



***HYPERICUM PSEUDOLAEVE* ROBSON VE *VERBASCUM*  
*STACHYDIFOLIUM* BOISS. & HELDR. VAR. *STACHYDIFOLIUM* BİTKİ  
EKSTRELERİNİN YARA İYİLEŞTİRME ÜZERİNE ETKİLERİNİN *IN*  
*VITRO* ÇALIŞMALAR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Bahar KAPTANER İĞCİ**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARALIK 2019**

Bahar KAPTANER İĞCİ tarafından hazırlanan “*HYPERICUM PSEUDOLAEVE* ROBSON VE *VERBASCUM STACHYDIFOLIUM* BOISS. & HELDR. VAR. *STACHYDIFOLIUM* BİTKİ EKSTRELERİNİN YARA İYİLEŞTİRME ÜZERİNE ETKİLERİNİN *IN VITRO* ÇALIŞMALAR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Zeki AYTAÇ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

**Başkan:** Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ

Farmasötik Botanik Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

**Üye:** Prof. Dr. Hayri DUMAN

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

**Üye:** Prof. Dr. Murat EKİCİ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

**Üye:** Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

Temel Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 12/12/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Bahar KAPTANER İĞCİ

12/12/2019

*HYPERICUM PSEUDOLAEVE* ROBSON VE *VERBASCUM STACHYDIFOLIUM* BOISS. &  
 HELDR. VAR. *STACHYDIFOLIUM* BİTKİ EKSTRELERİNİN YARA İYİLEŞTİRME  
 ÜZERİNE ETKİLERİNİN *IN VITRO* ÇALIŞMALAR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ  
 (Doktora Tezi)

Bahar KAPTANER İĞCİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
 FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2019

ÖZET

Bu çalışma, *Hypericum pseudolaeve* Robson (HP) ve *Verbascum stachydifolium* Boiss & Heldr. var. *stachydifolium*'un (VS) maserasyon ve soxhlet yöntemleriyle elde edilmiş metanollü ve sulu ekstralarının *in vitro* yara iyileştirici etkilerini ve bunların sitotoksiteleri, antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşenlerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, spektrofotometri bazlı yöntemler kullanılarak ölçülmüştür. Bitki ekstralarının antioksidan aktivitesi DPPH ve total antioksidan kapasite (fosfomolibden) yöntemleri ile belirlenmiştir. Ekstrelerin L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiş ve ayrıca *in vitro* yara modeli olarak ekstre uygulanmış fibroblast hücrelerinin göçü hücre çizik testi ile değerlendirilmiştir. Türlerin kimyasal içeriği Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile analiz edilmiştir. Ek olarak, yara iyileşmesinde önemli olduğu bilinen kollajen tip I, FGF-7, TGF- $\beta$ 1 ve VEGF gen ifadeleri RNA ve protein seviyesinde sırasıyla qRT-PCR ve ELISA yöntemleri ile değerlendirilmiştir. HP ekstralarında VS'ye göre daha fazla total fenolik (HP: 123,03-177,21; VS: 41,41-104,48 mg/g GAE) ve total flavonoit (HP: 21,79-123,40; VS: 13,22-52,65 mg/g RUE) bulunmuştur. Antioksidan aktivite DPPH yöntemiyle HP için 13,04-14,68, VS için 31,08-113,83  $\mu$ g/ml IC<sub>50</sub> değerleri arasında belirlenmiştir. Toplam antioksidan kapasite ise HP ekstralarında 243,91-318,67, VS'de 119,27-215,46 mg/g AAE olarak bulunmuştur. YBSK sonuçlarına göre, bakılan bileşikler arasında HP ekstralarında epikateşin en bol olarak bulunmuştur ve kayda değer ölçüde hiperosit, kersetin, kersitrin ve gallik asit bulunduğu belirlenmiştir. VS'de ise gallik asit, rutin ve kersetin diğer bileşiklerden daha fazla miktarda bulunmuştur. Ekstreler 31,25-500  $\mu$ g/ml konsantrasyon aralığında kullanıldığında 18, 24 ve 48 saatte fibroblast hücreleri üzerinde belirgin bir toksik etki göstermemiştir. İstisnai olarak maserasyon ile elde edilmiş VS metanol ekstresi 500  $\mu$ g/ml konsantrasyonda tüm saatlerde toksik etki gösterirken, VS sulu ekstresi aynı dozda 48 saatte toksik etki göstermiştir. Hücre çizik testindeki en iyi etki, her iki türün de maserasyon yöntemiyle elde edilen sulu ekstralarında görülmüştür. HP ve VS sırasıyla %76,7 ve %60,4 hücre kapatma değerleri ile kayda değer aktivite göstermiştir. İfade seviyelerine qRT-PCR ile bakılan sitokinler ve kollajen her iki bitkinin sulu ekstresi uygulandıktan sonra artış göstermiştir. VEGF ve TGF- $\beta$ 1 ifadesi HP uygulamasında daha fazla artış gösterirken, FGF-7 ise VS grubunda daha fazla artmıştır. ELISA yöntemi ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, HP ve VS'nin yara iyileştirici özelliklerini *in vitro* yöntemler ile ortaya koymuş, fibroblastlarda yara iyileşmesinde önemli sitokinlerin ekspresyonunu arttırdığını ve çeşitli fenolik bileşikleri içerdiğini göstermiştir.

Bilim Kodu : 20309  
 Anahtar Kelimeler : Yara iyileşmesi, bitki ekstresi, antioksidan, fenolikler, YBSK, *in vitro*, ELISA, qRT-PCR  
 Sayfa Adedi : 115  
 Danışman : Prof. Dr. Zeki AYTAÇ

EVALUATION OF THE WOUND HEALING EFFECTS OF *HYPERICUM PSEUDOLAEVE*  
 ROBSON AND *VERBASCUM STACHYDIFOLIUM* BOISS. & HELDR. VAR.  
*STACHYDIFOLIUM* PLANT EXTRACTS BY *IN VITRO* STUDIES  
 (PhD Thesis)

Bahar KAPTANER İĞCİ

GAZİ UNIVERSITY  
 GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2019

ABSTRACT

This study aimed to investigate the *in vitro* wound healing effects of the methanolic and aqueous extracts of *Hypericum pseudolaeve* (HP) Robson and *Verbascum stachydifolium* Boiss & Heldr. var. *stachydifolium* (VS) obtained by maceration and soxhlet methods as well as their cytotoxicity, antioxidant activity and phenolic constituents. Total phenolic and flavonoid contents were measured using spectrophotometry-based methods. Antioxidant activities of the extracts were determined using DPPH and total antioxidant capacity (phosphomolybdenum) methods. Cytotoxic effects of the extracts on L929 mouse fibroblast cells were evaluated by MTT assay. Moreover, migration of the treated fibroblast cells was assessed by cell scratch assay as an *in vitro* wound healing model. Phytochemical content was analyzed by using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Additionally, the expressions of collagen type I, FGF-7, TGF- $\beta$ 1 and VEGF, which are important genes in wound healing, were evaluated at RNA and protein level by using qRT-PCR and ELISA methods, respectively. HP extracts were found to contain more phenolics (HP: 123,03-177,21; VS: 41,41-104,48 mg/g GAE) and flavonoids (HP: 21,79-123,40; VS: 13,22-52,65 mg/g RUE) compared to VS. Antioxidant activity of HP and VS extracts were determined between 13,04-14,68 and 31,08-113,83  $\mu$ g/ml IC<sub>50</sub>, respectively by using DPPH method. Total antioxidant capacity of HP and VS extracts were calculated to be between 243,91-318,67 and 119,27-215,46 mg/g AAE, respectively. According to HPLC results, the most abundant compound in HP was epicatechin. Hyperoside, quercetin, quercitrin and gallic acid were also found in higher amounts in HP than the other compounds analyzed. The amounts of gallic acid, rutin and quercetin were relatively higher in VS. All extracts did not show significant cytotoxic effect on fibroblast cells at between 31,25-500  $\mu$ g/ml concentration after 18, 24 and 48 h treatment. As an exception, methanolic extracts of VS were cytotoxic at 500  $\mu$ g/ml whereas aqueous extracts of VS showed toxic effect after 48 h at 500  $\mu$ g/ml. Aqueous extracts of both species obtained by maceration were found the most potent based on the cell scratch assay. HP and VS showed significant activity with the cell closure rates of 76.7% and 60.4%, respectively. The mRNA levels of collagen and cytokines increased after treatment with aqueous extracts. VEGF and TGF- $\beta$ 1 expression increased more after HP treatment whereas FGF-7 was more after VS treatment. Similar results were also obtained at protein level by ELISA method. The results of this study showed that HP and VS have wound healing potential as determined by *in vitro* methods, the expression of some cytokines important in wound healing in fibroblasts increased after treatment with the extracts of HP and VS, and these plants contain various phenolic compounds.

Science Code : 20309

Key Words : Wound healing, plant extract, antioxidant, phenolics, HPLC, *in vitro*, ELISA, qRT-PCR

Page Number : 115

Supervisor : Prof. Dr. Zeki AYTAÇ

## TEŞEKKÜR

Tez ve akademik yaşantım boyunca elini bir an olsun üzerimden çekmeyen ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Zeki AYTAÇ'a içten teşekkür ederim. Aynı zamanda tez çalışmalarımda ciddi destekleri bulunan ve yoluma ışık tutup tüm laboratuvar imkânlarını benimle koşulsuz bir şekilde paylaşan sevgili hocam Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ'a (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Laboratuvarı); lisansüstü eğitimim boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve tezime katkıları bulunan değerli hocam Prof. Dr. Hayri DUMAN'a (Gazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü); lisansüstü eğitimim boyunca her zaman desteklerini hissettiğim Prof. Dr. Murat EKİCİ'ye (Gazi Ü. Biyoloji B.); Ankara Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü laboratuvar imkanlarından sonuna kadar faydalanmamı sağlayarak desteklerini esirgemeyen ve hücre hattımı edinmemde katkıları olan Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ (Ankara Ü., Biyoteknoloji Enstitüsü) ve Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a (Ankara Ü. Veteriner Fakültesi ve Biyoteknoloji Enst.) ve A. Ü. Biyoteknoloji Enst. akademik ve idari tüm personeline; ekstraksiyon çalışmamda yardımları olan Dr. Derya ÇİÇEK POLAT'a (Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi) ve Safa GÜMÜŞOK'a; HPLC ve qRT-PCR çalışmaları için laboratuvar olanaklarından faydalandığımız Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (BTUAM); hücre kültürü çalışmalarının bir kısmını yürüttüğüm Ankara Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü'ne; ekstraksiyon çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Laboratuvarına; laboratuvar imkanlarını koşulsuz bir şekilde paylaşan sayın Prof. Dr. Aslıhan KARATEPE'ye (Nevşehir Hacı Bektaş Veli Ü., Kimya Bölümü); laboratuvar imkanlarından faydalandığım Prof. Dr. Belma ASLIM (Gazi Ü., Biyoloji B.) ve ekibine; ilk hücre pasajlama işlemlerinde destek olan Dr. Ümmügülüm TÜKENMEZ EMRE ve Araş. Gör. Kübra TAN'a; lisansüstü eğitimim boyunca her zaman desteklerini hissettiğim Prof. Dr. Zekiye SULUDERE'ye (Gazi Ü. Biyoloji B.); Gazi Ü. Fen Bilimleri Enst. Öğrenci İşleri personeli Doğan KARA'ya; 2211/C Öncelikli Alanlar Ulusal Doktora Burs Programı kapsamında aldığım burstan dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na ve bu çalışmaya maddi destek sağladığı için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerine teşekkür ederim (Proje no: 05/2017-16). Lisansüstü eğitimim boyunca tüm sabrıyla yanımda olup sonsuz desteklerini hissettiğim annem, babam ve sevgili kardeşime teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca katkılarını esirgemeyen sabrıyla her daim yanımda olan değerli eşim Dr. Naşit İĞCİ'ye (Nevşehir Hacı Bektaş Veli Ü., Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) sonsuz teşekkürlerimle.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                                            | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                                                                                                                 | iv    |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                              | v     |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                                                                              | vi    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                                                          | vii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                                                                                                                                  | ix    |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....                                                                                                                                   | x     |
| RESİMLERİN LİSTESİ .....                                                                                                                                   | xii   |
| HARİTALARIN LİSTESİ .....                                                                                                                                  | xiii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                                                                                               | xiv   |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                                                                              | 1     |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....                                                                                                                                 | 5     |
| 2.1. Yara ve Yara İyileşmesinin Aşamaları .....                                                                                                            | 5     |
| 2.2. Yara İyileşmesinde Etkili Bitki Etken Maddeleri ve Özellikleri .....                                                                                  | 10    |
| 2.2.1. Tez kapsamında analizi yapılan bitki sekonder metabolitleri .....                                                                                   | 11    |
| 2.3. Yara İyileştirici Aktiviteyi Değerlendirmek İçin Dünya Geneline Yapılan<br><i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Model Çalışmalara Örnekler.....          | 14    |
| 2.4. Türkiye’de Bitkilerin Yara İyileştirici Aktivitesini Değerlendirmek İçin Yapılan<br><i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Model Çalışmalara Örnekler..... | 20    |
| 2.5. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Bitkilerin Ekstreleri ile Yapılmış<br>Çalışmalar ve Bu Bitkilerin Çalışma İçin Seçilme Nedenleri.....             | 33    |
| 2.6. Çalışmada Kullanılacak Bitkilerin Deskripsiyonu, Ekolojisi ve Lokaliteleri .....                                                                      | 35    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                                                                                                | 39    |
| 3.1. Materyal .....                                                                                                                                        | 39    |
| 3.1.1. Bitki örnekleri ve temini .....                                                                                                                     | 39    |
| 3.1.2. Çalışılan hücre ve temini.....                                                                                                                      | 41    |
| 3.1.3. Kimyasal bileşikler.....                                                                                                                            | 41    |



**Sayfa**

|                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2. Yöntem.....                                                                          | 43  |
| 3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması ve Ekstre Yüzde Verimliliği Hesaplaması           | 44  |
| 3.2.2. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi .....                                 | 46  |
| 3.2.3. Toplam Flavonoid Miktarının Belirlenmesi .....                                     | 46  |
| 3.2.4. Toplam Antioksidan Miktarının Belirlenmesi .....                                   | 46  |
| 3.2.5. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Deneyi .....                                | 47  |
| 3.2.6. YBSK Analizi ve Miktar Tayini .....                                                | 47  |
| 3.2.7. Hücre Kültürü.....                                                                 | 48  |
| 3.2.8. <i>In vitro</i> Sitotoksite Testi.....                                             | 49  |
| 3.2.9. <i>In vitro</i> Hücre Çizik Testi (“Cell Scratch Assay”) Yara İyileşme Modeli..... | 49  |
| 3.2.10. RNA İzolasyonu.....                                                               | 50  |
| 3.2.11. RNA örneklerinden cDNA sentezi.....                                               | 51  |
| 3.2.12. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR) .....                                     | 51  |
| 3.2.13. ELISA yöntemi ile protein seviyelerinin belirlenmesi .....                        | 52  |
| 3.2.14. İstatistik analizler .....                                                        | 54  |
| 4. DENEYSEL BULGULAR .....                                                                | 55  |
| 4.1. Ekstre Yüzde Verimliliği, Toplam Fenolik ve Flavonoid İçeriği .....                  | 55  |
| 4.2. Antioksidan Aktivitesi .....                                                         | 57  |
| 4.3. YBSK (HPLC) Analizi ve Miktar Belirlenmesi .....                                     | 59  |
| 4.4. <i>In vitro</i> Sitotoksisite ve Hücre Çizik Testi Bulguları.....                    | 63  |
| 4.5. qRT-PCR ile Belirlenen RNA Seviyesinde Gen İfadeleri .....                           | 66  |
| 4.7. ELISA Yöntemi ile Protein Seviyelerinin Belirlenmesi .....                           | 69  |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                         | 73  |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                                | 91  |
| KAYNAKLAR .....                                                                           | 95  |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                            | 111 |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                                                | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 2.1. Bazı büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki yeri.....                                                                                  | 7     |
| Çizelge 2.2. Yara iyileşmesinde bazı hücrelerin fonksiyonu.....                                                                                        | 10    |
| Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan sekonder metabolitler, kimyasal yapı ve sınıflandırması. ....                                                        | 12    |
| Çizelge 3.1. Çalışılan türlerin toplama ve lokasyon bilgileri.....                                                                                     | 41    |
| Çizelge 3.2. qRT-PCR reaksiyonu koşulları.....                                                                                                         | 52    |
| Çizelge 4.1. Toplam ekstre ve ekstre verimliliği. ....                                                                                                 | 55    |
| Çizelge 4.2. Toplam fenolik ve flavonoid içeriği. ....                                                                                                 | 56    |
| Çizelge 4.3. Ekstrelerin toplam antioksidan kapasite ve DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi.....                                                   | 57    |
| Çizelge 4.4. Analiz edilen referans bileşikler için YBSK (HPLC) yöntemi doğrulama parametreleri .....                                                  | 60    |
| Çizelge 4.5. <i>H. perforatum</i> ve <i>V. stachydifolium</i> 'un sekonder metabolit içeriğinin mg/g DW cinsinden ortalama değerleri.. ....            | 61    |
| Çizelge 4.6. En yüksek ekstre konsantrasyonları uygulamasından sonra MTT testi ile elde edilen hücre yaşayabilirlik yüzdeleri (250 ve 500 µg/ml). .... | 63    |
| Çizelge 4.7. Total RNA miktarlarını ve 260/280 oranlarını gösteren tablo.....                                                                          | 66    |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                                                                                                                                    | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Yara iyileşme aşamaları.....                                                                                                                                                                                                  | 5     |
| Şekil 2.2. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri.....                                                                                                                                                                                     | 6     |
| Şekil 3.1. Tezde yapılacak çalışmaların şematik gösterimi. ....                                                                                                                                                                          | 43    |
| Şekil 4.1. Fenolik madde miktarı hesaplanması için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve miktarları gösteren grafik. ....                                                                                                                     | 56    |
| Şekil 4.2. Flavonoid madde miktarı hesaplanması için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve miktarları gösteren grafik. ....                                                                                                                   | 56    |
| Şekil 4.3. Toplam antioksidan kapasitenin hesaplanması için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve miktarları gösteren grafik. ....                                                                                                            | 58    |
| Şekil 4.4. DPPH süpürücü etkisine ait IC <sub>50</sub> değerlerinin hesaplanmasında kullanılan sigmoidal doz-cevap eğrileri. ....                                                                                                        | 58    |
| Şekil 4.5. DPPH süpürücü etki IC <sub>50</sub> değerlerini gösteren grafik. ....                                                                                                                                                         | 59    |
| Şekil 4.6. YBSK analizi sonrası <i>H. pseudolaeve</i> 'ye ait temsili kromatogramlar A. 210 nm, B. 320 nm. ....                                                                                                                          | 62    |
| Şekil 4.7. YBSK analizi sonrası <i>V. stachydifolium</i> var. <i>stachydifolium</i> 'a ait temsili kromatogramlar A. 210 nm, B. 320 nm. ....                                                                                             | 62    |
| Şekil 4.8. L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde <i>H. pseudolaeve</i> ekstrelerinin sitotoksitesi. ....                                                                                                                               | 64    |
| Şekil 4.9. L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde <i>V. stachydifolium</i> var. <i>stachydifolium</i> ekstrelerinin sitotoksitesi. ....                                                                                                 | 64    |
| Şekil 4.10. Hücre çizik deneyinde <i>H. pseudolaeve</i> ve <i>V. stachydifolium</i> var. <i>stachydifolium</i> (62 µg/ml) ekstrelerinin fare dermal fibroblast (L929) göçü üzerindeki yüzdelik kapanma değerlerini gösteren grafik. .... | 65    |
| Şekil 4.11. Hücre çizik testi deneyinde <i>H. pseudolaeve</i> ve <i>V. stachydifolium</i> var. <i>stachydifolium</i> 'un (62 µg/ml) fare dermal fibroblast (L929) göçü üzerindeki etkisini gösteren temsili görüntü. Büyütme (4x).....   | 66    |
| Şekil 4.12. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde Kollajen geni mRNA düzeyi.....                                                                                                                                   | 67    |
| Şekil 4.13. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde FGF7 geni mRNA düzeyi.....                                                                                                                                       | 68    |

| <b>Şekil</b>                                                                                         | <b>Sayfa</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 4.14. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde TGF-β1 geni mRNA düzeyi..... | 68           |
| Şekil 4.15. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde VEGF geni mRNA düzeyi.....   | 69           |
| Şekil 4.16. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde Kollajen protein düzeyi..... | 70           |
| Şekil 4.17. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde FGF7 protein düzeyi.....     | 70           |
| Şekil 4.18. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde TGFβ-1 protein düzeyi.....   | 70           |
| Şekil 4.19. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde VEGF protein düzeyi.....     | 71           |

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                     | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 3.1. <i>Hypericum pseudolaeye</i> 'nin habitat görünümü .....                       | 39    |
| Resim 3.2. <i>V. stachydifolium</i> var. <i>stachydifolium</i> 'un habitat görünümü ..... | 39    |
| Resim 3.3. <i>Hypericum pseudolaeye</i> habitus görünümü .....                            | 40    |
| Resim 3.4. <i>V. stachydifolium</i> var. <i>stachydifolium</i> 'un habitus görünümü ..... | 40    |
| Resim 3.5. Maserasyon ekstraksiyon tekniği aşamaları .....                                | 45    |
| Resim 3.6. Soxhlet ekstraksiyon tekniği aşamaları. ....                                   | 45    |

**HARİTALARIN LİSTESİ**

| <b>Harita</b>                                                                     | <b>Sayfa</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Harita 2.1. <i>H. pseudolaeve</i> 'nin yayılışı.....                              | 36           |
| Harita 2.2. <i>V. stachydifolium</i> var. <i>stachydifolium</i> 'un yayılışı..... | 37           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

| <b>Simgeler</b> | <b>Açıklamalar</b>                           |
|-----------------|----------------------------------------------|
| %               | Yüzde                                        |
| $\mu$ l         | mikrolitre                                   |
| cm              | Santimetre                                   |
| dk              | Dakika                                       |
| g               | Gram                                         |
| g               | merkezkaç kuvveti                            |
| kb              | Kilobaz                                      |
| kDa             | Kilodalton                                   |
| L               | Litre                                        |
| M               | Molar                                        |
| m               | metre                                        |
| m <sup>2</sup>  | Metrekare                                    |
| mg/L            | Miligram/Litre                               |
| mL              | Mililitre                                    |
| mm              | milimetre                                    |
| n               | Tekrar sayısı                                |
| °C              | Santigrat derece                             |
| pH              | Asitlik bazlık birimi                        |
| rpm             | Dakikada devir sayısı (Rotations per minute) |
| $\alpha$        | Alfa                                         |
| $\beta$         | Beta                                         |
| $\mu$ g         | Mikrogram                                    |
| $\mu$ g/mL      | Mikrogram/Mililitre                          |
| $\mu$ L         | Mikrolitre                                   |
| Mm              | Mikromolar                                   |

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|                 |                                                               |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>BrdU</b>     | Bromodeoksiüridin                                             |
| <b>Cdc-42</b>   | Hücre bölünme kontrol proteini 42                             |
| <b>cDNA</b>     | Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit                            |
| <b>COL</b>      | Kollajen                                                      |
| <b>DPPH</b>     | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil                                  |
| <b>EGF</b>      | Epidermal Büyüme Faktörü                                      |
| <b>ELISA</b>    | Enzim bağlı immünsorbent deneyi                               |
| <b>FGF-7</b>    | Fibroblast büyüme faktörü                                     |
| <b>HaCaT</b>    | İnsan keratinosit hücre hattı                                 |
| <b>HPLC</b>     | Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi                          |
| <b>LC-MS/MS</b> | Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi                 |
| <b>LDH</b>      | Laktat dehidrogenaz                                           |
| <b>MTT</b>      | 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid |
| <b>PDGF</b>     | Trombosit kökenli büyüme faktörü                              |
| <b>PFTE</b>     | Politetrafloroetilen                                          |
| <b>qRT-PCR</b>  | Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu         |
| <b>Rac-1</b>    | Ras ile ilişkili C3 botulinumtoksin substratı 1               |
| <b>Rho-A</b>    | Dönüştürücü protein Rho-A                                     |
| <b>RNA</b>      | Ribonükleikaasit                                              |
| <b>TGF</b>      | Dönüştürücü büyüme faktörü                                    |
| <b>TNF</b>      | Tümör nekroz faktör                                           |
| <b>VEGF</b>     | Vasküler endotelyal büyüme faktörü                            |
| <b>WST-1</b>    | 1-metoksi-5-metil-fenazinyum metil sülfat                     |
| <b>YBSK</b>     | Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi                          |



## 1. GİRİŞ

Günümüzde yapılan tahminler yaklaşık 6 milyon insanın kronik yaralardan mustarip olduğunu göstermektedir. İyileşmeyen yaralar veya kronik yaralar yılda tahmini 9 milyar liradan daha fazla bir bütçe harcanmasıyla ciddi sağlık desteği gerektirir. Darbe, kesik, basınç, yanık vb. sebeplerle oluşan fiziksel yaralanmalar ve diyabetik, gastrik ve duodenal ülserler gibi yaralar hastalara, ailelerine, bakmakla yükümlü oldukları kişilere ve sağlık bakım kurumlarına yaşlanan nüfus artışı ile küresel düzeyde sağlık hizmeti maliyeti açısından ciddi etkiler yapmaya devam etmektedir. Yaralar genellikle normal cilt anatomisini ve fonksiyonunu bozan fiziksel hasarlar, yanıklar, enfeksiyonlar veya kronik hastalıklar nedeniyle ciltte oluşan kesik veya bir açıklıktan kaynaklanır. Cildin altındaki bağ dokunun kaybına ve epitel dokunun bütünlüğünün bozulmasına neden olurlar. Kronik ve gecikmiş akut yaralar iyileşmesi en zor yaralardır. Yara iyileşmesi, iltihaplanma (0-3 gün), hücresel çoğalma (3-12 gün) ve yeniden şekillendirmeyi (3-6 ay) içeren dinamik bir süreçtir. Yara iyileşme sürecinde, kollajenaz ve elastaz enzimleri, kollajen, elastin ve fibrin gibi hücre dışı matris bileşenlerini parçalamalarıyla önemli bir role sahiptir. Ancak aktiviteleri inhibisyon mekanizmaları ile dengelenmelidir çünkü bu enzimlerin uzun süreli aşırı ekspresyonu yara iyileşmesine engel teşkil edebilir. Son yıllarda sebebi metabolik bozukluk olan hastalarda kronik yaraları iyileştirmek için doğadan (bitkiler, deniz ortamı, mantarlar ve diğer mikroorganizmalar) daha yeni ve güçlü iyileştiriciler arayışı son derece artmıştır. İskemi, Diabetes Mellitus, Venöz Staz hastalığı veya basınç ile ilişkili ülserler gibi çoğu kronik yaralar ve yara semptomları, yara bölgesinde fiziksel hasarlar, kanama, duyu ve fonksiyon kaybı, yara çevresinde kızarıklık, acı, zonklama hissi, bölgedeki dokularda büzüşme ve akıntı meydana getirir. Dünya nüfusunun %60'ı ve gelişmekte olan ülkelerin %60-90'ı birinci basamak sağlık hizmetlerinde geleneksel tıbbi bitkileri kullanmaktadır. Bir süredir, ABD, Avrupa ve Japonya da dahil olmak üzere gelişmiş ülkelerdeki insanlar arasında çeşitli hastalık durumlarının yönetim ve tedavisinde bitkisel ve doğal ürünler kullanımında artış olmuştur. Bu durum, tıbbi bitkilerde bulunan biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve karakterize edilmesine yönelik çalışmaların ve doğal ürünlerin potansiyel temel farmakolojik mekanizmalarını keşfetmek için yapılan araştırmaların bir itici gücü olmuştur [1-3]. Çeşitli ailelere dahil birçok bitki ekstresinin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle gösterilmiştir [1]. Çalışmaların çoğunda *in vivo* etkisi gösterilmiş olup, moleküler mekanizmaya yönelik detaylı çalışmalar genelde yapılmamıştır.

Yara iyileştirici faktörler, keratinosit farklılaşması ve çoğalmasının uyarılması; fibroblast çoğalması ve göçünün uyarılması; kollajen oluşumunun arttırılması ve antioksidan, antimikrobiyal ve antienflamatuar özellikler sergilemeleriyle etkilerini gösterir [1].

*Hypericum* L. (Hypericaceae) cinsi dünyada 484 takson ve 36 taksonomik seksiyon ile temsil edilir [4] ve Türkiye’de ise 119 takson ile temsil edilen *Hypericum* cinsinin 49’u endemiktir [5]. *Hypericum pseudolaeye* Robson türü *Hirtella* Stef. seksiyonunda gruplandırılır ve ülkemizde orta ve doğu Anadolu’da yayılış göstermektedir. *Hypericum* cinsi, özellikle *H. perforatum* L. (Sarı Kantaron, Binbir Delik Out, St. John's Worth), depresyon için en yaygın kullanılan tıbbi bitkilerden biridir ve yara iyileştirici etkileri hem etnobotanik hem de fonksiyonel olarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir [1,6–9]. *Hypericum* cinsinin üyeleri Türkiye’de farklı bölgelerde yayılış göstermektedir ve halk tıbbında kullanılmaktadır [10]. *H. perforatum*’un yaygın kullanımı zeytinyağında güneş ışığında masere edildiği yöntemdir [6]. *H. perforatum*’un yara iyileşme etkileri gösterilmiş olmasına rağmen (yukarıda bahsedildiği gibi), literatürde *H. pseudolaeye*’ye ait yara iyileşme potansiyeli ile ilgili herhangi bir veri yoktur. Ayrıca, bu türün kimyasal bileşenleri hakkında sınırlı bilgi mevcuttur.

*Verbascum* L. (Scrophulariaceae) cinsi Türkiye’de 411 takson ile temsil edilir ve bunların 197 taksonu endemiktir. *Verbascum stachydifolium* Boiss & Heldr. var. *stachydifolium* Türkiye’de orta Anadolu’da yayılış gösteren endemik bir türümüzdür [5]. *Verbascum* cinsine ait türlerin çeşitli kısımları insanlar arasında tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır [11] ve bu kullanımların bazıları bilimsel olarak da kanıtlanmıştır [12–14]. *Verbascum* cinsinin türleri, halk tıbbında yaraların tedavisinde kullanılmaktadır [15]. Ancak bu konuda sınırlı sayıda bilimsel çalışma vardır. *V. stachydifolium*’un yara iyileştirme özellikleri daha önce *in vivo* bir çalışma ile gösterilmiştir [6] ancak literatürde ek bir çalışma mevcut değildir. Bunun yanı sıra bildiğimiz kadarıyla bu endemik bitki türünün kimyasal bileşenleri, sitotoksitesi, antioksidan aktivitesi ve yara iyileştirme etkisinin moleküler mekanizması hakkında literatürde bilgi mevcut değildir.

#### Araştırmanın amaç ve kapsamı

Bu çalışmanın amacı potansiyel yara iyileştirici bitkiler olduğu düşünülen *H. pseudolaeye* ve *Verbascum stachydifolium* var. *stachydifolium* türlerinin yara iyileştirici özelliklerinin *in*

*vitro* olarak araştırılması, mekanizmaya dair moleküler veri elde edilmesi ve kimyasal içeriklerinin belirlenmesidir. Bu çalışma ile incelenen türlerin yara iyileştirme mekanizması hakkında moleküler seviyede daha detaylı veri elde edilerek *in vivo* ve *in vitro* modellerin uyumluluğu da değerlendirilebilecektir.

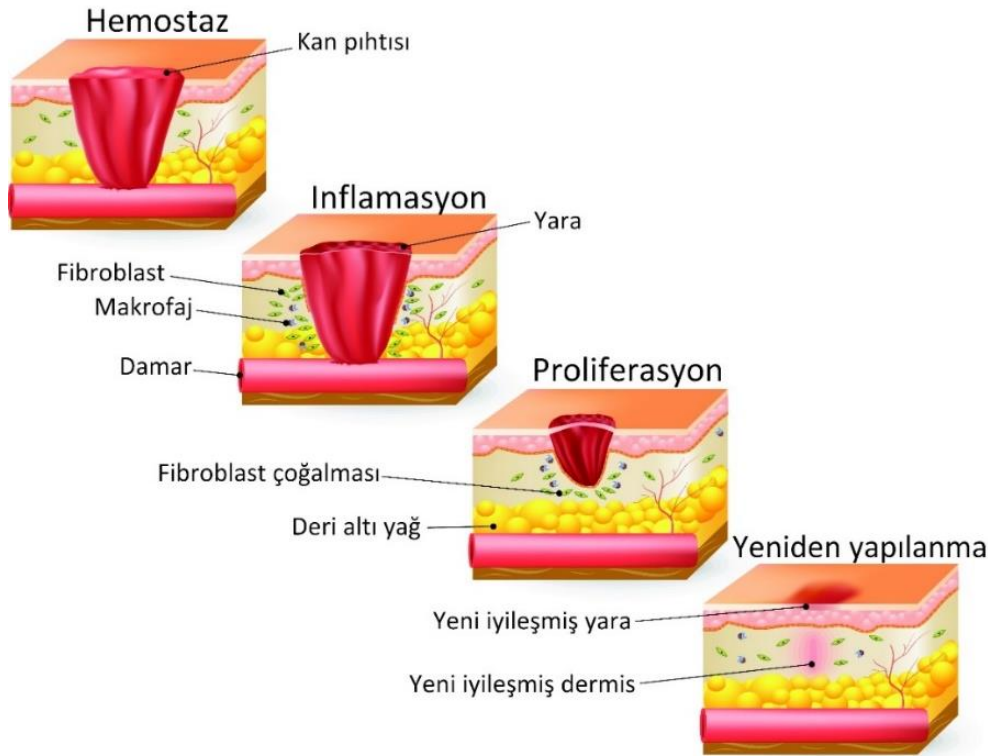
Bu amaçla sonraki başlıklarda da detaylı bilgileri verilen literatür taraması ışığında toprak üstü kısımları toplanmış bitkilerden metanol ve su ekstraktları hazırlanmıştır. Yapılan literatür taramalarında bitkilerden elde edilen etken maddelerin en iyi bu çözücülerde ortaya çıktığı gözlenmiştir. Fibroblast hücreleri düzgün bir yara iyileşme sürecinde özellikle proliferasyon, yeniden modellenme ve reepitelizasyon süreçlerinde çok önemli roller alır ve kollajen üretimi için ana hücreler olup aynı zamanda salgıladıkları sitokinler ile de yara iyileştirme sürecini yönlendirirler. Bu nedenle yara iyileşmesinin *in vitro* olarak değerlendirildiği çalışmalarda en yaygın kullanılan hücre tiplerinden biridir. Bu sebeple çalışmamızda *in vitro* yara iyileşme sürecinin değerlendirilmesinde fare fibroblast hücreleri (L929) seçilmiştir. Öncelikle ekstraktların fibroblast hücre kültürlerinde sitotoksik etkileri tetrazolium tabanlı kolorimetrik bir yöntem olan 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid (MTT) testi ile değerlendirilmiştir. Daha sonra ekstraktların fibroblast hücre göçüne etkileri hücre çizik deneyi (“*cell scratch assay*”) ile *in vitro* olarak araştırılmıştır. Hücre kazıma yöntemi, yara iyileşme sürecinde hücrelerin göçünü taklit etmesi bakımından, yara iyileşmesinin değerlendirilmesinde *in vitro* alternatif olarak kabul görmüştür ve bitki ekstraktlarının yara iyileştirici etkilerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonrasında yara iyileşmesinde önemli olduğu bilinen kollajen tip I, fibroblast büyüme faktörü-7 (FGF-7), dönüştürücü büyüme faktörü-  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) ve damar endotel büyüme faktörü (VEGF) gen ifadesi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile değerlendirilip ayrıca proteinin miktarı ise enzim bağlı immünsorbent deneyi (ELISA) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile bitkilerin kimyasal içeriği belirlenmiştir. Ayrıca total fenolik, flavonoid miktarları ve antioksidan aktiviteleri spektroskopik yöntemler ile belirlenmiştir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Yara ve Yara İyileşmesinin Aşamaları

Yaralar, normal deri anatomisi ve işlevinde bozulmaya neden olan cildin açılması veya kopmasıyla oluşan fiziksel hasarlardır. Altta yatan bağ dokusunun kaybolması ile epitel dokunun sürekliliğinin kaybedilmesine neden olurlar. İyileşmesi en zor yaralar gecikmiş akut yaralar ve kronik yaralardır [1]. Yara iyileşmesi sürekli olarak hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkilerinin olduğu inflamasyon (0-3 günler), hücresel proliferasyon (3-12. günler) ve remodelizasyon (3-6 ay) aşamalarını kapsamaktadır [2,16] (Şekil 2.1).

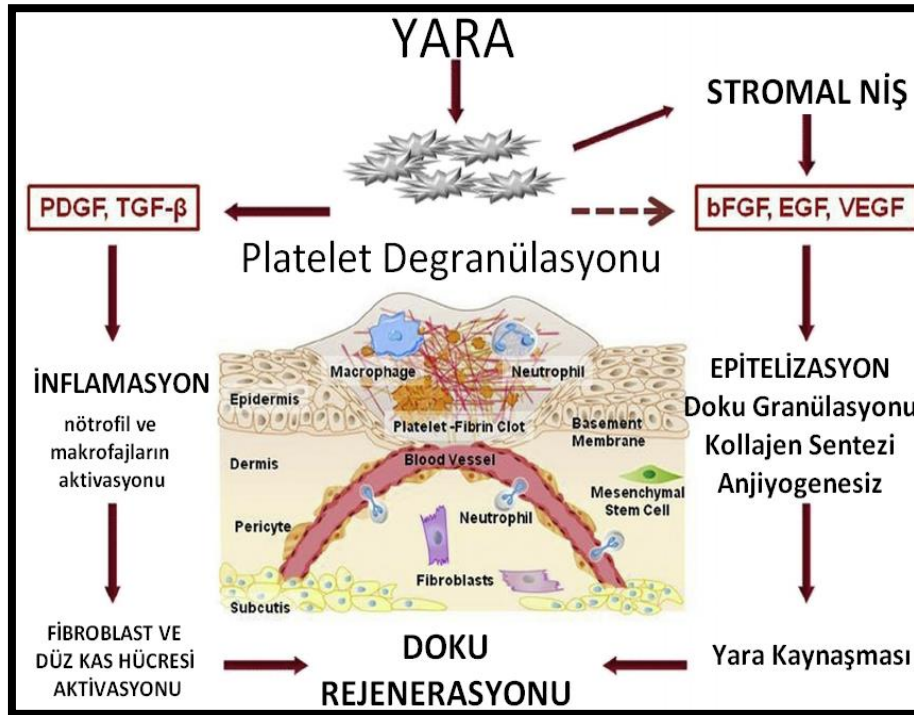


Şekil 2.1. Yara iyileşme aşamaları [17]

Yara iyileşmesi 4 ana süreçte gerçekleşir. Bunlar;

- Hemostaz,
- İnflamasyon,
- Proliferasyon ve
- Yeniden yapılanmadır.

