü ve kökünden hazırlanan metanol ekstralarının demir (III) indirgeme aktivitesi

Ekstreler	FRAP (mM FeSO <sub>4</sub> /mg ekstre)
Topraküstü ekstresi	1.56± 0.03
Kök ekstresi	1.02± 0.05
BHA	16.9±0.02

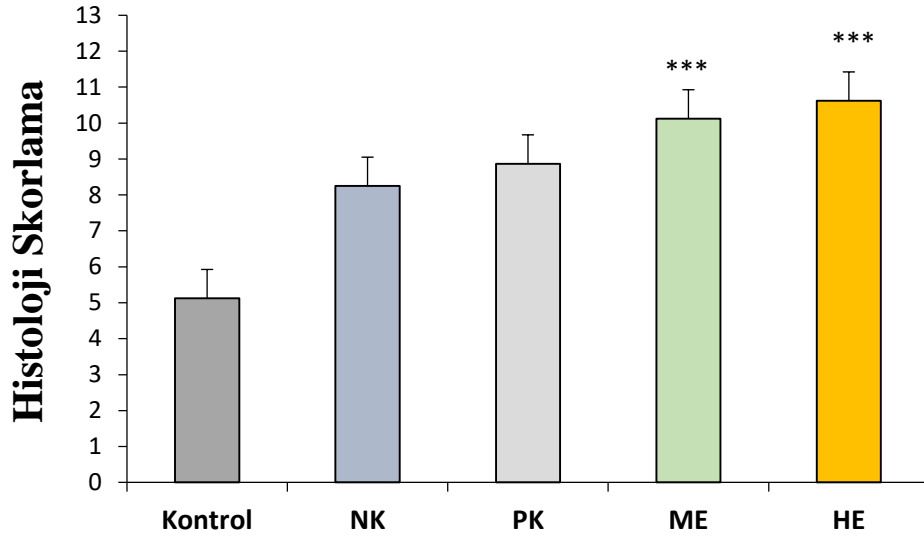


**Şekil 29.** Bitkinin topraksütü ve kökünden hazırlanan metanol ekstrlerinin demir (III) indirgeme aktivitesi

## 10.2. Histolojik inceleme

Kontrol grubu H&E ve GT kesitlerinde, yoğun inflamatuvar hücre, daha az fibroblast ve neovaskülarizasyon içeren granülasyon dokusu izlendi (Resim 18a, Resim 18b). Benzer bulgular negatif kontrol grubunda da saptandı (Resim 19a, Resim 19b). Pozitif kontrol grubu, kesi yarası grubu ile karşılaştırıldığında inflamatuvar hücrelerde azalma buna karşın fibroblast proliferasyonunun olduğu granülasyon dokusu görüldü. Bazı kesitlerde yeni kolajen birikiminin baskın olduğu izlendi (Resim 20a, Resim 20b). Tedavi heptan ekstresi (Resim 21a, Resim 21b) ve tedavi metanollü ekstre (Resim 22a, Resim 22b) grupları yara kesi grubu granülasyon dokusu ile karşılaştırıldığında her iki tedavi grubunda baskın fibroblast ve kolajen birikimi saptandı. Tüm gruplarda epitelyal rejenerasyonunun tamamlandığı gözlemlendi. Histoloji skorlama sonuçlarına göre ise kontrol grubuna (5,12±3,13) göre kıyasladığımızda zaman ME (10,125±0,74) ve HE (10,62±0,31) zaman anlamlı bir yükselme göstermiştir (\*\*\*) $p < 0.001$ ) (Şekil 30).





**Şekil 30.** Histolojik Skorum sonuçları. ME ve HE grupları \*\*\* $p < 0.001$  kontrol grubuna göre kıyaslandığında.

NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ME: Metanollü Ekstre, HE: Heptan Ekstre

**Tablo 10.** Histolojik inceleme skorumlama puanları

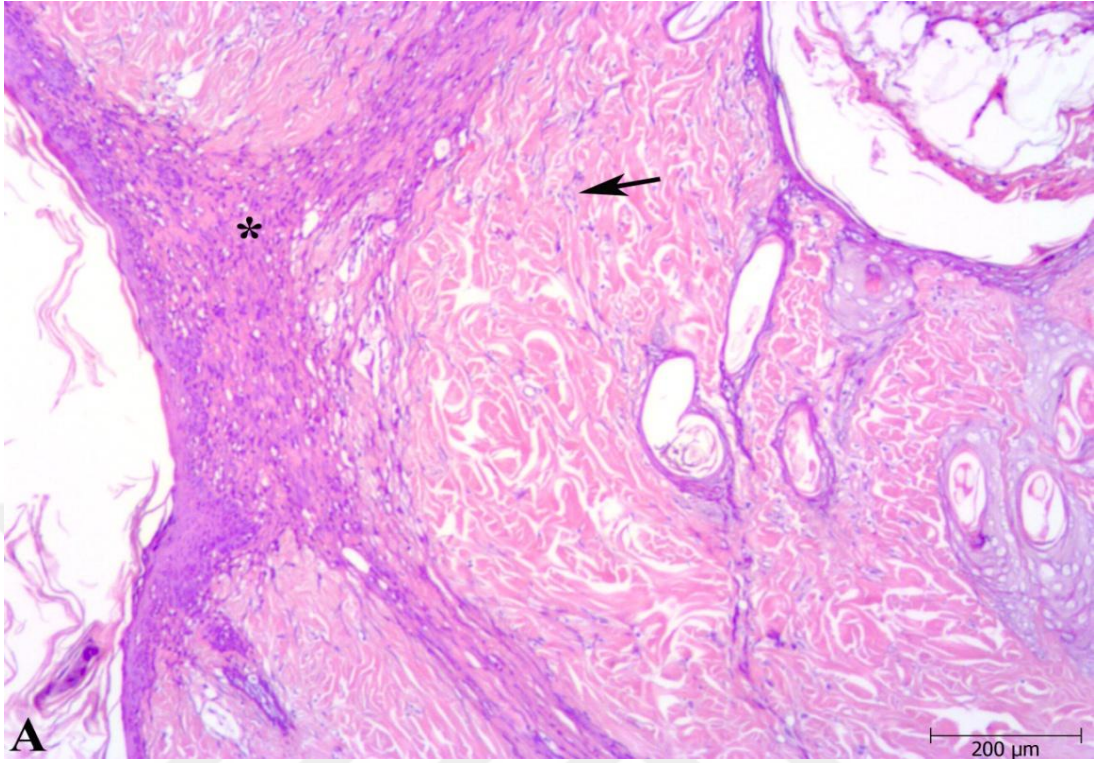
1-3: Hücre birikimi yok veya minimal, granülasyon doku veya epitel göçü yok

4-6: İnflamatuar hücreden zengin, birkaç fibroblast, kapillerler veya kollajen depozitleri ve minimal epitelyal göç içeren ince immatür granülasyon dokusu

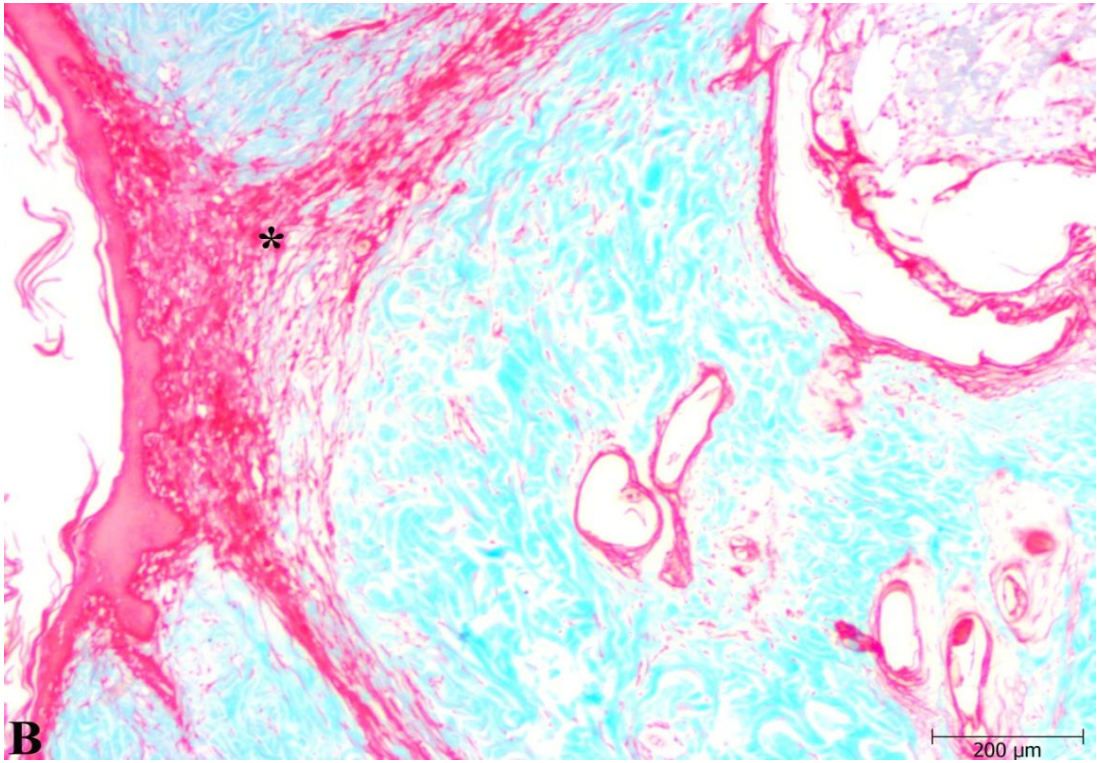
7-9: Orta kalınlıkta granülasyon dokusu, baskın inflamatuar hücre, daha fazla fibroblast ve kollajen depozitleri, aşırı damar oluşumu, minimalden orta dereceye doğru epitel göçü