Hemostaz: Vücudun kanamayı durdurmak amacıyla verdiği ilk ve hızlı tepkidir ve yaralı bölgedeki arteriyel kan akışını damar düz kaslarının sitoplazmik kalsiyum seviyesindeki artışı izleyen kasılma (vazokonstrüksiyon) ile azaltmasıdır. Vazokonstrüksiyonla kan akımının azalmasına bağlı olarak ortaya çıkan hipoksi ve asidoz sonucunda salınan nitrik oksit (NO), adenosin ve diğer vazoaaktif metabolitler refleksi vazodilatasyona ve arteriyel damarların gevşemesine neden olur. Buna eş zamanlı olarak mast hücrelerinden salınan histamin de vazodilatasyona katkıda bulunur ve vasküler permeabilitenin artışıyla enflamatuvar hücrelerin yara arteriyel damarların gevşemesine neden olarak ve enflamatuvar hücrelerin yara bölgesindeki ekstraselüler alana girişini kolaylaştırır. Bu durum yeni oluşan yaraların neden sıcak, kızamık ve şişkin olduğunu açıklamaktadır. Trombüs oluşumu daha fazla kan kaybını önleyen bir dizi süreçle meydana gelir. Bu süreçte rol alan trombositlerin trombüs oluşumundaki rolünün yanında çeşitli büyüme faktörlerini salgılaması yara iyileşme sürecinde önemli rol oynar. Bazı büyüme faktörleri ve fonksiyonları Çizelge 2.1’ de ve bu faktörlerin etki mekanizması Şekil 2.2’de gösterilmiştir [2].



Şekil 2.2. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri [18]

Çizelge 2.1. Bazı büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki yeri [2,19]

| Büyüme Faktörleri | Salındığı Hücre                                                                  | Görevi                                                                                                                                                                                     |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TGF- $\alpha$     | Makrofaj,<br>Trombosit                                                           | Granülasyon dokusu oluşumu, Fibroblast ve endotelial hücrelerin proliferasyonunun uyarılması                                                                                               |
| TGF- $\beta$      | Trombosit,<br>Makrofaj,<br>Nötrofil,<br>Fibroblast,<br>Keratinosit               | Kemotaksi<br>Anjiyogenezin uyarılması<br>Fibroblast ve miyofibrillerin farklılaşması<br>Kollajen matriks yapımı<br>Yara kontraksiyonu<br>Diğer büyüme faktörlerinin salınımının uyarılması |
| EGF               | Platelet,<br>Makrofaj,<br>Fibroblast                                             | Reepitelizasyon                                                                                                                                                                            |
| FGF-2             | Keratinosit,<br>Mast hücreleri,<br>fibroblast,<br>endotel, düz kas,<br>kondrosit | Granüle doku oluşumu, reepitelizasyon, matriks oluşumu, yeniden modellenme                                                                                                                 |
| VEGF              | Trombosit,<br>Nötrofil,<br>Keratinosit,<br>Makrofaj,<br>Endotel,<br>Fibroblast   | Neovaskülarizasyon ve anjiyogenezin stimülasyonu                                                                                                                                           |

Çizelge 2.1. (devam) Bazı büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki yeri [2,19]

|                |                                                                                |                                                                                                                       |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PDGF           | Trombosit,<br>Endotel<br>hücreleri,<br>Fibroblast,<br>Makrofaj,<br>Keratinosit | Kemotaksi, Fibroblast proliferasyonu ve göçü,<br>Kollajen depozisyonu, Granülasyon dokusu<br>oluşumu, Reepitelizasyon |
| TNF- $\alpha$  | Trombosit,<br>monosit,<br>makrofaj                                             | Kemotaksi, NO salınımı, inflamasyon<br>Diğer büyüme faktörlerinin salınımının<br>uyarılması                           |
| Lökotrienler   | Trombosit,<br>Lökosit                                                          | Kemotaksi<br>Vasküler permabilite artışı Lökosit adezyonu                                                             |
| Tramboksan A2  | Trombosit                                                                      | Trombosit agregasyonu Vazokonstrüksiyon                                                                               |
| İnterlökin – 1 | Trombosit,<br>Endotelyal<br>hücre, Lenfosit,<br>Keratinosit                    | Kemotaksi, inflamasyon, reepitelizasyon                                                                               |
| Serotonin      | Trombosit                                                                      | Kemotaksi, Vazokonstrüksiyon, Trombosit<br>agregasyonu, Vasküler permabilite artışı                                   |

Kısaltmalar: PDGF: Trombosit kökenli büyüme faktörü, TGF: Dönüştürücü büyüme faktörü, TNF: Tümör nekroz faktör, VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü, EGF: epidermal büyüme faktörü, FGF: Fibroblastik büyüme faktörü.

İnflamasyon: Yara iyileşmesindeki bu fazın temel amacı enfeksiyonların önlenmesidir. Bu aşamada ilk tepki 48 saat içinde yara dokusuna gelen nötrofillerin bakterileri ve yabancı partikülleri fagositozla veya salgıladığı toksik maddelerle etkisiz hale getirmesidir. Nötrofillerin aktivitesi sırasında serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşur. Yaralanmayı takip eden 48-72 saatler arasında zirve konsantrasyona ulaşan makrofajlar büyük, fagositoz özelliği olan hücrelerdir. Makforajlar aynı zamanda TGF- $\beta$ , epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi yangısal cevabı düzenleyen, anjiyojenez ve granülasyon dokusu oluşumunda önemli rol oynayan büyüme faktörlerinin kaynağı olması yönüyle son derece önemli hücrelerdir. 72 saat sonra yara bölgesine gelen lenfositler ekstraselüler matriks sentezi ve kollajen yapılanmasında rol oynar. Çeşitli hücre tiplerinin yara iyileşmesindeki fonksiyonları Çizelge 2.2’ de özetlenmiştir. İnflamasyon fazı, aşırı kalıntı ve bakterilerin yok



edilip yara temizliği sağlanıncaya kadar devam eden süreç olup bu sürecin fazla uzaması doku hasarı ve proliferasyonun gecikmesine neden olarak kronik yara oluşumuna sebep olur.

**Proliferasyon:** Bu kompleks süreç anjiyojenez, granülasyon dokusu oluşumu, kollajen depozisyonu, epitelizasyon ve yara kapanması aşamalarından oluşur. Trombositlerden salınan büyüme faktörlerinin önemli rol oynadığı anjiyojenez aşamasında zengin kapiler damar ağı oluşumu gerçekleşir. Hipoksiye yanıt olarak salgılanan VEGF ve diğer sitokinler damarlanmayı uyarır, trombositlerden salınan büyüme faktörleri; özellikle TGF- $\beta$  ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) fibroblastların proliferasyonunu uyarır. Yara dokusunun fibroblastlarca zengin hale gelmesiyle fibronektin ve kollajen üretimi gerçekleşir. Miyofibroblast haline dönüşen fibroblastlar kendini çevreleyen proteinler, fibronektin ve kollajenlerle bir araya gelip yara kapanmasına yardımcı olur. Epitel hücreleri, yaralanmanın başından itibaren hasarlı yüzeyinin tamamı kapanıncaya kadar yara kenarından göç ederek alt kısımdaki matriksle birleşir. Yaralanmadan 7 gün sonra yara kontraksiyonu görölmeye başlanır ve bu aşamada miyofibroblastlar önemli rol oynar. Aktin ve miyozinlerin etkileşimi dokunun iyileşmesi için gerekli olan hücreleri o bölgeye doğru çeker. Yaklaşık 0.75 mm/gün hızında gerçekleşen kontraksiyon sürecine yaranın şekli başta olmak üzere birçok faktör etki eder. Doğrusal yaralar daha hızlı kapanırken dairesel yaralarda bu süreç daha uzundur.

**Matürasyon (Olgunlaşma, Yeniden Yapılanma):** Son faz olan ve 2 yıla kadar sürebilen bu aşama yara dokusunun olgunlaşması ve normal epitelin oluşumu gerçekleşir. Kollajen ve diğer proteinlerin sentezi ve parçalanması ile devam eden bu sürecin sonunda yaralanmamış normal dokuya benzer bir yapı oluşur, ancak asla eski doku gibi olamaz. Gerilme gücünün %50'sine üç haftada ulaşılırken uzun dönemde ancak %80'ine ulaşılır [3].

Tez kapsamında yapılan çalışmada da bitki ekstraktlerinin yara iyileştirici etkisini moleküler seviyede incelemek açısından burada bahsi geçen proteinlerden kollajen, VEGF, TGF-  $\beta$  ve FGF-7 gen ifade seviyeleri araştırılmıştır.

Çizelge 2.2. Yara iyileşmesinde bazı hücrelerin fonksiyonu [2]

| Hücre Tipi  | Aktivite Zamanı                 | Fonkiyon                                                                                                            |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Trombosit   | Saniyeler içinde                | Trombüs oluşumu, Koagülasyon sürecinin aktivasyonu, İnflamatuar medyatörlerin                                       |
| Fibroblast  | 120 saat                        | Granülasyon dokusu oluşumu, Kollajen sentezi<br>Ekstraselüler matriks komponentlerinin                              |
| Nötrofiller | 24 saatte pik seviyesine ulaşır | Hücresel debris ve bakterilerin fagositozu, Protolitik enzimlerin salınımı ROS üretimi, Vasküler permabilite artışı |
| Lenfositler | 72-120 saat                     | Kollajen depozisyonu, Proliferasyon fazının düzenlenmesi                                                            |

## 2.2. Yara İyileşmesinde Etkili Bitki Etken Maddeleri ve Özellikleri

Birçok ham bitki ekstresinin bilimsel olarak yara iyileştirici etkilere sahip olduğunun gösterilmesinin yanı sıra bu bitkilerin bazılarında zenginleştirilmiş fraksiyonlar ve izole edilmiş bileşiklerin belirli yara iyileştirici özelliklere sahip oldukları da gösterilmiştir. Bitki özütlerinin aktif bileşenlerinin yara iyileşmesine yönelik olarak bilinen aktif etkilerinin, kan pıhtılaşması, antimikrobiyal, antioksidan, mitojenik etkinlikler yoluyla olduğu ve ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörünün ekspresyonunu arttırdığı ve böylece doku onarımı ilerledikçe anjiyogenez ve kan akışını geliştirdiği bilinmektedir. Kronik yaralarda, keratinositlerin farklılaşmasına neden olan ajanlar da önemli bir rol oynamaktadır [1].

Bitki ekstrelerinin yara iyileştirici özellikleriyle ilgili yapılan çalışmalar onaylı tıbbi ürünlere de dönüşmektedir. Bunun en önemli örneği, günümüzde yara tedavilerinde topikal krem olarak kullanılan Madecassol® ticari ismiyle satılan kremdir. Bu kremin içeriğinde %1 oranında *Centella asiatica* ekstresi vardır [20,21]. Bu bitkinin ekstresinin fibroblast hücre proliferasyonunu ve kollajen sentezini arttırdığı bilinmektedir [22].

Bitki polifenoller, insan beslenmesinde bulunan en bol fitokimyasal maddeler arasında bulunurlar. Bitkisel fenoliklerin antioksidan, antiinflamatuvar, immünmodülatör gibi pek

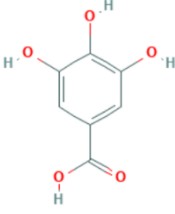
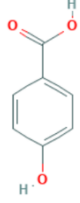
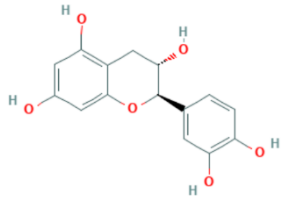
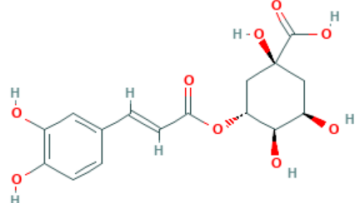
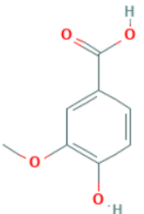
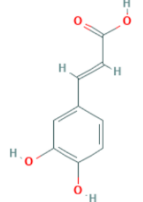
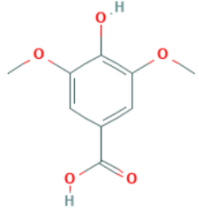
çok aktivitesi bilinmektedir. Fenolik bileşenlerin, özellikle flavonoidler ve tanenlerin hızlı deri rejenerasyonunu sağladığı ve antimikrobiyal etkileri olduğu bilinmektedir. Yara iyileşmesinde kullanılan birçok bitki özütü, aktif maddeleri olarak prosiyanidinler, flavonoidler ve fenolik asitler şeklinde fenolikleri içerir. Polifenoller olan tanenler ve prosiyanidinlerin aktif olarak yara iyileşmesini kolaylaştırdığı bilinmektedir [1,21,23,24]. Bitki polifenollerinin keratinosit proliferasyonunu uyardığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [25].

Yapılan bir çalışmada *Hamamelis virginiana* L. ekstresinden polisakkaritler ve proantosiyaniidinler (polifenolik bileşenler) elde edilmiş ve bunların insan keratinosit hücreleri üzerindeki etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada polisakkaritler belirgin bir etki göstermezken, polifenoller (proantosiyaniidinler) keratinosit hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarmıştır [25]. Bununla birlikte, diğer bazı bitkilerden elde edilen polisakkaritlerin fibroblast ve keratinosit hücre göçünü, proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyardığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [26].

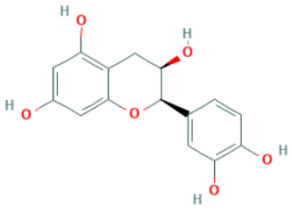
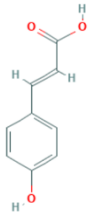
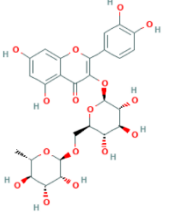
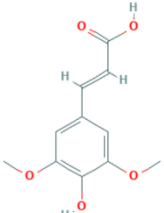
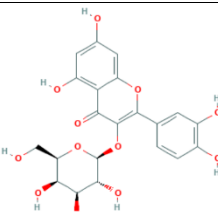
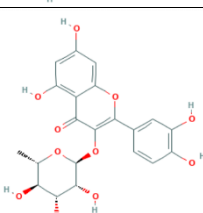
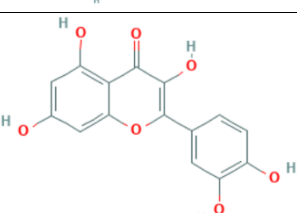
### 2.2.1. Tez kapsamında analizi yapılan bitki sekonder metabolitleri

Bitkiler bulundukları ortamdan çeşitli maddeleri alırlar ve basit inorganik bileşiklerin kimyasal yapılarını değiştirerek yeni organik ve inorganik bileşikler üretirler. Bunlar primer (birincil) bileşikler ve sekonder (ikincil) bileşikler olmak üzere iki ana grup altında incelenebilir. Primer bileşikler bitki büyüme ve gelişmesinde doğrudan görev alan, insan ve diğer canlıların beslenmesi için gerekli olan bileşiklerdir. Bunların en önemlileri arasında karbonhidratlar, proteinler, lipitler, mineral ve vitaminler sayılabilir. Sekonder bileşikler ise bitki büyüme ve gelişiminde doğrudan etkili olmayan bileşikler olup, bunlar bitkilere dolaylı olarak fayda sağlarlar (ör: zararlılarla, enfeksiyonla ve diğer stres koşullarıyla mücadele). Sekonder metabolitler ise başlıca 3 ana gruba ayrılırlar: bunlar terpenler, fenolik ve azotlu bileşiklerdir [27]. Çalışmamızda HPLC ile analiz edilen sekonder bileşikler, kimyasal yapı ve sınıflandırmaları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

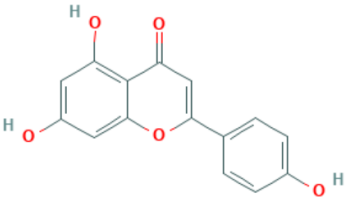
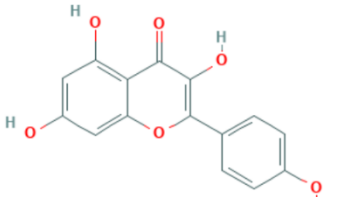
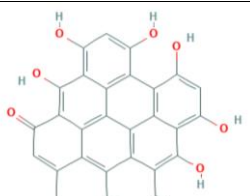
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan sekonder metabolitler, kimyasal yapı ve sınıflandırması  
(Açık kimyasal formüller PubChem'den alınmıştır)

| Sekonder metabolit     | Kimyasal formül                                                                     | Sınıflandırma                              |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Gallik Asit            |    | Fenolik bileşik<br>Benzoik asit            |
| 4-hidroksibenzoik asit |    | Fenolik bileşik<br>Hidroksibenzoik asit    |
| (+)-Kateşin            |   | Flavonoid madde<br>Flavanol                |
| Klorojenik Asit        |  | Fenolik asit                               |
| Vanilik Asit           |  | Fenolik asit                               |
| Kafeik Asit            |  | Fenolik asitlerden<br>Hidroksisinamik asit |
| Siringik Asit          |  | Fenolik asit<br>Trihidroksibenzoik asit    |

Çizelge 2.3. (devam) Çalışmada kullanılan sekonder metabolitler, kimyasal yapı ve sınıflandırması (Açık kimyasal formüller PubChem'den alınmıştır)

|                |                                                                                     |                                            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| (-)-Epikateşin |    | Flavonoid madde<br>Flavanol                |
| p-Kumarik Asit |    | Fenolik asitlerden<br>Hidroksisinamik asit |
| Rutin          |   | Flavonoid madde<br>Flavanol                |
| Sinapik Asit   |  | Fenolik asitlerden<br>Hidroksisinamik asit |
| Hiperozid      |  | Flavonoid madde<br>Flavanol                |
| Kersitrin      |  | Glikozit                                   |
| Kersetin       |  | Flavonoid madde<br>Flavanol                |

Çizelge 2.3. (devam) Çalışmada kullanılan sekonder metabolitler, kimyasal yapı ve sınıflandırması (Açık kimyasal formüller PubChem’den alınmıştır)

|           |                                                                                   |                             |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Apijenin  |  | Flavonoid madde<br>Flavon   |
| Kemferol  |  | Flavonoid madde<br>Flavanol |
| Hiperisin |  | Naftodiantron               |

### 2.3. Yara İyileştirici Aktiviteyi Değerlendirmek İçin Dünya Geneline Yapılan *in vivo* ve *in vitro* Model Çalışmalara Örnekler

*In vivo* modeller yara iyileştirici aktivitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsizyon yaraları, yüzeysel yaralar, ölü alan ve yanık yaraları gibi doku modelleri genellikle yaraların tekrar epitelizeasyon, kollajenasyon, damarlanmasını belirlemek için kullanılır. Bu tip çalışmalarda hayvanlarda oluşturulan yaraların iyileşme süreci hem direkt gözlem hem histolojik hem de moleküler seviyede araştırılabilmektedir. Tavşan kulak kepçesi, hamster yanak derisi, tavşan göz kapağı ve tavuk koryoallantoik membran gibi modeller, tekrar epitelizeasyon, damarlanma ve dermal yeniden yapılandırma düzeylerini araştırmak için de kullanılabilir [1]. Bu konuda yapılmış bazı çalışmalara aşağıda değinilmiştir.

Nijerya’da yara iyileştirici olarak halk tarafından kullanılan bazı bitkilerin (*Ageratum conyzoides* L., *Anthocleista djalensis* A. Chev., *Napoleonaea imperialis* P.Beauv., *Ocimum gratissimum* L.) metanolik ekstraktları hazırlanmış ve *in vivo* yara iyileştirici özellikleri eksizyon yara modeli ile araştırılmıştır. Bu ekstraktların, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yara iyileşmesini hızlandırdığı gözlemlenmiştir [28].

*Heliotropium indicum* L., *Plumbago zeylanica* L. ve *Acalypha indica* L. bitkilerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen ethanol ekstralarının yara iyileştirici etkileri sıçan eksizyon ve insizyon yara modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bunların arasında en iyi etkinin *Heliotropium indicum* bitkisinde olduğu rapor edilmiştir [29].

Karodi ve ark. *Rubia cordifolia* L. köklerinin etanolik ekstresinin yara iyileştirici etkisini farede eksizyon yara modeli ile göstermişlerdir [30].

*Myristica andamanica* Hook.f. yaprak ekstralarının farede eksizyon yara modeli ve histopatolojik inceleme yöntemiyle yara iyileştirici aktivitesinin araştırıldığı çalışmada ekstralar metanol, etanol, etil asetat, kloroform ve hekzan ile hazırlanmıştır ve en etkili sonuç metanol ekstresini %1 oranında içeren krem formülasyonundan elde edilmiştir [31].

*Pedilanthus tithymaloides* (Haw.) Sweet yaprak metanol, petrol eteri ve kloroform ekstresinin yara iyileştirici etkisi fare eksizyon ve insizyon modeli ile değerlendirilmiş ve biyoaktivite rehberli karakterizasyon ile 2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-5,7-dihydroxy-chromen-4-one ve 1, 2- tetradecanediol, 1-(hydrogen sulfate), sodium salt maddeleri tanımlanmıştır. Metanolik ekstresin etkili olduğu belirlenmiş ve bu ekstretan tanımlanan maddelerin de yara iyileştirici etkide olduğu bulunmuştur [32].

*In vivo* çalışmalarla ilgili daha fazla örnek Türkiye’de yapılan çalışmalar başlığında verilmiştir.

*In vitro* modeller genel olarak basit, hızlı ve tüm hayvansal çalışmalara kıyasla en az etik kaygı içeren modellerdir ve test maddesinin neden olduğu biyokimyasal ve fizyolojik süreçler hakkında fikir verir. Farklı konsantrasyonlarda bulunan birçok farmakolojik madde bu çalışmalar sayesinde eş zamanlı olarak değerlendirilir. Rejeneratif cilt, bağ dokusu ve epitel dokusu ile karakterize olduğundan, yara iyileşmesi aktivitesinin tam olarak değerlendirilmesi için dermal keratonositler, dermal fibroblastlar ve epitel hücreleri kullanılmaktadır. *In vitro* modeller, yara iyileşmesi sırasında hücre göçünü taklit eden hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminin çalışılması ile ilgilidir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi de hücre kazıma (scratch assay) yöntemidir. *In vitro* modellerde yara iyileştirici maddeler veya bileşiklerin yara iyileştirici özelliklerini

değerlendirmek için tek hücreli sistemler, üç boyutlu sistemler, çok hücreli sistemler veya organ kültürleri kullanabilir [1].

Primer kültür ile elde edilmiş insan dermal fibroblastları kullanılarak yapılan bir çalışmada, büyüme faktörleri açısından zengin plazmanın fibroblast hücre göçü üzerindeki etkileri araştırılmıştır ve TGF- $\beta$ 1, VEGF ve prokollajen tip I seviyeleri kültür besiyerinde ELISA yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Plazma uygulamasının fibroblast hücre göçünü ve TGF- $\beta$ 1, VEGF ve prokollajen tip I seviyelerini arttırdığı bulunmuştur [33].

Pirinç hücrelerinden metanol ve sıcak su ile elde edilen ekstraların yara iyileşmesi üzerine etkileri *in vitro* olarak insan dermal fibroblast ve keratinosit hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Hücreler üzerindeki sitotoksik etki WST-1 reaktifi ile belirlenmiştir ve belirgin bir toksisite gözlenmemiştir. Hücre göçü üzerindeki etkileri hücre çizik testi ile değerlendirilmiştir ve her iki ekstresin de hücre göçünü arttırdığı görülmüştür. Ayrıca fibroblast hücrelerinde qRT-PCR ile kollajen tip I mRNA ve ELISA yöntemi ile protein seviyelerine bakılmıştır ve ekstre uygulamasının kollajen tip I seviyesini arttırdığı görülmüştür. Ayrıca ekstraların total fenolik miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir ve yara iyileştirici aktivite ile pozitif korelasyon gösterdiği görülmüştür [21].

Wang ve ark. tarafından yapılan çalışmada, geleneksel Çin tıbbında yer alan ve Çin Farmakopesinde yara iyileştirici özellikleri tanımlanan 12 bitkinin yara iyileştirici özellikleri insan primer dermal fibroblast ve keratinosit hücre hatları kullanılarak *in vitro* olarak araştırılmıştır [23]. Çalışmada, bitkilere ait su ve etanol-su ekstraları kullanılmıştır. MTT yöntemi ve BdU boyası kullanılarak hücrelerin canlılıkları ve proliferasyonları değerlendirilmiştir. Araştırılan bitki drog preparat ekstralarının bazılarında belirgin etkiler görülmezken, bazılarında etki görülmüştür, proliferasyonu arttırmıştır. *Paeonia suffruticosa* Andr (Ranunculaceae) ekstresi en yüksek etkiyi göstermiştir. Bu bitkinin ekstresinden biyoaktivite-rehberli karakterizasyon ile aktif bileşenler belirlenmiştir: paeonol, flavan-3-olskateşin, epikateşin-3-O-gallat, dimerik proantosiyanidin epikateşin-(4 $\beta$ →8)-kateşin, trigalloyl-glukoz ve 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glukoz (PGG). Proantosiyanidin ve PGG içeren fraksiyonlar en etkili olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, bitkilerde görülen yara iyileştirici etkinin yoğunlaşmış ve hidrolize olabilen tannin kaynaklı polifenollerden kaynaklı olabileceği önerilmiştir [23].



Park et al. tarafından yapılan çalışmada *Piper cambodianum* P. Fourn. kök ve yaprak metanol ekstresinin (1-50 µg/ml) insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir ve yara iyileştirici özelliği açısından değerlendirilmiştir [34]. Aynı çalışmada *in vivo* yara modeli de kullanılmıştır. Çalışma sonucunda ekstresin fibroblast hücrelerinde kollajen, elastin, hyaluronan sentaz-2 gibi hücre-dışı matriks proteinlerinin ifadesini (qRT-PCR ve Western Blot ile sırasıyla mRNA ve protein seviyelerine bakılmıştır) arttırdığı bulunmuştur. *In vivo* olarak da yara iyileştirici etki gözlemlenmiştir, bu anlamda *in vitro* ve *in vivo* sonuçlar birbirini desteklemiştir [34].

Harishkumar ve ark. *Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka ile yaptıkları *in vitro* bir çalışmada insan fibroblast hücrelerinde Rac-1, Rho-A, ve Cdc-42 genlerinin ekspresyon seviyelerine bakmışlardır [35]. Akış sitometresi hücre döngüsü analizi çalışılmıştır. Western blot tekniği ile protein seviyelerine de ayrıca bakılmıştır. Bu bitkinin ekstresi uygulanan hücrelerde siklin bağımlı kinaz geninin önemli bir derecede arttığını görmüşlerdir [35].

Adetutu ve ark. *Bridelia ferruginea* Benth yapraklarının ethanol ve su ekstralarının antimikrobiyal ve insan dermal fibroblast (FS5) hücreleri üzerindeki proliferatif etkilerini Neutral Red yöntemi ile araştırmıştır [36]. Ayrıca DPPH süpürme yöntemi ile antioksidan aktivitesi de değerlendirilmiştir. Etanolik ekstresinin 5 µg/ml konsantrasyonunda fibroblast hücre proliferasyonunu arttırdığı, daha üzerindeki dozlarda ise toksik etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca bu ekstre, sulu ekstreye göre yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir [36].

Nijerya'da halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılan bazı bitkilerin etkilerinin *in vitro* olarak değerlendirildiği çalışmada 9 bitkinin etanol ve su ekstralarının insan dermal fibroblast hücre çoğalması üzerindeki etkileri Neutral Red boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca DPPH yöntemi ile antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ekstrelerin hepsinde belirgin antioksidan aktivite görülmüştür. Ayrıca *Bridelia ferruginea* (1-30 µg/ml) ve *Parkia biglobosa* (Jacq. Benth) R. Br. ex G. Don (15-30 µg/ml) etanolik ekstralarının fibroblast hücre çoğalmasını arttırdığı bulunmuştur [36].

Gana'da halk tarafından yara iyileştirici olarak kullanılan bazı bitkilerin su ve etanol/su ekstraları aktiviteleri insan primer kültür dermal fibroblast ve keratinosit (HaCaT) hücrelerinde MTT, BrdU ve LDH testleri ile *in vitro* olarak araştırılmıştır. Etanolik

ekstrelerin antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi ile belirlenmiştir. *Phyllanthus muellerianus* (O Ktze) Exell, *Pycnanthus angolensis* (Welw.) Warb. ve *Combretum smeathmanni* G. Don su ekstrelerinin 10-100 µg/ml konsantrasyonda her iki hücre hattında da çoğalmayı anlamlı ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Bu bitkilerin antioksidan aktivitesi de yüksek bulunmuştur. Ayrıca ekstrelerin tannin içerikleri de belirlenmiştir ve etki görülen ekstreler tannin içerikleri bakımından da diğerlerine göre yüksek olarak bulunmuştur [37].

*Moringa oleifera* Lam. bitkisinin yapraklarının metanol, etanol ve su ekstrelerinin yara iyileştirici etkileri insan dermal fibroblast hücreleri (ATCC CRL-2301) kullanılarak *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada hücre canlılığı, proliferasyonu ve hücre çizik testi ile hücre göçü değerlendirilmiştir. Üç fraksiyondan en etkili olan metanol olmuştur (12.5-800 µg/ml), hücre proliferasyonunu ve göçünü kontrol ve diğer ekstrele göre belirgin derecede arttırmıştır. Daha sonra bu fraksiyondan biyoaktivite-rehberli karakterizasyon ile aktif bileşenler YBSK ve LC-MS/MS yöntemleriyle tespit edilmiştir. Ham metanol ekstresinde kemferol ve kersetin maddeleri, aktif fraksiyonda ise Vicenin-2 (bir flavonoid) maddesi tespit edilmiştir [38]. Aynı ekibin daha sonra yaptığı çalışmada, Vicenin-2'nin ana madde olarak bulunduğu aktif fraksiyonun diyabetik farede yara iyileştirici etki gösterdiği de bulunmuştur ve bu anlamda *in vitro* sonuçlar *in vivo* olarak doğrulanmıştır [39].

*Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. (Asteraceae) bitkisinin yapraklarından elde edilen etanolik ekstre fraksiyonlarının yara iyileştirici etkisi *in vitro* olarak L929 fare fibroblast hücre hattında MTT yöntemi ve hücre çizik testi ile çalışılmıştır. Fibroblast hücrelerinin hücre dışı çözünmüş kollajen miktarı kolorimetrik kit kullanılarak ölçülmüştür. Ayrıca fibroblast hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan oksidatif stres sonucu hasarı önleyip önlemediği de araştırılmıştır. DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite bakılmıştır. Ekstresin total fenolik ve flavonoit içerikleri belirlenmiştir. Bitki ekstresinin fibroblast hücre canlılığını ve göçünü arttırdığı, oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu ve kollajen miktarını arttırdığı bulunmuştur. Bu açılardan yara iyileştirici potansiyelinin olduğu belirlenmiştir [40]. Aynı araştırma ekibi daha sonra *Wedelia trilobata* (Asteraceae) bitkisinin yapraklarından elde edilen etanolik ekstrenin yara iyileştirici etkisini fraksiyonlarını da elde ederek *in vitro* olarak L929 fare fibroblast hücre hattında MTT yöntemi ile çalışmıştır. Biyoaktivite rehberli karakterizasyon ile elde edilen aktif fraksiyonun antimikrobiyal etkisi ve yine fibroblast hücre canlılığını arttırıcı etkisi ve fibroblast hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan oksidatif stres sonucu hasarı önlediği görülmüştür. Etkin fraksiyonda ana madde olarak ent-kaura-

9(11),16-dien-19-oik asit (grandiflorenik asit, diterpen yapıda bir bileşik) NMR ile tanımlanmıştır [41].

Fronza ve ark. tarafından yapılan çalışmada *Calendula officinalis* L., *Matricaria recutita* L. hekzan ve etanol ekstraları ile *Hypericum* yağının yara iyileştirici etkileri 3T3 fare fibroblast hücreleri kullanılarak hücre çizik testi ile *in vitro* olarak çalışılmıştır [42]. Hücre proliferasyonu ve göçü arasındaki farkı görebilmek için antimitotik mitomycin C maddesi de kullanılmıştır. *C. officinalis* 'in her iki ekstresi da düşük konsantrasyonlarda (10 µg/ml) proliferasyon ve hücre göçünü arttırmıştır. Proliferasyonun mitomisin C ile inhibe edilmesiyle elde edilen sonuçlar, özellikle hücre göçünün etkin olduğunu göstermiştir. *Matricaria recutita* ekstraları çok etkili bulunmamıştır. *Hypericum* yağı ise 0.5 µg/ml yukarıdaki konsantrasyonlarda toksik etki göstermiştir. Çalışmada hücre çizik yönteminin yara iyileşmesinin *in vitro* modeli olarak etkin bir şekilde kullanılabileceğine vurgu yapılmıştır [42].

Güney Afrika'da deri hastalıklarında ve yara iyileştirici olarak kullanılan 11 bitkinin antimikrobiyal aktiviteleri, sitotoksik özellikleri ve fenolik bileşen içerikleri belirlenmiştir. 0.125-2 mg/ml arasında uygulanan bütün bitki ekstralarının Afrika Yeşil Maymunu böbrek hücrelerinde (Vero) IC<sub>50</sub> değeri 1 mg/ml'den yüksek bulunduğu için belirgin toksik etki göstermediği saptanmıştır [24].

*Aloe vera* (L.) Burm.f. jelinin (50-150 µg/ml) yara iyileştirici etkisinin *in vitro* olarak değerlendirildiği bir çalışmada fare embriyonik fibroblast hücreleri kullanılmış ve moleküler mekanizma hakkında bilgi edinmek amacıyla, yara iyileşmesinde önemli olduğu bilinen TGFβ1 ve bFGF seviyelerine qRT-PCR ve ELISA ile bakılmıştır. Çalışma sonucunda *A. vera* jel ekstresi uygulamasının doza ve zamana bağlı olarak gen/protein seviyelerini arttırdığı bulunmuştur [43].

Yara iyileştirici etkisi iyi bilinen *Centella asiatica* L. bitkisinin etken maddelerinden biri olan asiaticoside bileşiğinin insan dermal fibroblast ve keratinosit hücrelerindeki yara iyileştirici etkisi *in vitro* olarak MTT, BrdU ve hücre çizik testi yöntemleriyle çalışılmıştır. Yapılan çalışmada bu bileşiğin hücrelerin proliferasyonunu ve göçünü arttırdığı görülmüştür [44].

*Adiantum capillus-veneris* L., *Commiphora molmol* Engl, *Aloe vera* etanol ve metanol ekstralarının *in vitro* fare deri fibroblast hücrelerinde (c147) yara iyileştirici etkisi MTT ve hücre çizik testi yöntemleri ile değerlendirilmiştir. TGF- $\beta$ 1 ve VEGF-A ifadeleri RT-PCR ile değerlendirilmiştir. Ekstrelerin TGF- $\beta$ 1 ve VEGF-A ifadesini arttırdığı, fibroblast hücre proliferasyonu ve göçünü arttırdığı görülmüştür [45].

Yapılan *in vitro* çalışmalara bakıldığında, çeşitli bitkilerin yara iyileşme üzerindeki etkileri özellikle fibroblast ve keratinosit hücrelerinde çalışılmıştır. Bunun nedeni bu hücrelerin yara iyileşme sürecinin farklı aşamalarında önemli rol oynamalarıdır. Bununla daha detaylı bilgiler ilgili başlıklarda verilmiştir. Moleküler seviyede yapılan çalışmalarda fibroblast hücrelerinde özellikle TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF-7 (KGF-1) ve kollajen tip I seviyelerine bakıldığı görülmüştür.

#### **2.4. Türkiye’de Bitkilerin Yara İyileştirici Aktivitesini Değerlendirmek İçin yapılan *in vivo* ve *in vitro* Model Çalışmalara Örnekler**

Yıllardır Türkiye’de çeşitli bitkiler yerel halk tarafından yara iyileştirmesi için kullanılmıştır. Bununla ilgili yapılan çok sayıda etnobotanik çalışmalar yapılmaktadır. Ancak 2000 yılından bu yana halk tarafından kullanılan, antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özelliği olan bitki özütlerinin *in vivo* ve *in vitro* deneyleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar ağırlıklı olarak sıçan ve tavşanlarda yara iyileşmesinin *in vivo* değerlendirilmesine yönelik araştırmalardır, *in vitro* ve moleküler mekanizmalara yönelik çalışmalar daha kısıtlıdır. 2006 yılından sonra sıklaşan çalışmaların içerikleri aşağıda detaylı bir şekilde verilmektedir.

Özgen ve ark. *Onosma argentatum* Hub.-Mor. türünün n-hekzan ekstresi ile insan amniyon fibroblast hücreleri üzerinde çalışmalar yapmış ve izole edilen bileşiklerden sadece “5,8-O-dimetil asetil shikonin” büyüme uyarıcı etki göstermiştir [46].

Öztürk ve ark. *Hypericum perforatum* L. bitkisinin ekstresini *Centella asiatica* özütü ve dekspentanol ile karşılaştırarak tavuk embriyo fibroblast hücre kültüründe boyanan hücrelerin mikroskopik teknikleri kullanılarak hücre bölünmesi, morfolojik değişiklikler ve kollajen üretimlerine bakılmıştır [47]. Böylelikle yara iyileşmesine etki mekanizması yaklaşımı parametreleri olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak *H. perforatum* türünün yara

iyileştirici aktivitesinin fibroblastlarda kollajen üretimine bağlı olduğu kanısına varılmıştır [47].

Ermertcan ve ark. tarafından *Centella asiatica* ve kollejenazın etkilerini üç eşit gruba böldükleri 27 dişi ratta TGF- $\beta$ , iNOS, eNOS, VEGF, TGF- $\alpha$ , laminin, fibronektin, Kollajen I ve interleukin-1b proteinlerinin ifadeleri yara dokularında imminohistokimyasal ve histopatolojik olarak incelenmiştir [48]. Bu incelemeler sonucunda en etkili sonuçlar kollejenaz uygulanan grupta gözlenmiştir. *Centella asiatica* grubunda TGF- $\beta$  ve iNOS etkili immünoreaksiyon göstermiştir. Çalışma sonucunda immünohistokimyasal bulgulara göre kollajenaz grubu *C. asiatica* grubundan daha etkili sonuçlar ortaya koymuştur. Kollajenaz merhemi *C. asiatica* ya göre yara iyileşme sürecinin ilk aşamalarında daha etkilidir [48].

Akkol ve ark. *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. türünün kök kısmından hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol çözücülerini ile ekstreler hazırlamış ve bunları *in vivo* olarak açık yara oluşturulmuş fare ve ratlarda denemiştir [49]. En etkili sonuç %1 lik konsantrasyona sahip hekzan ekstresinde gözlenmiştir. Hem insizyon hem de eksizyon yaralarında histopatolojik deneylerle bu sonuç desteklenmiştir. Karşılaştırma ile Madecassol® (%1'lik *Centella asiatica* ekstresi içeren bir merhem) merhemi ile yapılmıştır. Çalışma sonucunda *A. densiflora* türünün dikkate değer yara iyileştirici bir bitki olduğunun kanısına varılmıştır [49].

Akkol ve Ercil bazı *Linaria* cinsi üyeleri üzerinde antinosiseptik ve antienflamatuar etkileri çalışmıştır [50]. Bu çalışmada *L. aucheri* Boiss.'nin etil asetat ekstresi ve *L. aucheri* % 20 sulu özütünün yanı sıra antirinosid'in oral yolla uygulanmasıyla 12-O- tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA)'nın yol açtığı kulak ödeminin belirgin olarak önlendiğini ortaya koymuştur [50].

Akkol ve ark. *Juniperus* L. cinsinin Türkiye'de yetişen taksonlarının (*J. Drupacea* Lab., *J. communis* var. *communis* L., *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall., *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*, and *J. oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball) metanol ve sulu ekstrelerinin antiinflamatuvar ve antinosiseptik etkilerine bakmışlardır [51]. Antiinflamatuvar etki için Karrajene bağlı ve PGE2 ile indüklenen arka pençe ödem modelleri; antinosiseptik etkiler için ise P-benzokinon kaynaklı kıvrımlanma ve sıcak plak testleri kullanılmıştır.

Sonuç olarak deneysel veriler, *J. oxcedrus* subsp. *oxycedrus* ve *J. communis* var. *saxatilis* türlerinde dikkate değer bir anti-inflamatuar ve antinosiseptif aktivite sergilemiştir. Bununla birlikte, aktif anti-enflamatuar ve antinosiseptif bileşenlerin, bu aktif türlerden tanımlanması ve izole edilmesi ve inflamatuvar bozuklukların tedavisinde kullanılacak güvenli ve etkin ajanlar verebilecek başka çalışmalara da ihtiyaç duyulduğuna vurgu yapılmıştır [51].

Koca ve ark. halk tıbbında kullanılan Türkiye’de yayılış gösteren *Centaurea iberica* Trev. ex Sprengel türünün antiinflamatuvar ve yara iyileştirici özellikleri üzerine çalışmışlardır [52]. Bunun için bitkilerin toprak üstü kısımlarından hekzan, kloroform, etil asetat ve sulu metanol çözücülerinde ekstraktları hazırlanmıştır. Yüzey tensiometresi kullanılarak insizyon ve eksizyon yaraları üzerine bu ekstraktların yara iyileştirici etkilerine bakılmıştır, sonuçlar *in vivo* olarak histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda *Centaurea iberica* türünün metanol ekstresinin kayda değer yara iyileştirici etkileri ortaya konulmuştur. Bu çalışmada karşılaştırma daha önceki çalışmalarda da konusu geçen Madecassol® merhemi ile yapılmıştır [52].

Süntar ve ark. Türkiye’de halk tarafından sıkça yara iyileştirici olarak kullanılan ve kantaron olarak bilinen *H. perforatum* bitkisinin çiçekli toprak üstü kısımlarından zeytinyağı ile ekstraktları hazırlanmıştır ve bunlarla *in vivo* çalışmalar ile yara iyileştirici ve antiinflamatuvar etkilere bakmıştır [6]. Bu çalışmaya paralel bir şekilde *H. scabrum* L. bitkisinin etanol ekstresi ile de bir çalışma yürütülmüştür. İnsizyon ve eksizyon yaraları oluşturulmuştur. Daha sonra histopatolojik çalışmalar ile ANOVA istatistik yöntemi ile bu çalışma değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda *H. perforatum* kuvvetli etkiler gösterirken *H. scabrum* bitkisinin etanol ekstresi ne yara iyileştirici bir etki ne de antiinflamatuvar etki göstermiştir [6].

Süntar ve ark. *Verbascum* L. cinsine ait 13 türün (*V. chionophyllum* Hub.-Mor., *V. cilicicum* Boiss., *V. dudleyanum*, *V. lasianthum* Boiss. ex Benth, *V. latisepalum* Hub.-Mor., *V. mucronatum* Lam., *V. olympicum* Boiss., *V. pterocalycinum* var. *mutense* Hub.-Mor., *V. pycnostachyum* Boiss. & Heldr, *V. salviifolium* Boiss., *V. splendidum* Boiss., *V. stachydifolium* Boiss. & Heldr ve *V. uschakense* (Murb.) Hub.) yaprak, çiçek ve tüm toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktlarının *in vivo* yara iyileşmesi üzerine etkilerine bakmıştır. Madecassol merhemiyle karşılaştırarak linear insizyon ve sirküler eksizyon yaralarının histopatolojik çalışmaları ile değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada *V. olympicum*, *V. stachydifolium* ve *V. uschakense* türleri her iki yara tipinde de en iyi sonuçları vermiştir. Bu

sonuçlar ise halk tarafından kullanılmasını doğrular nitelikte *Verbascum* türlerinin yara iyileştirmesi üzerine etkili olduğunu göstermiştir [12].

Akdemir ve ark. *Verbascum mucronatum* türünün yaprak, iek ve tüm toprak üstü kısımlarının metanol, kloroform ve su ekstrelerinin *in vivo* olarak antiinflamatuvar, antisepetik ve yara iyileştirici aktivitelere bakmıştır [14]. Antiinflamatuvar etkilerine karregan indükleyici arka kol dem modeli üzerine ekstreler denenerek bakılmıştır. Ratlarda oluşturulmuş insizyon ve eksizyon yaralarına Madecassol® ve bu ekstreler uygulanarak histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Fraksiyon ve izolasyon teknikleri ile dört glikozid, iki saponin bir fenilatenoid glukozid izole edilmiş ve bunlar spektral teknikler ile aydınlatılmıştır. Tüm bu araştırmalar ışığında *V. mucronatum*'un dikkate değer antinosiseptik, antiinflamatuvar ve yara iyileştirici özellikleri olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca en etkili sonuçları su ekstresinde vermiştir [14].

Akkol ve ark. bitki yara iyileştirme aktivitesini değerlendirmek için *Achillea biebersteinii* Afan.'nin köklerinden ekstreleri sırasıyla hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol ile hazırlamışlardır [53]. Fareler ve sıçanlarda tensiometre ile linear insizyon ve sirküler insizyon yara modellerine uygulandı. Yara iyileştirme etkisi, standart cilt merhemi Madecassol® ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. N-hekzan özütü ile işleme tabi tutulmuş hayvan grupları, referans ilaç olan Madecassol'un (%100) kasılma değerine yakın olan %84,2 oranında bir daralma göstermiştir. Öte yandan, insizyon yara modelindeki aynı ekstre, diğer gruplara kıyasla, belirgin bir artış (%40,1) göstermiştir. Histopatolojik inceleme sonuçları lineer insizyon ve dairesel eksizyon yara modellerinin sonuçlarını desteklemiştir. Deneysel veriler, *A. biebersteinii*'nin kayda değer yara iyileştirme özelliklerini sergilediğini göstermiştir [53].

Akkol ve ark. *Typha domingensis* Pers. türünün dişi çiçeklerinin n-hekzan, metanol, kloroform ve su ekstreleri *in vivo* olarak linear insizyon ve sirküler eksizyon yara modellerine uygulanmıştır [54]. Doku kesitleri aynı zamanda histopatolojik olarak da değerlendirilmiştir. Madecassol merhemiyle karşılaştırıldığında bitkinin yara iyileşmesi üzerine kayda değer etkileri gösterilmiştir [54].

Süntar ve ark. *Rubus sanctus* Schreb türünün toprak üstü kısımlarının n-hekzan, metanol, kloroform ve su ekstreleri *in vivo* olarak linear insizyon ve sirküler eksizyon yara

modellerine uygulanmıştır [55]. Doku kesitleri aynı zamanda histopatolojik olarak da değerlendirilmiştir. %1'lik metanol ekstresinin Madecassol merhemiyle karşılaştırıldığında bitkinin yara iyileşmesi üzerine kayda değer etkileri gösterilmiştir [55]

Akkol ve ark. yaptıkları çalışma ile *Scorzonera cinerea* Boiss., *S. incisa* DC., *S. latifolia* (Fisch. & C.A.Mey.) DC., *S. mollis* subsp. *szowitsii* (DC.) D.F.Chamb, *S. Parviflora* Jacq., *S. tomentosa* L. bitkilerini ayrıca *S. latifolia* bitkisinin kökünden elde edilen “yakı sakızı” denilen kurutulmuş lateksin antiinflamatuvar ve yara iyileştirici etkilerini araştırmışlardır [56]. Bu çalışmada *in vivo* olarak linear insizyon ve sirküler eksizyon yaraları oluşturulmuş modellerde çalışılmıştır. İnflamatuvar aktivitesi asetik asit indükleyici kapiler dayanıklılık testi kullanılarak yapılmıştır. Aktif bileşenler YBSK ile belirlenmiştir. Sonuç olarak *S. latifolia*, *S. mollis* subsp. *szowitsii* bitkilerinin metanol ekstreleri en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Ayrıca klorojenik asit hem kökte hem de bitkinin diğer parçalarında ana bileşik olarak belirlenmiştir. Bunun yanında hiperosid toprak üstü kısımların bileşiği olarak belirlenmiştir [56].

Süntar ve ark. *Colutea cilicica* Boiss. & Balansa bitkisinin 40 derece su kullanılarak hazırlanmış meyveli ve çiçekli kısımlarının ratlarda tensiometre kullanılarak insizyon yara modelleri, farelerde ise eksizyon yara modeli üzerinde çalışmışlardır [57]. Adı geçen modellerde sulu ekstresinin %1'lik konsantrasyonda kullanılmasıyla önemli derecede yara iyileştirici etki görülmüştür. Meyve ekstresi ile muamele edilen yaralar %78,1 oranında daralma göstermiştir ki bu değer Madecassol uygulanan yaralara yakın bir değerdir. Öte yandan çiçekli kısımlardan elde edilen ekstrenin insizyon yara modelinde yara gerilme kuvveti %42 oranında ölçülerek bu anlamda da önemli bir artış göstermiştir. Dahası meyve ve çiçekteki çinko ve C vitamini oranları yara iyileşmesine önemli bir katkıda bulunmuştur [57].

Süntar ve ark. *Salvia cryptantha* Montbret & Aucher ex Benth. ve *S. cyanescens* Boiss. & Balansa türlerinin *in vivo* ve *in vitro* deneyler ile etanol ekstrelerinin yara iyileştirici, antioksidan ve tirozinaz inhibitör etkileri çalışmışlardır [58]. Rat ve farelerde linear insizyon ve sirküler eksizyon yaraları oluşturulmuştur ve bu modeller üzerinde ekstrak Madecassol® merhemi ile karşılaştırılarak *in vivo* incelenmiştir. Deri yaşlanmasında anahtar bir enzim olan tirozinaz inhibisyonu araştırılmıştır. Antioksidan aktivitesi 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ve süperoksit radikal süpürücü etkisi, demir iyon kenetleme yeteneği ve demir azaltıcı antioksidan gücü testleri ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak Madecassol



ile karşılaştırılınca yara modellerinde %56,5 daralma, linear insizyon yara modelinde %33,2 değerinde gerilim kuvveti ölçülmüştür [58].

Süntar ve ark. *Ononis sessilifolia* Bornm., *O. basiadhata* Hub. & Mor. ve *O. macrosperma* Hub. & Mor. su ve metanol ekstreleri *in vivo* olarak linear insizyon ve sirküler eksizyon yara modellerine uygulanmıştır [59]. Doku kesitleri aynı zamanda histopatolojik olarak da değerlendirilmiştir. Madecassol merhemiyle karşılaştırıldığında bitkinin yara iyileşmesi üzerine kayda değer etkileri gösterilmiştir. Antiinflamatuvar etki için kılcal geçirgenlikte asetik asitle indüklenen artış *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. Sonuç itibariyle *Ononis macrosperma* türü en yüksek yara iyileştirici ve antiinflamatuvar etkiyi göstermiştir [59].

Tümen ve ark. *Abies bornmulleriana* Mattf., *A. cilicica* (Antoine et Kotschy) Carrière, *A. nordmanniana* (Steven) Spach ve *Cedrus libani* A.Rich. bitkilerinin kozalaklarından elde edilen esansiyel yağları *in vivo* olarak linear insizyon ve sirküler eksizyon yara modellerine uygulanmıştır [60]. Doku kesitleri aynı zamanda histopatolojik olarak da değerlendirilmiştir. Madecassol merhemiyle karşılaştırıldığında bitkinin yara iyileşmesi üzerine kayda değer etkileri gösterilmiştir. Antiinflamatuvar etki için kılcal geçirgenlikte asetik asitle indüklenen artış *in vivo* değerlendirilmiştir. Sonuç olarak *C. libani* ve *A. cilicica* türü en yüksek yara iyileştirici ve antiinflamatuvar etkiyi göstermiştir [60].

Güvenç ve ark. *Michauxia nuda* A. DC., *M. campanuloides* L Hér. ex Aiton, *M. laevigata* Vent. ve *M. thyrsoidea* Boiss. & Heldr türlerinin su, etil asetat ve metanol ekstrelerini *in vivo* olarak linear insizyon ve sirküler eksizyon yara modellerinde çalışmıştır [61]. Doku kesitleri aynı zamanda histopatolojik olarak da değerlendirilmiştir. Madecassol merhemiyle karşılaştırıldığında bitkinin yara iyileşmesi üzerine kayda değer etkileri gösterilmiştir. Antiinflamatuvar etki kılcal geçirgenlikte asetik asitle indüklenen artış *in vivo* değerlendirilmiştir. Antioksidan testler için ise tiyobarbitürik asit (TBA) ve DPPH testleri testleri uygulanmıştır. Sonuç olarak *M. nuda* dikkate değer antiinflamatuvar etki göstermiştir. *M. tchihatchewii* türünün etil asetat ekstresi ise en yüksek antioksidan etkiyi göstermiştir [61].

Akkol ve ark. *Ranunculus pedatus* Waldst. & Kit. ve *Ranunculus constantinopolitanus* (DC.) d'Urv türlerinin su, etil asetat, n-hekzan, dietileter ve metanol ekstrelerini *in vivo* olarak linear insizyon ve sirküler eksizyon yara modellerinde çalışmıştır [62]. Doku kesitleri

aynı zamanda histopatolojik olarak da değerlendirilmiştir. Madecassol merhemiyle karşılaştırıldığında bitkinin yara iyileşmesi üzerine kayda değer etkileri gösterilmiştir. Antiinflamatuvar etki için kılcal geçirgenlikte asetik asitle indüklenen artış *in vivo* değerlendirilmiştir. Sonuç olarak *R. pedatus* bitkisinin metanol ekstresi hem insizyom hem de eksizyon yara modellerinde önemli etki göstermiştir. *R. constantinopolitanus* ise nispeten antiinflamatuvar etki göstermiştir. Bunlara ek olarak dokuların hidroksiprolin içeriklerine bakılmıştır [62].

Süntar ve ark. *Daphne oleoides* Schreb subsp. *kurdica* (Bornm.) Bornm bitkisinin toprak üstü kısımlarının %85'lik metanol ekstresini *in vivo* ve *in vitro* deneylerde kullanmışlardır [63]. Bu çalışmanın amacı bu bitkinin etnofarmakolojik değerlendirmesini yapmaktır. Yara iyileşme aktivitesi insizyon ve eksizyon yaraları ile değerlendirilmiştir. Yara iyileşmesine katkısının doğrudan olduğu bilinen antiinflamatuvar ve antioksidan deneyleri ise sırasıyla Whittle metodu ve DPPH radikal-süpürme denemeleri ile yapılmıştır. Bu ekstre izolasyon ve tanımlamayı sağlayan çeşitli kromatografik ayırım teknikleri ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, *in vitro* hiyaluronidaz, kollajenaz ve elastaz enzimlerinin inhibitör aktivite testleri, tedavinin etkinlik yollarını keşfetmek için aktif bileşenler üzerinde yürütülmüştür. YBSK ile 5 alt ekstre olarak ayrılmış ve bunların yapıları NMR ile ortaya konulmuştur. İlk üç alt ekstre dafnetin, dimetildafnoretin-7-O-glukozid ve luteolin-7-O-glukozid olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada luteolin-7-O-glukozid bileşiği yara iyileşmesinden sorumludur ayrıca antiinflamatuvar, antioksidan, antihyaluronidaz ve antikollajenaz etkileri de söz konusudur. Çalışma sonucu olarak luteolin-7-O-glukozid bileşiğinin toprak üstü kısımların ana aktif bileşiği olduğu belirlenmiştir [63].

Süntar ve ark. *Cichorium intybus* L. türünün *in vivo* deneyler ile metanol ekstresini elde edip bunun alt ekstre gruplarını kromatografik teknikler ile ayırıp NMR ile yara iyileşmesinde rol alan aktif bileşiği belirlemeyi amaçlamıştır [64]. Bunun için bitkinin yaprak veya köklerinin küllerinden haricen çeşitli kısımlarından elde edilen kısımların ekstreleri ile çalışmışlardır. Alt ekstre ve fraksiyonları *in vivo* fare ve ratlar üzerinde denemişlerdir. Sonuç olarak bitkinin metanol ekstresi önemli yara iyileştirici etki göstermiştir ve aktiviteden sorumlu bileşik ise b-sitosterol olarak belirlenmiştir [64].

Süntar ve ark. etnobotanik verilerinde de geçen *Pinus* L. türlerini (*P. brutia* Ten., *P. halepensis* Mill., *P. nigra* J.F.Arnold, *P. pinea* L. ve *P. sylvestris* L.) *in vivo* yara iyileşme

ve antiinflamatuvar etkilerini incelemiştir [65]. Uçucu yağlardan hazırlanan merhemlerin *in vivo* yara iyileştirme aktivitesi lineer insizyon ve dairesel eksizyon deneysel yara modelleri, ardından histopatolojik analiz ve hidroksiprolin içeriği ile değerlendirmiştir. Ayrıca uçucu yağlar anti-hiyalüronidaz aktivitesi açısından taranmıştır. Bununla birlikte anti-enflamatuvar aktivite, kılcal geçirgenlikte asetik asidin neden olduğu artışın inhibisyonuna dayanan Whittle metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. *P. pinea* ve *P. halepensis*'in kozalaklarından elde edilen uçucu yağlar yara iyileştirme etkinliği modellerinde en yüksek etkileri göstermiş. Öte yandan, uçucu yağların geri kalanında önemli bir yara iyileşmesi ve anti-inflamatuvar aktivite bulunmamıştır [65].

Tümen ve ark. *Cupressus* L. ve *Juniperus* meyvelerinden elde edilen esansiyel yağları yara iyileşmesi ve anti-inflamatuvar etkileri açısından değerlendirmiştir [66]. *In vivo* yara iyileştirme aktivitesi lineer insizyon ve dairesel eksizyon deneysel yara modelleri, hidroksiprolin içeriğinin değerlendirilmesi ve daha sonra histopatolojik analiz ile araştırılmıştır. İyileştirme potansiyeli, bir referans merhem olan Madecassol ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca yağların anti-inflamatuvar aktivitesi için asetik asit kaynaklı kılcal geçirgenlik testi kullanılmıştır. *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* ve *J. phoenicea* L. en yüksek aktiviteleri göstermiş; diğer türler ise herhangi bir yara iyileştirme etkisi göstermemiştir. Deneysel çalışma, *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* ve *J. phoenicea* bitkilerin halk tarafından kullanımını destekleyen etkili yara iyileşmesi ve anti-enflamatuvar etkiler sergilemektedir [66].

Satar ve ark. *Momordica charantia* L. bitkisinin yağlı homojenize formu ve toz formunu ve *Centella asiatica* bitkisinin merhemini ve bunların dışında kontrol grubu ve saf zeytinyağını (5 grup) 30 tavşan üzerinde denemiştir [67]. Yaralar günlük olarak gözlenmiştir ve sonuç olarak *Momordica charantia* bitkisinin yağlı homojenize formu ve *Centella asiatica* bitkisinin merhemi diğer gruplar arasında en etkili sonuçları göstermişlerdir [67].

Renda ve ark. 13 *Trifolium* L. cinsine ait türler (*Trifolium ambiguum* M. Bieb., *T. arvense* var. *arvense* L., *T. campestre* Schreb., *T. canescens* Willd., *T. hybridum* var. *anatolicum* (Boiss.) Boiss., *T. hybridum* var. *hybridum* L., *T. pannonicum* Jacq., *T. pratense* var. *pratense* L., *T. purpureum* var. *purpureum* Lois., *T. repens* var. *repens* L., *T. resupinatum* L. var. *microcephalum*, *T. spadiceum* L. ve *T. trichocephalum* M.Bieb.) toplamıştır ve bu türlerin %80'lik sulu metanol çözeltilerini *in vivo* olarak rat ve fareler üzerinde denemiştir

[68]. Histopatolojik gözlemler de yapabilmek adına bu ekstreler insizyon ve eksizyon yaraları üzerine denenmiştir. Aktif bileşikler YBSK ile değerlendirilmiştir. *T. canescens* türünde yara iyileşmesi potansiyeli görülmüştür bunun da içinde yer alan izoflavon genistein, formononetin, daidzein ve biochanin A bileşiklerinin kombine etkisine bağlı olabileceğini vurgulamışlardır [68].

Süntar ve ark. *Helichrysum graveolens* (M.Bieb.) Sweet türünün metanol ekstresinin yara iyileştirici etkilerini *in vivo* insizyon ve eksizyon yaralarında denemiştir [69]. Yara iyileşmesine katkısının doğrudan olduğu bilinen antiinflamatuvar ve antioksidan deneyleri ise sırasıyla Whittle metodu ve DPPH radikal-süpürme denemeleri ile yapılmıştır. Bu ekstre izolasyon ve tanımlamayı sağlayan çeşitli kromatografik ayırım teknikleri ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, *in vitro* hiyalüronidaz, kollajenaz ve elastaz enzimlerinin inhibitör aktivite testleri, tedavinin etkinlik yollarını keşfetmek için aktif bileşenler üzerinde yürütülmüştür. Sonuç olarak mevcut çalışma, *H. graveolens* çiçeklerinin yara iyileşmesi için geleneksel kullanımını desteklemiştir ve apijenin fraksiyonasyon prosedürleri vasıtasıyla aktif bileşenlerden biri olarak izole edilmiştir [69].

Demirci ve ark. *Verbascum speciosum* türünün metanol ekstresinin *in vitro* deneyler ile yara iyileştirme üzerine etkilerini araştırmıştır [13]. *V. speciosum*'un yara iyileştirici mekanizmaları tamamen bilinmemektedir. Mevcut çalışma ile canlılık, göç, apoptoz, hücre döngüsü ve fibroblast ile endotel hücrelerindeki bazı (p53, kaspaz-3 ve kollajen tip I) gen ekspresyon modelleri üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Sonuçlar, 200 µg/ml bitki özütünün, insan ve fare fibroblastları üzerinde dikkate değer bir proliferatif ve göç etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Ekstre ile işleme tabi tutulan grupta apoptotik gen seviyelerine bakacak olursak p53 ve kaspaz-3 azalırken, kollajen tip I gen düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ve Annexin V boyama ve hücre döngüsü analizi göstermiştir ki bitki özütü fibroblast hücrelerinin hücre döngüsü dağılımlarını etkilemeksizin apoptotik hücre sayısını azaltmıştır. Buna ek olarak, matrigel üzerinde kültürlenmiş insan kordon veni endotel hücreleri (HUVEC) hücre kültürü tarafından oluşan tüp benzeri yapı oluşumu bitki ekstresinin varlığında artmıştır. Bu çalışmada, *V. speciosum*'un fibroblast proliferasyonunu, migrasyonu ve anjiyogenezi teşvik ederek cilt yara iyileşmesi için potansiyel bir terapötik madde olabileceği ve geleneksel kullanımını desteklediği öne sürülmüştür. *V. speciosum* bilimsel delil olmaksızın halk tarafından yara iyileştirici bir madde olarak kullanılır. Mevcut çalışma, *in vitro* yaklaşımları kullanarak yara iyileşmesindeki potansiyel aktivitesini keşfetmek için yürütülmüştür [13].

Pişkin ve ark. *Momordica charantia* bitkisinin zeytinyağlı ekstresini, dekspanthenol (Bepanthen®; BP grup) ve nitrofurazon (Furacin®; FR grup) ayrıca bunlara ek olarak kontrol grubunu (her birinden 7 bireye uygulamak üzere toplam 28 tavşan) *in vivo* olarak karşılaştırmalı çalışmışlardır. Deney sonuçlarına göre BR ve FR gruplarına göre *M. charantia* ekstresi yara iyileşmesini hızlandırmıştır [70].

Süntar ve ark. tarafından yapılan çalışmanın amacı *Daphne oleoides* Schreb. subsp. *oleoides* (DOO) bitkisinin etnobotanik kullanımını doğrulamaktır [71]. DOO bitkisinin romatizmal ağrıya karşı ve Türk halk tıbbında yara iyileşmesi için kullanıldığını ortaya koymuştur. Fraksiyonasyon prosedürleri ile izole bileşiklerin aktivite mekanizmalarını aydınlatılmaya çalışılmıştır. Metanol ekstresi, alt ekstreleri, fraksiyonları ve izolatlarının yara iyileştirme aktivitesi, iki farklı *in vivo* yara iyileştirme deney tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Test materyalinin antienflamatuar ve antioksidan aktiviteleri de çalışılmıştır. Aktivite mekanizmalarının belirlenmesi için, izole edilen bileşikler hiyalüronidaz, kollajenaz ve elastaz enzim inhibisyon faaliyetleri açısından değerlendirilmiştir. DOO'nun metanolik ekstresinin güçlü yara iyileştirme aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu ekstre daha sonra n-hekzan, diklorometan, etil asetat (EtOAc) ve n-butanol ile ardışık çözücü ekstraksiyonlarına tabi tutulmuştur. EtOAc alt ekstresinde kromatografik ayırma teknikleri kullanılarak quercetin 3-O-glukosid, triumbellin ve rutarensin olmak üzere üç bileşik elde edilmiştir. Deneysel çalışma, DOO'nun metanolik ekstresinin önemli yara iyileştirici etkiye sahip olduğunu ve etkinlikten sorumlu aktif bileşen olarak quercetin 3-O-glukosid bileşiği belirlenmiştir [71].

Süntar ve ark. *Pimpinella anisum* L., *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison, *Cuminum cyminum* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Laurus nobilis* L.'den elde edilen bazı uçucu yağların yara iyileştirme potansiyelini değerlendirmeyi amaçlamışlardır [72]. *Lavandula angustifolia* subsp. *angustifolia* Mill. ve *Melissa officinalis* L. aromaterapide sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada seçilen uçucu yağların *in vivo* yara iyileşmesi aktiviteleri linear insizyon ve sirküler eksizyon yara modelleri kullanılarak araştırılmıştır. Bu test sistemlerinde aktif olan yağlar, ana bileşenlerin tanımlanması için GC-MS ile analiz edilmiştir. *L. angustifolia* subsp. *angustifolia* ve *L. nobilis* test edilen numuneler arasında en aktif esansiyel yağ olarak belirlenmiştir. Bu araştırma aktif yağların geleneksel kullanımını doğrulamıştır [72].

Agar ve ark. bu çalışmada fenollerin muazzam tıbbi önemini göz önünde bulundurarak, Türkiye'de yetişen üç türü olan *Achillea coarctata* Poir., *A. kotschy* subsp. *kotschy* Boiss. ve *A. lycaonica* Boiss. & Heldr. fenolik bileşimleri, toplam fenolik içeriği (TPC), antioksidan özellikleri, NIH-3T3 fibroblastlarında yara iyileştirme potansiyelleri ve MCF-7 insan göğüs kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler açısından değerlendirilmiştir [73]. Kapsamlı LC-MS/MS analizi, *A. kotschy* subsp. *kotschy* bitkisinin klorojenik asit, hiperozid, apijenin, hesperidin, rutin, kemferol ve luteolin bakımından belirgin biçimde zengin olduğunu ortaya koymuştur. Bulgular, TPC ile hem serbest radikal temizleme aktivitesi hem de toplam antioksidan kapasite arasında güçlü bir uyum göstermiştir. İncelenen türler arasında en yüksek fenol miktarı ve radikal temizleme en belirgin yara iyileşmesi ve en fazla sitotoksik aktivite *A. kotschy* subsp. *kotschy* bitkisinde gözlenmiştir. Sonuçlar, *A. kotschy* subsp. *kotschy* bitkisinin önemli antioksidan, yara iyileşmesi ve sitotoksik aktivitelerle birlikte değerli bir flavonoid ve klorojenik asit kaynağı olduğunu ileri sürmüştür. Bu bulguların, *A. kotschy* subsp. *kotschy* bitkisinin farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrisinde kullanılabilecek bir biyoaktif kaynak olarak potansiyelini değerlendirmek için yapılacak daha ileri araştırmalara temel oluşturacağı belirtilmiştir [73].

Akkol ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada insizyon ve eksizyon yara modelleri kullanılarak *Morus nigra* L.'nın yaprak ve meyve ekstrelerinin yara iyileşme aktivitesi üzerinde etkilerini değerlendirmek üzere tasarlanmıştır. Ayrıca, anti-inflamatuar etki Whittle yöntemi ile değerlendirilmiştir [74]. Liyofilize meyve ekstresi önemli yara iyileştirme aktivitesi sergilerken, sulu yaprak ekstresi böyle bir sonuç vermemiştir. Biyolojik etkinlik biyoaktivite rehberli fraksiyonlama tekniği ile meyve ekstresi ardışık çözücü ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Elde edilen alt ekstreler arasında, n-butanol (MNF-n-BuOH) alt ekstresinin yara iyileştirme aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Meyve ekstresinin n-BuOH alt ekstresi aynı biyolojik aktivite testlerine uygulanan üç fraksiyon elde etmek üzere Sephadex LH-20 kolon kromatografisine tabi tutulmuştur. Bileşikler 1 ve 2 aktif fraksiyondan izole edilmiştir ve yapıları sırasıyla kersetin-3-O-rutinosid ve kemferol-3-O-rutinosid olarak tanımlanmıştır. İzolatlar *in vitro* enzim önleme faaliyetleri için araştırılmıştır. İzolatların hyaluronidaz, kollajenaz ve elastaz enzim inhibisyon aktiviteleri için *in vitro* yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Böylelikle her iki bileşiğin de hyaluronidaz ve kollajenaz enzimlerini inhibe edici etkisi olduğu görülürken, elastaz enzim inhibisyon aktivitesi ikisinde de görülmemiştir [74].

İlhan ve ark. sıçanın bukkal (ağız boşluğu) mukozasında oluşturulan lineer insizyon ve sirküler eksizyon yara modellerinde *Momordica charantia* bitkisinin zeytinyağı ekstresinin yara iyileştirme aktivitesi araştırılmıştır [75]. Dokular histopatolojik olarak değerlendirilip ayrıca dokuların hidroksiprolin içeriği belirlenmiştir. Anti-inflamatuar aktivite Whittle yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak yara iyileşmesi ve etkili antiinflamatuar etki görülmüştür [75].

Süntar ve ark. *Campanula lyrata* subsp. *lyrata* Lam. bitkisinin *in vivo* teknikler ile yara iyileştirici ve antiinflamatuar etkisine bakmıştır [76]. Bitki kurutulup toz haline getirildikten sonra ayrı ayrı n-hekzan, dietil eter, etil asetat, metanol ve su ekstraları hazırlanmıştır. Anti-enflamatuvar aktivitenin değerlendirilmesi için, karragen ve serotonin nedenli arka ayak ödemi, 12-O- tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA)-nedenli kulak ödemi ve asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışı modelleri kullanılmıştır. Yara iyileştirici etki, insizyon ve eksizyon yara modelleri kullanılarak, hidroksiprolin miktar tayini ve histopatolojik analizlerle beraber değerlendirilmiştir. Metanol ekstresinin karragen-, ve serotonin- nedenli arka ayak ödemi ve asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışı modellerinde sırasıyla %25,3, %27,8 ve %31,8 değerleri ile anlamlı derecede anti-enflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir. Metanol ekstresinin benzer şekilde insizyon ve eksizyon yara modellerinde sırasıyla %26,9 ve %39,6 değerleri ile anlamlı derecede yara iyileştirici etki gösterdiği ve metanol ekstresi ile hazırlanan merhemle tedavi edilen dokularda hidroksiprolin miktarının arttığı belirlenmiştir. Bu çalışma, *C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinin halk arasında anti-enflamatuvar ve yara iyileştirici amaçlarla kullanımını desteklemektedir [76].

Akkol ve ark. yara iyileşmesi aktivitesini araştırmak için, Türkiye’de yaygın olarak yetişen yaygın türlerden biri olan *Rubus sanctus* bitkisinin toprak üstü kısımlarının n-hekzan, etil asetat (EtOAc) ve metanol (MeOH) ekstraları ardışık olarak hazırlanmıştır [77]. Ekstrelerin yara iyileştirici etkisi, bunların hepsi yara iyileştirme sürecinde önemli bir role sahip olan hiyalüronidaz, kollajenaz ve elastaz enzimleri üzerindeki potansiyel engelleyici aktivitelerini değerlendirerek belirlenmiştir. Aktiviteyi yönlendiren fraksiyonasyon tayinine göre, metanol ekstresi, silika jel kolon kromatografisiyle fraksiyon haline getirilmiştir. Preparatif ince tabaka kromatografi (TLC) analizi, kersetin-3-O- $\beta$ -galaktoz, yani hiperozid gibi spektral tekniklerle açıklanan saf bir bileşiği vermiştir. *In vitro* deneyler, hiperozidin, kollajenaz ve elastaz enzimlerini inhibe ederek yara iyileştirme sürecini ilerlettiğini göstermiştir [77].

Aksoy ve ark. *Cotinus coggygia* Scop. yapraklarının etanol ekstresini diabetik ratlarda denemişlerdir [78]. Bu bakımdan çalışmada biyokimyasal ve histolojik etkiler araştırılmıştır. Bu çalışmada tek doz streptosotosin ile enjekte edilen diyabetik Wistar albino sıçanlar üzerinde yürütülmüştür. Daha sonra tüm hayvanlarda eksizyon yara modeli oluşturulmuştur; Diyabetik kontrol sıçanlara topikal olarak basit merhem uygulanmış ve deney periyodu boyunca günde bir kez, bitki ekstresi ile birlikte %5 oranında merhem diyabetik tedavi farelerine uygulanmıştır. Yara dokularında malondialdehit, glutatyon ve hidroksiprolin düzeyleri 3., 7. ve 14. gün sonunda araştırılmıştır. Histopatolojik incelemeler de yapılmıştır. Hidroksiprolin içeriği, 3. ve 7. günlerden sonra kontrol ile karşılaştırıldığında ekstre ile tedavi edilen grupta anlamlı şekilde artmıştır. Glutatyonda 3., 7. ve 14. günlerde istatistiksel olarak anlamlı yükselme ve kontrol grubuna karşı tedavi edilen grupta 7. Günün sonunda malondialdehit düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir tespit edilmiştir. Bu sonuçlar histolojik analizlerle de desteklenmiştir. Bu bulgular, ekstreinin diyabetik yaralarda kutanöz yara iyileştirme sürecini hızlandırdığını ve geleneksel kullanımının onaylandığını göstermektedir [78].

Çoban ve ark. yaptıkları çalışma ile Türkiye’de yıllardır yara tedavisinde geleneksel olarak kullanılan kantaron yağının (*H. perforatum*’un zeytinyağı ile elde edilen ekstresi) üzerinde moleküler çalışmalar yapmıştır [79]. Kantaron yağının yara iyileştirici özellikleri yanında ağrı kesici, enfeksiyon engelleyici özellikleri bulunmaktadır. Literatürde bu yağın yara iyileşmesine olan pozitif etkisi ile ilgili birçok çalışma olduğunu ancak literatürde şimdiye dek bu özelliklerin hangi yolaklar üzerinden olduğunu gösterir hayvan deneylerini içeren detaylı bir çalışma bulunmadığını vurgulamışlardır. Bu çalışma ile kantaron yağının yara iyileşmesi üzerine erken dönem (ilk 7 gün) ve geç dönem (ikinci 7 gün) etkisi farelerde sırt bölgesinde steril sütürler oluşturularak gösterilmiştir. Sonuçlara göre, farelerde oluşturulan yara yüzeyinde morfolojik olarak kantaron yağının erken dönem kullanımda pozitif etkisi olmakta, geç dönem uygulamada bu etki görülmemektedir. Bu bulgu kantaron yağının yara iyileşmesine yara oluştuktan sonraki ilk haftada pozitif etkisi olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu dönemde alınan dokulardan RT-PCR yöntemi ile anjiyogenez üzerinden yara iyileşmesinde rolü olan VEGFA, VEGFB, VEGFC, PDGFB ve FGF2 genlerinin gen ekspresyon profilleri incelenmiştir. Sonuç olarak erken dönemde VEGFA, VEGFB, VEGFC ve FGF2 genlerinin gen ekspresyonları artmakta, geç dönemde bu etki yalnızca VEGFA geninde saptanmaktadır. Erken ve geç dönemde bulunan gen ekspresyonu bulguları saptanan morfolojik özelliklerle korelasyon göstermektedir. Bulgular kantaron yağının erken dönem



yara iyileşmesini anjiyogeneze rol oynayan VEGFA, VEGFB, VEGFC ve FGF2 üzerinden yaptığını göstermesi açısından önemli olduğunu belirtmişlerdir [79].

Eruygur ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada yara iyileşme potansiyelinin değerlendirilmesi için dört *Echium* L. türü (*E. italicum* L., *E. vulgare* L., *E. angustifolium* Mill., *E. parviflorum* Moench) seçilmiştir [80]. Aktif ekstraktlardan aktif bileşen(ler)in biyoaktivite rehberli karakterizasyon fraksiyonlama prosedürleri vasıtasıyla izole edilmiştir. *In vivo* hayvan modelleri üzerinde linear insizyon ve sirküler eksizyon yara oluşturularak incelenmiştir. Hidroksiprolin ölçümleri bunun için oturtulmuş standart bir teknikle ölçülmüştür. Daha sonra histopatolojik olarak çalışılmıştır. Tüm bu çalışmalar ışığında *E. italicum* en etkili yara iyileştirici içeriğe sahip bitki olarak belirlenmiştir. NMR sonuçları ile aktif bileşik olarak Shikonin türevleri olan “Asetilshikonin”, “Deoksishikonin” ve “2-metil-n-butyrylshikonin + Isovalerylshikonin” bileşikleri belirlenmiştir [80].

## 2.5. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Bitkilerin Ekstreleri ile Yapılmış Çalışmalar ve Bu Bitkilerin Çalışma İçin Seçilme Nedenleri

Çeşitli ailelere dahil birçok bitki ekstresinin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle gösterilmiştir [1]. Ancak çalışmaların çoğunda *in vivo* etkisi gösterilmiş olup, moleküler mekanizmaya yönelik detaylı çalışmalar genelde yapılmamıştır.