10-12: Kalın, vasküler granülasyon dokusu yerine baskın fibroblast varlığı, aşırı kollajen depolanması ve yarayı kısmen kapatan epitel

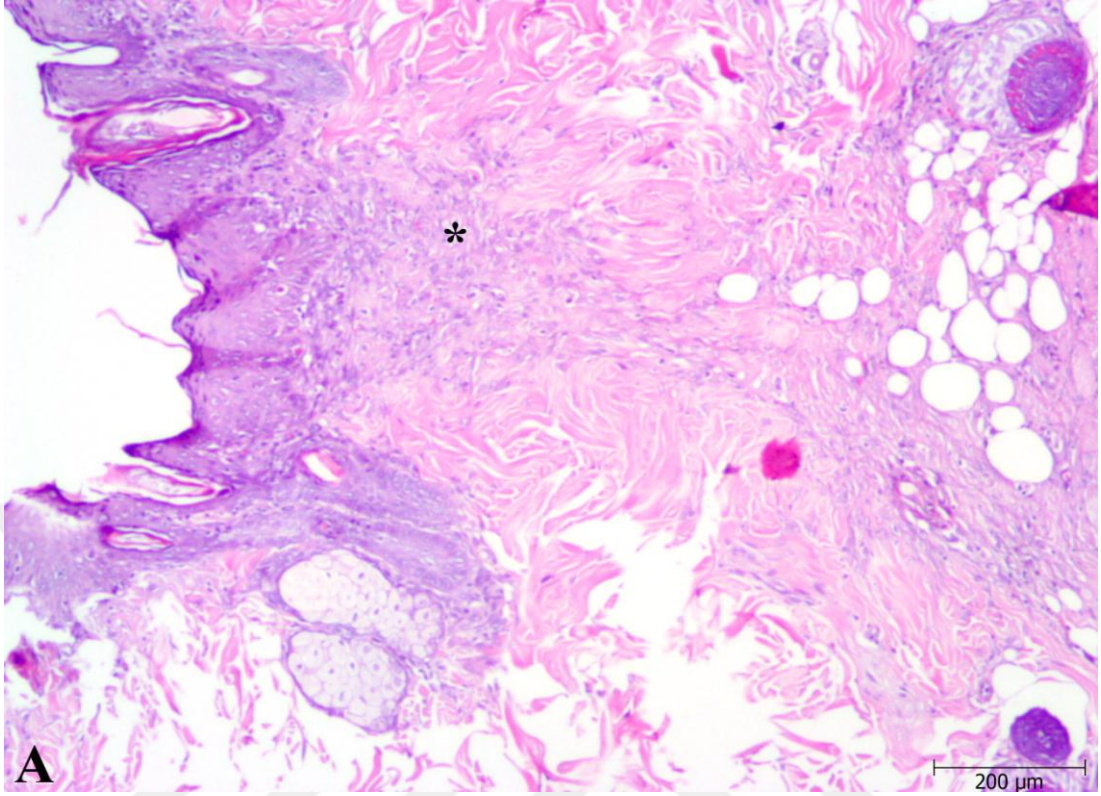
Grup	1-3	4-6	7-9	10-12
K1		4		
K2		4		
K3		6	7	
K4				
K5		4		
K6		4		
NK1	1			
NK2			9	
NK3			7	
NK4				10
NK5			7	
NK6	1			
PK1			7	
PK2				12
PK3		6		
PK4			9	
PK5		6		
PK6			9	
ME1				10
ME2				11
ME3				11
ME4			7	
ME5				11
ME6				12
HE1				12
HE2				12
HE3				11
HE4				12
HE5				10
HE6				11



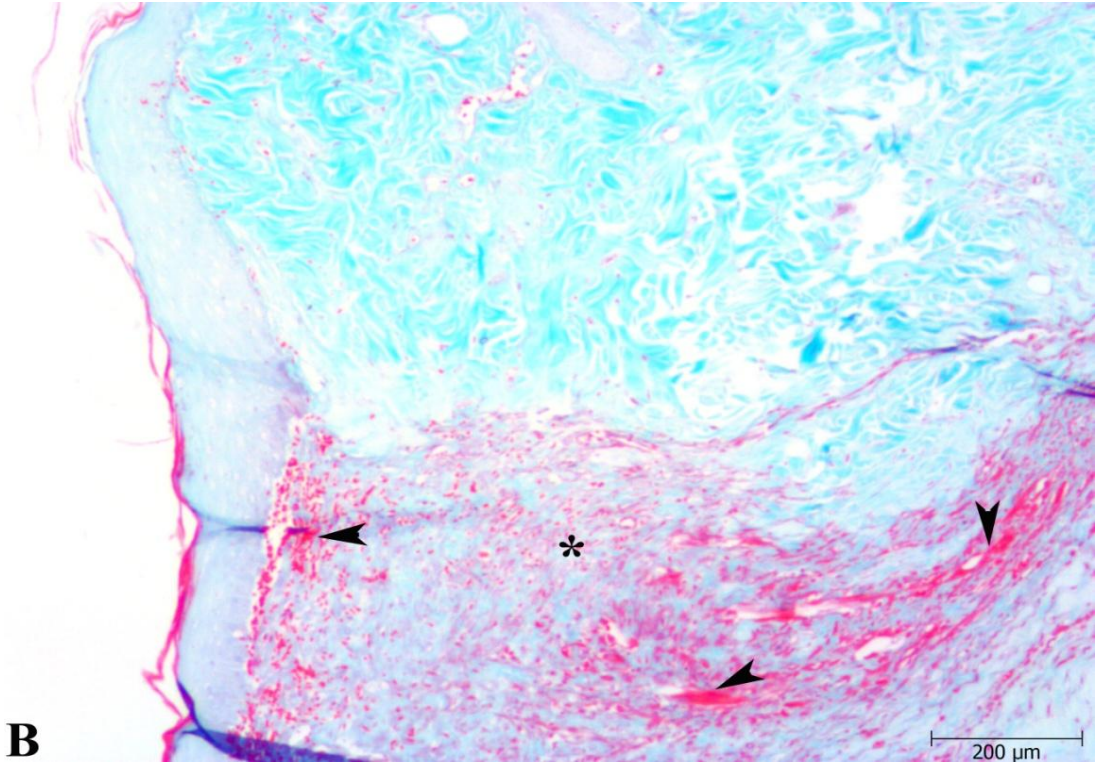
**Resim 18a.** Kontrol grubunda H&E boyasında fibroblast ve yoğun inflamatuvar hücre içeren granülasyon dokusu (\*), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok).



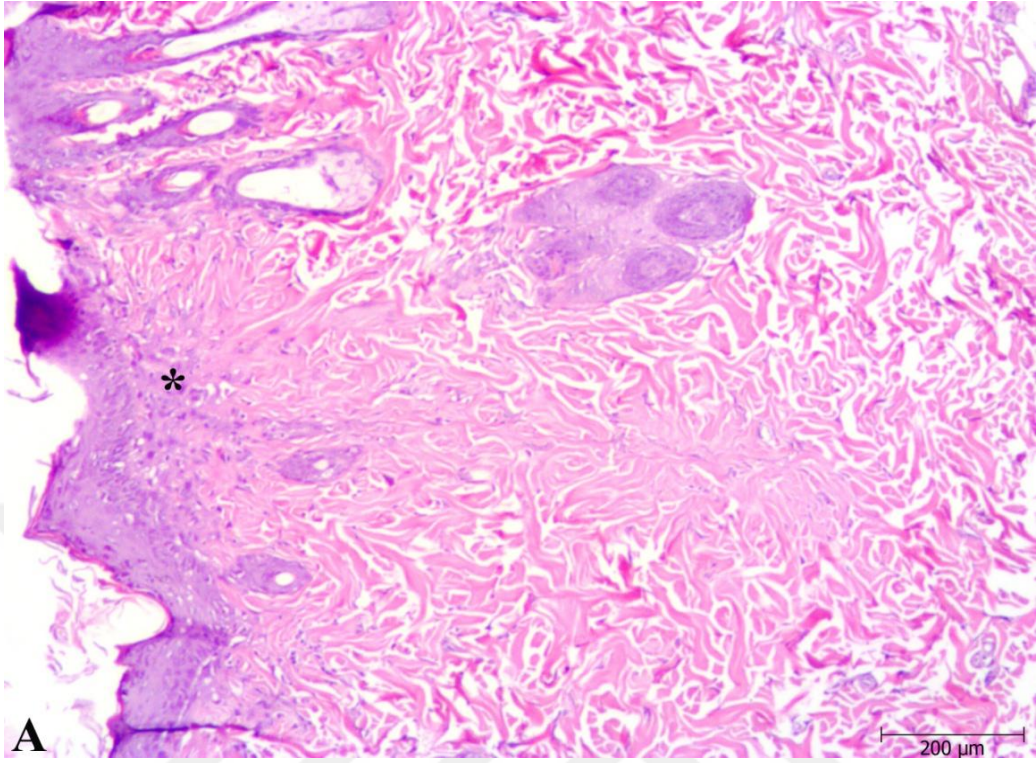
**Resim 18b.** GT boyasında granülasyon dokusu (\*).