Tez çalışmasında belirlenen türlerden biri olan *Hypericum pseudolaeye* ekstresinin yara iyileştirici etkisi ile ilgili literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak *Hypericum* cinsi, özellikle de *H. perforatum* türü yaygın olarak kullanılan tıbbi bitkilerden birisidir ve yara iyileştirici etkileri gerek etnobotanik gerekse de fonksiyonel *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir [1,6–8]. Bu çalışmalardan bazılarıyla ilgili detaylı bilgiler “Türkiye’de yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar” başlığı altında verilmiştir. Yine bu türe (*H. perforatum*) ait ekstraktların fibroblast göçünü ve kollajen sentezini arttırdığı da bilinmektedir [8]. Bu nedenle tez kapsamında çalışılacak olan Türkiye’de doğal yayılışa sahip *H. pseudolaeye* türünün de yara iyileşmesinde etkili olacağı düşünülmüştür ve hakkında hiçbir veri bulunmaması nedeniyle çalışmaya dahil edilmiştir. Türün uçucu yağının karakterizasyonuna [81] ve bazı fenolik bileşenlerinin tespitine [82] yönelik bir çalışma yapılmış olmakla birlikte, yara iyileştirici etkisine dair literatürde veri bulunmamaktadır.

*Hypericum* cinsine dahil Türkiye’de bulunan bazı türlerin hidrodistilasyon ile elde edilen esasnsiyel yağlarının kimyasal içerikleri gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) yöntemiyle yapılan çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir [81, 83–86]. İncelenen türler arasında *H. pseudolaeve* de vardır. Esansiyel yağlar çalışmamız kapsamı dahilinde olmadığından burada bu çalışmaların detayı verilmemiştir.

Teze dahil olan *H. pseudolaeve* türünün, esansiyel yağ çalışması dışında kimyasal içeriğinin tespitine yönelik olarak Eroglu Ozkan ve ark. tarafından yapılmış bir çalışma bulunmaktadır [82].

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *Hypericum* cinsine dahil türlerde bulunan temel sekonder metabolitler olarak floroglukinol türevleri olan hiperforin ve adhiperforin, naftodiantron bileşikler olan hiperisin ve psödohiperisin (kırmızı pigment maddeleri) ve flavonoid yapıda olan hiperosid, rutin, kersitrin, izokersitrin, kersetin, mikuelianin, epikateşin, kateşin ve biapijenin gibi fenolik bileşenler ve fenilpropan, kafeik ve klorojenik asitler, ksantonlar ve tanninler söylenebilir ve bu maddelerin çok çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Özellikle, hiperforin, hiperisin ve fenolik bileşenlerin ana etken bileşikler olduğu bilinmektedir [10,87–94].

Tezde kullanılan diğer tür ise *Verbascum stachydifolium*’dur. *Verbascum* cinsine ait türlerin çeşitli kısımları halk arasında tıbbi amaçlı kullanılmaktadır ve bu kullanımlardan bazıları bilimsel olarak da kanıtlanmıştır. *Verbascum* cinsine ait türler halk tıbbında yara iyileştirici olarak da kullanılmaktadır ancak bu konuda kısıtlı bilimsel çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada Türkiye’de bulunan 13 *Verbascum* türünün metanolik ekstralarının yara iyileştirici etkileri *in vivo* olarak değerlendirilmiştir [12]. Bu çalışmada, *V. stachydifolium* ekstresinin yara iyileşmesinde en etkili olan türlerden biri olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada yine Türkiye’de yayılış gösteren bazı *Verbascum* türlerinin ekstralarının tuzlu su karidesi (*Artemia salina*) üzerindeki *in vivo* sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *V. stachydifolium* kayda değer bir toksik etki göstermemiştir. Bu tez çalışması için de toksik etki göstermemesi önemli bir kriter olduğu için bu bitkinin belirlenmesinde göz önünde bulundurulmuştur. Yine yapılan çalışmalarla *Verbascum* cinsine ait türlerden elde edilen bileşiklerin (aşağıda belirtilmiştir) antioksidan aktivitelerinin de gösterilmiş olması yara iyileşmesindeki potansiyel etkilerine işaret etmektedir [95].

Tez çalışmasında araştırılan *V. stachydifolium* ile ilgili kimyasal bir çalışma bulunmamakla birlikte, cinsin diğer türleriyle yapılan çalışmalar ışığında *Verbascum* türlerinde bulunabilecek fitokimyasallar hakkında bilgi sahibi olunabilir. Yapılan çalışma ile *Verbascum salviifolium* türünün toprak üstü kısımlarından dört flavonoid glikozitler, feniletanoid glikozitler, neolignan glikozitler tanımlanmıştır. Bu bileşiklerin DPPH testi ile antioksidan özellikleri olduğu da gösterilmiştir [96,97]. *Verbascum pycnostachyum* metanolik ekstresinden Aukubin, Ajugol, Ajugosid, Harpagosid, Verbaskosid tanımlanmıştır [98]. *Verbascum pinetorum* metanolik ekstresinde iridoid glikozitler, saponinlerin, flavonoidlerin ve diğer fenolik bileşenlerin varlığı tespit edilmiştir [99]. *Verbascum mucronatum* türünden biyoaktivite rehberli karakterizasyon ile anti-inflamatuar, ağrı kesici ve yara iyileştirici özelliğe sahip glikozitler tanımlanmıştır. Tanımlanan bileşikler iridoid glikozitler, fenilethanoit glikozitler (verbaskozit), saponinler sınıfındadır. Bu çalışmada da verbaskozit bileşiğinin etkileri yüksek bulunmuştur [14].

Konusu geçen *in vivo* çalışmanın dışında, *V. stachydifolium* ekstrelerinin yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin *in vitro* olarak değerlendirildiği, sitotoksik etkilerinin araştırıldığı ve yara iyileşmesinin moleküler mekanizmasına ait değerlendirme yapıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, yukarıda bahsedilen gerekçeler ışığında ve türün Türkiye'ye endemik olması nedeniyle çalışmamıza dahil edilerek, yara iyileştirici etkisi daha detaylı olarak araştırılacak, olası toksik etkileri ortaya koyulacak ve *in vitro* modeller ile *in vivo* modellerin uyumluluğu değerlendirilebilecektir. Ayrıca bu türün fitokimyasal içeriği ve antioksidan özellikleri hakkında da bu çalışma ile ilk kez veri elde edilecektir.

## 2.6. Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Betimi, Ekolojisi ve Lokaliteleri

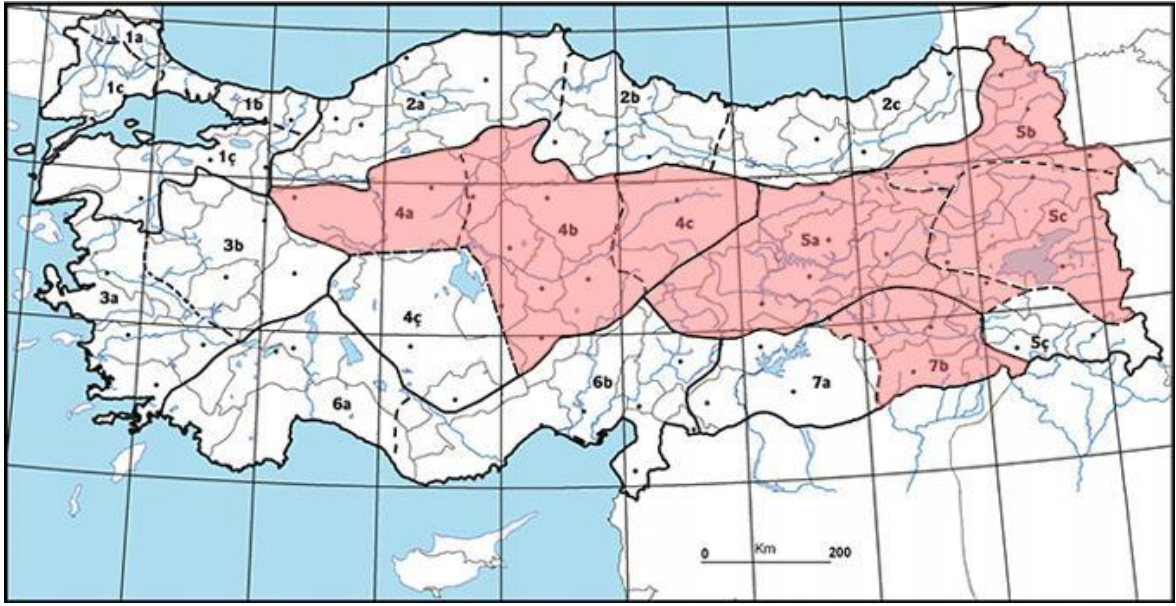
*Hypericum pseudolaeve* Robson- Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh 27: 190 (1967)

Çok yıllık otsu, 15–60 cm, dik, tabandan itibaren dallanmış durumda, steril sürgünlü. Gövde küçük amber rengi veya kırmızımsı glandlara sahip; internodlar 15-40 mm, yapraklar internodlardan kısa. Gövde yaprakları 8-22 mm dar oblong- linear bazen revulat uçta dairesel veya hafif çıkıntılı tüysüz veya  $\pm$  papilloz. Çiçeklenme silindirik- genişçe piramidal, çok çiçekli. Sepaller oblong-lanseolat, uçta akut veya dairesel, glandular dişli veya glandlar sapsız. Petaller 6-8 mm. Kapsül 4-6 mm tüysüz bazen hafifçe gagalı.

Habitatı; Kuru magmatik veya metamorfik stepler veya bozkır; 500-2000 m.

Çiçeklenme 5. ve 7. aylarda.

Türkiye'deki dağılışı; Nevşehir, Ankara, Erzincan, Malatya Erzurum, Elazığ (Harita 2.1) [100].



Harita 2.1. *H. pseudolaeve*'nin yayılışı

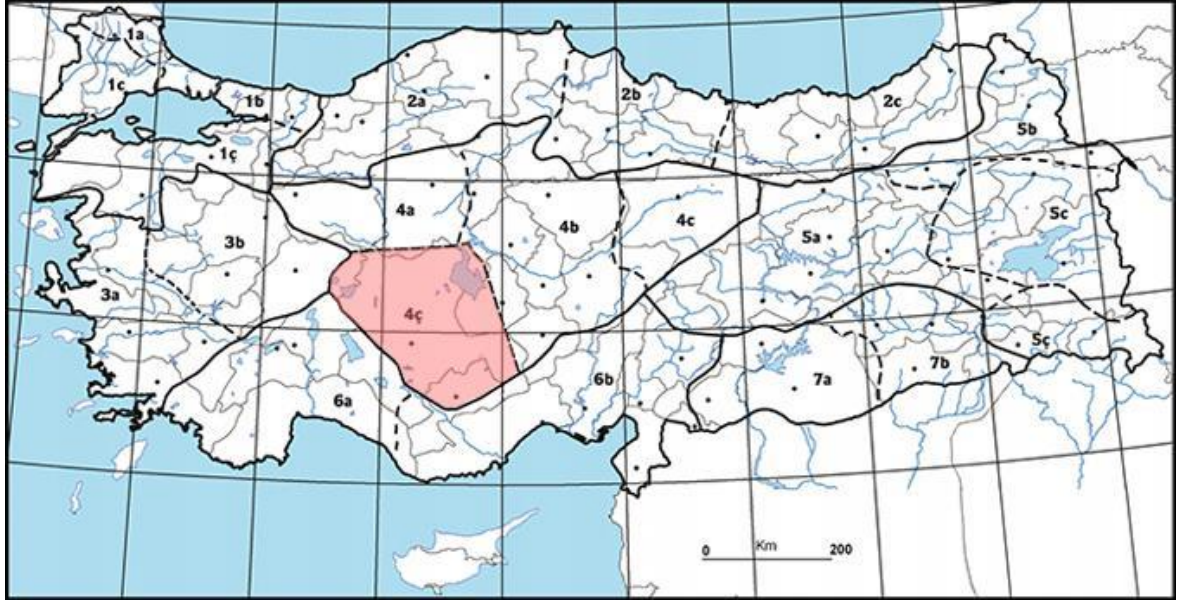
*Verbascum stachydifolium* Boiss. & Heldr. var. *stachydifolium*- Diagn.Pl. Orient ser. 1(12): 25 (1853)

İki yıllık otsu bitki, 30-80 cm, grimsi tomentoz tüylü, olgunlukta tüysüz. Gövde yuvarlak, düz veya geniş açılı basit veya dallı. Taban yapraklar oblong-linear lanseolat arasında, krenulat ile ince krenulat kenar arasında. Yaprak sapı 1-5 cm, gövde yaprakları taban yapraklarına benzer ama daha küçük uçta akut ile akuminat arasında. Çiçeklenme durumu gevşek, basit, rasem veya dallı panikül. Çiçek kümeleri 1-2. Brakteler lanseolattan lineara kadar değişir. Brakteler pedisellerden daha uzun veya kısa. Pediseller 3-5 mm. Kaliks 4-9 mm loblar lanseolat ile linear,  $\pm$  obtus. Korolla sarı, 20-30 mm çapında pellusid glandlı, dışı flokkos-tomentos. Stamenler 5, anterler reniform, filamentler beyaz sarı yünsü tüylü, 2 filamentin üst kısmı tüysüz. Kapsül 4,5-6x3-5 mm, stellat-tomentoz, glabressent. Kapsül ovat- subgloboz ve kaliksi 4-5 mm geçer.

Çiçeklenme 6. ve 8. aylarda.

Habitatı; Step, tarla ve yol kenarları 830-1040 m.

Türkiye dağılışı; Konya- Ankara arasında (Harita 2.2). Endemik. [100].



Harita 2.2. *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*'un yayılışı





### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki örnekleri ve temini

Araştırma materyali olan örnekler tarafımızdan İç Anadolu Bölgesinden toplanmıştır. *H. pseudolaeye* Ortahisar-Nevşehir arasından kuru magmatik metamorfik yamaçlar veya bozkırlardan (1434 m) (Resim 3.1) ve *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* ise Cihanbeyli-Konya arasından buğday tarlaları, steplerden (986 m) toplanmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.1. *Hypericum pseudolaeye*'nin habitat görünümü



Resim 3.2. *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*'un habitat görünümü

Çalışmalarda içeriğin standart olması için tek bir popülasyona ait bitki örnekleri kullanılmıştır. Bitkiler toplandıktan sonra gölgede kurutulmuştur. Toplanan bitkiye ait arazi

fotoğrafları Resim 3.3 ve 3.4’de verilmiştir. Toplanan bitkilere ait kontrol örnekleri Gazi Üniversitesi Herbaryumu’nda saklanmaktadır (Çizelge 3.1). Bitkilerin toprak üstü kısımları Waring marka ticari parçalayıcı ile toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilmiş bitkiler kullanılmadan önce güneş ışığına maruz kalmadan oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



Resim 3.3. *Hypericum pseudolaeve* habitus görünümü (siyah ok sepal ve petal üzerindeki sekresyon glandlarını göstermektedir)



Resim 3.4. *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*’un habitus görünümü



Çizelge 3.1. Çalışılan türlerin toplama ve lokasyon bilgileri

| Taksonlar                                                                            | Toplanma Tarihi | Lokalite                                                          | Toplayıcı Numarası |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <i>Hypericum pseudolaeye</i> Robson                                                  | 06.06.2017      | 38°36'21.44"N,<br>34°48'41.86"E – Ortahisar,<br>Nevşehir, Türkiye | BK1265             |
| <i>Verbascum stachydifolium</i> Boiss. & Heldr. var. <i>stachydifolium</i> (Endemik) | 10.07.2017      | 38°13'25.20"N,<br>32°44'56.11"E –<br>Cihanbeyli,Konya,<br>Türkiye | BK1268             |

### 3.1.2. Çalışılan hücre ve temini

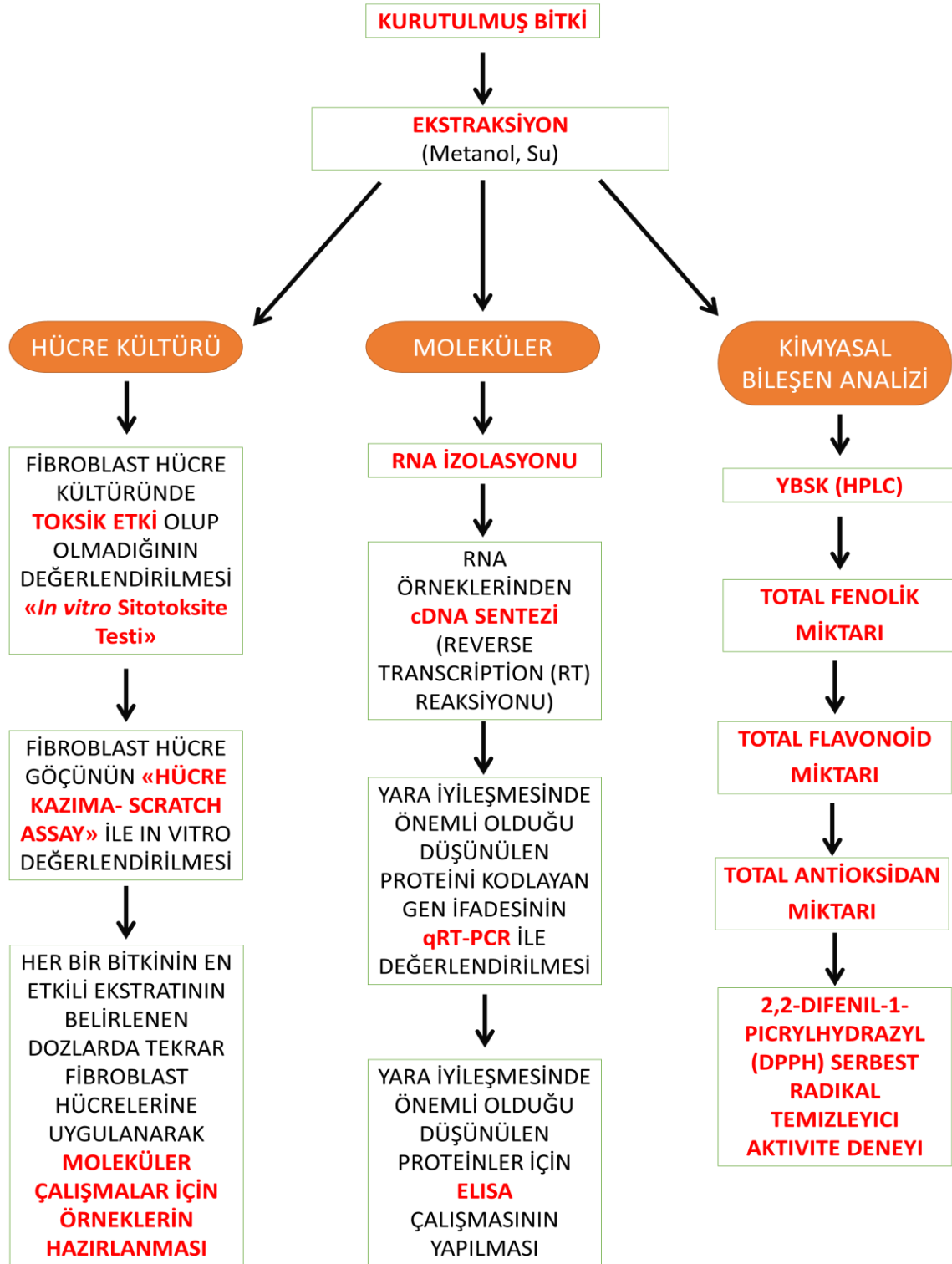
Çalışmamızda yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılan L929 (ATCC® CCL-1™) fare fibroblast hücre hattı kullanıldı ve hücre hattı Şap Enstitüsünden (Ankara) temin edilerek *in vitro* deneylerde kullanılmıştır.

### 3.1.3. Kimyasal bileşikler

YBSK için kullanılan standartlar (hiperisin hariç), TBA ve dimetilsülfoksit (DMSO) Sigma'dan; Hiperisin, Santa Cruz Biotechnology'den; Difenil-2pirilhidrazil (DPPH) Aldrich'ten; Folin-Ciocalteu reaktifi, askorbik asit, sodyum karbonat, potasyum asetat, alüminyum klorür heksahidrat ve sülfürik asit Merck'ten; metanol Atabay'den; sodyum fosfat Riedel-de Haën'den; amonyum molibdat Fluka'dan; Hücre Besiyeri (DMEM) Gibco'dan; fetal bovin serumu (FBS), fosfat tamponlu salin (PBS), L-glutamin ve penisilin/streptomisin (100 birim/ml penisilin ve 100 ug/ml streptomisin) PAN Biotech'ten; tripsin/EDTA Biological Industries'den; MTT Fisher Scientific'ten temin edilmiştir. Ayrıca qRT-PCR çalışmaları için kullanılan Kollajen 1 (Thermo 4331182 Tagman Gene Expression Assays, 250 rxns COL1A1, Mm00801666\_g1), FGF7 (Thermo 4331182 Tagman Gene Expression Assays, 250 rxns FGF7, Mm00433291\_m1), VEGF (Thermo 4331182 Tagman Gene Expression Assays, 250 rxns VEGFa, Mm00437306\_m1), TGFβ1 (Thermo 4331182 Tagman Gene Expression Assays, 250 rxns TGFb1, Mm01178820\_m1) ve GAPDH (Thermo 4331182 Tagman Gene Expression Assays, 250 rxns GAPDH, Mm99999915\_g1) gen ekspresyon TaqMan primer-prob kitleri Thermo'dan temin edilmiştir. Ayrıca qRT-PCR için kullanılan mastermiks (SensiFAST™ Probe No-ROX Kit- Catalog No: BIO\_86005) Bioline'dan temin edilmiştir. ELISA çalışmaları için TGFb1 (Mouse TGF-beta 1 DuoSet

ELISA DY1679\_05), VEGF (Mouse VEGF DuoSet ELISA DY493\_05), DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 1 (DY007) ve DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2 (DY008) R&D Systems'den temin edilmiştir. Kollajen (Mouse COL1(Collagen Type I) ELISA Kit, Catalog No: E-EL-M0325) için kit Elabscience'dan; FGF7 (ELISA Kit for Fibroblast Growth Factor 7 (FGF7), Catalog No: SEA636Mu) için kit Cloud-Clone Corp.'dan temin edilmiştir. RNA izolasyonu için kit (Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit (#K0731 #0732)) Thermo'dan; cDNA eldesi kit (Hyperscript (First strant synthesis kit) Cat. No.: 601-005) GeneAll'dan temin edilmiştir.

### 3.2. Yöntem



Şekil 3.1. Tezde yapılacak çalışmaların şematik gösterimi

### 3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması ve Ekstre Yüzde Verimliliği Hesaplaması

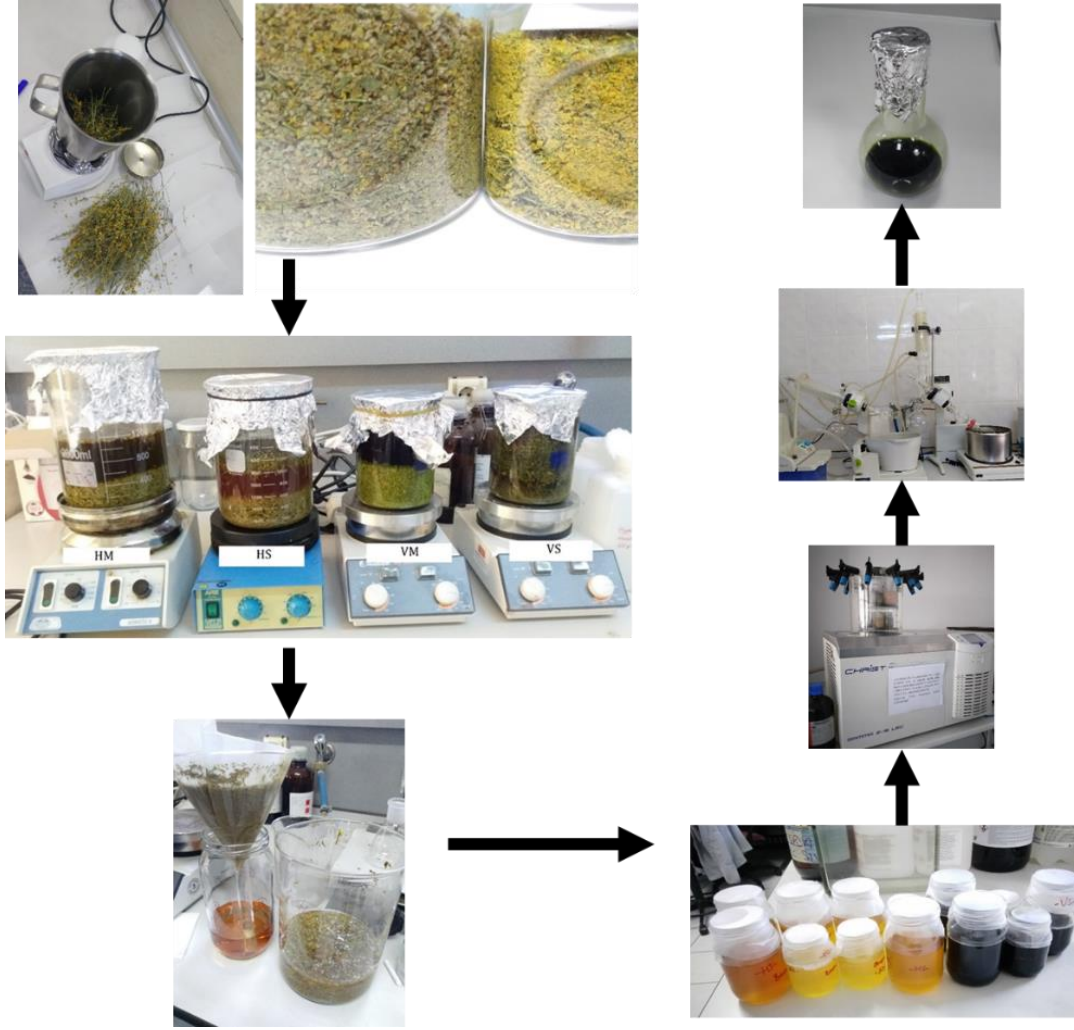
*H. pseudolaeye* ve *V. s. var. stachydifolium* bitkilerinin ekstreleri hem maserasyon hem de sokslet tekniği kullanılarak elde edilmiştir. Maserasyon tekniğinde 60 gr sokslet tekniğinde ise 20 gr öğütülmüş bitki materyali kullanılmıştır. Çözücü olarak su ve methanol kullanılmıştır. Çözücüler sokslet tekniği için 150 ml maserasyon tekniği için ise 600 ml kullanılmıştır.

Maserasyon tekniği için öğütülmüş bitki materyali üç kez metanol veya distile su ile oda sıcaklığında “Heidolph MR 3001, VELP ve SELECTA” markalı manyetik karıştırıcılar üzerinde masere edilmiştir. Sokslet işlemi için distile su veya metanol ile Soxhlet aparatı kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemlerinden sonra Whatman Grade No.1 marka filtre kâğıdı ile süzme işlemi yapılmıştır. Metanol “Heidolph-Rotar VV2000” marka döner vakum evaporator ile 40 °C de buharlaştırılmıştır. Su ekstreleri ise -20°C de dondurulmuş ve sonra “Christ Gamma 2-16 LSC” marka liyofilizatörde kurutulmuştur. Bitki ekstreleri kurutulana kadar karanlıkta ve 4°C de muhafaza edilmiştir.

İşlemlerin sonunda sekiz farklı ekstre elde edilmiştir ve bu ekstreler tez boyunca şu şekilde kısaltmalar ile verilecektir: *H. perforatum* (H), maserasyon tekniği ile elde edilen methanol ekstresi (HMM), maserasyon tekniği ile elde edilen su ekstresi (HSM), sokslet tekniği ile elde edilen methanol ekstresi (HMS), sokslet tekniği ile elde edilen su ekstresi (HSS), *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* (V), maserasyon tekniği ile elde edilen metanol ekstresi (VMM), maserasyon tekniği ile elde edilen su ekstresi (VSM), sokslet tekniği ile elde edilen metanol ekstresi (VMS), sokslet tekniği ile elde edilen su ekstresi (VSS).

Bitkilerin su ve metanol ekstreleri hazırlandıktan sonra çözücüler uzaklaştırılmış ve % verimlilikleri hesaplanmıştır. Verimlilik formülü olarak aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Yüzde verimlilik (g/g) = (Ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstre, g) / (Başlangıçta ölçülen kuru bitki miktarı, g) × 100



Resim 3.5. Maserasyon ekstraksiyon tekniği aşamaları



Resim 3.6. Soxhlet ekstraksiyon tekniği aşamaları

### 3.2.2. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir [101]. Kalibrasyon grafikleri elde etmek için referans bileşik olarak gallik asit kullanıldı (10-100 µg/ml arasında 10 farklı konsantrasyon kullanıldı). Kısaca, 0.5 ml ekstre (1 mg / ml), 2.5 ml 1:10 seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi, 2 ml sodyum karbonat çözeltisi (%7,5 ağırlık/hac) ile karıştırıldı ve 45°C'de 15 dakika bekletildi. Blank, standartlar ve numuneler spektrofotometre kuvvetlerine aktarıldı ve 765 nm dalga boyunda (Perkin Elmer, Lambda 25) UV/VIS spektrofotometresi kullanılarak okundu. Her bir örnek üçlü olarak ölçülmüş ve ortalama değerler kullanılmıştır. Sonuçlar mg/g gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g) olarak verilmiştir.

### 3.2.3. Toplam Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

Toplam flavonoid madde miktarı alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir [102]. Kalibrasyon grafikleri elde etmek için referans bileşik olarak gallik asit kullanıldı (10-80 µg/mL arasında 8 farklı konsantrasyon kullanıldı). Kısaca, 0.5 ml ekstre çözeltileri (0,5 mg/ml), 0.1 ml %10 alüminyum klorür heksahidrat, 0.1 ml 1M potasyum asetat ve 2.8 ml distile su karıştırılıp 40 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Blank, standartlar ve numuneler spektrofotometre kuvvetlerine aktarıldı ve 415 nm dalga boyunda (Perkin Elmer, Lambda 25) UV/VIS spektrofotometresi kullanılarak okundu. Her bir örnek üçlü olarak ölçülmüş ve ortalama değerler kullanılmıştır. Sonuçlar mg/g rutin eşdeğeri (mg ru/g) olarak verilmiştir.

### 3.2.4. Toplam Antioksidan Miktarının Belirlenmesi

0.3 ml ekstre (1 mg / ml), 3 ml reaksiyon çözeltisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) ile karıştırıldı. Reaksiyon çözeltisi içeren tüpler 90 dk 95°C de inkübe edildi. Oda sıcaklığına getirildikten sonra blank, standartlar ve numuneler spektrofotometre kuvvetlerine aktarıldı ve 695 nm dalga boyunda (Perkin Elmer, Lambda 25) UV/VIS spektrofotometresi kullanılarak okundu. Kalibrasyon grafikleri elde etmek için referans bileşik olarak askorbik asit kullanıldı (3.9-500 µg/mL arasında 2 kat seri dilüsyonla hazırlanmış 8 farklı konsantrasyon kullanılmıştır). Her bir örnek üçlü olarak ölçülmüş ve

ortalama değerler kullanılmıştır. Sonuçlar mg/g askorbik asit eşdeğeri (mg aae/g) olarak verilmiştir [103].

### 3.2.5. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Deneyi

Ekstreler 15.62, 31.25, 62.5, 125 ve 250 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Her konsantrasyonda hazırlanmış 3 ml ekstre 1 ml metanolle hazırlanmış 0,1 mM DPPH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 517 nm dalga boyunda (Perkin Elmer, Lambda 25) UV/VIS spektrofotometresi kullanılarak okunmuştur. Negatif kontrol için ekstre içermeyen çözücü, pozitif kontrol için ise askorbik asit kullanılmıştır. Antioksidan kapasitenin etkisi, mor DPPH'nin renginin sarı/açık-sarıya renk değişimi olarak gözlenmiş olup kullanılan her ekstre için % inhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = ((A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blank}}) - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{blank}})) \times 100 / (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blank}})$$

Burada,  $A_{\text{kontrol}}$ , negatif kontrolün absorbansıdır (O.D.),  $A_{\text{örnek}}$ , askorbik asit veya ekstre numunelerinin absorbansıdır (O.D.) ve  $A_{\text{blank}}$ , kör örneğinin absorbansıdır. IC<sub>50</sub> değerleri, sigmoidal eğrilerin çizilmesinden sonra dört parametrelili bir lojistik regresyon modeli kullanılarak inhibisyon oranları ile hesaplandı. Standart ve ekstreler üç tekrar halinde ölçülmüş ve hesaplamalar için ortalama değerler kullanılmıştır [37].

### 3.2.6. YBSK Analizi ve Miktar Tayini

Ekstrelerin kimyasal içeriği ters faz YBSK-Diode Array Dedektörü (YBSK-DAD/HPLC-DAD) metodu ile analiz edilmiştir. Referans bileşikler ise bitkilerde ikincil metabolitler olarak yaygın olan fenoliklerden seçilmiştir. Ekstre kromatogramları ile standart alıkonma sürelerini eşleştirerek sırasıyla *V. stachydifolium* ve *H. pseudolaeve*'nin ekstrelerinde 15 ve 17 farklı referans bileşik analiz edilmiştir.

Kromatogramlar 8 farklı dalga boyunda kaydedilmiştir ve referans maddelerin maksimum absonsansına göre analizler 210, 260, 270, 320 ve 590 nm dalgaboylarında kaydedilen kromatogramlar ile yapılmıştır. Her ne kadar standart bileşikler birden fazla dalga boyunda

saptanabilse de analizler her bir standart için maksimum absorpsiyonlu kromatogramlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve bu şekilde analizin kesinliği arttırılmıştır. Kersitrin ve 4-hidroksibenzoik asit için 260 nm’de; gallik asit için 270 nm’de; kateşin, epikateşin, vanilik asit, siringik asit, rutin, kersetin, hiperozid, apijenin ve kemferol için 210 nm’de; klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit ve sinapik asit için 320 nm’de; hiperisin için 590 nm’de kaydedilen kromatogramlar kullanılmıştır. YBSK analizi için kullanılan ekstre konsantrasyonu 1 mg/ml olarak belirlenmiştir. Tüm standartlar ve ekstreler 0,45 µm politetrafloroetilen (PFTE) membrandan süzölmüş, üç tekrarlı olarak ölçölmüş ve ortalama değlerler verilmiştir.

DAD dedektörlü YBSK (Agilent, 1220 Infinity) kullanılarak C18 kolonunda (Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.7 µm, 4,6 x 10 mm) kromatografik ayırma yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C ye ayarlanıp akış hızı 0,8 ml/dak olarak belirlenmiş ve 20 µl standart veya örnekler kolona enjekte edilmiştir. Ters faz ayrımı, mobil faz A (%0,1 TFA ile asitlenmiş distile su) ve B (%0,1 TFA ile asitlenmiş asetonitril) içeren bir gradyan yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gradyan şu şekilde uygulanmıştır: 0-1 dk %95 A; 2-30 dk A %95’ten %50’ye; 31-35 dk A %50’den %5’e; 36-37 dk %5 A, 38-39 dk A %5’ten ile %95’e, 1 dk %95 A.

Metot validasyon parametreleri olarak, her referans için Eurachem Guide, 2. basıma [104] göre tespit limiti (LOD) ve kantitasyon limiti (LOQ) değlerleri hesaplanmıştır. Ek olarak, yöntemin gün içi kesinliği bağıl standart sapma yüzdesi (% RSD) olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.7. Hücre Kültürü

L929 (ATCC® CCL-1™) fare fibroblast hücre hattı Şap Enstitüsünden temin edildi ve *in vitro* deneylerde kullanıldı. Hücre hattına *Mycoplasma* testi uygulanmış olup sonuç negatif çıkmıştır. Hücreler, 25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup> hücre kültür flasklarında %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve 4 mM L-glutaminli DMEM besiyerinde 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatörde çoğaltılmıştır. Besiyerleri düzenli olarak her 2 günde bir değıştırilmiştir. Hücreler flaskları %80-90 kaplayınca tripsin-EDTA ile 1:3 oranında pasajlanmıştır. Yapılan tüm deneylerde 4-6 pasaj aralığındaki hücreler kullanılmıştır.



### 3.2.8. *In vitro* Sitotoksite Testi

Sitotoksiste testi, yaşayan hücrelerin mitokondriyal redüktaz aktivitesini ölçen ve tetrazolium tabanlı kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi ile belirlenmiştir [102]. Hücreler flaskları %80-90 kaplayınca pasajlamış ve  $10^4$  hücre/ml konsantrasyonundaki büyüme ortamından her kuyucuğa 200  $\mu$ l 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına aktarılmıştır. Besiyerinde bitki ekstraktları 31.25, 62.5, 125, 250 ve 500  $\mu$ g/ml konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Hücreler kuyucukları en az %80 kaplayınca besiyeri çekilmiş ve 200  $\mu$ l bitki uygulanmıştır. Negatif kontrol için sadece (bitki ekstresi çözücüsüne göre) su veya metanol konulmuştur. 18, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlardan sonra kuyucuklara 50  $\mu$ l MTT eklenmiştir. Daha sonra tüm sölüsyonlar çekilmiş ve DMSO eklenmiştir. Plateler 30 dk karanlıkta inkübe edilmiş ve daha sonra 570 nm’de Mikroplate Okuyucuda okunmuştur (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, Biotek, Winooski, VT, USA). Deneyler 4 tekrarlı şekilde yapılmış ve daha sonra ortalama değerler verilmiştir.

### 3.2.9. *In vitro* Hücre Çizik Testi (“Cell Scratch Assay”) Yara İyileşme Modeli

L929 fare fibroblast hücrelerinin göç kabiliyeti hücre çizik testi yara iyileşme modeli ile değerlendirilmiştir. Hücreler,  $2 \times 10^4$  hücre/ml konsantrasyonunda %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve 4 mM L-glutamin eklenmiş 300  $\mu$ l DMEM ortamında 48 kuyucuklu doku kültür kaplarına ekilmiş ve tek tabaka halinde kaplayıncaya kadar bekletilmiştir. Sekiz bitki ekstresinin tamamı, besiyerinde 62  $\mu$ g/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. Daha sonra steril 200  $\mu$ l pipet ucu ile tek tabakalı hücrelere doğrusal bir yara oluşturulmuştur. Çizme işlemi yapıldıktan sonra herhangi bir kalıntı kalmaması açısından PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Bu işlemten sonra bitki ekstraktlarını içeren besiyerinden 300  $\mu$ l uygulanmış ve %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatörde 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol kuyucuklarına, bitki içermeyen çözücü (metanol veya su) ilave edilmiştir. Hücrelerin ilk etapta çizme işleminden hemen sonra ters mikroskop ile fotoğrafları çekilmiştir. Bu fotoğraf 0 (başlangıç) fotoğrafı olarak değerlendirilmiştir. Aynı şekilde gerekli hesaplamaların yapılabilmesi için 24 saat sonra da dijital olarak fotoğraflanmıştır [105].

Çizilen kısım arasında kalan ImageJ yazılımı kullanılarak fotoğraf işleme işlemi ile ölçülmüştür. Öncelikle hücrelerin kenarları kontürlenmiştir ve daha sonra aradaki alan

piksellere dayalı olarak hesaplanmıştır. Aynı kuyucuktan alınan üç fotoğrafın ortalama değerleri her tekrar kuyucuk için kullanılmıştır. Hücrelerin oluşan boşluğu kapatma oranı ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Yara kapatma oranı} = [(Alan_{t0} - Alan_{t24}) / Alan_{t0}] \times 100$$

Burada  $Alan_{t0}$  başlangıçta çekilen fotoğrafın ölçülmüş alanı,  $Alan_{t24}$  24'üncü saatte alınan fotoğrafın alanıdır. Deney üç tekrar halinde (her kuyucukta da farklı bölgelerden üç farklı tekrar) yapılmış ve ortalama değerler sunulmuştur.

### 3.2.10. RNA İzolasyonu

Tüm gen ifade deneylerinde kullanılacak örnekler için daha önceden 62 µg/ml konsantrasyonunda bitki ekstraktları (HSM ve VSM) hücrelere 24 saat T25 flasklarda uygulanmıştır. Uygulama her bir ekstre ve negatif kontrol grubu için 3 ayrı flaskta yapılmıştır

RNA izolasyonu “Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit (#K0731 #0732)” ile protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Hücreler soğuk PBS ile yıkanmış ve yine soğuk olan PBS ile kazınmıştır. Doğrudan her bir örneğe 600 µl lizis tamponu ardından 360 µl etanol eklenmiştir. Lizatların 700 µl'si tüplü kolonlara aktarılmış ve 1 dk 12000 x g'de santrifüj edilmiştir. Bu adım lizatın tamamı kolona gelene kadar tekrarlanmıştır. Toplama kısmı atılmış ve 2 ml toplama tüpü takılmıştır. Ardından 700 µl yıkama tamponu 1'den eklenmiş ve 1 dk 12000 x g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırılıp tekrar aynı yerine takılmıştır. 250 µl yıkama tamponu 2'den eklenmiş ve 2 dk 12000 x g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü atılmış ve 1,5 ml'lik yeni tüp takılmıştır. Membranın ortasına 100 µl nükleaz bulundurmeyen su eklenmiş ve 1 dk 12000 x g'de santrifüj edilmiştir. 50 µl daha su eklenip bu adım tekrarlanmıştır. Bu şekilde tüm RNA'nın membrandan akıtılması sağlanmıştır. RNA örnekleri miktarları ve saflık dereceleri belirlendikten sonra -80 derecede muhafaza edilmiştir.

### RNA miktarı

İzole edilen RNA'ların miktar ve saflık derecelerinin belirlenmesi Nanodrop (UV/VIS Spektrofotometre) cihazında (Thermo Scientific NanoDrop 1000 marka) absorbanslarının ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'nın saflığını kontrol etmek için 260 ve 280 nm'deki absorbanslarının oranına bakılmaktadır. 260/280 absorbans değeri 1,8 ile 2,1 arasında olmalıdır. 260/280 absorbans değerinin 1,8'in altında veya 2,1'in üzerinde olması kontaminasyonu işaret etmektedir. Çalışmamızda 1,8-2,1 aralığında derişime sahip RNA örnekleri ile deneyler yapılmıştır. Ayrıca 260/230 oranı da kontrol edilmiştir. RNA miktar hesaplaması için 230 nm dalgaboyunda ölçüm yapılmıştır.

#### **3.2.11. RNA örneklerinden cDNA sentezi (Reverse transcription (RT) reaksiyonu)**

cDNA eldesi "Hyperscript (First strant synthesis kit) Cat. No.: 601-005" ile protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

RNA örneklerinin hazırlanması için içeriklerinde 500 ng poly(A) RNA olacak şekilde tüpler hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan 12 µl RNA kalıbı üzerine 1 µl oligodT ve 1 µl dNTPs eklenmiştir. 65 derecede 5 dk bekletilmiş ve daha sonra 1 dk buz üzerine alınmıştır. Daha sonra sırasıyla 2 µl 10x RNase reaksiyon tamponu, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl Hyperscript™ Reverse Transkriptase ve 1 µl ZymeAll™ RNase inhibitör eklenmiştir. Karıştırılıp ve 42-60 derecede 30-50 dk bekletilmiştir. 85 derecede de 5 dk bekletildikten sonra buz üzerine alınmıştır ve bu şekilde cDNA elde edilmiştir. Örnekler -80 derecede muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.12. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)**

cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı qRT-PCR amplifikasyon reaksiyonu, TaqMan primer-prob kiti kullanılarak üreticinin talimatlarına göre kurulmuş ve gerçek zamanlı PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Bioneer, Exicycler 96). Kullanılan PCR döngü koşulları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Ekspresyon düzeyi normalizasyonu için GAPDH geni kullanılmış olup  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  yöntemi ile normalize transkript seviyesi hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2. qRT-PCR reaksiyonu koşulları

| Döngü | Sıcaklık | Zaman | Aşama                 |
|-------|----------|-------|-----------------------|
| 1     | 95°      | 2 dk  | Polimeraz aktivasyonu |
| 40    | 95°      | 10 sn | Denatürasyon          |
|       | 60°      | 50 sn | Bağlanma/Uzama        |

### 3.2.13. ELISA yöntemi ile protein seviyelerinin belirlenmesi

Tüm ELISA deneylerinde kullanılacak örnekler için daha önceden T25 flasklarda 62 µg/ml konsantrasyonunda bitki ekstraktları (HSM ve VSM) uygulanmış olan hücre kültür flasklarının 24 saat sonraki besiyerleri kullanılmıştır. Uygulama her bir ekstre ve negatif kontrol grubu için 3 ayrı flaskta yapılmıştır.

#### VEGF

VEGF protein miktarı analizi “Duoset ELISA-Mouse VEGF- Katalog No: DY493-05 (R&D system)” ile protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Bu kite ek olarak aynı markanın “Ancillary Reagent Kit 2” kiti kullanılmıştır).

Protokole uygun olarak dilüe edilmiş plate kaplama tamponu her bir kuyucuğa 100’er µl koyulmuştur. Daha sonra plate üzeri kapatılıp gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra her kuyucuk 400 µl yıkama tamponu ile yıkanıp (x5) temiz kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Her kuyucuğa 300 µl Reagent Diluent 2 konulmuş oda sıcaklığında minimum 1 saat bekletilmiştir. Yıkama tekrarlanmıştır (x5). Standartlar ise 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında örnekler hazırlanmıştır. Örnek ve standartlardan 100’er µl kuyucuklara eklenip 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından yıkama basamağı tekrarlanmıştır (x5) ve 100’er µl Detection Antibody eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yıkama işlemi tekrarlanmıştır (x5). Ardından seyreltilmiş 100’er µl Streptavidin HRP kuyucuklara yüklenmiştir. Tekrar yıkama işlemi yapılır (x5). Ardından her kuyucuğa 100’er µl substrate solution koyulmuş ve 20 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bunun üzerine 50’şer µl durdurma çözeltisi konur ve hafifçe karıştırılıp 450 nm (ve referans dalgaboyu olarak 570 nm)’de mikropılaka okuyuculu spektrofotometrede ölçülür (Perkin Elmer, Victor3).

### TGF- $\beta$ 1

TGF- $\beta$ 1 protein miktarı analizi “Duoset ELISA-Mouse TGF $\beta$ 1- Katalog No: DY1679\_05 (R&D system)” ile protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Bu kite ek olarak aynı markanın “Ancillary Reagent Kit 1” kiti kullanılmıştır).

Protokole uygun olarak seyreltilmiş plate kaplama tamponu her bir kuyucuğa 100'er  $\mu$ l koyulmuştur. Daha sonra plate üzeri kapatılıp gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra her kuyucuk 400  $\mu$ l yıkama tamponu ile yıkanıp (x5) temiz kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Her kuyucuğa 300  $\mu$ l Reagent Diluent 3 konulmuş oda sıcaklığında minimum 1 saat bekletilmiştir. Yıkama tekrarlanmıştır (x5). Örnekler için daha önceden 62  $\mu$ g/ml konsantrasyonunda bitki HSM ve VSM uygulanmış hücre kültür flasklarının 24 saat uygulamasından sonraki besiyerleri kullanılmıştır. Standartlar ise 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000  $\mu$ g/ml konsantrasyonlarında örnekler hazırlanmıştır. Örnekler için kit prosedürüne uygun olarak aktivasyon işlemi yapılmıştır. Örnek ve standartlardan 100'er  $\mu$ l kuyucuklara eklenip 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından yıkama basamağı tekrarlanmış (x5) ve 100'er  $\mu$ l Detection Antibody eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yıkama işlemi tekrarlanmıştır (x5). Ardından seyreltilmiş 100'er  $\mu$ l Streptavidin HRP kuyucuklara yüklenmiştir. Tekrar yıkama işlemi yapılır (x5). Ardından her kuyucuğa 100'er  $\mu$ l substrate solution konulur 20 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilir. Bunun üzerine 50'şer  $\mu$ l durdurma çözeltisi konur ve hafifçe karıştırılıp 450 nm (ve referans dalga boyu olarak 570 nm)'de mikropłaka okuyuculu spektrofotometrede ölçülür (Perkin Elmer, Victor3).

### Kollajen 1

Kollajen protein miktarı analizi “Mouse Coll (Collagen Type 1) Elisa Kit, Katalog No: E\_EL\_M0325 (Elabscience)” ile protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu kit içinde plate hazır kaplanmış olarak gelir ve öncelikle standart ve örnekler her kuyucuğa 100'er  $\mu$ l konur. 37°'de 90 dakika bekletilir. Daha sonra kuyucuklardan sıvılar çekilir, yıkanmadan 100'er  $\mu$ l Detection Antibody konulur ve plate kapatılıp 37°'de 1 saat inkübe edilir. Ardından 350  $\mu$ l yıkama tamponu ile yıkanır (x5). Her kuyucuğa 100'er  $\mu$ l Streptavidin HRP eklenir ve 37°'de 30 dakika bekletilir. Yıkama işlemi tekrarlanıp (x5), 90

$\mu$ l Substrate Reagent eklenip 15 dakika 37°'de karanlıkta bekletilir. En son Stop Solution eklenip 450 nm'de mikrolaka okuyucu ile ölçülmüştür (Perkin Elmer, Victor3)

### FGF7

FGF7 protein miktarı analizi “Elisa Assay Kit, FGF7, Mouse, Katalog No: SEA636Mu (Cloud-Clone Corp.)” ile protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Kit içerisinde kaplanmış plate bulunmaktadır. Tüm çözelti, örnek ve standartlar hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 100  $\mu$ l standart ve örneklerden konulup 1 saat 37°'de bekletilmiştir. Sıvı çekilmiş ve 100'er  $\mu$ l Detection Antibody A konulmuş ve 1 saat 37 derecede bekletildikten sonra yıkama işlemi yapılmıştır (x3). Ardından 100'er  $\mu$ l Detection Antibody B eklenmiş ve 30 dakika 37°'de bekletilmiştir. Yıkama işlemi yapılmıştır (x5). 90  $\mu$ l Substrate Solution eklenmiş ve 20 dakika 37°'de bekletildikten sonra 50  $\mu$ l Stop Solution konulmuş ve hemen 450 nm'de mikrolaka okuyucu ile ölçülmüştür (Perkin Elmer, Victor3).

### **3.2.14. İstatistik analizler**

Tüm sonuçlar en az üç tekrar ile elde edilmiş ve sonuçlar ortalama ( $\pm$ standart sapma ile) olarak verilmiştir. Varyans homojenliği Levene testi ile belirlenmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve bunu takiben post-hoc karşılaştırması için Tukey ve Tamhane testi ile belirlenmiştir.  $P < 0.05$  ise ortalama değerler istatistiksel olarak farklı kabul edilmiştir.

## 4. DENEYSEL BULGULAR

### 4.1. Ekstre Yüzde Verimliliği, Toplam Fenolik ve Flavonoid İçeriği

Ekstre verimi hesaplanmış olup yüzde verimlilik olarak verilmiştir (Çizelge 4.1). Ekstrelerin verimlilik açısından karşılaştırılması durumunda, maserasyon ile elde edilen ekstrelerin veriminin, sokslet tekniğiyle elde edilen ekstrelerden önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür. Çözücüler karşılaştırıldığında ise metanol ekstrelerinin su ekstrelerinden daha iyi verim göstermiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Toplam ekstre ve ekstre verimliliği

| Ekstreler | Ekstraksiyon öncesi<br>kuru bitki (g) | Ekstraksiyon sonrası<br>ekstre (g) | Ekstre<br>verimliliği (%) |
|-----------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| HMS       | 20                                    | 5,89                               | 29,45                     |
| HMM       | 60                                    | 24,05                              | 40,08                     |
| HSS       | 20                                    | 2,22                               | 11,10                     |
| HSM       | 60                                    | 10,25                              | 17,08                     |
| VMS       | 20                                    | 4,42                               | 22,10                     |
| VMM       | 60                                    | 19,44                              | 32,40                     |
| VSS       | 20                                    | 2,34                               | 11,70                     |
| VSM       | 60                                    | 13,60                              | 22,66                     |

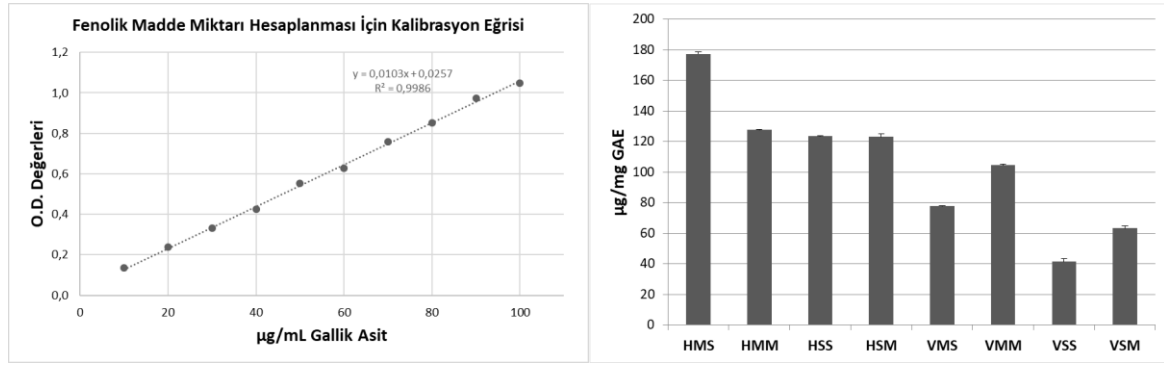
*H. pseudolaeve* ve *V. stachydifolium* ekstrelerinin hesaplanan toplam fenolik ve flavonoid içerikleri Çizelge 4.2’de gösterilmektedir ve Şekil 4.1. ve 4.2.’de ise grafik olarak gösterilmektedir. Sonuçlar, toplam fenolik içeriğin HMS’de 177,21 mg GAE/g ile en yüksek olduğunu göstermekte; ardından 127,50 mg GAE/g ile HMM, 123,48 mg GAE/g ile HSS, 123,03 mg GAE/g ile HSM gelmektedir. Benzer şekilde, toplam flavonoid içeriği HMS’de 123,40 mg RUE/g ile en yüksek, ardından 114,20 mg RUE/g ile HMM, 44,32 RUE/g ile HSS, 21,79 RUE/g ile HSM gelmektedir. *V. stachydifolium* ekstrelerinde, VMM’nin toplam fenolik içeriği 104,45 mg GAE/g ile en yüksek, ardından 77,79 mg GAE/g ile VMS ve 63,35 mg GAE/g ile VSM ve 41,41 mg GAE/g ile VSS gelmektedir. Toplam flavonoid içeriği bakımından, en yüksek miktar 52,65 mg RU/g olan VMS, ardından 42,08 mg RU/g olan VMM ile belirlenmiştir. VSS ve VSM’de sırasıyla 19,55 ve 13,22 mg RU/g toplam flavonoid içerdiği bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Toplam fenolik ve flavonoid içeriği

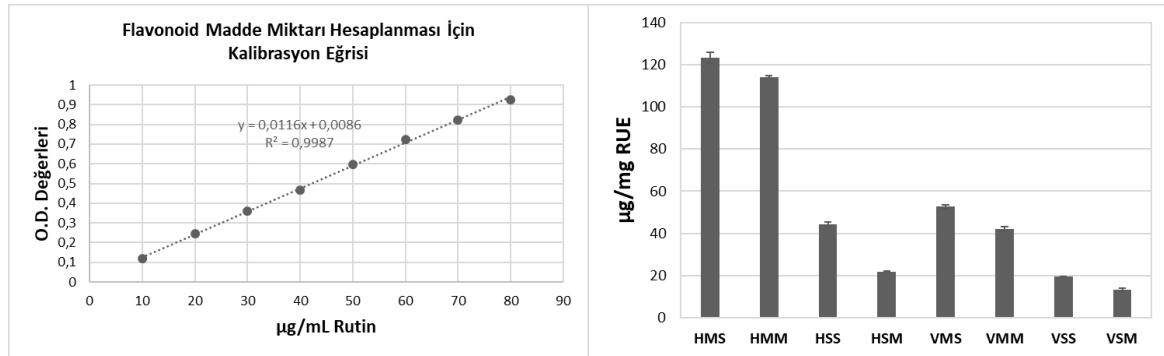
| Ekstreler | Toplam Fenolik İçeriği<br>(mg/g GAE) | Toplam Flavonoid İçeriği<br>(mg/g RUE) |
|-----------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| HMS       | 177,21 ± 1,48 <sup>a</sup>           | 123,40 ± 2,61 <sup>a</sup>             |
| HMM       | 127,50 ± 0,48 <sup>b</sup>           | 114,2 ± 0,45 <sup>b</sup>              |
| HSS       | 123,48 ± 0,29 <sup>c</sup>           | 44,32 ± 1,10 <sup>c</sup>              |
| HSM       | 123,03 ± 1,95 <sup>c</sup>           | 21,79 ± 0,17 <sup>d</sup>              |
| VMS       | 77,79 ± 0,29 <sup>d</sup>            | 52,65 ± 0,86 <sup>e</sup>              |
| VMM       | 104,45 ± 0,78 <sup>e</sup>           | 42,08 ± 0,94 <sup>c</sup>              |
| VSS       | 41,41 ± 1,87 <sup>f</sup>            | 19,55 ± 0,00 <sup>d</sup>              |
| VSM       | 63,35 ± 1,40 <sup>g</sup>            | 13,22 ± 0,77 <sup>f</sup>              |

Değerler, üç tekrarın ortalaması ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.1. Fenolik madde miktarı hesaplanması için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve miktarları gösteren grafik



Şekil 4.2. Flavonoid madde miktarı hesaplanması için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve miktarları gösteren grafik



## 4.2. Antioksidan Aktivitesi

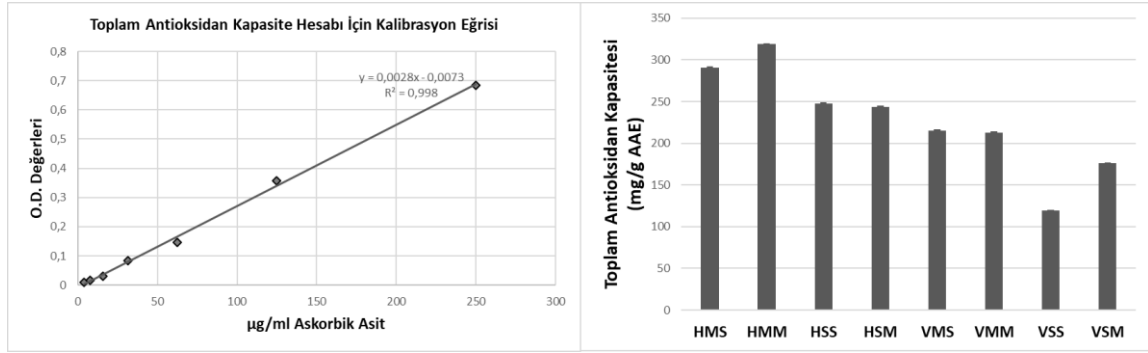
*H. pseudolaeye* ve *V. stachydifolium*'un antioksidan aktivitesi, iki farklı yöntem, DPPH serbest radikal süpürme ve fosfomolibden (phosphomolybdenum) deneyi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kuru ağırlığın g cinsinden mg askorbik asit eşdeğeri olarak ifade edilen toplam antioksidan kapasiteye (fosfomolibden deneyi) ilişkin olarak, değerler *H. pseudolaeye*'de 243.91-318.67 ve *V. stachydifolium* için ise 119.27 ile 215.46 arasındadır (Çizelge 4.3, Şekil 4.3). *H. pseudolaeye* ekstrelerinin DPPH testi için hesaplanan IC<sub>50</sub> değerlerinin 13,04 ila 14,68 µg/ml arasında, *V. stachydifolium* için ise 31.08-113.83 µg/ml arasında değişmekte olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3). DPPH deneyinde IC<sub>50</sub> hesaplaması için kullanılan doz-cevap eğrilerine ait görüntüler Şekil 4.4'te, değerlerin bar grafiği şeklinde gösterimi ise Şekil 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Ekstrelerin toplam antioksidan kapasite ve DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi

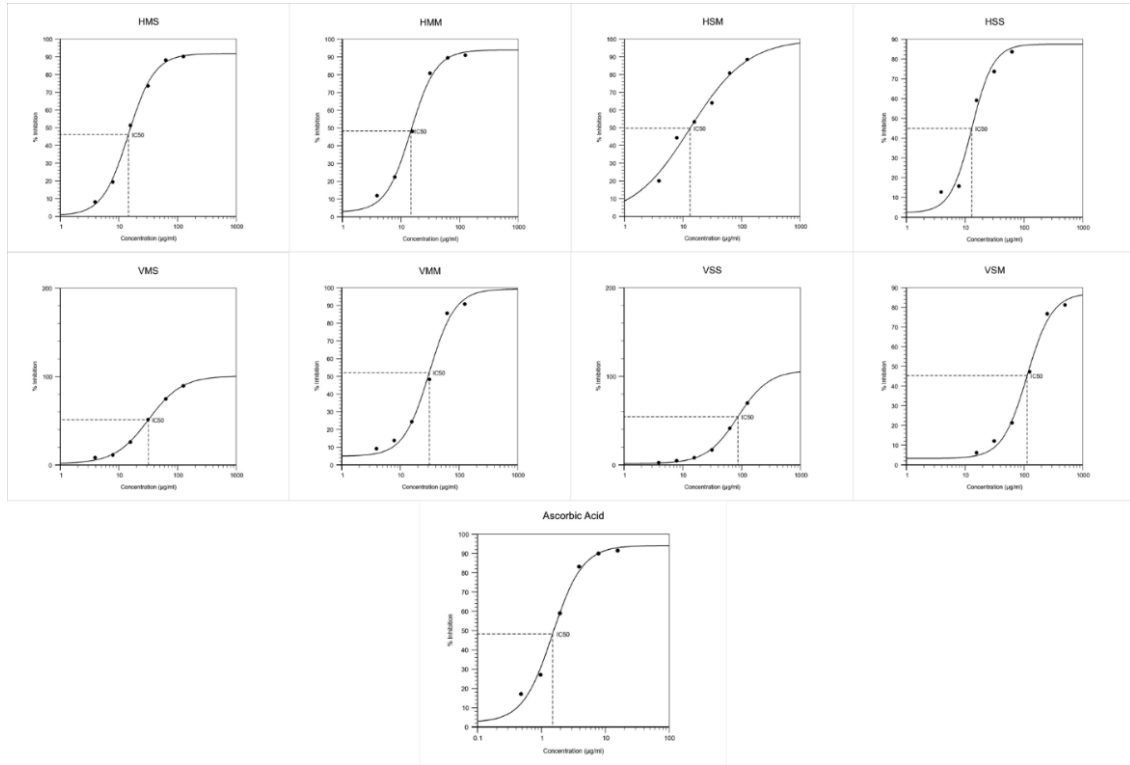
| Ekstreler     | Toplam Antioksidan Kapasitesi (mg/g AAE) | DPPH Süpürücü Aktivitesi (IC <sub>50</sub> değerleri, µg/ml) |
|---------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| HMS           | 290,70 ± 1,03 <sup>a</sup>               | 14,32 ± 0,13 <sup>a</sup>                                    |
| HMM           | 318,67 ± 0,00 <sup>b</sup>               | 14,68 ± 0,07 <sup>b</sup>                                    |
| HSS           | 247,84 ± 0,41 <sup>c</sup>               | 13,04 ± 0,03 <sup>c</sup>                                    |
| HSM           | 243,91 ± 0,41 <sup>d</sup>               | 13,29 ± 0,10 <sup>c</sup>                                    |
| VMS           | 215,46 ± 0,61 <sup>e</sup>               | 31,41 ± 0,12 <sup>d</sup>                                    |
| VMM           | 212,36 ± 0,89 <sup>f</sup>               | 31,08 ± 0,07 <sup>e</sup>                                    |
| VSS           | 175,82 ± 0,71 <sup>g</sup>               | 85,80 ± 0,10 <sup>f</sup>                                    |
| VSM           | 119,27 ± 0,41 <sup>h</sup>               | 113,83 ± 0,11 <sup>g</sup>                                   |
| Askorbik asit | —                                        | 1,49 ± 0,01 <sup>h</sup>                                     |

Değerler, üç tekrarın ortalaması ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

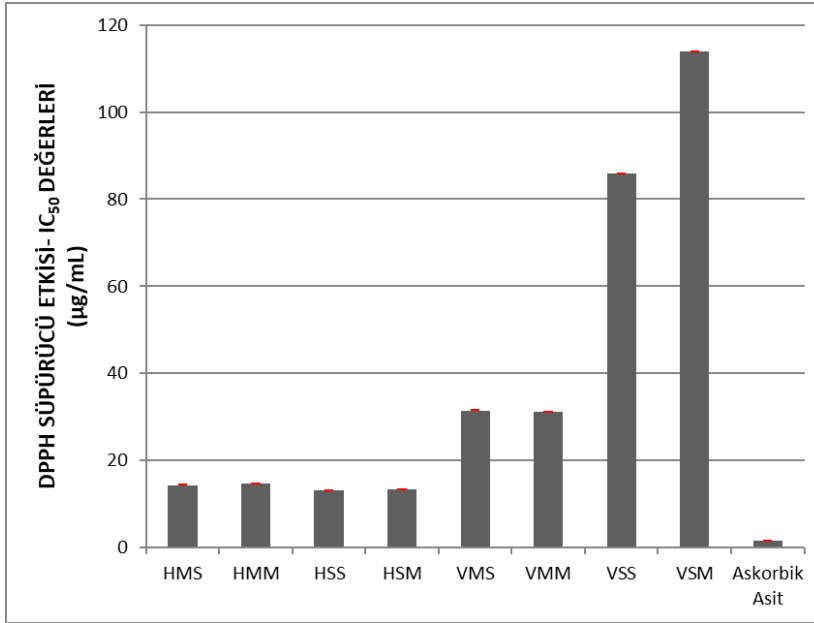
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.3. Toplam antioksidan kapasitenin hesaplanması için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve miktarları gösteren grafik



Şekil 4.4. DPPH süpürücü etkisine ait IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanmasında kullanılan sigmoidal doz-cevap eğrileri



Şekil 4.5. DPPH süpürücü etki IC<sub>50</sub> değerlerini gösteren grafik

### 4.3. YBSK (HPLC) Analizi ve Miktar Belirlenmesi

Bu çalışmada, Türkiye'de yetişen *H. pseudolaeve* ve *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* türleri sırasıyla 17 ve 15 farklı sekonder metabolit (özellikle fenolikler) için analiz edilmiştir. Doğrusal kalibrasyon eğrilerinin belirleme katsayısı ( $R^2$ ) değerleri, LOD, LOQ ve yöntemin kesinliği kabul edilebilir değerlerde hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). Miktar tayini yapılan tüm sekonder bileşiklere ait elde edilen sonuçlar mg/g DW (kuru ağırlık) olarak Çizelge 4.5'te verilmiştir. Tanımlanan bileşikleri gösteren temsili kromatogramlar ise Şekil 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.

YBSK analizine göre, *H. pseudolaeve* ekstrelerinde apijenin hariç kullanılan tüm referans bileşikler ve en yüksek konsantrasyonuyla epikateşin tanımlanmıştır. Eser miktarda 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit ve sinapik asit tespit edilmiştir. Kemferol yalnızca düşük konsantrasyon ile metanol sokset ekstresinde tespit edilmiştir. Epikateşin, tüm ekstrelerde 14.46-21.35 mg/g DW miktarı olan ana bileşiklerden biri olarak tespit edilmiştir. Ana bileşiklerden olan hiperozidin miktarı *H. pseudolaeve* ekstrelerinde 0.49 ile 9.28 mg/g DW arasında değişmiştir. Ekstrede belirgin seviyede bulunan kersetin ve kersitrin miktarı 2.46-5.44 ve 5.55-9.21 mg/g DW arasında değişmiştir. Gallik asit, diğer bileşiklere kıyasla

nispeten daha yüksek miktarda tespit edilmiştir. Hiperisin ise sadece metanol ekstraktlarında eser miktarda tespit edilmiştir.

*V. stachydifolium* var. *stachydifolium* ekstraktlarında bütün referans bileşikler (Hiperisin ve Hiperozid hariç) tanımlanmıştır, ancak klorojenik asit, vanillik asit, epikateşin, p-kumarik asit, sinapik asit, apijenin ve kemferol *H. pseudolaeva*'ye kıyasla çok küçük miktarlarda tespit edilmiştir. Gallik asit ve kersetin 7.71-7.78 ve 2.90-3.64 mg/g DW ile en yüksek miktarda tespit edilen bileşikler arasındadır.

Çizelge 4.4. Analiz edilen referans bileşikler için YBSK (HPLC) yöntemi doğrulama parametreleri. LOD ve LOQ, ana metinde belirtildiği şekilde hesaplandı, gün içi hassasiyet referans bileşiklerin 3,9 µg/ml konsantrasyonu kullanılarak hesaplandı. LOD: tespit limiti, LOQ: kantitasyon limiti, R<sup>2</sup>: regresyon modelini belirleme katsayısı, RSD: göreceli standart sapma

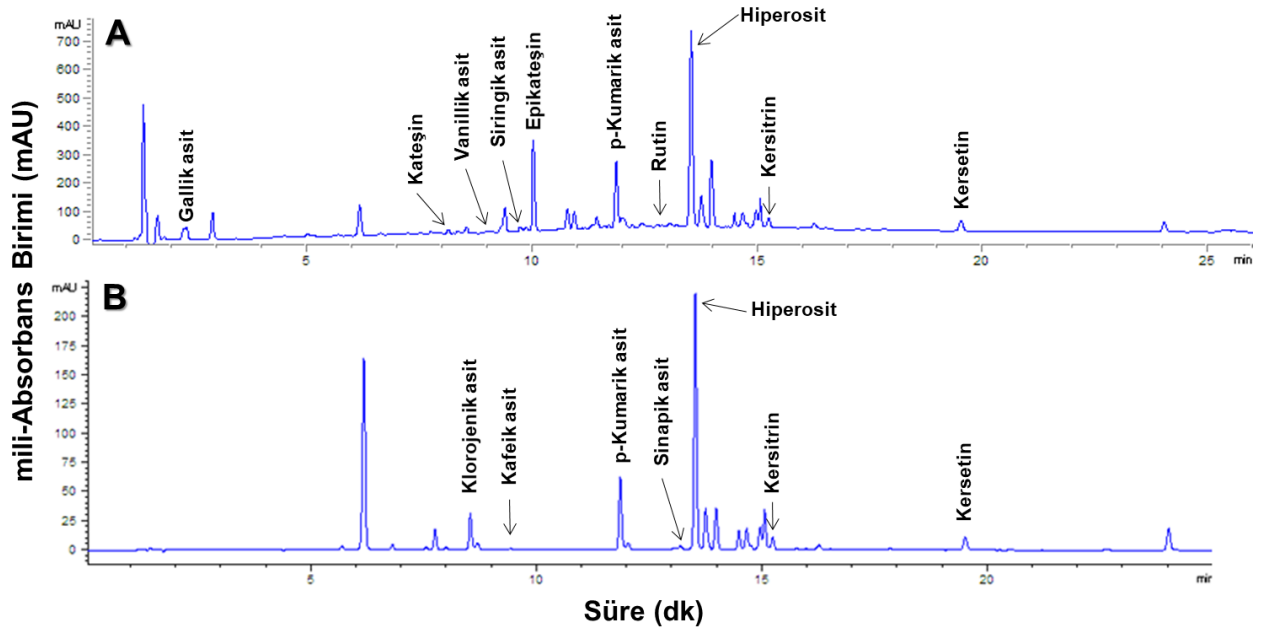
|                        | LOD   | LOQ  | R <sup>2</sup> | Hassasiyet<br>(RSD%) |
|------------------------|-------|------|----------------|----------------------|
| Gallik Asit            | 0,008 | 0,02 | 0,998          | 4,60                 |
| 4-hidroksibenzoik asit | 0,08  | 0,29 | 0,999          | 0,96                 |
| (+)-Kateşin            | 0,04  | 0,14 | 0,997          | 4,09                 |
| Klorojenik Asit        | 0,005 | 0,01 | 0,998          | 1,48                 |
| Vanilik Asit           | 0,28  | 0,93 | 0,999          | 9,12                 |
| Kafeik Asit            | 0,08  | 0,28 | 0,998          | 0,29                 |
| Siringik Asit          | 0,14  | 0,49 | 0,999          | 3,74                 |
| (-)-Epikateşin         | 0,11  | 0,39 | 0,999          | 1,57                 |
| p-Kumarik Asit         | 0,06  | 0,22 | 0,997          | 4,99                 |
| Rutin                  | 0,35  | 1,17 | 0,999          | 8,94                 |
| Sinapik Asit           | 0,15  | 0,51 | 0,999          | 3,23                 |
| Hiperozit              | 0,23  | 0,77 | 0,997          | 4,06                 |
| Kersitrin              | 0,10  | 0,35 | 0,994          | 0,85                 |
| Kersetin               | 0,46  | 1,54 | 0,980          | 0,59                 |
| Apijenin               | 0,05  | 0,19 | 0,993          | 2,25                 |
| Kemferol               | 0,08  | 0,27 | 0,998          | 0,34                 |
| Hiperisin              | 2,49  | 8,30 | 0,977          | 1,02                 |

Çizelge 4.5. *H. perforatum* ve *V. stachydifolium*'un sekonder metabolit içeriğinin mg/g DW cinsinden ortalama değerleri, analiz edilen referans bileşiklere dayanarak her referans ölçümü için LOD/LOQ değerleri ile karşılaştırılması. R<sub>t</sub>: standardın alıkonma zamanı, LOD: tespit limiti, LOQ: kantitasyon limiti, N/A: bu numune için geçerli değil

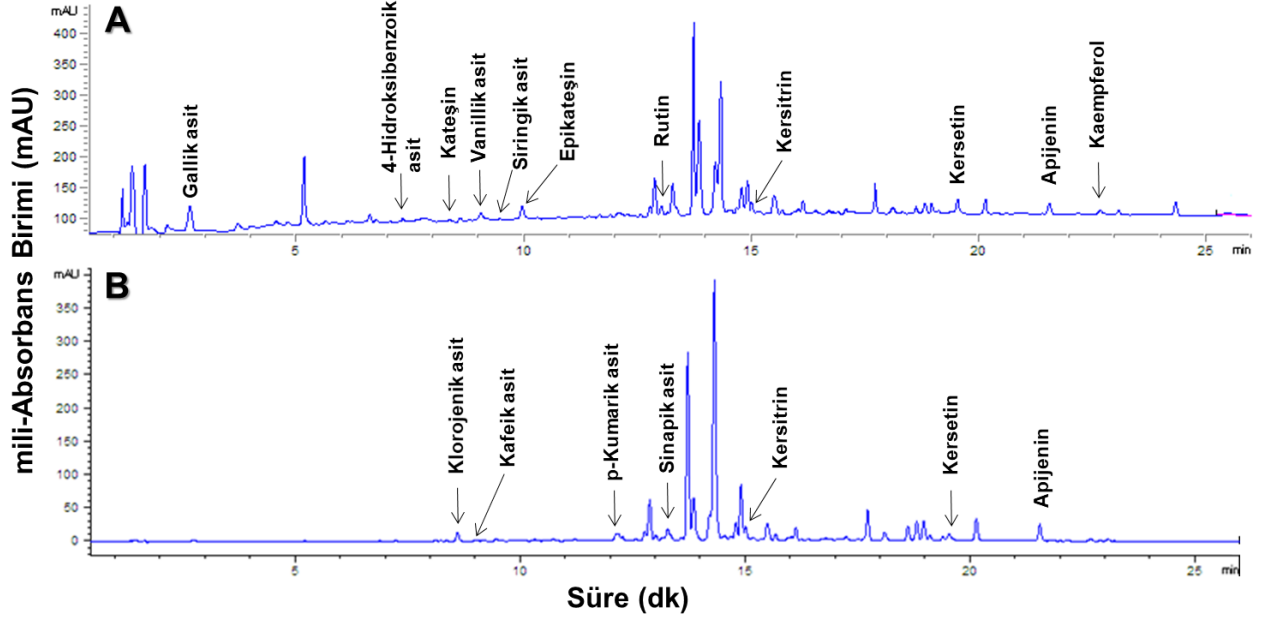
|                        | R <sub>t</sub><br>(min) | HMS        | HMM        | HSS        | HSM        | VMS        | VMM        | VSS        | VSM        | LOD/LO<br>Q |
|------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Gallik Asit            | 2,57                    | 7,79±0,01  | 7,73±0,02  | 7,87±0,00  | 8,00±0,04  | 7,78±0,00  | —          | 7,75±0,02  | 7,71±0,01  | 0,008/0,02  |
| 4-hidroksibenzoik asit | 7,37                    | +          | 0,10±0,04* | +          | 0,16±0,05* | 0,60±0,00* | 0,53±0,05  | 0,35±0,12  | 1,03±0,01  | 0,08/0,29   |
| (+)-Kateşin            | 8,13                    | 1,48±0,29  | 1,36±0,09  | 1,85±0,32  | 1,47±0,26  | 0,67±0,03  | 0,74±0,17  | 0,68±0,05  | —          | 0,04/0,14   |
| Klorojenik Asit        | 8,51                    | 2,83±0,03  | 3,02±0,01  | 4,25±0,07  | 4,84±0,27  | 1,09±0,00  | 0,92±0,00  | —          | —          | 0,005/0,01  |
| Vanilik Asit           | 8,87                    | +          | 0,37±0,06* | +          | +          | 0,55±0,29* | 0,54±0,24* | 0,66±0,32* | 1,17±0,56  | 0,28/0,93   |
| Kafeik Asit            | 9,21                    | 0,77±0,02  | 0,71±0,00  | 0,82±0,05  | 1,33±0,11  | 0,77±0,03  | 0,77±0,00  | 0,76±0,05  | 1,08±0,34  | 0,08/0,28   |
| Siringik Asit          | 9,65                    | 1,05±0,13  | 1,00±0,01  | 1,91±0,04  | 1,39±0,14  | 1,33±0,01  | 1,65±0,21  | 1,56±0,12  | 1,12±0,09  | 0,14/0,49   |
| (-)-Epikateşin         | 10,04                   | 14,79±0,16 | 14,49±0,08 | 14,46±0,07 | 21,35±0,07 | +          | +          | +          | +          | 0,11/0,39   |
| p-Kumarik Asit         | 11,77                   | 3,37±0,02  | 2,60±0,01  | 0,95±0,04  | 0,08±0,07* | 0,37±0,07  | 0,49±0,17  | 0,44±0,07  | 1,11±0,05  | 0,06/0,22   |
| Rutin                  | 13,07                   | 1,72±0,11  | 2,04±0,15  | 1,75±0,02  | 1,53±0,05  | 3,59±1,34  | 3,15±0,57  | 2,03±0,12  | 1,90±0,02  | 0,35/1,17   |
| Sinapik Asit           | 13,24                   | 0,53±0,03  | 0,44±0,00* | 0,26±0,01* | —          | 1,42±0,62  | 1,28±0,53  | 0,62±0,25  | 0,25±0,00* | 0,15/0,51   |
| Hiperozid              | 13,42                   | 9,28±0,04  | 8,27±0,04  | 3,76±0,03  | 0,49±0,10* | N/A        | N/A        | N/A        | N/A        | 0,23/0,77   |
| Kersitrin              | 15,13                   | 5,75±0,62  | 8,07±0,71  | 5,55±0,21  | 9,21±0,50  | 2,03±0,76  | 1,98±0,73  | 1,53±0,37  | 1,65±0,28  | 0,10/0,35   |
| Kersetin               | 19,23                   | 5,44±0,39  | 4,76±0,99  | 3,81±0,08  | 2,46±0,10  | 3,64±0,13  | 3,47±0,08  | 3,24±0,03  | 2,90±0,10  | 0,46/1,54   |
| Apijenin               | 21,90                   | —          | —          | —          | —          | +          | +          | +          | +          | 0,05/0,19   |
| Kemferol               | 22,40                   | 0,28±0,01  | —          | —          | —          | 1,12±0,36  | 0,78±0,02  | —          | —          | 0,08/0,27   |
| Hiperisin              | 33,59                   | +          | +          | —          | —          | N/A        | N/A        | N/A        | N/A        | 2,49/8,30   |

Değerler, üç tekrarın ortalaması olup ± standart sapma ile birlikte verilmiştir.