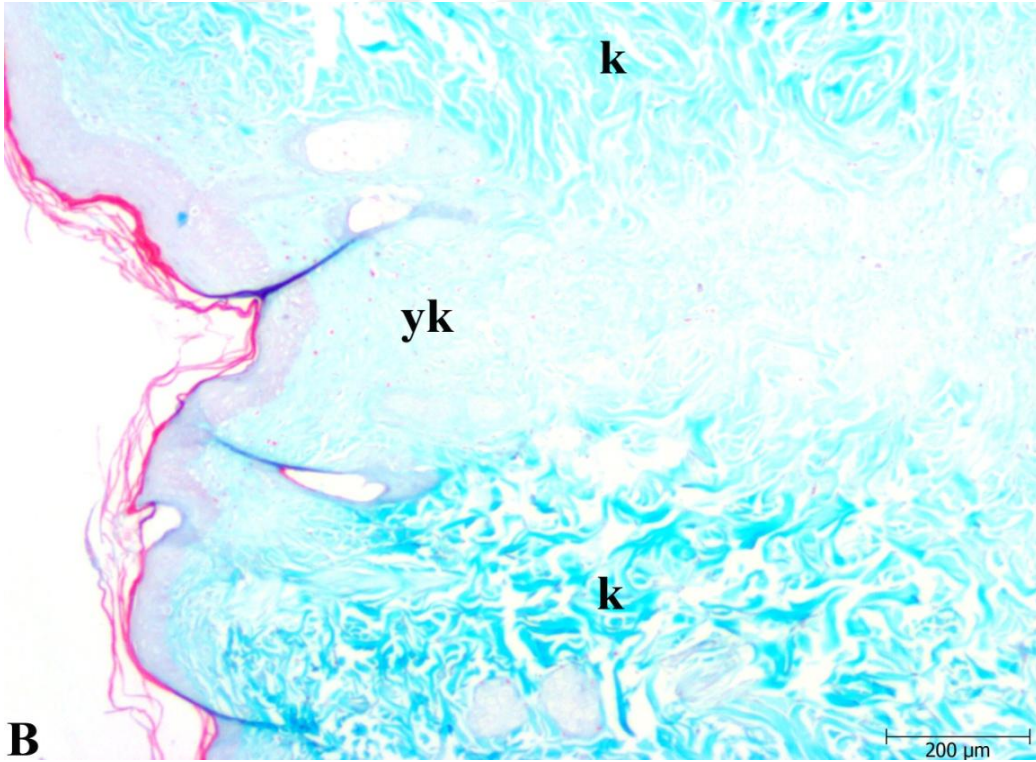
**Resim 19a.** Negatif kontrol doku grubunda H&E boyasında granülasyon dokusu (\*), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok).



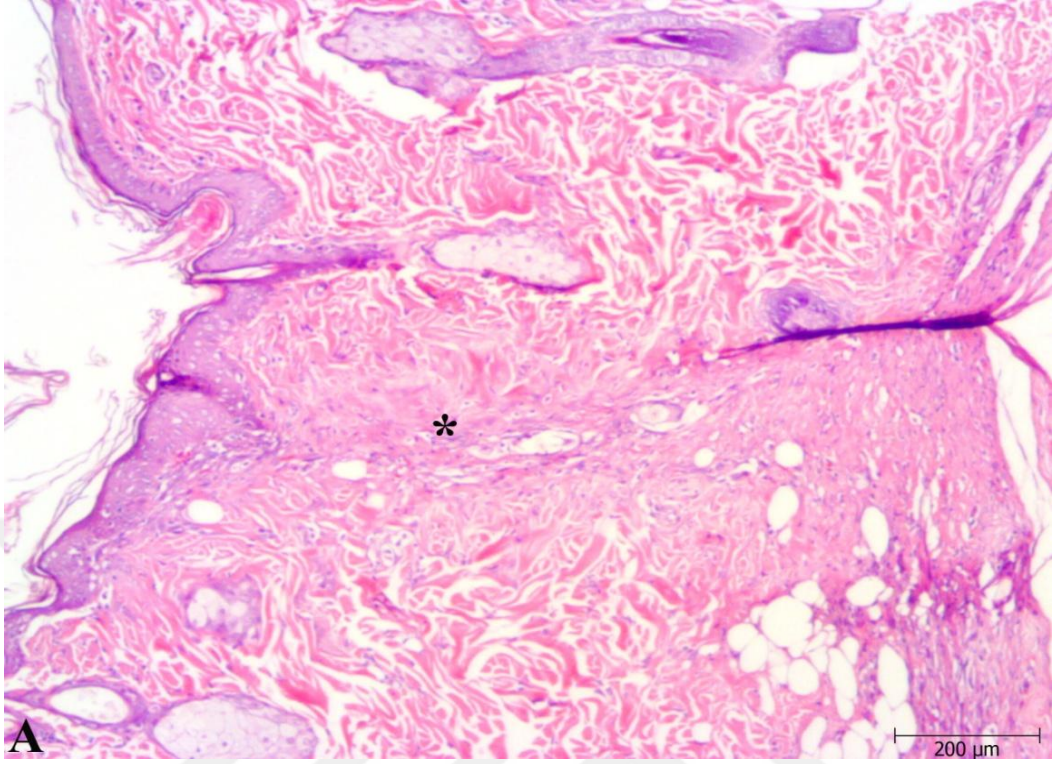
**Resim 19b.** GT boyasında granülasyon dokusu (\*), yeni damar oluşumu (ok başı).



**Resim 20a.** Pozitif kontrol doku grubunda granülasyon dokusu (\*), H&E boyası.



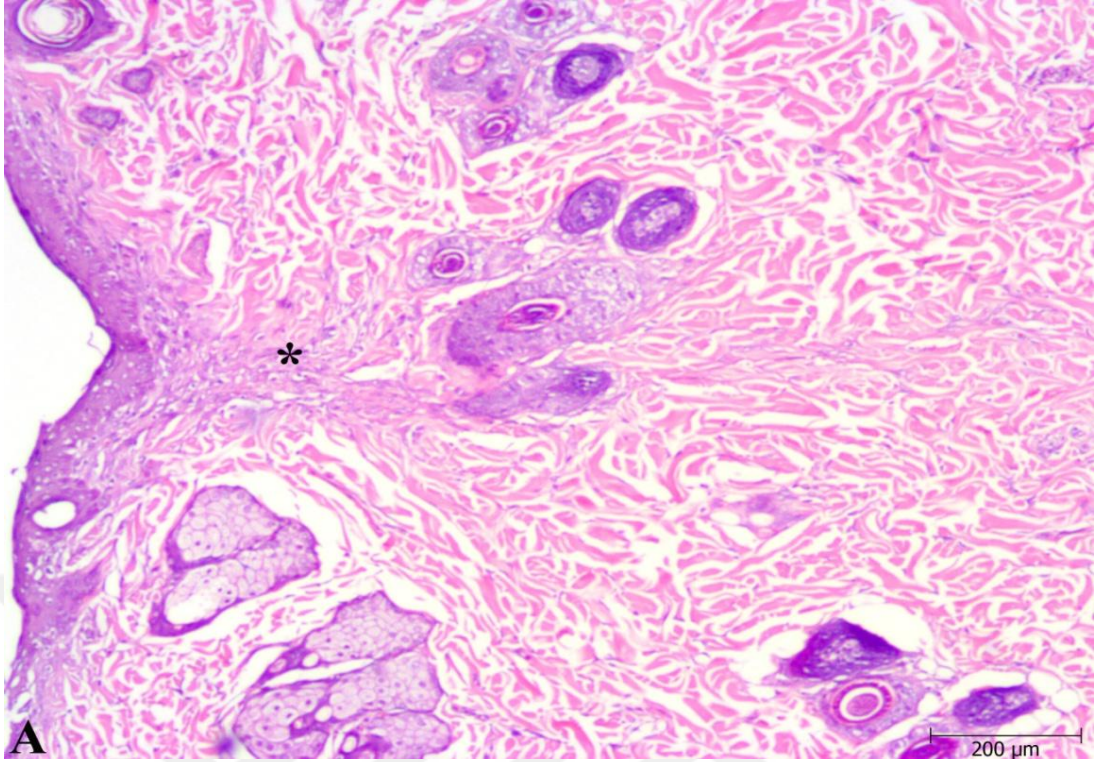
**Resim 20b.** GT boyasında yara alanı dışında yer alan kolajen (k) ve yara alanında daha açık yeşil renkte izlenen yeni kolajen birikimi (yk).



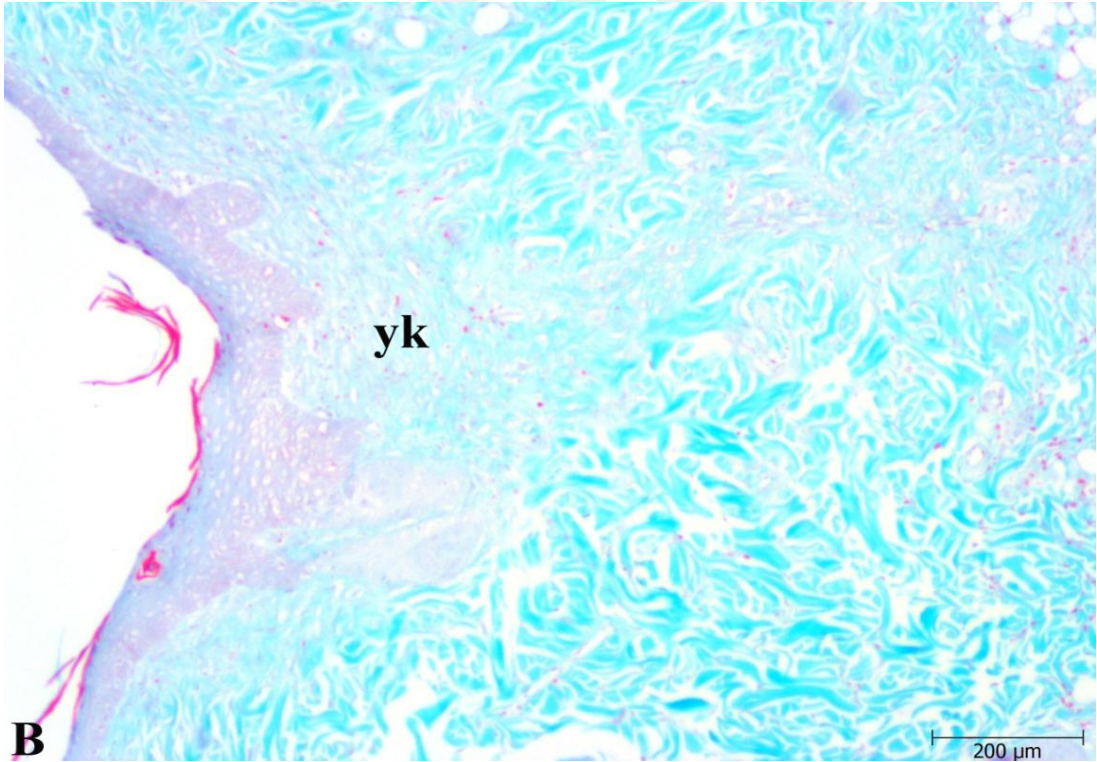
**Resim 21a.** Tedavi heptan ekstresi grubunda granülasyon dokusu (\*). H&E boyası.



**Resim 21b.** GT boyasında yara alanında izlenen yeni kolajen birikimi (yk).



**Resim 22a.** Tedavi metanollü ekstre grubunda granülasyon dokusu (\*). H&E boyası.



**Resim 22b.** Aynı grupta GT boyasında yara alanında izlenen yeni kolajen birikimi (yk).

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerin ürettiği doğal ürünler olan primer ve sekonder metabolitler doğrudan veya dolaylı olarak tedavi amaçlı kullanılabilen ilaç adayları için en temel ürünlerdir. Bu özelliklerinden dolayı bitkiler ve bitkilerin taşıdığı bu bileşikler üzerinde yapılan bilimsel araştırmaların sayısının her geçen gün arttığı görülmektedir. Günümüzde birçok rahatsızlığa karşı (diyabet, kanser vb.) doğal kaynaklı ürünleri kullanılması, tedavi amacıyla kullanılan bazı ilaçların yetersiz olması, insanları yeniden doğal kaynaklı ürünlere yönelmesine neden olmuştur. Ayrıca günümüzde, insanların tedavi konusunda bilinçlendiği, hastalıklara yakalanmamak ve bağışıklık sistemlerini güçlendirmek için günlük yaşamlarında doğal kaynaklı antioksidanlara yer verdiği görülmektedir. İnsan sağlığı açısından önem taşıyan güçlü antioksidan aktivite gösteren ekstrelerin ayrıca yara iyileştirici, antikolinesteraz ve antiinflamatuvar aktivite gibi birçok etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda, son yıllarda antioksidan aktivite gösteren bitki veya bitki ekstrelerinin, hem ilaç hem de gıda sanayiinde büyük önem kazandığı görülmektedir (Giorgi ve ark., 2009).

Yara, dış etmenlerin yanı sıra diyabet ve obezite gibi her geçen gün artış gösteren hastalıklarla da bağıntılı bir sağlık sorunudur. Yıllık yara tedavi masrafları 25 milyar ABD dolarını geçmekte ve cilt yara bakım ürünlerinin pazar değeri de 12 milyar ABD dolarına sahip bir piyasa oluşturmaktadır. Yaraların toplum üzerinde muazzam sosyal ve ekonomik etkilere sahip olması, yara komplikasyonlarının altında yatan biyolojik mekanizmaların ortaya çıkarılması için daha çok çalışmaya ve kaynak tahsis edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur (Sen ve ark., 2009).

Yara iyileşme aşamaları birçok biyolojik aktivite ile gerçekleşmektedir. Plateletlerin, nötrofillerin, makrofajların ve fibroblastların aktif rol almasının yanı sıra interlökinlerin ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin ve önemli büyüme faktörlerinin de (trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi) salgılandığı bir bütündür (Shah ve ark., 2012).



Dünya genelinde, tahminen 250 bin çiçekli bitki türünden sadece % 15'i fitokimyasal olarak değerlendirilmiş ve bunların arasından biyolojik aktivitesi taranan bitki sayısı ise % 6 olarak değerlendirilmiştir (Cronquist, 1981; Verpoorte, 2000). Son yıllarda geleneksel bitkiler kullanılarak yapılan tedaviye ilgi artmış ancak buna rağmen bilinen geleneksel bitkisel ilaçların çok az bir kısmı yara ve cilt bozukluklarının tedavisi için geliştirilmiştir (Mantle ve ark., 2001). Bu sebeple, yara iyileşmesi üzerine antiinflamatuar, antioksidan ve antimikrobiyal etki gibi olumlu etkilere sahip olan bitkisel ajanların araştırılması önem taşımaktadır (Pazyar ve ark., 2014).

Yapılan literatür taramasında, Ülkemizde Tunceli yöresinde geleneksel halk ilacı olarak haricen yara iyileşmesinde yaygın olarak kullanılan *Scorzonera veratrifolia* bitkisinin kökünde bulunan birkaç bileşiğin izolasyonu haricince (Sarı ve ark., 2011) herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile *Scorzonera veratrifolia* bitkisinin kök ve gövdesinden elde edilen ekstrelerin *in vivo* ve *in vitro* yöntemler kullanarak yara iyileşmesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Antioksidan aktiviteyi tespit etmek için toplam fenolik madde içeriği, demir (III) indirgeme antioksidan kuvvet ve DPPH\* radikal temizleme aktivitesi *in vitro* testler olarak çok sık kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. DPPH radikal temizleme aktivitesi olan antioksidanların bu özelliğinin hidrojen verme yetenekleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Wadood ve ark., 2013; Kumar ve ark., 2017). Polifenoller, antioksidan, antimutajenik, antitümör gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Tai ve ark., 2011). Fenolik bileşikler, antioksidatif ajanlar olarak hareket ettiklerinden sağlık açısından yararlı olarak görülmektedirler (Oztürk ve ark., 2011). FRAP testi ile bileşiklerin indirgeme potansiyeli gösterilmekte olup, yöntem  $Fe^{+3}$ 'ün  $Fe^{+2}$ 'ye indirgemesi prensibine dayanmaktadır (Benzie ve Stain, 1996).

*Scorzonera undulata* bitkisinden elde edilen ekstreler ile yapılan *in vitro* testlerde DPPH\* radikal temizleme ve FRAP aktivitesi ile toplam fenolik madde içeriğinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Athmouni ve ark., 2015).

*Justicia adhatoda* yapraklarından elde edilen ekstrelerle DPPH\* aktivitesinin ve toplam fenolik madde içeriğinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Jha ve ark., 2014).

Çalışmamızın ilk basamağını oluşturan antioksidan aktivitenin ve bitki içeriğindeki fenolik madde bileşiklerinin araştırılması ile elde edilen veriler sonucunda, *S. veratrifolia* bitkisinin toprak üstü kısmının kök kısmına göre DPPH radikal süpürücü ve FRAP aktivitesinin yüksek olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde toprak üstü kısmının kök kısmına göre toplam fenolik madde içeriğinin de daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda, güçlü antioksidan aktivite gözlenen *S. veratrifolia*'nın bu etkilerinin metanollü ve heptanlı ekstrelerinin taşıdıkları fenolik bileşiklerden dolayı olabileceği kanaatine varılmıştır.

Yara iyileşmesi, yara olan bölgeye hücre sel yanıtlarla başlar ve bu süreçte fibroblastların, endotel hücrelerin ve makrofajların aktivasyonu gerçekleşir. Yara olan bölgede yapının tekrar düzelmesi ve fonksiyonunu kazanması için fibroblast proliferasyonu gerçekleşir (Clark, 2001; Mensah ve ark., 2001). Bu sebeple yara iyileşmesinde fibroblast proliferasyonunun gösterilmesi önem arz etmektedir.

Muhammad ve ark. *Moringa oleifera* bitkisinin ekstresi ile yaptığı çalışmada yara iyileştirme üzerine etkinin gösterilmesi amacıyla hücre canlılığını *in vitro* olarak araştırmış ve bitki ekstresinin proliferasyon üzerine olumlu etkilere sahip olduğunu göstermişlerdir (Muhammad ve ark., 2013). Çalışmamızda da benzer şekilde *S. veratrifolia* bitkisinin kök ve toprak üstü ekstrelerinin kontrol grubuna kıyasla *in vitro* hücre canlılığını ve fibroblast göçünü arttırdığı ve ayrıca kök kısmının ise toprak üstü kısma göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Bitki ekstrelerinin antikanser ve sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi güvenli tedavi için önemlidir. Bitkinin olası toksik etkilerinin ve doz aşımında ortaya çıkabilecek istenmeyen etkilerinin belirlenmesine olanak sağlar. Hücre kültürü deneyleri, belli bir hücre türünün mikro boyutta bulunan maddelere karşı bile duyarlılığını test etmek için kullanılan popüler ve etkili yöntemlerdir. Bitki ekstrelerinin çeşitli hücre hatları üzerindeki toksik etkileri, sitotoksik ve antikanser aktivitesi MTT testi ile değerlendirilebilmektedir. Aynı şekilde NIH-3T3 fare fibroblast hücre kültürleri kullanılarak yapılan MTT testi de bu doğrultuda yara

iyileştirme aktivitesini *in vitro* olarak test etmek için kullanılan hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir yöntemlerden biridir (Abe ve ark., 2000; Padmaja ve ark., 2002; Rahman ve ark., 2016; Morshed ve ark., 2011). NIH-3T3 fibroblast hücre hattı ile yapılan bir çalışmada *Terminalia fagifolia* bitkisinden elde edilen ekstrelerin sitotoksik etki göstermediği görülmüştür (Araujo ve ark., 2015). Çalışmamızda da benzer şekilde, *Scorzonera veratrifolia* bitkisinin her iki ekstresinin farklı konsantrasyonlarda NIH-3T3 fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği ve bitki kökünden elde edilen ekstrenin, toprak üstü kısmından elde edilen ekstresine göre daha yüksek migrasyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

İnsan prostat kanseri hücre hattı olarak PC-3 hücreleri, insan rahim ağzı kanseri hücre hattı olarak HeLa hücreleri, insan kolon kanseri hücre hattı olarak HT29 hücreleri, insan akciğer kanseri hücre hattı olarak A549 hücreleri özellikle antikarsinojenik aktivitenin gösterilmesinde toksisite çalışmalarında kullanılan hücre hatları olup MTT tekniğiyle beraber çalışılmaktadır (Perkel ve ark., 1990; Scherer ve ark., 1953; Fogh ve Trempe, 1975; Giard ve ark., 1973).