+: pik tespit edildi ancak hesaplanan miktar LOD değerine eşit veya daha küçük; \*: hesaplanan miktar değeri > LOD, <LOQ olduğunu belirtir.



Şekil 4.6. YBSK analizi sonrası *H. pseudolaeye*'ye ait temsili kromatogramlar A. 210 nm, B. 320 nm



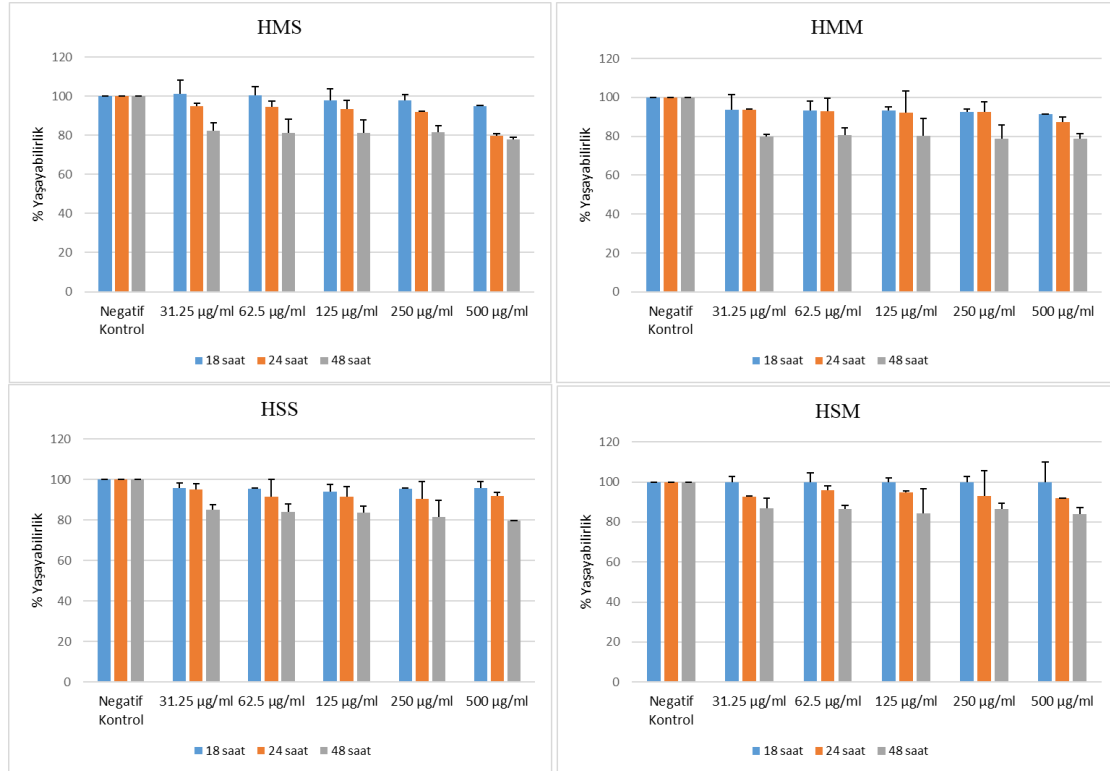
Şekil 4.7. YBSK analizi sonrası *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*'a ait temsili kromatogramlar A. 210 nm, B. 320 nm

#### 4.4. *In vitro* Sitotoksosite ve Hücre Çizik Testi Bulguları

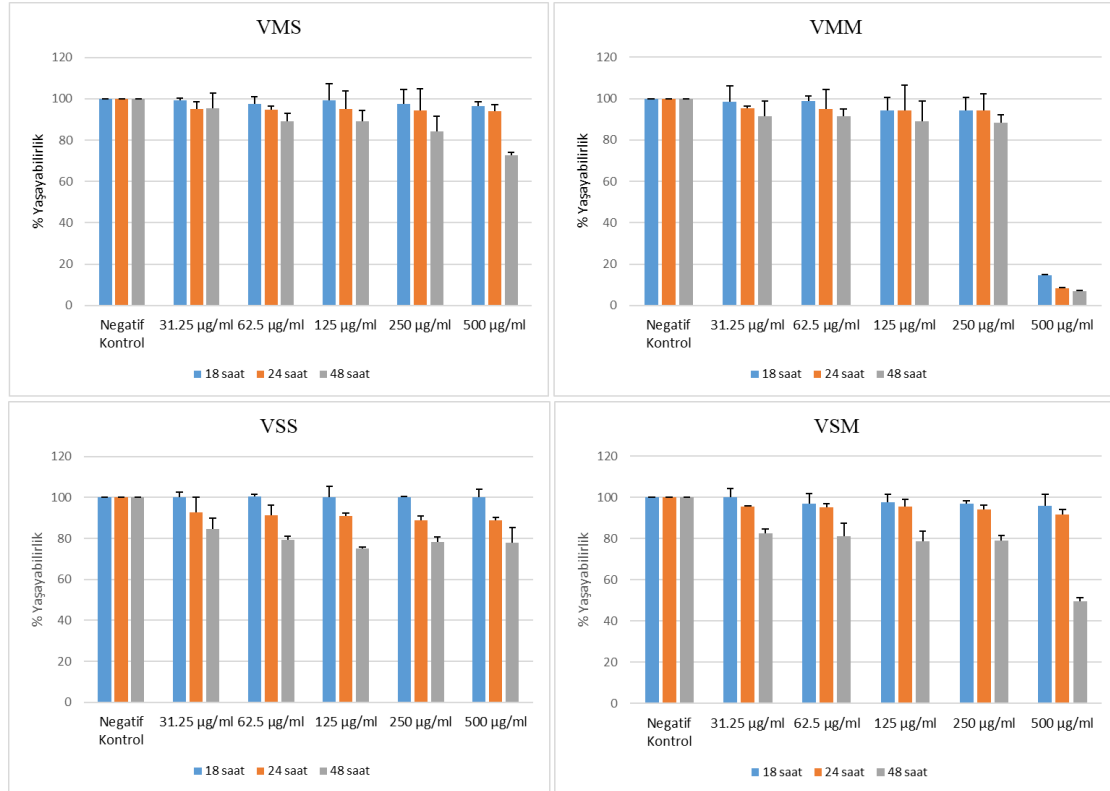
VMM hariç ekstrelerin hiçbiri, fare fibroblast hücrelerinde, 18 ve 24 saatte en yüksek konsantrasyonlarda (250 ve 500 µg/ml) belirgin derecede sitotoksosite göstermemiştir. *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*'un metanol ekstresi 500 µg/ml'de hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır, 250 µg/ml konsantrasyonda ise hücre canlılığını bir ölçüde azaltmış ancak yine de önemli sitotoksosite göstermemiştir. VMM dışındaki tüm ekstre uygulamalarında hücre canlılığı %50 seviyesine ulaşmadığı için, diğer bir ifade ile inhibisyon %50'den az olduğu için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmadı ve bunun yerine en yüksek iki konsantrasyonun (250 ve 500 µg/ml) % hücre canlılığı değerleri karşılaştırması tablo şeklinde Çizelge 4.6'da verilmiştir. Tüm konsantrasyonların hücre yaşayabilirlik yüzdeleri çubuk grafik olarak da gösterilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Ekstreler, en yüksek konsantrasyonlarda 48 saatte düşük seviyede sitotoksosite göstermiştir. Ekstreler ve ekstraksiyon yöntemleri arasında, 500 µg/ml'de sitotoksosite gösteren VMM hariç, önemli bir fark gözlenmemiştir.

Çizelge 4.6. En yüksek ekstre konsantrasyonları uygulamasından sonra MTT testi ile elde edilen hücre yaşayabilirlik yüzdeleri (250 ve 500 µg/ml)

| Ekstreler | 250 µg/ml |         |         | 500 µg/ml |         |         |
|-----------|-----------|---------|---------|-----------|---------|---------|
|           | 18 saat   | 24 saat | 48 saat | 18 saat   | 24 saat | 48 saat |
| HMS       | %99,2     | %91,9   | %81,6   | %94,9     | %79,6   | %78,0   |
| HMM       | %93,3     | %92,5   | %78,7   | %91,2     | %87,2   | %78,6   |
| HSS       | %95,5     | %90,5   | %81,5   | %97,2     | %91,8   | %79,7   |
| HSM       | %109,5    | %93,1   | %86,6   | %112,1    | %91,9   | %83,9   |
| VMS       | %97,4     | %94,5   | %84,3   | %96,5     | %93,8   | %72,5   |
| VMM       | %94,3     | %94,4   | %88,3   | %14,4     | %8,2    | %6,9    |
| VSS       | %115,4    | %88,8   | %78,3   | %103,3    | %88,7   | %77,7   |
| VSM       | %97,1     | %94,2   | %79,1   | %95,9     | %91,5   | %49,6   |



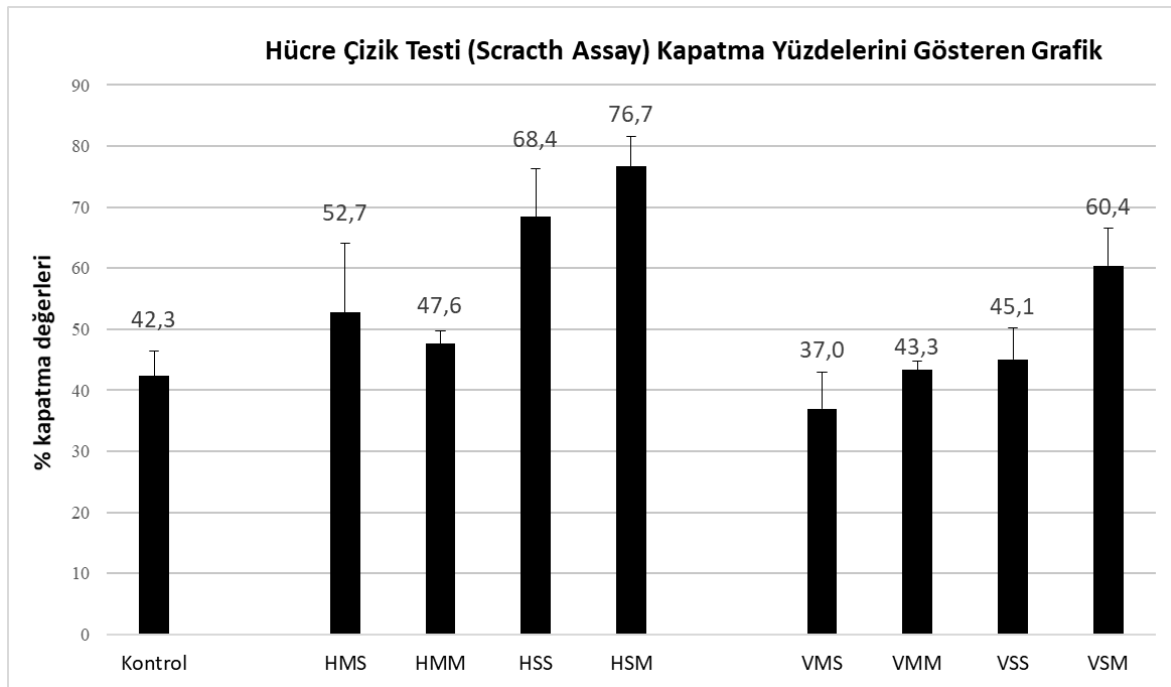
Şekil 4.8. L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde *H. pseudolaeye* ekstralarının sitotoksitesisi



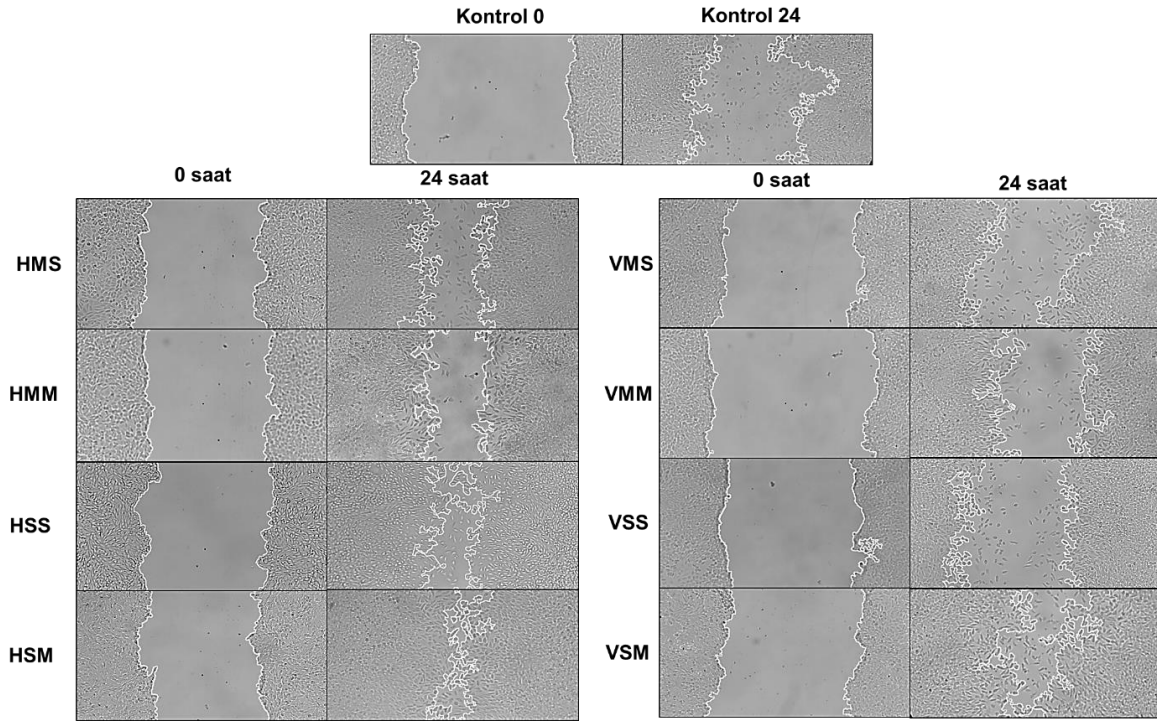
Şekil 4.9. L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* ekstralarının sitotoksitesisi



Bu çalışmada, bitki ekstralarının yara iyileştirme potansiyelini test etmek ve karşılaştırma yapmak için *in vitro* hücre çizik testi kullanılmıştır. Hesaplanan alan kapanma yüzdeleri ile ekstraların aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlarımız HSM (%76,7), HSS (%68,4) ve VSM'nin (%60,4) negatif kontrole kıyasla fibroblast göçünü önemli ölçüde arttırdığını ( $p < 0,05$ ) göstermektedir (Şekil 4.10). Bununla birlikte, diğer özütlerin daha yüksek konsantrasyonlarda daha etkili olması da mümkündür. Şekil 4.11'deki temsili görüntüler, fibroblast göçündeki artışı ve kapanmayı açıkça göstermektedir. Elde ettiğimiz verilerle yapılan kapanma yüzdesi hesaplamaları mikroskop görüntüleri ile de uyumludur. Bu testin sonucuna göre *H. pseudolaeye*'nin *in vitro* yara iyileştirici aktivitesi, *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* taksonundan daha iyi olarak gözükmemektedir. Ayrıca, kapama oranları sulu maserasyon ekstralarında daha yüksek gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Hücre çizik deneyinde *H. pseudolaeye* ve *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* (62 µg/ml) ekstralarının fare dermal fibroblast (L929) göçü üzerindeki yüzdelik kapanma değerlerini gösteren grafik. Sonuçlar HSM, HSS ve VSM'nin negatif kontrole kıyasla fibroblast göçünü anlamlı derecede arttırdığını ( $p < 0,05$ ) göstermiştir



Şekil 4.11. Hücre çizik testi deneyinde *H. pseudolaeye* ve *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*'un (62 µg/ml) fare dermal fibroblast (L929) göçü üzerindeki etkisini gösteren temsili görüntü. Büyütme (4x).

#### 4.5. qRT-PCR ile Belirlenen RNA Seviyesinde Gen İfadeleri

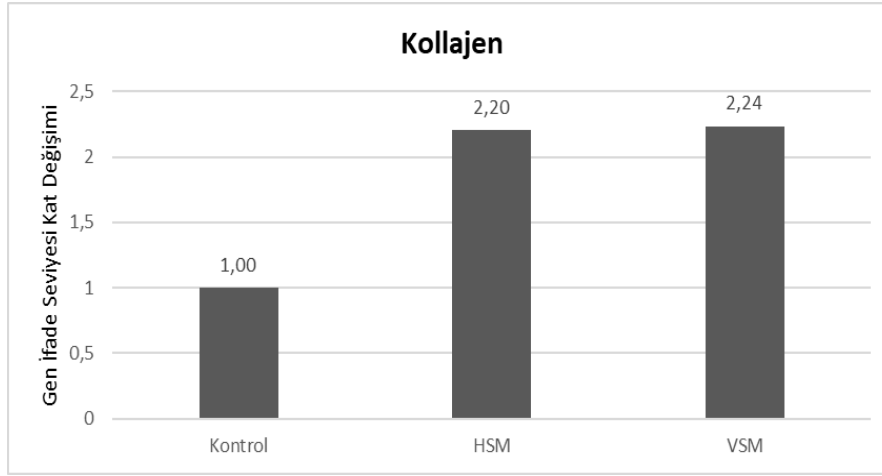
##### RNA izolasyonu

T25 flasklardan kazınan hücrelerden elde edilen total RNA miktarları ve 260/280 oranları Çizelge 4. 7'de verilmiştir. Total RNA miktarları kontrol grubunda 64,1-111,7; HSM grubunda 65,2-100 ve VSM grubunda ise 91,1-128,2 ng/µl arasında değişmiştir.

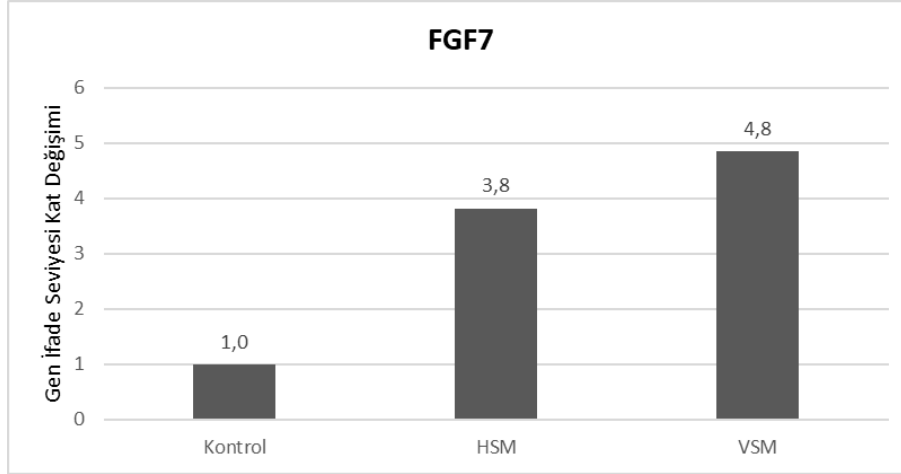
Çizelge 4.7. Total RNA miktarlarını ve 260/280 oranlarını gösteren tablo.

| Örnekler  | ng/µl | 260/280 |
|-----------|-------|---------|
| Kontrol-1 | 64,1  | 2,1     |
| Kontrol-2 | 109,6 | 2,1     |
| Kontrol-3 | 111,7 | 2,1     |
| HSM-1     | 65,2  | 2,1     |
| HSM-2     | 76,9  | 2,1     |
| HSM-3     | 100   | 2,1     |
| VSM-1     | 97,3  | 2,1     |
| VSM-2     | 91,1  | 2,0     |
| VSM-3     | 128,2 | 2,1     |

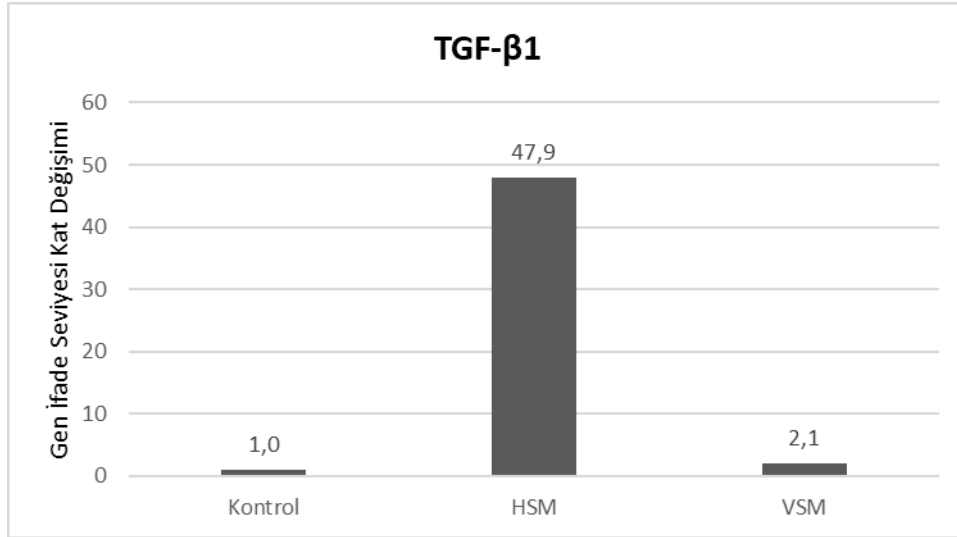
L929 hücrelerine 62 µl HSM ve VSM ekstraları uygulanmış ve uygulanan hücrelerde mRNA düzeylerine “TaqMan assay” ile bakılmıştır. Exicycler analiz yazılımından (Bioneer) elde edilen Ct değerleri kullanılarak değerler GAPDH ile normalize edilmiş ve  $2^{\Delta\Delta C_t}$  yöntemi ile normalize değerler hesaplanmıştır. Kat artışının daha net bir şekilde görülebilmesi için kontrol ifade değeri 1 olarak sabitlenmiş ve uygulama örnekleri buna göre oranlanmıştır. Kollajen geni için gen ifade düzeyi kat değişiminin HSM ve VSM ekstralarında kontrole göre neredeyse birbirine eşit ve yaklaşık 2 kat artış olarak ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4. 12). FGF7 geni mRNA seviyesi kontrole göre HSM ve VSM ekstralarında sırasıyla 3,8 ve 4,8 kat artış göstermiştir (Şekil 4. 13). TGF-β1 geni için hesaplanan gen ifade düzeyi kat değişimi HSM ve VSM ekstralarında sırasıyla 47,9 ve 2,1 olarak hesaplanmış (Şekil 4. 14). VEGF geni için gen ifade düzeyi kat değişiminin HSM ve VSM ekstralarında sırasıyla 3,6 ve 1,9 olduğu görülmüştür (Şekil 4. 15). Analiz edilen genlerin mRNA seviyesinde ölçülen ifadeleri belirli derecelerde artış göstermekle birlikte, en fazla göze çarpan HSM uygulaması ile 56,9 kat artış gösteren TGF-β1 olmuştur.



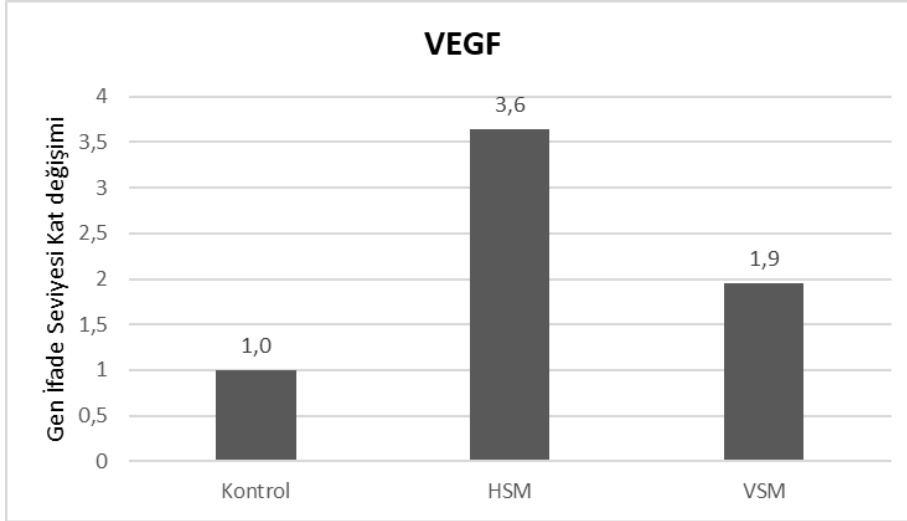
Şekil 4.12. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstraları uygulanmış L929 hücrelerinde Kollajen geni mRNA düzeyi



Şekil 4.13. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde FGF7 geni mRNA düzeyi



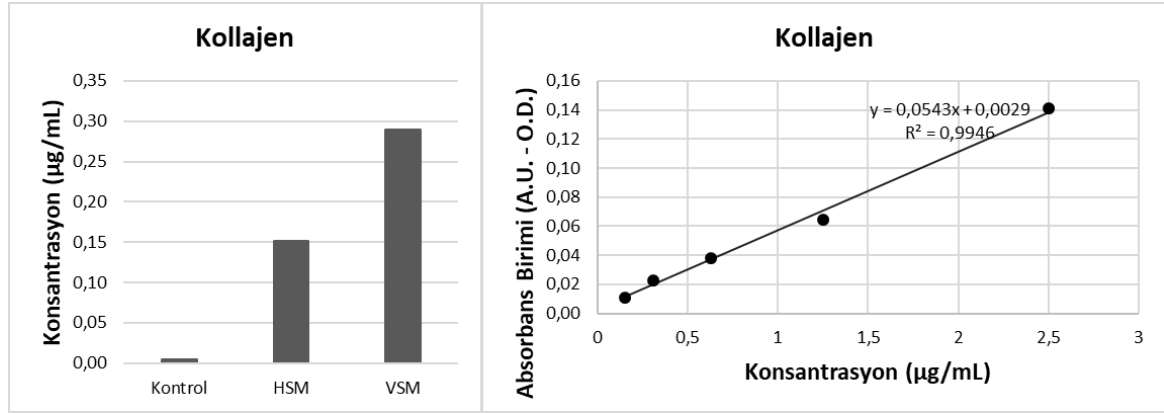
Şekil 4.14. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde TGF-β1 geni mRNA düzeyi



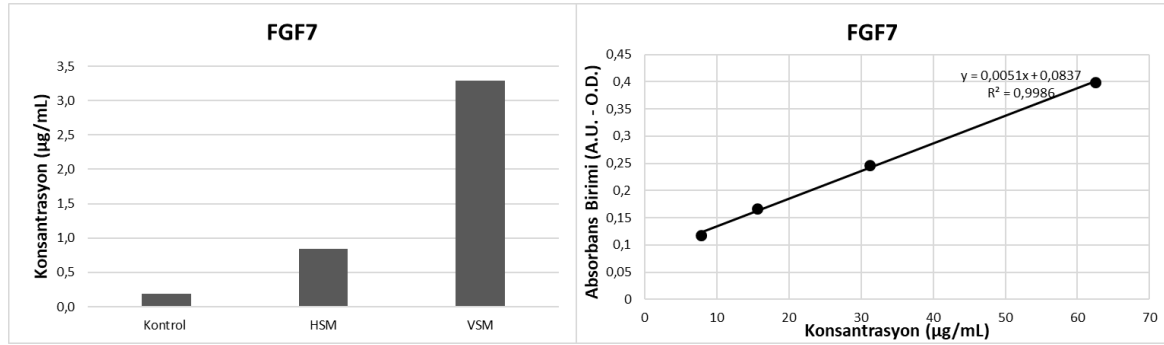
Şekil 4.15. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstraktları uygulanmış L929 hücrelerinde VEGF geni mRNA düzeyi

#### 4.7. ELISA Yöntemi ile Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

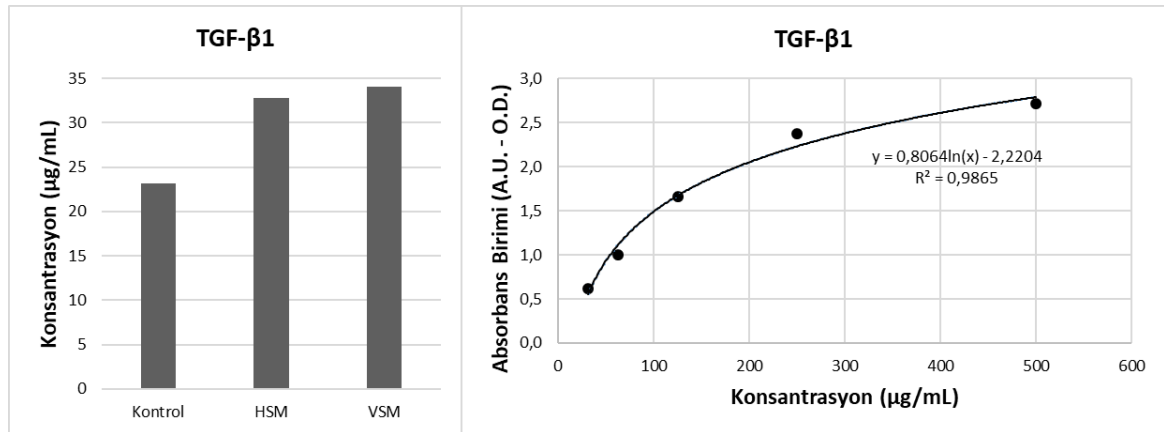
qRT-PCR ile gerçekleştirilen çalışmaya paralel olarak, T25 flakslarda büyütülen hücrelerin ilgilenilen genlerin ürünü olan proteinlerin besiyerindeki seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Her ne kadar protein miktarları bazı örneklerde oldukça düşük olarak hesaplanırsa da, O.D. değerleri blank kuyucuklarının üzerinde, hesaplanan konsantrasyonlar kitlerin alt limitinin üzerinde ve değerler kalibrasyon grafiği denkleminde konsantrasyon hesaplaması açısından uygun olduğu için elde edilen sonuçlar qRT-PCR çalışmasına tamamlayıcı olması açısından sunulmuştur ve karşılaştırma yapmak için yeterli sonuç elde edilmiştir. ELISA sonuçlarına göre kollajen miktarı HSM’de 0,15, VSM’de 0,29 µg/ml olarak hesaplanmıştır ve seviyesi çok düşük olan kontrole göre belli bir derecede artış gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.16). FGF7 miktarına bakıldığında kontrol 0,19, HSM 0.84 ve VSM 3,29 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Yine VSM’de biraz daha fazla artış görülmektedir (Şekil 4.17). TGF-β1 (Şekil 4.18) ve VEGF (Şekil 4.19) miktarları ise yine kontrole göre bir miktar artış göstermekle birlikte, HSM ve VSM arasında anlamlı bir fark yoktur.



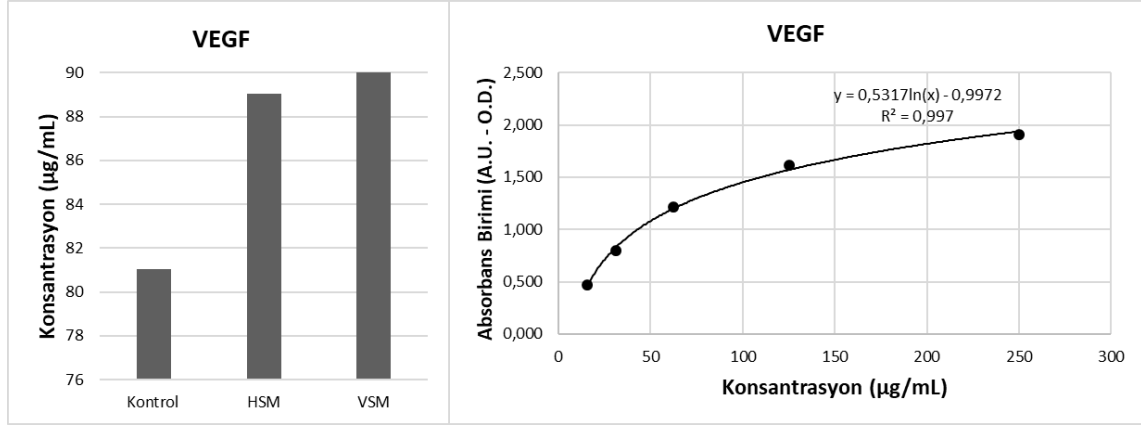
Şekil 4.16. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde Kollajen protein düzeyi



Şekil 4.17. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde FGF7 protein düzeyi



Şekil 4.18. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstreleri uygulanmış L929 hücrelerinde TGFβ-1 protein düzeyi



Şekil 4.19. 62 µg/ml HSM ve VSM ekstraları uygulanmış L929 hücrelerinde VEGF protein düzeyi





## 5. TARTIŞMA

### Toplam fenolik ve flavonoid içeriği

Literatüre bakıldığında çalışılan birçok türde yara iyileşme aktivitesi ve ekstrenin antioksidan özelliği arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir. Bitkilerin antioksidan aktivitelerinden sorumlu başlıca sekonder metabolit grubunun ise fenolik bileşikler olduğu bilinmektedir [1,40,73,106]. Bu sebeple çalışmada fenolik bileşiklere özel olarak odaklanılmıştır.

Çizelge 4.2'deki sonuçlar, *H. pseudolaeve* ekstrelerinin *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* ekstrelerinden daha fazla miktarda fenolik maddeye sahip olduğunu göstermektedir ve bu sonuç iki cinsin türlerinde önceden yayınlanmış çalışmalar ile uyumludur. Ayrıca bu bulgu YBSK analizimizle de doğrulanmıştır. Ekstraksiyon çözücülerini karşılaştırıldığında, metanolik ekstreler sulu ekstrelerden daha fazla fenolik maddeye sahiptir. Önceki çalışmalar da metanol ekstrelerinin fenolik içerik açısından daha zengin olduğunu göstermiştir [107,108]. Ekstraksiyon metodlarının karşılaştırılmasında, sokslet ile *H. pseudolaeve*'nin metanolik ekstraktının, maserasyon tekniğine kıyasla daha fazla fenolik içerdiği, sulu ekstreler arasında bir fark olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte, HSS'de bulunan toplam flavonoid içeriği HSM'ye kıyasla daha yüksektir. Buna karşılık, toplam fenolik içerik, maserasyon ile elde edilen *V. stachydifolium*'un metanolik ekstresi içerisinde daha yüksektir. Ekstraksiyon yöntemleri arasında bazı küçük farklılıklar görünse de çözücüye bağlı farklılıklar daha bariz görülmektedir. Özellikle toplam flavonoid içeriğinde bu farklılık daha belirgindir.

Flavonoid bileşiklerin *H. pseudolaeve*'deki fenolik bileşiklerin önemli miktarını oluşturduğu görülmüştür ve bu durum *Hypericum* türleri ile yapılan diğer çalışmaları destekler niteliktedir [82,94,109–111]. Konu ile alakalı yapılan diğer çalışmalara bakılınca bu moleküllerin özellikle *H. perforatum* gibi cins üyelerinin yara iyileşmesi ve antidepresan aktiviteleriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir [6,112]. *H. pseudolaeve*'nin metanolik ekstresi başka bir araştırmada toplam fenolik, flavonoid ve ek olarak antioksidan aktivite açısından araştırılmıştır [82]. Ancak bu çalışmada türün farklı bir popülasyonu incelenmiştir ve popülasyon farklılığı olunca coğrafi bölge, mevsim, fenolojik aşama ve habitat özellikleri de farklılık göstermektedir. Daha önceki çalışmalar bitki fitokimyasallarının bahsi geçen

ekolojik faktörlere göre popülasyonlar arası varyasyon gösterebildiğini ortaya koymuştur [91,113]. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan ekstrelerin de total fenolik bileşen ve antioksidan aktivite gibi özelliklerinin belirlenmesi karşılaştırma açısından önemlidir. Ek olarak, bu tez iki farklı yöntemle elde edilen hem metanol hem de sulu ekstrelerin sonuçlarını karşılaştırmalı bir şekilde sunarken, önceki çalışma sadece maserasyon ile elde edilmiş metanol ekstresinin sonucunu rapor etmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin daha önce yapılan çalışmanın sonuçlarından çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuç *H. pseudolaeye*'nin farklı coğrafi popülasyonlarının fenolik bileşen birikiminin değişebileceğini göstermektedir. Ayrıca, yaygın olarak kullanılan bir tıbbi bitki olan *H. perforatum*'un metanolik ekstresi ile ilgili bizim çalışmamızda da kullanılan yöntemle yapılan bir çalışmada toplam fenolik içerik 191 mgGAE/g olarak bulunmuştur [114]. *H. triquetrifolium* ve *H. scabroides* türlerinin etanolik ekstrelerinin toplam fenolik içeriği ise 267 ve 333 mgGAE/g olarak belirlenmiştir [115] ve *H. amblyseplum*'un metanolik ekstresi ise bitkinin farklı kısımlarında 115.8-154.5 mgGAE/g olarak belirlenmiştir [116]. Bizim yaptığımız çalışmada toplam fenolik madde miktarı 123.03-177.21 mgGAE/g olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Elde ettiğimiz sonuçları literatürdeki sonuçlarla karşılaştıracak olursak toplam fenolik ve flavonoid miktarının *H. pseudolaeye* türünde kayda değer ve *H. perforatum* türüne yakın olduğu söylenebilir.