Rascon ve ark.'nın *Asclepias subulata* bitki ekstrelerinde yaptığı çalışmada HeLa, A549 ve PC-3 hücre hatlarında antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Rascon ve ark., 2015).

*Curcuma zedoaria* bitkisinin ekstraktları ile yapılan testlerde ise PC-3 ve HT29 hücre hatlarında antiproliferatif bir aktivite görülmüştür (Ahmed ve ark., 2014).

Çalışmamızda *Scorzonera veratrifolia* bitkisinin her iki ekstresinin farklı konsantrasyonlarının insan rahim ağzı kanseri (HeLa), insan akciğer kanseri (A549), insan prostat kanseri (PC-3) ve insan kolon kanseri (HT29) hücre hatlarında ise antiproliferatif bir aktiviteye sahip olmadığı, aksine kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir.

Yara iyileşme süreci, dermis ve epidermis arasındaki hücrelerin etkileşimleri ile inflamatuvar hücrelerden, fibroblastlardan ve keratinositlerden salınan kimyasalların etkileşimiyle gerçekleşir. Mazonkimal hücrelerin ve kılcıl damarların çoğalmasının yanı sıra makrofajların granülasyon dokusu içine dahil olması, yara olan bölgedeki

defektin yerini almasına ve yeniden epitelizasyon için gereken substratlar ve indükleyiciler ile beraber hareket eder. Granülasyon dokusunun kütlesinin artması ve protein miktarının çoğalması, hücre dışı proteini olan kollajen sentezinin artışına neden olan hücrel proliferasyonu gösterir. Yara iyileşme sürecinin hızlanmasında epidermin yenilenmesi, fibroblastların ve endotel hücrelerin görevi, kılcal damarlanma ve kollajen artışının desteklenmesi gibi faktörlerin önemi birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Çeşitli hücre bazlı terapiler, fizyolojik ve patolojik durumlarda yara iyileşmesini hızlandırmak için umut verici stratejiler sunmaktadır (Wu ve ark., 2007; Kant ve ark., 2013; Yariswamy ve ark., 2013; Fikru ve ark., 2012; Gio ve Dipietro, 2010). Joshi ve ark.'nın *Leea macrophylla* bitkisinin ekstraktı ile yaptıkları çalışmada kollajen artışının yara iyileşme sürecine olan etkisini histolojik çalışmalar ile gösterilmiştir (Joshi ve ark., 2016). *Carissa spinarum* ekstresi ile yapılan histolojik çalışmada ise hücrel proliferasyonun artışı gözlemlenmiştir (Sanwal ve Chaudhary, 2011).

Çalışmamızda da benzer şekilde deri dokularının histolojik incelemeler sonrasında HE ve ME tedavi gruplarında kontrol grubuna göre inflamatuvar hücrelerin azalarak, fibroblast göçünün ve granülasyon dokusunun artış gösterdiği görüldü. Ayrıca bu bulgulara ilave olarak HE ve ME gruplarında baskın kollajen birikiminin olduğu da tespit edildi. Histoloji çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile *in vitro* hücre proliferasyonu testlerinden elde edilen veriler arasında korelasyon olduğu görüldü.

Literatürde, inflamasyon oluşumu ve lipid peroksidasyonunun bazı kimyasal ajanlar aracılığı ile DNA alt birimlerine bağlanarak özel bileşiklerin oluşmasına ve MPO aracılığı ile oluşan HOCl'in nükleotidlerin modifikasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Strzepa ve ark., 2017; Cadet ve Davies, 2017). MDA'nın DNA'ya bağlanarak aduktlar meydana getirebileceği ve DNA'nın işlevinde bozukluklara yol açabileceği bildirilmiştir (Chaudhary ve ark., 1994). Genotoksik ajanlara maruziyetin gösterilmesinde sıklıkla kullanılan Comet tekniği DNA hasarının düzeyini göstermek amacıyla kullanılan bir tekniktir (Collins, 2004; Sardas ve ark., 2010; Beceren ve ark., 2016). Çalışmamızda sıçanların periferik kan lenfositlerinde comet tekniği uygulanması sonucunda gruplardan elde edilen ortalama %DNA<sub>T</sub> değerleri

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı ( $p>0.05$ ) görüldü. Benzer şekilde oksidatif DNA hasarının gösterilmesinde bir biyogösterge olarak kullanılan 8-OHdG düzeyleri de ölçülmüş olup, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı ( $p>0.05$ ) görüldü.

Reaktif oksijen türlerinin, hücreler ve dokular üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle yara iyileşme sürecine olumsuz etki ettiği bildirilmiştir. Oksidatif stres olması halinde meydana gelen lipid peroksidasyonu ROS artışına bağlıdır. Hücrenin fonksiyonel yapısının bozulmasıyla meydana gelen oksidatif stres özellikle membran lipidlerinin oksidasyona uğraması sonucu olmaktadır. Oksidan hasarın belirlenmesinde bir biyogösterge olarak kullanılan MDA, lipid peroksidasyonunun bir ürünüdür (Casini ve ark., 1986). Abood ve ark.'nın sıçanlarda kesi yarası oluşturarak yaptıkları çalışmada, MDA seviyelerinde artış olduğu ve yaralı bölgeye *Phaleria macrocarpa* ekstresinin uygulanması ile MDA seviyelerinde anlamlı bir düşüş olduğu tespit edilmiştir (Abood ve ark., 2015). Bir başka çalışmada, *Annona muricata* yaprak ekstrelerinin kesi yarası oluşturulan sıçanlara uygulanması sonucunda MDA düzeylerinde anlamlı bir düşüş olduğu bildirilmiştir (Moghadamtousi ve ark., 2015). Benzer şekilde çalışmamızda *S.veratrifolia* bitkisinin metanollü ve heptanlı ekstrelerinin uygulandığı grupların doku MDA düzeylerinin kontrole kıyasla istatistiksel olarak düşük olduğu ve pozitif kontrol grubu ile benzer düzeyde olduğu görülmüştür.

Glutasyon, vücudun antioksidan savunma mekanizmasında önemli bir rol oynayan, canlı organizmalarda bulunan protein olmayan bir tiol antioksidan bileşimidir. GSH,  $H_2O_2$  ve lipid peroksit gibi oksitleyici ajanların indirgemesinde rol alarak radikallerin detoksifikasyonunda önemli bir yere sahiptir (Teng ve ark., 2001; Roy ve ark., 2012; Venukumar ve Latha., 2002). *Leea macrophylla* bitkisinden elde edilen ekstrelerle yapılan kesi yarası tedavisinde, GSH seviyelerinin anlamlı bir şekilde yükseldiği bildirilmiştir (Joshi ve ark., 2016). Aynı şekilde Chaturvedi ve ark.'nın *Jasminum grandiflorum* bitkisinden elde ettikleri ekstraktları sıçanların kesi yarasına uygulamaları sonucu GSH seviyeleri anlamlı bir şekilde yüksek çıkmıştır (Chaturvedi ve ark., 2013). Çalışmamızda ME ve HE gruplarında kontrole kıyasla

GSH düzeylerinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülürken ( $p<0.01$ ), pozitif kontrol ile kıyaslandığında anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ).

Yara oluşumu sonrasında oksidatif strese bağlı antioksidan savunma sisteminin zayıfladığı ve lipid peroksidasyonunun arttığı literatürde bildirilmektedir. Çalışmamızda doku MDA düzeylerinden elde edilen veriler *S.veratrifolia* bitkisinin lipid peroksidasyonunu azalttığını ya da önlediğini göstermektedir. MDA düzeylerinde görülen bu azalış, endojen antioksidan olan GSH düzeylerinin ME ve HE uygulamaları sonrasında artması ile oksidan hasara karşı dokuları koruyarak lipid peroksidasyonunu azalttığı şeklinde yorumlanabilir.

İnflamatuvar yanıt sırasında ekstraselüler sıvıya salınan MPO, fagositik hücrelerde bulunan lizozomal bir enzim türüdür. ROS'lar ve sitokinler tarafından harekete geçen nötrofiller MPO enziminin salınımını sağlar. Oksidatif stres esnasında çoğalan MPO aktivitesi oksidan moleküllerinin üretilmesini sağlayarak doku hasarına sebep olur (Nauseef, 1998; Şener ve ark., 2015). *Solidago chilensis* ekstraktlarının sıçanlarda oluşturulan yara modeline uygulanması sonucu yara dokularında MPO aktivitesinde anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür (Barros ve ark., 2015). Çalışmamızda ise deri dokularında MPO aktivitesinin ME ve HE gruplarında, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde düşük olduğu ( $p<0.001$ ) görülürken, pozitif kontrole göre kıyaslandığında anlamlı farklılık görülmemiştir ( $p>0.05$ ).

Yara oluşumunda belirlenen MDA düzeyleri ve MPO aktivitesindeki artış ile glutasyon düzeylerinde azalma ciddi doku hasarına neden olabilir (Parihar ve ark., 2008). Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, *S. veratrifolia* bitki ekstrelerinin uygulandığı kesi yarası dokularında MDA düzeyi ve MPO aktivitesindeki artışı önlediğini ve glutasyon düzeylerinin korunmasında etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca histolojik incelemelerde görülen inflamatuvar hücre proliferasyonundaki azalış, doku MPO aktivitesindeki azalış ile desteklenmektedir. Bu veriler doğrultusunda *S. veratrifolia* bitkisinin yara tedavisinde kullanılabileceği görüşüne varılmaktadır.

Yara iyileşmesi esnasında, granülasyon dokusunun gelişmesi için nötrofil ve makrofaj hücrelerinin yara bölgesine göç etmesini ve IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin de salgılanması gerçekleşir (Li ve ark., 2007). Sitokin düzeyleri iyileşmeyen yaralarda, özellikle de IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  düzeylerinde, iyileşme sürecinde olan yaralara göre daha yüksektir (Chin ve ark., 2005; Trengove ve ark., 2000). Bu sitokinlerin düzeylerinin yüksek olması, granülasyon dokusu oluşumundaki gecikmeyi ve yara iyileşmesinin yeterli olmadığını veya sürecinin uzadığını göstermektedir (Werner ve Grose, 2003). *Pyrostegia venusta* ekstreleriyle yapılan yara iyileşmesi çalışmasında TNF- $\alpha$  düzeylerinin yara iyileşme sürecinin son aşamalarında düşük seviyede çıktığı görülmüştür (Roy ve ark., 2012). Benzer şekilde Mendes ve ark.'nın *Aleurites moluccana* ekstreleri ile yaptığı çalışmada IL-1 $\beta$  sitokin salınımının yara iyileşme evresinde azaldığı bildirilmiştir (Mendes ve ark., 2015). Çalışmamızda, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyelerinin kontrol grubuna göre ME ve HE gruplarında düşük çıktığı görüldü.

Birden çok çalışmada oksijen bazlı serbest radikallerin doku hasarına yol açtığı raporlanmıştır (Bakar ve ark., 2015; Arthur ve ark., 1985). Bu sebepten serbest radikallerin süpürülmesinin dokuların oksidan hasara karşı korunmasında önemli olduğu gösterilmiştir (Ciftci ve ark., 2015; Alturfan ve ark., 2012; Sener ve ark., 2007). ROS'ların enzimatik olarak parçalanmasında ve zarar vermeyecek hale gelmesinde SOD, CAT ve GPx (glutatyon peroksidaz) enzimleri rol alır. SOD, CAT ve GPx enzimlerinin aktivitelerinde oluşacak azalma yüzünden dokularda bulunan ROS miktarında bir artış söz konusu olur (Bakar ve ark., 2015; Gerin ve ark., 2016). Dokularda ROS miktarı luminol ve lusigenin problemleri kullanılarak kemilüminesans yöntemiyle ölçülebilmektedir (Haklar ve ark., 2001; Sener ve ark., 2006). Luminol yardımıyla gerçekleştirilen ölçümlerde hidroksil, hidrojen peroksit, hipoklorit ve hidroperoksit radikalleri, lusigenin yardımıyla gerçekleştirilen ölçümlerde ise süperoksit tayini yapılır. Kemilüminesans yöntemler hipertansiyon, diyabet ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların dokularda bulunan O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretimini ne yönde etkilediği hakkında önemli bilgiler edinilmesini sağlamıştır (Dikalov ve ark., 2007).

Bizim çalışmamızda kesi yarası sonrasında deri dokusunda ROS miktarı luminol ve lusigenin aracılı kemilüminesans yöntem ile ölçüldü. Luminol düzeylerinin, ME

ve HE uygulaması ile kontrol grubuna göre azalış gösterdiği tespit edildi. Benzer şekilde deri dokusunda luminol düzeylerinin, pozitif kontrol grubunda, madekasol® uygulaması ile de azaldığı görüldü. Benzer sonuçlar lüsigenin aracılı kemilüminesans ölçümleri için de tespit edildi. *In vitro* antioksidan aktivite testlerinden elde edilen veriler ile *in vivo* ROS ölçümleri birbirini desteklemekte olup, *S. veratrifolia* bitkisinin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu dokularda görülen bu etkilerin ortaya çıkışını önlediğini göstermektedir.

Normal yara iyileşmesi sürecinde NO'nun önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır. Üç adet NOS izoformları deri dokularında eNOS, iNOS ve nNOS olmak üzere adlandırılır (Frank ve ark., 2002). Epidermal bazal tabakada, dermal fibroblastlarda, kılcal damarlarda ve ter bezlerinin keratinositlerinde eNOS ekspresyonu tespit edilebilir (Shimizu ve ark., 1997). NO, normal cilt homeostazisini gerçekleştirmede otokrin ve parakrin mediyatörü olarak görev alır (Frank ve ark., 2002; Witte ve Barbul, 2002). Yara iyileşmesinin merkezi süreçlerine destek olur (Ziche ve ark., 1994; Frank ve ark., 1999). Han ve ark., NO üzerinde *in vivo* ve *in vitro* olarak yaptığı çalışmada yara üzerinde NO varlığının yara iyileşme hızını arttırdığı yönündedir (Han ve ark., 2012). Bir başka çalışmada ise NO ile tedavi edilen yaşlı sıçanlar salin ile tedavi edilenlere kıyasla gecikmiş iyileşme gösterdiler (Bauer ve ark., 1998).

Bizim çalışmamızda kemilüminesans yöntem ile kesi yapılan deri dokularında NO düzeyleri ölçülerek karşılaştırılmıştır. NO düzeyleri kontrol ve negatif kontrol gruplarının her ikisinde de anlamlı düzeyde yüksek olup pozitif kontrol, metanol ekstresi ve heptan ekstresi uygulanan gruplarda ise NO düzeylerinin baskılanarak deri dokularında artışının önlendiği görülmüştür.

Literatürde *Scorzonera veratrifolia* bitkisinin potansiyel antioksidan, antiinflamatuar, sitotoksik ve antikarsinogenik özellikleri ile ilgili yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışma, *S. veratrifolia* bitkisinin bu özelliklerinin incelendiği ilk çalışma olması nedeniyle literatüre önemli bir katkı sunmaktadır. *S. veratrifolia* bitkisinin halk arasında yıllardır yara iyileştirmede tedavi amaçlı sıklıkla kullanılıyor olmasına dayanarak oluşturduğumuz hipotez sonucu yaptığımız *in vitro* ve *in vivo* deneylerden elde edilen veriler hipotezimizi



desteklemektedir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen veriler, ileri çalışmalara ışık tutması açısından da önem arz etmektedir. *S. veratrifolia* bitkisinin klinikte yara iyileşmesinde kullanılabilir alternatif bir tedavi yöntemi olması açısından yüksek bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Bu doğrultuda, yara iyileştirici özelliklerinin yanı sıra, olası yan etkilerinin veya toksik etkilerinin incelenmesine yönelik ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir.



## 8. KAYNAKLAR

Abe Y., Inagaki K., Fujiwara A., Kuriyama, K. Wound healing acceleration of a novel transforming growth factor-beta inducer SEK-1005. *Eur J Pharmacol.* 2000; 408: 213–218.

Aboud WN, Al-Henhena NA, Najim Aboud A, Al-Obaidi MM, Ismail S, Abdulla MA, Al Bartan R. Wound-healing potential of the fruit extract of *Phaleria macrocarpa*. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015; 12;15(2): 25-30.

Acıkara OB, Cıtioglu GS, Ozkan AMG. Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in *Scorzonera tomentosa* L. *Turk J Pharm Sci.* 2013; 10(1): 1-8.

Ahmed Hamdi OA, Syed Abdul Rahman SN, Awang K, Abdul Wahab N, Looi CY, Thomas NF, Abd Malek SN. Cytotoxic constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *ScientificWorldJournal.* 2014; 2014:321943.

Aktaş Ş. Kronik yarada lokal faktörler ve yardımcı tedaviler, *ANKEM Dergisi.* 2012; 26: 217-222.

Altındaş M. Yara-açık yara, *Cilt Hastalıkları ve Yara Bakımı Sempozyumu.* 2001; 19: 81-88.

Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Sehirli AO, Demiralp E, Sener G, Omurtag GZ. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(4) :4589-4596.

Arthur MJ, Bentley IS, Tanner AR, Saunders PK, Millward-Sadler GH, Wright R. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 1985; 89(5): 1114-1122.

Athmouni K, Belghith T, Bellassouad K, Feki AE, Ayadi H. Effect of extraction solvents on the biomolecules and antioxidant properties of *Scorzonera undulata* (Asteraceae): Application of factorial design optimization phenolic extraction. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2015; 14(4): 313-330.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 360438.

Bakar E, Ulucam E, Cerkezkayabekir A. Investigation of the protective effects of proanthocyanidin and Vitamin E against the toxic effect caused by formaldehyde on the liver tissue. *Environ Toxicol*. 2015;30(12): 1406-1415.

Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9): 1109-1115.

Bauer JA, Rao W, Smith DJ. Evaluation of linear polyethyleneimine/nitric oxide adduct on wound repair: therapy versus toxicity. *Wound Repair Regen* 1998;6: 569-577.

Beceran A, Akdemir N, Omurtag GZ, Tatlıpınar ME, Sardas S. DNA damage in gasoline station workers caused by occupational exposure to petrol vapour in Turkey. *Acta Pharm Sci*. 2016; 54(1): 53-62.

Benabdelaziza I, Habaa H, Lavaudb C, Benkhaleda M. Triterpenoids and Flavonoid from *Scorzonera undulata* ssp. *alexandrina*. *IJCBS*. 2014;5(2014): 1-5.

Benzie IF and Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;15;239(1): 70-6.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997;272(33): 20313-20316.