*Verbascum* cinsi için genel olarak saponinler ve glikozitler ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma [14,95,97,117] olmasına rağmen cinsin fenolik bileşikleri ile ilgili bazı çalışmalar da mevcuttur [96,118,119]. Literatürde *V. stachydifolium*'un fitokimyasal bileşenleri hakkında bilgi mevcut değildir, ancak cinsin diğer bazı üyelerinin fenolik içerikleri çalışılmıştır ve bizim çalışmamızın sonuçları bu çalışmalarla genel anlamda uyumludur [108,118]. Cins içinde bilinen en iyi tıbbi bitkilerden biri olan *V. phlomoides*'in (mullein-sığırkuyruğu) sulu ekstresinin Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilen ve yüzde olarak % 4.18 toplam fenolik içerdiği ortaya konulmuştur [118]. Bu oran çalışmamızda sulu sokslet ve maserasyon ekstrelerinde sırasıyla %4.14 ve %6.33 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Başka bir çalışmada, *V. phlomoides* ile karşılaştırılarak *V. nigrum* ve *V. thapsus*'un toplam fenolik ve flavonoid içerikleri verilmiştir [108]. Metanolik ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoid içeriğini sırasıyla 85.0-135.0 mgGAE/g ve 37.2-53.4mgRUE/g arasında bulmuşlardır. Sulu ekstreler için değerler sırasıyla 51.3-74.1 mgGAE/g ve 10.2-20.0 mgRUE/g arasında değişmektedir. *V. pinetorum* [99] ve *V. antiochium* [120]'un fenolik içeriği sırasıyla 42.45 ve 92.71 mgGAE/g olarak belirlenmiştir.

Sonuçlarımız, cins içindeki diğer türlerle karşılaştırılırsa *V. stachydifolium*'un polifenoller için iyi bir kaynak olduğunu göstermektedir.

#### Antioksidan aktivitesi

Bitkilerin antioksidan aktivitesinin çoğunlukla fenolik bileşiklerden kaynaklandığı bilinir. Bu sebeple antioksidan aktivite ve toplam fenolik miktarı, genel olarak farklı çözücülerle elde edilen ekstratlar ve türler arasında korelasyon gösterir [107,114]. Antioksidan aktiviteye sahip olma, iyi bir yara iyileştirici özelliği olan bitki ekstratlarının özelliklerinden biridir [1], bu nedenle çalışmamızda iki farklı yöntemle ekstratların antioksidan aktiviteleri de değerlendirilmiştir. Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, *H. pseudolaeve*'nin antioksidan aktivitesinin *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*'dan çok daha yüksek olduğu görülmektedir ve bu sonuç iki cinse ait diğer üyelerin antioksidan aktivitelerini ortaya koyan daha önce yapılmış çalışmaları desteklemektedir [109,111,115,120–122]. Metanolik ekstratlar, her iki türdeki sulu ekstratlardan daha iyi antioksidan aktivite gösterirken, ekstraksiyon metodu aktiviteyi önemli ölçüde etkilememiştir.

Çeşitli *Hypericum* türlerinin antioksidan aktiviteleri, DPPH süpürme testi dahil olmak üzere farklı yöntemler kullanılarak çalışılmıştır [109,111,115,122]. Eroğlu Özkan ve ark. tarafından *H. thymbrifolium*, *H. spectabile* ve *H. pseudolaeve* türlerinin metanolik ekstratlarının DPPH radikal süpürme aktiviteleri (mg/ml EC<sub>50</sub> değerleri olarak ifade edilmiştir) sırasıyla 0,622; 0,567 ve 0,916 olarak belirtilmiştir (µg/ml'ye dönüştürüldükten sonra 622, 567 ve 916) [82]. Çalışmamızda *H. pseudolaeve* ekstratları için yaklaşık altmış kat daha düşük (13,04 ve 14,68 µg/ml arasında değişen) IC<sub>50</sub> değerleri elde ettik. Bu fark, teknik bir varyasyondan kaynaklanabilir veya IC<sub>50</sub> değerlerini hesaplama modelindeki farklılık nedeniyle gözlenmiş olabilir, çünkü yazarlar hesaplama modelini (lineer veya sigmoidal) çalışmalarında belirtmemişlerdir. Coğrafi varyasyon da daha önce de tartışıldığı üzere başka bir farklılık konusu olabilir. Flavonoid bileşik içeriği bakımından zengin olan *H. perforatum* ekstresinin ise DPPH süpürme deneyi ile antioksidan aktivitesi IC<sub>50</sub> değerinin 10,63 µg/ml olduğu gösterilmiştir [109]. Daha önce yayınlanmış diğer çalışmalar, *H. scabrum*, *H. retusum*, *H. triquetrifolium* ve *H. scabroides* etanolik ekstratlarının DPPH süpürme yeteneğini sırasıyla 250 µg/ml konsantrasyonunda %90, %82, %82 ve %91 inhibisyon olduğunu belirtmişlerdir [115,122]. Güçlü antioksidan olan butillenmiş hidroksitoluen ve α-tokoferolün inhibisyonu, 250 µg/ml'de sırasıyla %96 ve %89 olarak

bulunmuştur [115]. Sonuçlarımız biyolojik aktivite hakkında daha güvenilir bir karşılaştırma sağlayan sigmoidal eğriler kullanılarak hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri ile ifade edilmiştir. Çalışmalarda kullandığımız en yüksek konsantrasyon 125 µg/ml olmuştur ve bu konsantrasyonda HMS, HMM, HSS ve HSM'de sırasıyla %90,23; % 90,95; % 90,83 ve %88,45 inhibisyon görülmüştür. Dolayısıyla *H. pseudolaeve*'nin antioksidan aktivitesinin cinsin diğer üyeleriyle karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

*V. stachydifolium* 'un aktioksidan aktivitesi ile ilgili literatürde ver bulunmamaktadır ancak *Verbascum* cinsinin farklı türlerinde antioksidan özellikler olduğu çeşitli çalışmalarda görülmüştür [95,99,120]. Yapılan bir çalışmada *V. macrurum*'un serbest radikal (DPPH) süpürme aktivitesinin 67 µg/ml olduğu belirtilmiştir [123]. Sonuçlarımız literatürdeki bu sonuçlarla uyum.göstermektedir

Antioksidanlar, hücrelerdeki oksidasyon işlemini inhibe edebilir veya geciktirebilir ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini engelleyebilir. Bu aktiviteler, ateroskleroz, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi farklı hastalıkların önlenmesinde rol oynadığından bitkilerin antioksidan özelliklerini önemli kılmaktadır [124]. Antioksidan aktivite, bitki ekstrelerinin yara iyileşme aktivitesinde de önemlidir [1,40,73]. Bu çalışmada elde edilen bulgular, literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında *H. pseudolaeve*'nin cinsin diğer türleri arasında *H. perforatum*'a yakın olarak iyi antioksidan kapasiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca *V. stachydifolium*, *H. pseudolaeve*'den düşük olmakla birlikte diğer *Verbascum* türlerine yakın antioksidan etki sergilemiştir. Bu antioksidan aktivitelerin, çalışmamızda kullanılan ekstrelerdeki fitokimyasalların sinerjistik etkilerinden kaynaklandığı ve yara iyileştirici etkilerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

#### YBSK (HPLC) analizi ve miktar belirlenmesi

Çalışmamızda *H. pseudolaeve*'de 17, *V. stachydifolium*'da ise 15 kimyasal bileşenin analizi yapılmıştır. Daha önce de bahsedildiği gibi fenolik maddelerin antioksidan aktivitede ve dolayısıyla yara iyileştirici özellikteki katkıları bilindiğinden özellikle bu bileşenlere odaklanılmıştır. YBSK analizimize göre bileşiklerin miktarı, ekstraksiyon yönteminden ziyade özellikle çözücüye (metanol veya su) bağlı olarak ekstreler arasında farklılık göstermiştir. İstisna olarak, epikateşin konsantrasyonunun sadece HSM'de diğer ekstrelerden önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur. VMM ekstresinde gallik asit

saptanmamıştır ve sadece HMS, VMS ve VMM ekstralarında kemferol saptanmıştır. Su ile infüzyon veya dekoksiyon insanlar arasında yaygın olarak kullanılan bir yöntem olduğu için ekstraksiyon çözücüsü olarak metanolün yanında su ekstresi de kullanılmıştır ve sulu ekstraların metanolik ekstralara yakın miktarda fenolik içerdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, sulu ekstralarda *H. pseudolaeye*'de bir naftodiantron molekülü olan hiperisin saptanmamıştır.

Literatürde *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*'un kimyasal bileşenleri hakkında bilgi mevcut değildir, ancak bazı sekonder metabolitler cinsin diğer üyelerinden izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Halk tıbbında kullanılan iyi bilinen bir şifalı bitki cinsi olan *Verbascum* türleri üzerinde yapılan çalışmalar, iridoid glikozitler (örneğin, aukubin, ajugol, katalpol ve türevleri), feniletanoik glikozitler (örneğin, verbaskositler), flavonoid glikozitler (örneğin, apijenin 7-glukozit, luteolin 7-glukozit), neolignan glikozitler, saponinler (örneğin, verbakosaponinler), fenolik asitler (örneğin, vanillik, hidroksibenzoik, p-kumarik, hidroksisinamik ve ferulik asitler) ve flavonoidler (örn. apijenin, rutin, kemferol, tamarixetin 7-rutinoside) dahil olmak üzere çeşitli sekonder metabolitlerin tanımlanmasına yol açmıştır [95–98,117,121].

Yapılan çalışmalar, *Verbascum* türlerinin özellikle iridoid ve feniletanoid glikozitler açısından zengin olduğunu göstermektedir ve biyolojik aktivite açısından verbaskosid bileşiği öne çıkan moleküllerden biridir [95,98].

Literatürde *Verbascum* türlerinin polifenolik içerikleri konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. *V. phlomoides* L. (mullein) türünün su ekstresinin polifenol içeriği ile ilgili bir çalışmada, ters fazlı YBSK-DAD analizi kullanılmıştır ve klorojenik (12,3 mg/g), kafeik (39,9 mg/g), ferulik (29,6 mg/g) rosmarinik asitler (14,9 mg/g) ve kersetin (17,2 mg/g) majör fenolikler olarak belirlenmiştir [118]. Apijenin ve aukubin iz miktarda tespit edilmiştir. Bu fenoliklerin, rosmarinik asit ve aukubin dışında (taranmamışlardır) *V. stachydifolium*'daki miktarları daha düşük olarak bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre, YBSK-DAD analizi ile bu çalışma kapsamında taranan 15 polifenol bileşik genellikle hem metanol hem de su ekstralarında az miktarda tespit edilmiştir. En yüksek miktarlarda gallik asit ve kersetin belirlenmiştir, ardından kafeik, 4-hidroksibenzoik, sirinik asitleri ve daha düşük miktarda rutin onları izlemiştir.

*Hypericum* cinsi, *H. perforatum* (St. John's Worth) dahil olmak üzere iyi bilinen bir tıbbi bitki grubudur. Bu cinsin üyelerinin kimyasal bileşenleri ve biyolojik aktiviteleri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır [10,125]. Literatürde *H. pseudolaeye*'nin kimyasal bileşimi hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır, ancak diğer türlerle (özellikle *H. perforatum*) yapılan çalışmalar cinsin ana sekonder metabolitlerini ortaya koymuştur (örneğin; naftodiantronlar (hiperisin, pseudohiperisin), hiperforin, hiperosid ve fenolik bileşikler gibi (fenolik asitler and flavonoidler)) [8,10,110,126].

Türkiye'den toplanan *H. thymbrifolium*, *H. spectabile* ve *H. pseudolaeye* türlerinin kimyasal içeriği daha önce yapılan bir araştırmada YBSK kullanılarak belirlenmiştir [82]. Yazarlar her bileşik için miktar (%) değerlerini yüzde olarak vermiş ve hesaplamayı belirtmemişlerdir, bu nedenle bu değerleri çalışmamızla karşılaştırırken mg/100mg kuru ekstre olarak hesapladıklarını kabul ettik. Ancak, çalışmalarında kateşin, epikateşin, vanillik, kafeik, siringik, p-kumarik, sinapik, gallik, 4-hidroksibenzoik asitler ve kersitrin taranmamıştır, yani bizim çalışmamızda farklı maddeler de analiz edilerek türün kimyasal içeriği hakkında ek veriler elde edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarla karşılaştırıldığında, ayrıca bizimle ortak olarak ise hiperisin, klorojenik asit, rutin, hiperosit, kersitrin, kemferol ve kersetin tespit etmişlerdir. Bahsi geçen çalışmada, *H. pseudolaeye*'nin ana bileşenlerinden biri olarak bizim çalışmamızda tespit edilen epikateşin bileşiği taranmamıştır. Kersetin, kersitrin ve hiperozit ise çalışmamızda daha yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, spesifik fenolik bileşiklerin miktarlarının, *H. pseudolaeye*'nin farklı coğrafi popülasyonları arasında değişebileceğini göstermektedir.

Ganzera ve ark., *H. perforatum* türünde bulunan temel sekonder bileşikleri karakterize etmek ve miktersal analizlerini yapmak için YBSK metodu kullanmışlardır [87]. Bu çalışmada rutin, hiperozid, izokersitrin, kersitrin, kersetin, I3,II8-biapijenin, pseudohiperisin, hiperisin, hiperforin bileşikleri tanımlanmıştır. Çalışmada metanolik ekstre ve ayrıca metanolün belirli oranlarda su ve piridin ile karıştırıldığı ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Metanolik ekstrenin bu maddelerin hepsini yüksek seviyede içerdiği görülmüştür ve optimum ekstraksiyon yöntemi olarak belirlenmiştir [87].

Camas ve ark., *Hypericum leptophyllum* türünün metanol ekstresinde floroglukinol türevi olan hiperforin, naftodianthron bileşikler olan pseudohiperisin ve hiperisin, fenilpropan klorojenik asit ve flavonoid bileşiklerden rutin, hiperozid, kemferol, izokersetin, kersitrin,

ve kersetin bileşiklerinin varlığını YBSK yöntemi ile araştırmıştır [93]. Bu türde klorojenik asit, hiperozid, izokersitrin, kersitrin, ve kersetin tespit edilirken, hiperforin, pseudohiperisin, hiperisin, rutin, ve kemferol tespit edilmemiştir [93].

Yapılan başka bir çalışmada *Hypericum* cinsine dahil Türkiye’de bulunan yedi türün kimyasal içerikleri YBSK yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmaya *H. aviculariifolium* subsp. *aviculariifolium* var. *albiflorum* (endemik), *H. bithynicum*, *H. calycinum*, *H. cardiophyllum*, *H. elongatum* subsp. *microcalycinum*, *H. hirsutum* ve *H. xylosteifolium* türleri dahil edilmiştir. Yapılan çalışmada bu türlerde hiperisin, pseudohiperisin, hiperforin, adhiperforin, klorojenik asit, neoklorojenik asit, kafeik asit, 2,4-dihidroksibenzoik asit, 13,118-biapijenin, hiperozid, isokersitrin, kersitrin, kersetin, avikularin, rutin, (+)-kateşin ve (-)-epikateşin bileşikler analizi edilmiştir. Çalışmada bitkilerin/bitki kısımlarının metanol ekstraktları elde edilmiştir. Hiperisin, hiperforin, kafeik asit, avikularin ve rutin dışındaki tüm bileşikler bitkilerin hepsinde değişen oranlarda tespit edilmiştir. Bu sayılan bileşiklerden bazıları ise bitkilerin bazılarında tespit edilmemiştir [94].

Yapılan diğer bir çalışmada *H. perforatum* bitkisinden metanol, diklorometan-metanol, su-metanol, su, dekoksiyon (su) ekstraktları elde edilmiştir ve farklı ekstraktların içerdiği bazı etken maddeler YBSK ile belirlenmiştir. Ayrıca antioksidan aktiviteye de bakılmıştır. Bu çalışmada klorojenik asit, rutin, hiperozid, isokersitrin, kersitrin, kersetin, 13,118-biapijenin tüm ekstraktlarda tespit edilirken, hiperisin ve hiperforin su içeren ekstraktlarda tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda da hiperisin su ekstraktlarında tespit edilmemiştir, bu açıdan sonuçlarımız literatürle uyumludur. Bu çalışmada metanolün, *H. perforatum*’un birçok bileşenini elde etmek için uygun bir çözücü olduğu da belirtilmiştir [90].

Diğer bir çalışmada ise *Hypericum adenotrichum* türünün kimyasal içeriği yukarıdakine benzer yöntemle araştırılmıştır ve hiperisin, pseudohiperisin, klorojenik asit, rutin, hiperozid, kersitrin, kersetin, kemferol, apijenin-7-O-glukozid ve amentoflavon maddeleri tespit edilirken, hiperforin tespit edilmemiştir [88].

*Hypericum calycinum* metanol ekstresinden iki kaffeoylquinik asit türevidir; butil klorojenat ve klorojenik asit, yedi flavonoid; kersetin, kersitrin, hiperozid, isokersitrin, miquelianin, rutin ve 13,118-biapijenin, ve iki flavanol; (+)-kateşin ve (-)-epikateşin saflaştırılmış ve tanımlanmıştır. Tanımlamalar NMR ve kütle spektrometresi kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri olduğu da belirlenmiş ve en yüksek etki flavanollarda görülmüştür [89]. Bizim çalışmamızda da *H. pseudolaeve* türünde epikateşin ana bileşiklerden biridir.

Çırak ve ark., Türkiye'de yetişen sekiz *Hypericum* türünün (*H. aviculariifolium*, *H. lydium*, *H. montbretii*, *H. orientale*, *H. organifolium*, *H. perfoliatum*, *H. perforatum*, *H. pruinatum*) etanolik ekstrelerinin kimyasal bileşenlerini araştırmıştır [127]. Bu çalışmada taranan bileşikler arasında klorojenik asit, rutin, hiperozid, kersetin, kersitrin ve hiperisin yer almaktadır. Elde ettiğimiz sonuçları Çırak ve arkadaşları ile karşılaştırdığımızda *H. pseudolaeve*'deki klorojenik asit ve rutin miktarı diğer türlere yakınsa kersetin içeriği çok daha yüksektir [127]. Çırak ve arkadaşları, *H. perforatum* ve *H. lydium*'da en yüksek miktar olarak 1.4 mg/g kersetin tespit ederken, bizim çalışmamızda *H. pseudolaeve*'de 8.2-8.9 mg/g tespit edilmiştir [127].

Başka bir çalışmada, Türkiye'de yetişen yedi *Hypericum* türünün sekonder metabolitleri (*H. aviculariifolium*, *H. bithynicum*, *H. calycinum*, *H. cardiophyllum*, *H. elongatum*, *H. hirsutum* ve *H. xylosteifolium*) YBSK-DAD yöntemi ile araştırılmıştır [128]. Yazarlar, bitkilerin farklı kısımlarının metanolik ekstrelerini kullanmıştır (çiçek, yaprak, gövde). Hiperisin, kafeik asit, 2,4-dihidroksibenzoik asit, kersetin, rutin ve kateşini genel olarak iz/düşük miktarlarda tespit etmişlerdir ve bazı türlerde de tespit edememişlerdir (istisnai olarak rutin içeriği *H. hirsutum*'da yüksektir). En yüksek klorojenik asit içeriği, sırasıyla 24,8 ve 17,3 mg/g DW miktarında *H. xylosteifolium* ve *H. calycinum* yapraklarında tespit edilmiştir. Hiperozid içeriği 0,1-7,8 mg/g (*H. cardiophyllum*'da en yüksek miktarda) arasında değişmektedir ve izokersitrin içeriği 0,03 ila 7,63 mg/g arasındadır (bazı kısımlar içermez). Epikateşin birikimi, bu yedi türün farklı bölümlerinde 0,03 ile 7,57 mg/g arasında değişmektedir.

Çırak ve ark., Güney Anadolu'da yetişen sekiz *Hypericum* türünün sekonder metabolitlerini taramışlardır (*H. capitatum* var. *capitatum*, *H. capitatum* var. *luteum*, *H. elongatum* var. *elongatum*, *H. olympicum*, *H. polyphyllum*, *H. retusum*, *H. salsolifolium*, *H. spectabile*) [110]. Sonuçları karşılaştırıldığında, bütün türlerin metanolik ekstrelerinin bitkilerin farklı bölümlerinde değişen konsantrasyonlarda hiperisin, klorojenik asit, 2,4-dihidroksibenzoik asit, hiperosit, kersitrin, kersetin, rutin ve epikateşin içerdiği bulunmuştur. *H. elongatum* var. *elongatum* dışındaki tüm türlerde kateşin tespit etmişlerdir. Bahsedilen türlerin hiçbirinde kafeik asit tespit etmemişlerdir.



Ccana ve ark. ise, Peru'dan dört *Hypericum* türünün (*H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. silenoides*, *H. laricifolium*) ham etanolik ekstralarının fitokimyasal profillerini değerlendirmiştir [112]. Klorojenik asit ve rutin tespit edilmemiştir ve bu bileşikler bizim sonuçlarımıza bakacak olursak *H. pseudolaeve*'de tespit edilmiştir. Hiperozid, bu dört türün en önemli bileşiğidir ve miktarını 70,3 ve 119,4 mg/g DW arasında belirtmişlerdir. Ayrıca *H. pseudolaeve*'de bulduğumuz miktara yakın miktarlarda kersetin tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda taranan diğer bileşikler çalışmamışlardır.

Genel olarak literatürdeki sonuçlar incelendiğinde, çalışmamızda *H. pseudolaeve*'de tanımlanan sekonder metabolitler, daha önce yayınlanmış literatür kayıtları ile uyum içindedir ve ayrıca bu bileşiklerin çoğu *H. perforatum*'da da bulunur [6,129–132]. Bu çalışmanın belirgin bir sonucu olarak ve yayınlanmış literatüre dayanarak *H. pseudolaeve*'nin cinsin diğer türlerine kıyasla en yüksek miktarda epikateşin içeren türlerden biri olduğu tespit edilmiştir. Epikateşin, kardiyovasküler nöropsikolojik sağlık için faydalı olan önemli bir antioksidan flavonoiddir [133]. Ayrıca, *H. perforatum*'un yara iyileşme aktivitesine sahip aktif fraksiyonunun da epikateşin içerdiği daha önceki *in vivo* çalışma ile bulunmuştur [6].

Fenolik bileşiklerin miktarı *V. stachydifolium*'da düşük konsantrasyonlarda tespit edilirken, *H. pseudolaeve* tarafından üretilen ikincil metabolitlerin önemli bir bölümünü oluşturur ve bu sonuç toplam fenolik içerik sonuçlarımızı desteklemektedir. YBSK analizi ile bu çalışmada *H. pseudolaeve* ve *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*'un biyolojik aktivitelerine katkıda bulunan fenolik bileşiklerden bazılarını miktarları tespit edilmiş ve türlerin kimyasal içerikleri hakkında veri elde edilmiştir. Ayrıca literatürde yer alan ve bu tez kapsamında elde edilen sonuçlara bakıldığında, epikateşin bileşiğinin *Hypericum* cinsinin yara iyileştirici aktivitesinde önemli olduğu düşünülmektedir.

#### *In vitro* sitotoksitesite ve yara iyileşmesi aktivitesi

Bitki ekstralarının yara iyileştirme aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan *in vitro* hücre çizik testi bu tez çalışmasında model olarak uygulanmıştır [13,38,41,42,134]. *In vitro* hücre çizik yöntemi, yara iyileşme sürecinde hücrelerin göçünü taklit etmesi bakımından, yara iyileşmesinin değerlendirilmesinde *in vitro* alternatif olarak kabul görmüş ve bitki ekstralarının yara iyileştirici etkilerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesinde yaygın

olarak kullanılan bir yöntemdir. Fibroblastlar ve keratinositler gibi deri hücreleri ile yapılan göç deneyi, bileşiklerin ve doğal ürünlerin aktivitesi hakkında bilgi sağlamaktadır [42,135]. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma *Hypericum* cinsinde metanolik ve sulu ekstrelerini kullanarak hücre çizik deneyinin sonuçlarını ortaya koyan ilk çalışmadır. Yara iyileşmesi deneyini gerçekleştirmeden önce, ekstrelerin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki potansiyel sitotoksik etkisi araştırılmıştır çünkü hücre proliferasyonunun azaltılmış seviyeleri sonuçları etkileyen bir faktördür ve ayrıca toksisite değerlendirmesi farmasötik preparatlarda kullanımı için de önemli bir parametredir. Literatüre baktığımızda çalışılan türlerin sitotoksitesi ve *in vitro* yara iyileşme aktivitesi üzerine daha önce bir çalışma yapılmadığı görülmektedir.

Farklı *Hypericum* türleri üzerinde yapılan benzer çalışmalar, ekstrelerin keratinositler ve fibroblastlar üzerinde önemli sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermiştir, bu da onları topikal uygulamalar için daha güvenli kılmıştır [47,136,137]. Bizim sonuçlarımız da bu anlamda literatürle uyumludur. Ek olarak, *H. amblysepalum*'un metanolik ekstresinin 24 saatlik uygulamadan sonra HeLa serviks kanseri ve NRK-52E sıçan böbrek epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği (LC<sub>50</sub> değerleri 4.12 (meyveler) ve 2.86 (tohumlar) µg/ml olarak belirtilmiştir) bulunmuştur [116].

Yine literatürde *Verbascum* cinsinin üyeleri ile yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır. *V. speciosum*'un metanolik ekstresinin, L929 fare fibroblast hücre hattında, insan umbilikal damar endotel hücrelerinde (HUVEC) ve primer insan fibroblastlarının 24, 48 ve 72 saatlerde 400 µg/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarda sitotoksikite gösterdiği belirtilmiştir [13]. Tatlı ve Akdemir, *Verbascum*'un 15 taksonunun (*V. stachydifolium* var. *stachydifolium* hariç) çeşitli kanser ve kanserli olmayan normal hücre (Vero, Afrika yeşil maymunu böbrekleri) hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmiştir. Bazı türlerin kanser hücre hatlarına karşı aktivitelerini saptamışlardır, ancak 100 µg/ml konsantrasyonda önemli sitotoksikite gözlemlememişlerdir [138]. Salamura karides (*Artemia salina*) öldürücü deneyi kullanılarak değerlendirilen bazı *Verbascum* türlerinin toksik aktiviteleri üzerine yapılan bir çalışmada, *V. stachydifolium* anlamlı bir toksisite göstermemiştir [139]. Sitotoksikite sonuçlarımız, farklı *Verbascum* türleri için bildirilen literatürle uyumludur.

Çalışılan türlerin yara iyileştirici aktivitesini *in vitro* olarak değerlendiren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Fronza ve ark., *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita* ve

*H. perforatum* yağından elde edilen etanolik ekstrelerin yara iyileşme aktivitelerini 3T3 fare fibroblast hücre hattı kullanarak yapılan hücre çizik testi ile araştırmışlardır [42]. *H. perforatum* yağının 0.5 µg/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olduğunu, *Calendula officinalis* ile 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında pozitif sonuçlar verdiği sonucunu elde etmişlerdir. *H. perforatum*'un yara iyileşme aktivitesi ayrıca *in vivo* yara modelleri ile gösterilmiştir ve doğal bir yara iyileştirici doğal ürün olarak önerilmiştir [6]. Bu şifalı bitki ayrıca Türk halk tıbbında zeytinyağlı preparatlarla yara ve yanıkların tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır [10,125]. Bu türün dışında, *Hypericum patulum* metanol ekstresi içeren krem preparatının yara iyileştirici özelliği *in vivo* eksizyon ve insizyon yara modelleriyle ortaya koyulmuştur [9].

*H. perforatum*'un iki farklı alt türünün (*H. perforatum* subsp. *perforatum*, *H. perforatum* subsp. *veronense*) yara iyileştirici özellikleri NIH-3T3 fare embriyonik fibroblast hücrelerinde *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen metanol-aseton ekstreleri 1-100 µg/ml konsantrasyonları arasında uygulanmıştır. *H. perforatum* alt türlerinin ekstreleri *Centella asiatica* titre edilmiş ekstresi ile (1-100 µg/ml) karşılaştırılmıştır. Hücrelerin proliferasyonu, göçü ve kollajen granülü miktarı mikroskopik morfolojik çalışmalar ile belirlenmiştir. Ekstrelerin, özellikle 1-10 µg/ml arasında konsantrasyonun mitotik aktiviteyi ve kollajen birikimini arttırdığı görülmüştür, 10 µg/ml dozdan sonra mitotik aktivite azalmıştır [136].

Bu çalışmanın sonuçları ilk kez, özellikle Orta ve Doğu Anadolu'da yayılış gösteren bir bitki türü olan, *H. pseudolaeye*'nin yara iyileştirici aktivite potansiyeli olduğunu göstermiştir. Hücre çizik deneyinde en aktif ekstrenin, YBSK analizimize göre diğer ekstrele kıyasla önemli ölçüde daha yüksek miktarda (-)-epikateşin içeren HSM olduğu gösterilmiştir. Süntar ve ark., aynı zamanda *H. perforatum* özütünün yara iyileştirici özellikteki aktif fraksiyonunda epikateşini tanımlamıştır [6]. Bu sonuçlar (-)-epikateşin'i *Hypericum* türlerinin yara iyileşmesi aktivitesine katkıda bulunan en önemli faktörlerden biri olarak ön plana çıkarmaktadır. Saf epikateşin gallatın yara iyileşme aktivitesi daha önce yapılan bazı çalışmalarda belirlenmiştir [140]. Bu sonuçlar (-)-epikateşinin *Hypericum* cinsinin biyolojik olarak aktif bir sekonder metaboliti olduğunu göstermektedir. Ayrıca yine bahsi geçen *in vivo* çalışmada aktif fraksiyonda epikateşin dışında hiperozid, hiperisin ve rutin de tespit edilmiştir. Bu bileşikler bizim çalışmamızda da *H. pseudolaeye*'de tespit edilmiştir. Klorojenik asit ve kersitrin miktarları da, *H. pseudolaeye* ekstrelerinin *in vitro* yara iyileşme

aktiviteleri ile korelasyon gösterir; YBSK analizimize göre HSM ekstresi bu bileşiklerin en yüksek miktarını içermektedir. Klorojenik asit ve kersitrinin de yara iyileşme potansiyeline sahip olduğu çalışmalar ile gösterilmiştir [141,142]. Sonuçlarımız ve literatürdeki veriler, fenolik bileşiklerin *Hypericum* cinsinin yara iyileşme potansiyelinde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir.

Daha önce yayınlanmış çalışmalar, hiperisinin geniş bir yelpazede protein kinaz C ve CD8<sup>+</sup> T-hücre kaynaklı sitotoksikite ve antiviral aktivite inhibisyonu da içeren moleküler fonksiyonlara ve biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir [8]. Bazı sınırlı çalışmalar da saflaştırılmış hiperisinin yara iyileştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir [143]. Sonuçlarımıza göre, sulu ekstrelerin hücre göçü bakımından daha etkili olduğu saptanmıştır. Ancak bu ekstrelerde hiperisin saptanmamıştır ve metanolik ekstrelerde de konsantrasyonu çok düşük olarak saptanmıştır. Hiperisinin yara iyileşme sürecine olan katkısı, saflaştırılmış hali kullanılarak daha ayrıntılı çalışmalarla araştırılmalıdır. Hiperforin (bir floroglusinol türevi), *Hypericum* cinsinin bir başka tipik bileşiğidir ve *H. perforatum*'un majör antidepresan bileşenlerinden biri olarak kabul edilir. Hiperforinin ayrıca antibakteriyel, antioksidan, antikanser ve antisikloksigenaz-1 aktiviteleri de dahil olmak üzere başka biyolojik etkileri de vardır [8,144]. Ancak Süntar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hiperforin *H. perforatum*'un yara iyileştirici aktif fraksiyonunda tespit edilmemiştir [6]. Önceki yapılan çalışmada *H. pseudolaeve*'de ise çok düşük (% 0.0023) miktarda tespit edilmiştir [82].

Süntar ve ark., 13 *Verbascum* türünün *in vivo* yara iyileşme aktivitelerini lineer insizyon ve dairesel eksizyon yara modelleri kullanarak araştırmıştır. Türk halk tıbbında kullanımlarını destekleyecek şekilde, *V. splendidum*, *V. stachydifolium* ve *V. uschackense*'in metanolik ekstreleriyle en iyi sonuçları elde etmişlerdir [12]. Literatürde *V. stachydifolium* var. *stachydifolium*'un, sitotoksik aktivitesi ve kimyasal bileşimi ile ilgili bilgi mevcut değildir. Sonuçlarımız *V. stachydifolium*'un yara iyileşme aktivitesini *in vitro* yöntem ile doğrulamıştır ve sulu ekstrelerinin de yara iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. *V. speciosum*'un metanolik ekstresinin yara iyileşme aktivitesi, L929 fare fibroblastı ve primer insan fibroblast hücreleri ve HUVEC hücre çizik testi kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalar ile de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 200 µg/ml konsantrasyon, L929-HUVEC ortak kültür hücresi çizme deneyinde kapanma oranını arttırmıştır [13]. Çalışmamızda daha

düşük konsantrasyonda *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* ekstresi ile benzer sonuç elde edilmiştir. Ayrıca *Verbascum speciosum* türünün *in vitro* fare ve insan fibroblast hücre kültürlerinde proliferasyon ve hücre göçünü ve kollajen sentezini arttırdığı da görülmüştür [13].

### Gen ifade analizleri

Yara oluşumundan sonra birkaç gün içerisinde, yaranın etrafındaki bölgedeki fibroblastların proliferasyonu ve yara oluşan bölgeye göçü gerçekleşir. Bu işlemin gerçekleşmesinde yara bölgesinde lokal olarak salgılanan büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin önemi büyüktür [145]. Bu sitokinlerin başlıca kaynakları makrofajlar, nötrofiller, plateletler, keratinosit ve fibroblast hücreleridir. Yara iyileşmesinden sorumlu olan başlıca faktörlere örnek olarak TGF alfa ve beta, PDGF, VEGF, TNF- $\alpha$ , EGF, insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF), ve FGF gen ailesi verilebilir [3,146,147]. Bu tez çalışması kapsamında da yara iyileşmesinde önemli sitokinlerden TGF-beta, VEGF, FGF7 ve yine yara iyileşme mekanizmasında rolü olabilen kollajen ifadeleri qRT-PCR ve ELISA yöntemleriyle araştırılmıştır. Bu şekilde ekstrelerdeki aktivitenin moleküler mekanizmaları hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Analiz edilen genler aşağıda yarı başlıklar halinde tartışılmıştır.

### Kollajen tip 1

Yara iyileşme sürecinde fibroblast göçü ve proliferasyonu önemli bir yer tutmakta ve bu olaylar hem yara bölgesindeki diğer hücrelerden salgılanan parakrin, hem de fibroblast hücrelerinin kendileri tarafından salgılanan otokrin sitokinler tarafından düzenlenmektedir. Fibroblast hücreleri düzgün bir yara iyileşme sürecinde çok önemli olan kollajen üretimi için ana hücrelerdir. Yukarıda bahsi geçen çeşitli sitokinlerin kültüre edilmiş fibroblast hücrelerinden kollajen sentezini arttırdığı görülmüştür. Kollajen sentezinin artması ve hızlanması, yara iyileşme sürecini de hızlandıran bir faktördür ve yara iyileşmesini hızlandıran çeşitli bitki ekstrelerinin kollajen sentezini arttırdığı tespit edilmiştir [1,3,22,146,148,149]. Yara iyileştirici özelliği iyi bilinen *C. asiatica* ekstresinin de fibroblast hücrelerinde kollajen sentezini arttırdığı görülmüştür ve yara iyileşme sürecini hızlandıran önemli bir mekanizma olarak belirtilmiştir [22]. Başka bir çalışmada ise *Acalypha indica* bitkisinin topikal uygulamasının sıçanlarda kollajen sentezini neredeyse iki kat arttırdığı görülmüştür [150]. Lee ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Piper cambodianum* P.

Fourn. bitkisinin farelerde oluşturulmuş yara iyileşme modelleri ve insan dermal fibroblast hücrelerinde kollajen sentezini artırdığı görülmüştür [151].

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda kullanılan bitki ekstralarının yara iyileşme süreci üzerindeki etkisini moleküler seviyede değerlendirmek amacıyla fibroblast hücrelerinin kollajen tip I sentezi üzerindeki etkileri gen ekspresyonu (mRNA) ve protein seviyesinde tespit edilmiştir. Çalışmamızda kollajen geni için gen ifade düzeyi kat değişiminin HSM ve VSM ekstraları (62 µg/ml) uygulanmış L929 hücrelerinde kontrole göre neredeyse birbirine eşit ve yaklaşık olarak 2 kat artış ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4. 12). ELISA sonuçlarına göre kollajen miktarı HSM’de 0,15, VSM’de 0,29 µg/ml olarak hesaplanmıştır ve seviyesi çok düşük olan kontrole göre belli bir derecede artış gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.16). Kollajen sentezinin artmasının yara iyileşme sürecini hızlandıran bir faktör olduğu düşünülürse bu çalıştığımız ekstraların yara iyileştirme potansiyeline katkıları olacağı düşünülebilir.

### FGF-7

FGF ailesine dahil proteinlerin hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve damarlanma üzerinde çok önemli rolleri vardır. FGF ailesinin iyi karakterize edilmiş bilinen 23 üyesi vardır. Bunlardan yara iyileşmesinde daha önemli olanları FGF-2, FGF-7 ve FGF-10'dur. Farklı FGF tipleri keratinositler, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, kondrositler, mast hücreleri ve fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir. Bunlar genellikle parakrin özellikte sitokinler olup, etkiledikleri hücrelerde reseptörleri mevcuttur [19,152,153]. Çalışmamızda ifade seviyesine bakılacak olan FGF-7, keratinosit büyüme faktörü-1 (KGF-1) olarak da adlandırılmaktadır ve dermal fibroblast hücrelerinde de ifade edilmektedir [19,152–154]. Reseptörü keratinosit hücrelerinde bulunmaktadır. Bu anlamda fibroblast hücrelerinden salınan FGF-7’nin parakrin etkili olduğu söylenebilir. Yapılan *in vitro* çalışmalar FGF-7’nin, keratinosit göçünü ve proliferasyonunu uyarak epitelizasyonu sağladığı ve bu anlamda da yara iyileşmesinde önemli rolü olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda damar endotel hücreleri için de mitojen özellikte olup, bu hücrelerde VEGF sentezini arttırmaktadır [19]. Yine endotel hücrelerinde urokinaz tip plazminojen aktivatör (yeniden damarlanma için gerekli bir serin proteaz) sentezini uyarmaktadır [155]. FGF-7’nin yara iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi *in vivo* hayvan modellerinde ve klinik araştırmalar ile de gösterilmiştir [156]. Bu özellikleri nedeniyle FGF-7 yara iyileşmesindeki en önemli sitokinler arasındadır.