Cadet J, Davies KJA. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. *Free Radic Biol Med*. 2017;107: 13-34.

Candolle DE. *Flore Francaise*. 1805; 4. H. Agasse. Paris

Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res*. 2000;87(5): 349-354.

Casini A, Ferrali M, Pompella AS, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol.* 1986; 123: 520-531.

Castro L, Freeman BA. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* 2001; 17(2): 163-165.

Chamberlain DF. Scorzonera L. In: Davis PH. ed *Flora of Turkey and the East Aegean Islands.* Edinburgh University Press. 1975;5: 632-657

Chaturvedi AP, Kumar M, Tripathi YB. Efficacy of *Jasminum grandiflorum* L. Leaf extract on dermal wound healing in rats. *Int Wound J.* 2013;10(6): 675-82.

Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR, Yeola SN, Morrow JD, Blair IA, Marnett LJ. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science.* 1994;265(5178): 1580-2.

Chin GC, Diegelmann RF, Schultz GS. Cellular and molecular regulation of wound healing. In: Falabella AF, Kirsner RS, editors. *Wound Healing.* Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2005; 17–37.

Ciftci G, Aksoy A, Cenesiz S, Sogut MU, Yarim GF, Nisbet C, Guvenc D, Ertekin A. Therapeutic role of curcumin in oxidative DNA damage caused by formaldehyde. *Microsc Res Tech.* 2015;78(5): 391-395.

Clark RAF. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936(1) 355-367.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3): 249-261.

Collins AR. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol.* 2002;203: 163-177.

Cronquist A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants.* New York: Columbia University Press, 1981.

Çavdar, C, Sifil, A, Çamsarı T. Reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma. Turk Neph Dial. 1997;3: 92-95.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta. 2003;329(1-2): 23-38.

Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis, 2007;257: 143-79

De Araujo AR, Quelemes PV, Perfeito ML, de Lima LI, Sá MC, Nunes PH, Joanitti GA, Eaton P, Soares MJ, de Souza de Almeida Leite JR. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of Terminalia fagifolia Mart. extract and fractions. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015;19: 14:25.

De Barros M, Mota da Silva L, Boeing T, Somensi LB, Cury BJ, de Moura Burci L, Santin JR, de Andrade SF, Monache FD, Cechinel-Filho V. Pharmacological reports about gastroprotective effects of methanolic extract from leaves of Solidago chilensis (*Brazilian arnica*) and its components quercitrin and afzelin in rodents. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2016;389(4): 403-17.

Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. Hypertension. 2007;49(4): 717-27.

Doğan A. Pertek (Tunceli) Yöresinde Etnobotanik Araştırmalar. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. 2014, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. E Tuzlacı)

Doğan A, Tuzlacı E. Tunceli'nin bazı yöresel bitki adları. Avrasya Terim Dergisi. 2015;3(2): 23-33.

Dreifke MB, Jayasuriya AA, Jayasuriya AC. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.. 2015;48: 651-662.

Enoch, S and Leaper DJ. Basic science of wound healing. 2008;6: 31 37

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995;339(1): 37-59.

Fikru A, Makonnen E, Egualé T, Debella A, Abie Mekonnen G. Evaluation of *in vivo* wound healing activity of methanol extract of *Achyranthes aspera* L. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(2): 469-74.

Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. In: Fogh J (ed) *Human tumor cell in vitro*. Springer. 1975;1: 115-159.

Frank S, Kämpfer H, Wetzler C, Pfeilschifter J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int.* 2002;61(3): 882-888.

Frank S, Stallmeyer B, Kämpfer H. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J.* 1999;13: 2002-2014.

Gerin F, Erman H, Erboğa M, Sener U, Yılmaz A, Seyhan H, Gurel A. The effects of ferulic acid against oxidative stress and inflammation in formaldehyde-induced hepatotoxicity. *Inflammation.* 2016;39(4): 1377-1386.

Gewanther J. *Studies in Oxidative Damage-induced Signaling: A Focus Outside the Nucleus.* Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine and Dentistry. 2011; University of Rochester. (Supervised by Professor Michael A. O'Reilly).

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5): 1417-23.

Goto M, Ueda K, Hashimoto T, Fujiwara S, Matsuyama K, Kometani T, Kanazawa K. A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2' deoxythymidine. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(9): 1318-1325.

Greenwald RA. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical.* CRC Press Inc. 1985;3: 343.

Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res.* 2010;89(3): 219-229.

Güner İ, Özmen D, Bayındır O. Sitokinler. *T Klin J Med Sci* 1997; 17

Haklar G, Özveri ES, Yüksel M, Aktan AÖ, Yalçın AS. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. *Cancer Lett.* 2001;165: 219-224.

Han G, Nguyen LN, Macherla C, Chi Y, Friedman JM, Nosanchuk JD, Martinez LR. Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition. *Send to Am J Pathol.* 2012;180(4): 1465-1473.

Harkati B, Akkal S, Bayat C, Laouer H, Dijoux Franca MG. Secondary Metabolites from *Scorzonera undulata* ssp. *deliciosa* (Guss.) Maire (Asteraceae) and Their Antioxidant Activities. *Rec. Nat. Prod.* 2010;4(3): 171-175.

Henle ES, Luo Y, Gassmann W, Linn S. Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions: the deoxyguanosine family. *J Biol Chem.* 1996; 271(35): 21177-21186.

Hodgman MJ, Garrard AR. A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin.* 2012;28(4): 499-516.

Johansen JS, Harris, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol.* 2005;4: 5.

Jha DK, Panda L, Ramaiah S, Anbarasu A. Evaluation and comparison of radical scavenging properties of solvent extracts from *Justicia adhatoda* leaf using DPPH assay. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;174(7): 2413-2425.

Jones DP, Go YM, Anderson CL, Ziegler TR, Kinkade JM Jr, Kirilin WG. Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. 2004;18(11): 1246-1248.

Joshi A, Joshi VK, Pandey D, Hemalatha S. Systematic investigation of ethanolic extract from *Leea macrophylla*: Implications in wound healing. J Ethnopharmacol. 2016;191::95-106.

Jun MZ, Jianxiong AN. Cytokines, Inflammation and Pain, Int Anesthesiol Clin. 2007;45(2): 27–37.

Kalinina EV, Chernov NN, Saprin AN. Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. 2008;73(13): 1493-1510.

Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. Eur J Dermatol, 2002;12: 390-399.

Kant V, Gopal A, Kumar D, Bag S, Kurade NP, Kumar A, Tandan SK, Kumar D. Topically applied substance P enhanced healing of open excision wound in rats. Eur J Pharmacol. 2013;715(1-3): 345-53.

Kargol HS, Elgadi HM, Gadamsi MT, Shubar HM, Geroushi AM. Pharmacognostical, antimicrobial and laxative study of *Scorzonera undulata* in Libya, Int. Res. J. Pharm. 2013;4: 4

Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, Saito H, Nishimura S. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. Nucleic Acids Res. 1984;12(4): 2127-2136.

Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion. Gann. 1984;75(7): 565 566.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol. 2005;77(5): 598-625.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol. 2002;30(6): 620-650.



Korting HC, Schöllmann C, White RJ. Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25: 130-137.

Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011;711(1-2): 193-201.

Kumar S, Yadav A, Yadav M, Yadav JP. Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f. *BMC Res Notes.* 2017;10: 60.

Kurulay F, Çavdar Z. İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış. *GenelTipDer.* 2006;16(3): 143-152

Lai JJ. The Role of Androgen Receptor in Cutaneous Wound Healing. 2009; University of Rochester. (Supervised by Professor Chawnschang Chang)

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25: 9-18.

Liska DJ. The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev.* 1998;3(3): 187-198

Lu C, Song G, Lin JM. Reactive oxygen species and their chemiluminescencedetection methods. *Trends Analyt Chem.* 2006;25(10): 985-995.

Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2003;121: 231-41.

Mahmud J. The development of a novel technique in measuring human skin deformation *in vivo* to determine its mechanical properties. Institute of Medical Engineering and Medical Physics School of Engineering. 2009; Cardiff University.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999;424(1-2): 83-95.

Mantle D, Gok MA, Lennard TW. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. *Adverse Drug React Toxicol Rev.* 2001;20(2): 89-103.

McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. 2000; 108(8): 652-659.

Mendes Hoepers S, Tolentino de Souza HG, Meira Quintão NL, Roberto Santin J, Cechinel Filho V, Silva RM, Garcia Couto A, Simão da Silva KA. Topical anti-inflammatory activity of semisolid containing standardized *Aleurites moluccana* L. Willd (Euphorbiaceae) leaves extract. *J Ethnopharmacol.* 2015;173: 251-255

Mensah AY, Sampson J, Houghton PJ. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *J Ethnopharmacol.* 2001;77-2 3: 219-226.

Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Hajrezaie M, Karimian H, Abdulla MA, Kadir HA. *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. *Int J Surg.* 2015;18: 110-117.

Morshed MA, Uddin A, Rahman A, Hasan T, Roy S, Al Amin A, Ahsan R, Islam R. *In vitro* antimicrobial and cytotoxicity screening of *Terminalia arjuna* ethanol extract. *IJB.* 2011;1(2): 31-38

Muhammad AA, Pauzi NAS, Arulselvan P, Abas F, Fakurazi S. *In Vitro* Wound Healing Potential and Identification of Bioactive Compounds from *Moringa oleifera* Lam. *Biomed Res Int.* 2013; 974580: 10

Nauseef WM. Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. *Mol Med.* 1998;76: 661-668.

Nawaz, Z and Bentley G. Surgical incisions and principles of wound healing. *Surgery* 2010; 29: 59-62.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123(1): 291-298.

Oztürk H, Kolak U, Meric C. Antioxidant, Anticholinesterase and Antibacterial Activities of *Jurinea consanguinea* DC. *Rec. Nat. Prod.* 2011;5(1): 43-51.

Özoran K, Tüfek N, Düzgün N. Romatoid Artrit (Ra) ve Sitokinler: İnterlökin-1 (Il-1), İnterlökin-6 (Il-6), Tümör Nekrozis Faktör Alfa (Tnf-A) Ve İnterferon Gama (Ifn-Y). Ankara Tıp Mecmuası (The Journal of The Faculty of Medicine) 1994;47: 495-504.

Padmaja R, Arun PC, Prashanth D, Deepak M, Amit A, Anjana M. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. *Fitoterapia*. 2002;73(6): 508-10.

Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*. 2008;34: 6-17.

Pazyar N, Yaghoobi R, Rafiee E, Mehrabian A, Feily A. Skin wound healing and phytomedicine: a review. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27: 303-310

Perkel VS, Mohan S, Herring SJ, Baylink DJ, Linkhart TA. Human prostatic cancer cells, PC3, elaborate mitogenic activity which selectively stimulates human bone cells. *Cancer Res*. 1990;50(21): 6902-6907.

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8): 1499-1503.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008;17: 1063-1072.

Rahman A, Akhtar J, Sahabjadab, Arshad M. Evaluation of cytotoxic potential and apoptotic effect of a methanolic extract of *Bauhinia racemosa* Lam. against a human cancer cell line, HeLa, *EIJM*. 2016;8(4): 513-518.

Raheim AE, Donia M. Phytochemical and pharmacological studies on *Scorzonera alexandrina* Boiss. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2013;20(1): 433-439

Rascón Valenzuela LA, Jiménez Estrada M, Velázquez Contreras CA, Garibay Escobar A, Medina Juárez LA, Gámez Meza N, Robles Zepeda RE. Antiproliferative and apoptotic activities of extracts of *Asclepias subulata*. *Send to Pharm Biol*. 2015; 53(12): 1741-1751.

Roy P, Amdekar S, Kumar A, Singh R, Sharma P, Singh V. *In vivo* antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *J Ethnopharmacol.* 2012;140(1): 186-192.

Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, eds. *DNA repair mechanisms*. New York: Academic Press; 1978; 465-468.

Sanwal R and Chaudhary AK. Wound healing and antimicrobial potential of *Carissa spinarum* Linn. in albino mice. *J Ethnopharmacol.* 2011;135(3): 792-6.

Sardas S, Omurtag GZ, Tozan A, Gul H, Beyoglu D. Evaluation of DNA damage in construction-site workers occupationally exposed to welding fumes and solventbased paints in Turkey. *Toxicol Ind Health.* 2010;26(9): 601-608.

Sarı A, Ozbek B, Ozgokce F. Antimicrobial activities of two *Scorzonera* species growing in Turkey. *Asian J Chem.* 2009;21(6): 4785-4788.

Sarı A. Two new 3-benzylphthalides from *Scorzonera veratrifolia* Fenzl, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters.* 2010;24(1): 56-62.

Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. 2008;58(2): 165-71.

Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 1953;97(5): 695-710.

Schuller-Levis GB, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid. *Fems Microbiol Lett.* 2003;226(2): 195-202.

Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt T, Gottrup F, Gurtner G, Longaker M. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* 2009;17(6): 763-771

Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008;1780: 1348–1361

Sener G, Sehirli O, Tozan A, Velioglu-Ovunc A, Gedik N, Omurtag GZ. Ginkgo biloba extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(4): 543-550.

Sener G, Sehirli O, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Erkanli G, Gedik N, Yeğen BC. Propylthiouracil (PTU)-induced hypothyroidism alleviates burn-induced multiple organ injury. *Burns*. 2006;32(6): 728-736.

Shah JM, Omar E, Pai DR, Sood S. Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian J Plast Surg*. 2012;45(2): 220-228.

Shimizu Y, Sakai M, Umemura Y, Ueda H. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. *J Dermatol*. 1997;24: 80-87.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1): 184-191.

Strzepa A, Pritchard KA, Dittel BN. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. *Cell Immunol*. 2017;317: 1-8

Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kačer P. Multimarker screening of oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 562860.

Şener TE, Yüksel M, Özyılmaz-Yay N, Ercan F, Akbal C, Şimşek F, Şener G. Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*. 2015;50(8): 1382-1387.

Tai Z, Cai L, Dai L, Dong L, Wang M, Yang Y, Cao Q, Ding Z. Antioxidant activity and chemical constituents of edible flower of *Sophora viciifolia*. *Food Chem*. 2011 Jun 15;126(4): 1648-54.

Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 1993: 401

Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. Complex cellular responses to reactive oxygen species, 2005;15(6): 319-326.

Teng S, Beard K, Pourahmad J, Moridani M, Easson E, Poon R, O'Brien PJ. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact*. 2001;130-132(1-3): 285-296.

Tsevegsuren N, Edrada R, Lin W, Ebel R, Torre C, Ortlepp S, Wray V, Proksch P. Biologically active natural products from Mongolian medicinal plants *Scorzonera divaricata* and *Scorzonera pseudodivaricata*. *J Nat Prod*. 2007;70(6): 962-967

Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2000; 8: 13-25.

Valendar P, *Gene therapy in a new model of delayed wound healing*, Lund University Faculty of Medicine Doctoral Dissertation Series 2010: 86.

Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009;37(5): 1528-1542.

Venukumar MR, Latha MS. Antioxidant activity of *Curculigo orchioides* in carbon tetrachloride-induced hepatopathy in rats. *Indian J Clin Biochem*. 2002;17(2): 80–87.

Verpoorte R. Pharmacognosy in the new millennium: lead finding and biotechnology. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 253-62.

Wang Y, Edrada-Ebel RA, Tsevegsuren N, Sendker J, Braun M, Wray V, Lin W, Proksch P. Dihydrostilbene Derivatives from the Mongolian Medicinal Plant *Scorzonera radiata*. *J. Nat. Prod*. 2009; 72 (4): 671–675

Wadood A, Ghufran M, Jamal SB, Naeem M, Asnad. Phytochemical Analysis of Medicinal Plants Occurring in Local Area of Mardan. *Biochem Anal Biochem.* 2013;2: 4

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83(3): 835-870.

Witte MB and Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg.* 2002;183(4) :406-12.

Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing, 1997;77(3): 509-528.

Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 2007;25(10):2648-2659.


Yan CW, Schsandrin B. Enhances Glutathione Antioxidant Status in Rat Skin Tissue and Human Skin Fibroblasts, Hong Kong University of Science and Technology, 2010



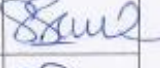

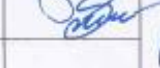
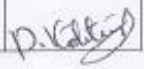
Yariswamy M, Shivaprasad HV, Joshi V, Nanjaraj Urs AN, Nataraju A, Vishwanath BS. Topical application of serine proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br. (Apocyanaceae) latex augments healing of experimentally induced excision wound in mice. *J Ethnopharmacol.* 2013;149(1): 377-383.

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration *in vitro* promoted by substance P. *J Clin Invest.* 1994;94(5): 2036-2044.

## 9. EKLER

### 9.1 Etik Kurul Onayı

  
**MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**  
**PROJE ONAY FORMU**

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	<b>PROTOKOL KODU</b>	035.2016.mar	<b>ÇALIŞMA: BİLİMSEL</b>		
	<b>PROJE ADI</b>	Neraband (Scorzonera veratrifolia) Bitkisinin Antioksidan ve Yara İyileştirici Özelliklerinin Araştırılması			
	<b>SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI</b>	Yrd. Doç. Dr. Ayfer BECEREN			
	<b>ARAŞTIRMA MERKEZİ</b>	DEHAMER			
	<b>DESTEKLEYİCİ</b>				
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>TARİH: 07.03.2016</b> Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurumumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.				
<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>					
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.				
<b>ÜYELER</b>					
<b>Ünvanı/ Adı/ Soyadı</b>	<b>Uzmanlık Dalı</b>	<b>Kurumu/ Ek Üyeligi</b>	<b>Onaylanan Proje ile İlişkisi</b>	<b>Toplantıya Katılım</b>	<b>İmza</b>
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. İnci ALICAN	Fizyoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul (Yürütücü Sekreter)	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diğ. Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet.Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÖMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Dilek KÖKTÜRK	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	



## 10. ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	Mert	<b>Soyadı</b>	Geçim
<b>Doğum Yeri</b>	Üsküdar-İstanbul	<b>Doğum Tarihi</b>	13.02.1988
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>Tel</b>	5077121604
<b>E-mail</b>	mgecim@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Lisans</b>	Pamukkale Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji	2014
<b>Lise</b>	Üsküdar Halide Edip Adivar Lisesi	2005

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint	Çok iyi

## Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Beceren A, **Gecim M**, Bingöl Ozakpınar O, Taskin T, Dogan A, Şardaş S. Antioxidant and *in vitro* wound healing activities of *Scorzonera veratrifolia*. Toxicology Letters, Volume 258, supplement, 16 September 2016, Page S73. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1346>

The 52nd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) Fibes Congress Center Seville, Spain, 04th-07th September 2016.

2. Beceren A, **Geçim M**, Bingöl Özakpınar Ö, Taşkın T, Doğan A, Şardaş S. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effect of *Scorzonera veratrifolia*. 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants "Natural and Healthy Life", 10-12 may 2017, (**Poster presentation** : P1360) Pages 165.

1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants "Natural and Healthy Life", 10-12 may 2017, (**Poster presentation** : P1360) Pages 165.

3. **Gecim M**, Beceren A, Aydemir S, Sardas S. Evaluation of incision wound healing activity of *Scorzonera veratrifolia* in Wistar albino rats. Toxicology Letters, Volume 280, Supplement, 20 October 2017, Pages S158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.442>

The 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) Bratislava, Slovakia, 10th–13th September, 2017