BALBc farelerde eksizyon yara oluşturularak yapılan bir çalışmada yara dokusunda farklı FGF'lerin gen ifadesi kontrol ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir [157]. Çalışma sonucunda, yara oluşturulduktan 1 gün sonra KGF (FGF-7) mRNA miktarının 160 kat arttığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, asidik ve bazik FGF ve FGF-5'in 2-10 kat arttığı görülmüştür. Normal ve yaralı dokuda FGF-3, FGF-4 ve FGF-6 ekspresyonu ise tespit edilememiştir. Yine bu çalışmada *in situ* hibridizasyon ile KGF ekspresyonu 1 günlük yara sınırındaki dermis ve yara altındaki hipodermis bölgelerine lokalize edilmiştir. Bu faktörün reseptörünün ise özellikle epidermiste ifade olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, KGF'nin bazal keratinositleri uyarak yara iyileşmesinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir [157].

Çalışmamızda FGF7 geni için gen ifade düzeyi kat değişiminin HSM ve VSM ekstreleri (62 µg/ml) uygulanmış L929 hücrelerinde kontrole göre yaklaşık olarak 4 kat artış ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4. 13). ELISA sonuçlarına bakacak olursak FGF7 miktarına bakıldığında kontrol 0,19, HSM 0.84 ve VSM 3,29 µg/ml olarak hesaplanmıştır VSM'de biraz daha fazla artış görülmektedir (Şekil 4.17). Bu sitokinin yara iyileşmesindeki rolü düşünüldüğünde, tez kapsamında elde edilen ekstrelerin bu genin ifadesini arttırarak yara iyileştirme özelliklerini destekledikleri düşünülebilir.

### TGF-β1

Dönüştürücü büyüme faktörü β (transforming growth factor β, TGF-β) ailesi TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, kemik morfojenik proteini ve aktivinlerden oluşur. Memelilerde TGF-β1-3 formları yaygındır, her üç form da yara iyileşme süreçlerinde rol alır ancak yara iyileşmesinde etkileri en iyi gösterilmiş olan TGF-β1'dir [19,158]. TGF-β1 yara dokusunda plateletler, makrofajlar, keratinositler ve fibroblastlar tarafından sentezlenerek salınır [33,152,158–166]. TGF-β1 yara iyileşmesinde inflamasyonda, damarlanmada, reepitelizasyonda ve bağ doku rejenerasyonunda etkilidir [19]. Fibroblast proliferasyonunu ve hücre dışı matriks sentezini arttırır [43,167,168]. Yapılan çalışmalarda yara oluşumu takiben yara dokusunda TGF-β1 seviyesinin arttığı ortaya konulmuştur, ayrıca TGF-β1 çeşitli hücrelerden VEGF salgılanmasını uyarmaktadır. TGF-β1, yeniden modellenme evresinde kollajen üretiminde de rol oynamaktadır [19,169,170]. TGF-β1'in fibroblast hücrelerinde CTGF gen ifadesini arttırdığı da yapılan *in vitro* fonksiyonel çalışmalar ile gösterilmiştir [171,172].

Farelerde yapılan bir çalışmada yara dokusunda, yara iyileşmesinin farklı aşamalarında TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3'ün gen ifade seviyelerine bakılmıştır. Yara iyileşmesinin ilk günlerinde özellikle TGF- $\beta$ 1 seviyesinde anlamlı artış görülmüştür. İmmünohistokimya ile ifadenin ağırlıklı olarak göç eden fibroblastlar ve ayrıca makrofajlardan oluşan dermiste olduğu belirlenmiştir [158]. Bu ve benzeri destekleyici çalışmalar ışığında yara oluşumunda, yara iyileşmesinin erken safhalarında TGF- $\beta$  kaynağının ilk olarak plateletler olduğu, daha sonra ise keratinositler, makrofajlar ve fibroblastların TGF- $\beta$ 'nın yara bölgesindeki kaynakları olduğu ortaya koyulmuştur [166].

Gopalakrishnan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sıçanlara uygulanan kersetinin TGF- $\beta$ 1 miktarını arttırdığı görülmüştür [173]. Bu bileşik uygulanan ekstrelerde de bulunmaktadır.

Liu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Dracaena cochinchinensis* (Loureiro) S. C. Chen bitkisi insizyon ve eksizyon yara modeli oluşturulmuş sıçanlara uygulanmıştır ve sonuç olarak TGF- $\beta$ 1 ekspresyon seviyesini arttırdığı görülmüştür [174].

Çalışmamızda TGF- $\beta$ 1 geni için gen ifade düzeyi kat değişiminin HSM ve VSM ekstreleri (62  $\mu$ g/ml) uygulanmış L929 hücrelerinde kontrole göre HSM'de yaklaşık 48 kat artış gösterirken VSM'de yaklaşık 2 kat artış göstermiştir (Şekil 4. 14). ELISA sonuçlarına bakacak olursak TGF- $\beta$ 1 (Şekil 4.18) miktarı kontrole göre bir miktar artış göstermekle birlikte, HSM ve VSM arasında anlamlı bir fark yoktur. ELISA çalışmasında hücrelerden dışarı salınan sitokinlerin miktarı besiyerinde belirlenmiştir. Ancak sentez hızının artmasından sonra proteinlerin dışarı salınması belli bir süreç gerektirdiğinden çalışmada daha iyi bir değerlendirme yapmak için qRT-PCR da dahil edilmiştir. Nitekim bu gen için ifade farklılığı özellikle qRT-PCR çalışması ile daha net ortaya koyulmuştur. Elde edilen bulgular, özellikle *H. pseudolaeva*'nin yara iyileştirici aktivitesini göstermesindeki önemli moleküler mekanizmalardan birinin fibroblastlardaki TGF- $\beta$ 1 ifadesini arttırması olduğunu ortaya koymuştur.

### VEGF-A

VEGF ailesinin üyeleri VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörüdür. VEGF'nin yara iyileşmesinde başlıca rollerinden biri damarlanmanın



uyarılmasıdır. Yara iyileşmesi sürecinde gerçekleşen yeniden damarlanma çeşitli basamakları içerir. Bu basamaklardan önemli olanlar vazodilasyon, bazal membran degradasyonu, endotel hücre göçü ve proliferasyonudur. Takiben kılcal tüp oluşumu gerçekleşir ve yeni bazal membran oluşur. VEGF, bu olayların hepsi üzerinde etkilidir [175]. VEGF-A'nın yara iyileşmesi üzerindeki etkileri çalışmalarla ortaya koyulmuştur ve kaynağı plateletler, makrofajlar, nötrofiller, keratinositler ve fibroblastlardır [19,33,152–154,175–180]. Yapılan çalışmalar VEGF-A'nın yara iyileşmesinde yeniden damarlanma sürecinde endotel hücre göçünü ve proliferasyonunu sağlayarak önemli rol oynadığını göstermiştir ve yara iyileşmesinin erken safhalarında ifadesi artmaktadır [19,175,176,181]. Temel rolü damarlanmanın uyarılması olan VEGF, reepitelizasyon ve kollajen sentezinde de önemlidir [175]. Ayrıca akut yaralarda VEGF-A seviyesinin arttığı *in vivo* çalışmalar ile de gösterilmiştir [182]. Yapılan bir çalışmada cerrahi operasyon geçirmiş kişilerden, operasyon sonrası 7. güne kadar farklı zamanlarda 70 farklı kişiden yara sıvısı örneği toplanmış ve 0. günden 7. güne doğru VEGF miktarının arttığı görülmüştür [178]. Yaralanmanın ardından, yara bölgesinde miktarı artan VEGF-A'nın ilk kaynağı aktive olmuş plateletler ve makrofajlardır [19,183]. Makrofajlar ayrıca TNF- $\alpha$  da salgılar ve bu sitokin keratinositler ve fibroblastlarda VEGF-A sentezini uyaran faktörlerden biridir [158,177]. TNF- $\alpha$  dışında TGF- $\beta$ 1, EGF, TGF- $\alpha$ , KGF (FGF-7), bFGF, PDGF-BB ve IL-1  $\beta$  da parakrin etki ile çeşitli hücrelerde VEGF sentezini ve salgılanmasını arttırmaktadır [19]. Hayvan çalışmaları ile VEGF uygulamasının reepitelizasyonunu ve damarlanmasını arttırdığı gözlemlenmiştir [184–186].

Hipoksi ortamı oluşturulmuş *ex vivo* insan deri organ modelinde ve kültüre edilmiş insan dermal keratinosit ve fibroblast hücrelerinde, kontrol grubuna göre VPF/VEGF ifadesinin arttığı northern blot ve *in situ* hibridizasyon yöntemleriyle ortaya koyulmuştur. Dokulardaki hipoksi durumu malin tümörler ve yara dokularında söz konusu olduğundan, yara iyileşmesinde yara bölgesinde çeşitli hücrelerde VEGF salgısının artmasında hipoksi durumunun da tetikleyici bir etmen olabileceği öne sürülmüştür [187]. Başka bir çalışmada leptin reseptörü içermeyen diyabetik transgenik fareler ile kontrol farelerden alınan deri fibroblast hücrelerinin *in vitro* ortamda hücresel özellikleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada diyabetik fibroblastların göçünün azaldığı ve VEGF üretiminin önemli derecede azaldığı ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. Ayrıca hipoksik koşulların normal fibroblastlarda VEGF sentezini arttırırken, diyabetik fibroblastlarda belirgin bir artışa sebep olmadığı görülmüştür [188].

Gopalakrishnan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sıçanlara uygulanan kersetinin VEGF miktarını arttırdığı görülmüştür [173]. Bu bileşik uygulanan ekstrelerde de bulunmaktadır.

Khanna ve ark. Üzüm çekirdeği proantosiyenin ekstresini kültürlenmiş keratinositlere uygulamıştır ve VEGF seviyelerinde artış gözlemlemiştir. VEGF sitokininin yara iyileşme sürecine katkıları düşünüldüğünde bu ekstremin yara iyileşmeye katkıları olacaktır [189].

Liu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise *Dracaena cochinchinensis* (Loureiro) S. C. Chen bitkisi insizyon ve eksizyon yara modeli oluşturulmuş sıçanlara uygulanmıştır ve sonuç olarak VEGF ekspresyon seviyesini arttırdığı görülmüştür [174].

Çalışmamızda VEGF geni için mRNA seviyesinde gen ifade düzeyi kat değişimi HSM ve VSM ekstreleri (62 µg/ml) uygulanmış L929 hücrelerinde kontrole göre HSM’de yaklaşık 4 kat artış gösterirken VSM’de yaklaşık 2 kat artış göstermiştir (Şekil 4. 15). ELISA sonuçlarına bakacak olursak VEGF (Şekil 4.19) miktarı yine kontrole göre bir miktar artış göstermekle birlikte, HSM ve VSM arasında anlamlı bir fark yoktur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar *Hypericum pseudolaeye* ve *Verbascum stachydifolium* var. *stachydifolium* ekstrelerinin yara iyileşme potansiyeline sahip olduğunu ve birkaç önemli antioksidan fenolik bileşik içerdiğini göstermektedir.

Antioksidan aktiviteleri, ilgili iki cins içindeki diğer türlere yakındır. İnsanlar arasında tercih edilen bir kullanım olan sulu ekstrelerin literatürdeki metanolik ekstrelerin sonuçlarına kıyasla iyi aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Maserasyon metodu iyi sonuçlar vermiş olup kolay ve ucuz bir ekstraksiyon metodu olarak kullanılabilir.

Sonuçlar, *in vitro* kazıma testinin, *Hypericum* ve *Verbascum* cinsine ait türlerin yara iyileşme potansiyelini değerlendirmek için kullanılabileceğini göstermiştir ve bu sonuçlar yayınlanmış *in vivo* çalışmalarla korelasyon gösterdiğinden, hayvan kullanımını azaltacak niteliktedir.

Bu çalışmanın sonuçları, literatürdekilerle birlikte, (-)-epikateşini, yara iyileşmesi aktivitesine olası bir katkı olarak gösterir ve *H. pseudolaeye*, bu flavonoidi cinsinin diğer üyelerine kıyasla en yüksek miktarda biriktirir. Bu iki bitki, aktif bileşiklerin izole edilmesini ve tanımlanmasını amaçlayan daha fazla araştırmayı hak eder.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar *Hypericum pseudolaeye* ve *Verbascum stachydifolium* var. *stachydifolium* ekstrelerinin yara iyileşme potansiyeline sahip olduğunu ve önemli fenolik bileşikler içerdiğini göstermektedir. *H. pseudolaeye*'nin total fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* ekstrelerine göre daha fazla bulunmuştur. YBSK sonuçları da göre de bakılan fenolik bileşiklerin miktarları *H. pseudolaeye*'de genel olarak daha fazladır. Literatür karşılaştırmalarında *H. pseudolaeye* için elde edilen total fenolik, antioksidan aktivite ve YBSK ile bakılan fenolik madde miktarları bu cinsin en bilinen tıbbi bitkisi olan *H. perforatum* türünün değerlerine yakın olarak bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmada çözücü olarak hem metanol hem su kullanılmıştır ve ayrıca sokslet ve maserasyon yöntemleriyle ekstreler elde edilmiştir. Bulgularımız elde edilen 8 farklı ekstre için karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Bu sonuçlara göre bakılan aktiviteler ve kimyasal içerik analizleri için genel olarak farklı çözücüler arasında daha belirgin farklar görülürken birkaç istisnai durum dışında aynı çözücünün ekstraksiyon yöntemleri arasında bu kadar belirgin farklar görülmemiştir. Hücre çizik testi sonuçlarına göre sulu ekstreler en iyi sonucu vermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre insanlar arasında tercih edilen bir kullanım olan sulu ekstrelerin de iyi aktivite gösterdiği ve fenolik bileşenleri içerdiği görülmüştür. Ayrıca maserasyon yöntemi de genel olarak iyi sonuçlar vermiş olup bitki ekstre çalışmalarında kolay ve ucuz bir ekstraksiyon metodu olarak kullanılabilir.

İyi bir yara iyileştirici doğal ürünün en önemli özelliklerinden biri olarak antioksidan aktivitesi ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında bu aktiviteye yer verilmiş ve antioksidan aktiviteden sorumlu ana bileşikler olan fenoliklere odaklanılmıştır. Ancak sonraki çalışmalarda bitkilerde bulunan diğer bileşik sınıfları da değerlendirmeye alınabilir (ör: *Verbascum* türlerinde verbaskozid gibi glioksitler ve *Hypericum* türlerinde hyperforin gibi naftodianthron bileşikler de önemlidir.).

Sonuçlarımız, in vitro hücre çizik testinin, *Hypericum* ve *Verbascum* cinsine ait türlerin yara iyileşme potansiyelini değerlendirmek için ön tarama testi olarak kullanılabileceğini göstermiştir ve bu sonuçlar yayınlanmış in vivo çalışmalarla korelasyon gösterdiğinden, hayvan kullanımını azaltacak niteliktedir.

Bu çalışmanın sonuçları ve literatürde *H. perforatum* ile yapılan çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, (-)-epikateşin molekülünün tek başına veya diğer moleküllerle birlikte sinerjistik etki göstererek *Hypericum* cinsine ait bitkilerin yara iyileştirme aktivitesinde önemli bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında yapılan çalışmalarda da fibroblast hücre göçünü en fazla uyaran ekstrenin diğerlerine göre belirgin derecede daha fazla epikateşin içerdiği görülmüştür. Saf epikateşin ile yapılmış literatürde yer alan birkaç sınırlı çalışma da bu sonuçları destekler niteliktedir. Bu nedenle saf epikateşin molekülünün yara iyileştirici aktiviteleri daha detaylı olarak araştırılmalıdır. Yaptığımız çalışmada ise cinsin diğer türleriyle karşılaştırıldığında *H. pseudolaeye*'nin en fazla epikateşin içeren türlerden biri olduğu görülmüştür.

Tez kapsamında ham ekstreler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular araştırılan iki bitkinin potansiyelini ortaya koymuştur. Sonraki çalışmalarda biyoaktivite rehberli karakterizasyon yaklaşımı ile biyolojik aktivitelerinden sorumlu yara iyileştirmede etkileri olan bileşiklerin saf olarak elde edilmesi ve karakterizasyonlarının yapılması gerekmektedir. *V. stachydifolium* var. *stachydifolium* için literatürde yer alan *in vivo* bulgular ile *in vitro* sonuçlarımız birbirini desteklemiştir. *H. pseudolaeva*'nin ise yara iyileştirici potansiyeli ilk defa bu tez çalışması ile gösterilmiştir ve yapılacak *in vivo* çalışmalar ile bulgular teyit edilmelidir.

Tez çalışması kapsamında araştırılan ekstrelerin yara iyileştirici özelliklerinin anlaşılmasına yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Doğal ürünler yara iyileştirici etkilerini moleküler seviyede genellikle kollajen sentezini arttırarak veya sitokinleri etkileyerek gösterebilmektedir. Bu çalışmada iki türün özellikle sitokin seviyelerini (VEGF, TGF- $\beta$ 1, FGF-7) etkilediği ortaya koyulmuştur. Yapılacak *in vivo* ve *in vitro* diğer çalışmalarda sitokinlere de odaklanılması biyolojik aktivitenin moleküler mekanizmasının aydınlatılması için faydalı olacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Agyare, C., Bekoe, E.O., Boakye, Y.D., Dapaah, S.O., Appiah, T., and Bekoe, S.O. (2016). Medicinal Plants and Natural Products with Demonstrated Wound Healing Properties, in *Wound Healing - New insights into Ancient Challenges*, 487–535.
2. Özkorkmaz, E.G., and Özay, Y. (2009). Yara İyileşmesi ve Yara İyileşmesinde Kullanılan Bazı Bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2 (2), 63–67.
3. Berk, A., Dokumacı, A.H., and Kaymaz, M.B. (2014). Yara İyileşmesi Ve Diyabetik Yara Tedavisinde Kullanılan Tıbbi Bitkiler. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 23 (3), 99–103.
4. Crockett, S.L., and Robson, N.K.B. (2011). Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5 (Special Issue 1), 1–13.
5. Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., and Babaç, T. (2012). *List of Turkish Flora (Vascular Plants)*, Nezahat Gökyiğit Botanical Garden and Flora Research Society.
6. Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yilmazer, D., Baykal, T., Kırmızıbekmez, H., Alper, M., and Yeşilada, E. (2010). Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 127 (2), 468–477.
7. Süntar, I., Akkol, E.K., Keleş, H., Oktem, A., Başer, K.H.C., and Yeşilada, E. (2011). A novel wound healing ointment: A formulation of *Hypericum perforatum* oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 134 (1), 89–96.
8. Altan, A., Damlar, İ., Aras, M.H., and Alparslan, C. (2015). Sarı Kantaronun (*Hypericum perforatum*) Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi. *Çukurova Ü. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24 (4), 578–591.
9. Mukherjee, P.K., Verpoorte, R., and Suresh, B. (2000). Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 70 (3), 315–321.
10. Esra, E.Ö., and Afife, M. (2013). An overview on *Hypericum* species of Turkey. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5 (3), 38–46.
11. Ozkan, G., Kamiloglu, S., Ozdal, T., Boyacioglu, D., and Capanoglu, E. (2016). Potential use of Turkish medicinal plants in the treatment of various diseases. *Molecules*, 21 (3), 1–32.
12. Süntar, I., Tatlı, I.I., Küpeli Akkol, E., Keleş, H., Kahraman, Ç., and Akdemir, Z. (2010). An ethnopharmacological study on *Verbascum* species: From conventional wound healing use to scientific verification. *Journal of Ethnopharmacology*, 132 (2), 408–413.
13. Demirci, S., Doğan, A., Demirci, Y., and Şahin, F. (2014). In vitro wound healing activity of methanol extract of *Verbascum speciosum*. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 7 (3), 37–44.

14. Akdemir, Z., Kahraman, Ç., Tatlı, I.I., Küpeli Akkol, E., Süntar, I., and Keles, H. (2011). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory, antinociceptive and wound healer glycosides from the flowers of *Verbascum mucronatum* Lam. *Journal of Ethnopharmacology*, 136 (3), 436–443.
15. Saraç, D.U., Özkan, Z.C., and Akbulut, S. (2013). Ethnobotanic features of Rize/Turkey province. *Biological Diversity and Conservation*, 6 (3), 57–66.
16. Shah, A., and Amini-Nik, S. (2017). The Role of Phytochemicals in the Inflammatory Phase of Wound Healing. *International journal of molecular sciences*, 18 (5), 1-17.
17. İnternet: HealthCare, S. (2017). URL: <http://www.shieldhealthcare.com/community/popular/2015/12/18/how-wounds-heal-the-4-main-phases-of-wound-healing/>. Son erişim tarihi: 25.07.2017.
18. Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M.B.C., and Schallmoser, K. (2016). Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation. *Biomaterials*, 76, 371–387.
19. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Perspective Article: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16 (5), 585–601.
20. Suguna, L., Sivakumar, P., and Chandrakasan, G. (1996). Effects of *Centella asiatica* extract on dermal wound healing in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 34 (12), 1208–11.
21. Kim, Z.-H., Kim, S.-M., Park, J.H., Park, C.-M., Choi, H.-Y., Lee, H., Park, J.K., Kwon, S., Kim, D.-I., Chang, K.-H., Choi, Y.-S., and Lim, S.-M. (2016). Evaluation of the Wound-healing Activity of Rice Cell Extracts *in vitro*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 44 (3), 285–292.
22. Maquart, F.-X., Bellon, G., Gillery, P., Wegrowski, Y., and Borel, J.-P. (1990). Stimulation of Collagen Synthesis in Fibroblast Cultures by a Triterpene Extracted from *Centella Asiatica*. *Connective Tissue Research*, 24 (2), 107–120.
23. Wang, R., Lechtenberg, M., Sendker, J., Petereit, F., Deters, A., and Hensel, A. (2013). Wound-healing plants from TCM: *in vitro* investigations on selected TCM plants and their influence on human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Fitoterapia*, 84 (1), 308–317.
24. Ghuman, S., Ncube, B., Finnie, J.F., McGaw, L.J., Cooposamy, R.M., and Van Staden, J. (2016). Antimicrobial Activity, Phenolic Content, and Cytotoxicity of Medicinal Plant Extracts Used for Treating Dermatological Diseases and Wound Healing in KwaZulu-Natal, South Africa. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 1–9.
25. Deters, A., Dauer, A., Schnetz, E., Fartasch, M., and Hensel, A. (2001). High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from Hamamelis virginiana bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*, 58 (6), 949–958.



26. Deters, A.M., Schröder, K.R., Smiatek, T., and Hensel, A. (2005). Ispaghula (*Plantago ovata*) Seed Husk Polysaccharides Promote Proliferation of Human Epithelial Cells (Skin Keratinocytes and Fibroblasts) via Enhanced Growth Factor Receptors and Energy Production. *Planta Medica*, 71 (1), 33–39.
27. Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., and Bansal, Y.K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9 (3), 293–304.
28. Chah, K.F., Eze, C.A., Emuelosi, C.E., and Esimone, C.O. (2006). Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 104 (1–2), 164–167.
29. Reddy, J.S., Rao, P.R., and Reddy, M.S. (2002). Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* and *Acalypha indica* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 79 (2), 249–251.
30. Karodi, R., Jadhav, M., Rub, R., and Bafna, A. (2009). Evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Rubia cordifolia* L. (Indian madder) in mice. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 2 (2), 12–18.
31. Arunachalam, K.D., and Subhashini, S. (2011). Preliminary phytochemical investigation and wound healing activity of *Myristica andamanica* leaves in Swiss albino mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (7), 1095–1106.
32. Ghosh, S., Samanta, A., Mandal, N.B., Bannerjee, S., and Chattopadhyay, D. (2012). Evaluation of the wound healing activity of methanol extract of *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit leaf and its isolated active constituents in topical formulation. *Journal of Ethnopharmacology*, 142 (3), 714–722.
33. Anitua, E., Pino, A., and Orive, G. (2016). Plasma rich in growth factors promotes dermal fibroblast proliferation, migration and biosynthetic activity. *Journal of Wound Care*, 25 (11), 680–687.
34. Park, J., Hong, Y., Kwon, S.H., Park, J., and Lee, H. (2016). Anti-aging effects of *Piper cambodianum* P. Fourn. extract on normal human dermal fibroblast cells and a wound-healing model in mice. *Clinical Interventions in Aging*, Volume 11, 1017–1026.
35. Harishkumar, M., Masatoshi, Y., Hiroshi, S., Tsuyomu, I., and Masugi, M. (2013). Revealing the mechanism of in vitro wound healing properties of *Citrus tamurana* extract. *BioMed research international*, 1–8.
36. Adetutu, A., Morgan, W.A., and Corcoran, O. (2011). Ethnopharmacological survey and in vitro evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (1), 50–56.
37. Agyare, C., Asase, A., Lechtenberg, M., Niehues, M., Deters, A., and Hensel, A. (2009). An ethnopharmacological survey and in vitro confirmation of ethnopharmacological use of medicinal plants used for wound healing in Bosomtwi-Atwima-Kwanwoma area, Ghana. *Journal of Ethnopharmacology*, 125 (3), 393–403.

38. Muhammad, A.A., Pauzi, N.A.S., Arulselvan, P., Abas, F., and Fakurazi, S. (2013). In Vitro Wound Healing Potential and Identification of Bioactive Compounds from *Moringa oleifera* Lam. *BioMed Research International*, 1–10.
39. Amali Muhammad, A., Fakurazi, S., Arulselvan, P., See, C.P., and Abas, F. (2016). Evaluation of wound healing properties of bioactive aqueous fraction from *Moringa oleifera* Lam on experimentally induced diabetic animal model. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1715.
40. Balekar, N., Katkam, N.G., Nakpheng, T., Jehtae, K., and Srichana, T. (2012). Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 141 (3), 817–824.
41. Balekar, N., Nakpheng, T., Katkam, N.G., and Srichana, T. (2012). Wound healing activity of ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Phytomedicine*, 19 (13), 1178–1184.
42. Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., and Merfort, I. (2009). Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 126 (3), 463–467.
43. Hormozi, M., Assaei, R., and Boroujeni, M.B. (2017). The effect of *Aloe vera* on the expression of wound healing factors (TGFβ1 and bFGF) in mouse embryonic fibroblast cell: In vitro study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 610–616.
44. Lee, J.-H., Kim, H.-L., Lee, M.H., You, K.E., Kwon, B.-J., Seo, H.J., and Park, J.-C. (2012). Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vitro wound healing model. *Phytomedicine*, 19 (13), 1223–1227.
45. Negahdari, S., Galehdari, H., Kesmati, M., Rezaie, A., and Shariati, G. (2017). Wound healing activity of extracts and formulations of aloe vera, henna, adiantum capillus-veneris, and myrrh on mouse dermal fibroblast cells. *International Journal of Preventive Medicine*, 8 (1), 18.
46. Ozgen, U., Ikbali, M., Hacimuftuoglu, A., Houghton, P.J., Gocer, F., Dogan, H., and Coskun, M. (2006). Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of *Onosma argentatum* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 104 (1–2), 100–103.
47. Öztürk, N., Korkmaz, S., and Öztürk, Y. (2007). Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 111 (1), 33–39.
48. Ermertcan, A.T., Inan, S., Ozturkcan, S., Bilac, C., and Cilaker, S. (2008). Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: An immunohistochemical and histopathological study. *Wound Repair and Regeneration*, 16 (5), 674–681.
49. Akkol, E.K., Koca, U., Peşin, I., Yilmazer, D., Toker, G., and Yeşilada, E. (2009). Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by in vivo models. *Journal of Ethnopharmacology*, 124 (1), 137–141.
50. Akkol, E.K., and Ercil, D. (2009). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of some *Linaria* species from Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 47 (3), 188–194.

51. Akkol, E.K., Güvenç, A., and Yesilada, E. (2009). A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *Journal of Ethnopharmacology*, 125 (2), 330–336.
52. Koca, U., Süntar, I.P., Keles, H., Yesilada, E., and Akkol, E.K. (2009). In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. *Journal of Ethnopharmacology*, 126 (3), 551–556.
53. Akkol, E.K., Koca, U., Pesin, I., and Yilmazer, D. (2011). Evaluation of the Wound Healing Potential of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae) by In Vivo Excision and Incision Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1–7.
54. Akkol, E.K., Süntar, I., Keles, H., and Yesilada, E. (2011). The potential role of female flowers inflorescence of *Typha domingensis* Pers. in wound management. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (3), 1027–1032.
55. Süntar, I., Koca, U., Keleş, H., and Akkol, E.K. (2011). Wound Healing Activity of *Rubus sanctus* Schreber (Rosaceae): Preclinical Study in Animal Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1–6.
56. Küpeli Akkol, E., Acıkara, O.B., Süntar, I., Citoğlu, G.S., Keleş, H., and Ergene, B. (2011). Enhancement of wound healing by topical application of *Scorzonera* species: Determination of the constituents by HPLC with new validated reverse phase method. *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (2), 1018–1027.
57. Peşin Süntar, I., Koca, U., Küpeli Akkol, E., Yilmazer, D., and Alper, M. (2011). Assessment of Wound Healing Activity of the Aqueous Extracts of *Colutea cilicica* Boiss. & Bal. Fruits and Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–7.
58. Süntar, I., Akkol, E.K., Enol, F.S., Keles, H., and Orhan, I.E. (2011). Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using *in vivo* and *in vitro* experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 135 (1), 71–77.
59. Süntar, İ., Baldemir, A., Coşkun, M., Keleş, H., and Akkol, E.K. (2011). Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 135 (1), 63–70.
60. Tumen, I., Akkol, E.K., Süntar, I., and Keleş, H. (2011). Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: Preclinical experimental research in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (3), 1215–1220.
61. Güvenç, A., Küpeli Akkol, E., Hürkul, M.M., Süntar, İ., and Keleş, H. (2012). Wound healing and anti-inflammatory activities of the *Michauxia* L'Hérit (Campanulaceae) species native to Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 139 (2), 401–408.
62. Küpeli Akkol, E., Süntar, I., Fafal Erdoğan, T., Keleş, H., Mert Gonenç, T., and Kırçak, B. (2012). Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 139 (2), 478–484.

63. Süntar, I., Küpeli Akkol, E., Keles, H., Yesilada, E., Sarker, S.D., Arroo, R., and Baykal, T. (2012). Efficacy of *Daphne oleoides* subsp. *kurdica* used for wound healing: Identification of active compounds through bioassay guided isolation technique. *Journal of Ethnopharmacology*, 141 (3), 1058–1070.
64. Süntar, I., Küpeli Akkol, E., Keles, H., Yesilada, E., Sarker, S.D., and Baykal, T. (2012). Comparative evaluation of traditional prescriptions from *Cichorium intybus* L. for wound healing: Stepwise isolation of an active component by in vivo bioassay and its mode of activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 143 (1), 299–309.
65. Süntar, I., Tumen, I., Ustün, O., Keleş, H., and Küpeli Akkol, E. (2012). Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by in vivo and in vitro experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 139 (2), 533–540.
66. Tumen, I., Süntar, I., Keleş, H., and Küpeli Akkol, E. (2012). A Therapeutic Approach for Wound Healing by Using Essential Oils of *Cupressus* and *Juniperus* Species Growing in Turkey. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–7.
67. Satar Gül, N.Y., Topal, A., Yanık, K., Oktay, A., Batmaz, E., and İnan, K. (2013). Comparison of the Effects of Bitter Melon (*Momordica charantia*) and Gotu Kola (*Centella asiatica*) Extracts on Healing of Open Wounds in Rabbits. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 161–166.
68. Renda, G., Yalçın, F.N., Nemutlu, E., Akkol, E.K., Süntar, I., Keleş, H., İna, H., Çalış, I., and Ersöz, T. (2013). Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium* L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients. *Journal of Ethnopharmacology*, 148 (2), 423–432.
69. Süntar, I., Küpeli Akkol, E., Keles, H., Yesilada, E., and Sarker, S.D. (2013). Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component. *Journal of Ethnopharmacology*, 149 (1), 103–110.
70. Pişkin, A., Altunkaynak, B.Z., Tümentemur, G., Kaplan, S., Yazıcı, Ö.B., and Hökelek, M. (2014). The beneficial effects of *Momordica charantia* (bitter gourd) on wound healing of rabbit skin. *Journal of Dermatological Treatment*, 25 (4), 350–357.
71. Süntar, I., Akkol, E.K., Keles, H., Yesilada, E., Sarker, S., and Baykal, T. (2014). *Daphne oleoides* Schreber ssp. *oleoides* exhibits potent wound healing effect: Isolation of the active components and elucidation of the activity mechanism. *Records of Natural Products*, 8 (2), 93–109.
72. Süntar, I., Küpeli Akkol, E., Tosun, A., and Keleş, H. (2014). Comparative pharmacological and phytochemical investigation on the wound-healing effects of the frequently used essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26 (1), 41–49.
73. Agar, O.T., Dikmen, M., Ozturk, N., Yilmaz, M.A., Temel, H., and Turkmenoglu, F.P. (2015). Comparative studies on phenolic composition, antioxidant, wound healing and cytotoxic activities of selected *Achillea* L. species growing in Turkey. *Molecules*, 20 (10), 17976–18000.

74. Akkol, E.K., Süntar, I., Keleş, H., Sezik, E., and Gürler, G. (2015). Bioassay-guided isolation and characterization of wound healer compounds from *Morus nigra* L. (moraceae). *Records of Natural Products*, 9 (4), 484–495.
75. İlhan, M., Bolat, I.E., Süntar, I., Kutluay Köklü, H., Uğar Çankal, D.A., Keleş, H., and Küpeli Akkol, E. (2015). Topical application of olive oil macerate of *Momordica charantia* L. promotes healing of excisional and incisional wounds in rat buccal mucosa. *Archives of Oral Biology*, 60 (12), 1708–1713.
76. İpek, S., Esra, K.A., Tuba, M.G., Tuğçe, F.E., Hikmet, K., and Bijen, K. (2015). Scientific Assessment of the Anti-Inflammatory and Wound Healing Potential of *Campanula lyrata* subsp. *lyrata*, A Turkish Folk Remedy. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12 (2), 157–168.
77. Küpeli Akkol, E., Süntar, I., İlhan, M., and Aras, E. (2015). In vitro enzyme inhibitory effects of *Rubus sanctus* Schreber and its active metabolite as a function of wound healing activity. *Journal of Herbal Medicine*, 5 (4), 207–210.
78. Aksoy, H., Sen, A., Sancar, M., Sekerler, T., Akakin, D., Bitis, L., Uras, F., Kultur, S., and Izzettin, F.V. (2016). Ethanol extract of *Cotinus coggygria* leaves accelerates wound healing process in diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 54 (11), 2732–2736.
79. Çoban, Z.D., Yener, M., Benli, A.S., Amanov, K., Altaylı, E., Demir, H., Kılıçarslan, Ö., Çavana, E., and Güran, Ş. (2016). Molecular view to the effect of centaury oil on wound healing Kantaron yağının yara iyileşmesi üzerine olan etkisine moleküler bakış. *Cumhuriyet Medical Journal*, 38 (4), 231–239.
80. Eruygur, N., Yılmaz, G., Kutsal, O., Yücel, G., and Üstün, O. (2016). Bioassay-guided isolation of wound healing active compounds from *Echium* species growing in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 370–376.
81. Bağci, E., and Yuce, E. (2010). The essential oils of the aerial parts of two *Hypericum* (*Hypericum pseudolaeye* Robson and *Hypericum thymbrifolium* Boiss. & Noe) (Guttiferae) species from Turkey. *Journal Essential Oil Bearing Plants*, 13 (4), 390–397.
82. Eroğlu Özkan, E., Özsoy, N., Yılmaz-Ozden, T., Özhan, G., and Mat, A. (2018). Evaluation of Chemical Composition and In-vitro Biological Activities of Three Endemic *Hypericum* Species from Anatolia (*H. thymbrifolium*, *H. spectabile* and *H. pseudolaeye*). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17 (3), 1036–1046.
83. Demirci, B., Baser, K.H.C., Crockett, S.L., and Khan, I.A. (2005). Analysis of the Volatile Constituents of Asian *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hyperidoideae) Species. *Journal of Essential Oil Research*, 17 (6), 659–663.
84. Bağci, E., and Yuce, E. (2011). Composition of the essential oil of *Hypericum salsolifolium* Hand.- Mazz. and *Hypericum retusum* Aucher from Turkey. *Acta Botanica Gallica*, 158 (2), 169–173.
85. Ahmed, M., Djebli, N., Aissat, S., Khiati, B., Douichene, S., Meslem, A., and Berrani, A. (2013). Composition of Essential Oils from Five Endemic *Hypericum* Species of Turkey. *Organic Chemistry: Current Research*, 2 (1), 1–5.

86. Özkan, E.E., Demirci, B., Güner, Ç.Ü., Kültür, Ş., Mat, A., and Başer, K.H.C. (2013). Essential Oil Composition of Five Endemic *Hypericum* Species from Turkey. *Medicinal & Aromatic Plants*, 02 (02), 2–5.
87. Ganzera, M., Zhao, J., and Khan, I.A. (2002). *Hypericum perforatum*—Chemical profiling and quantitative results of St. John's Wort products by an improved high-performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91 (3), 623–630.
88. Çirak, C., Ivanauskas, L., Janulis, V., and Radušienė, J. (2009). Chemical constituents of *Hypericum adenotrichum* Spach, an endemic Turkish species. *Natural Product Research*, 23 (13), 1189–1195.
89. Kirmizibekmez, H., Bassarello, C., Piacente, S., Celep, E., Atay, I., Mercanoğlu, G., and Yeşilada, E. (2009). Phenolic compounds from *Hypericum calycinum* and their antioxidant activity. *Natural product communications*, 4 (4), 531–534.
90. Franchi, G.G., Nencini, C., Collavoli, E., and Massarelli, P. (2011). Composition and antioxidant activity in vitro of different St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (17), 4349–4353.
91. Çirak, C., Radušienė, J., Karpaviciene, B., Çamaş, N., and Odabaş, M.S. (2013). Changes in phenolic content of wild and greenhouse-grown *Hypericum triquetrifolium* during plant development. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37 (3), 307–314.
92. Derun, E.M., Eslek, Z., and Piskin, S. (2013). Extraction and Analysis of *Hypericum perforatum* L. from Turkey. *International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, 7 (7), 72–76.
93. Camas, N., Radusiene, J., Stanius, Z., Caliskan, O., and Cirak, C. (2012). Secondary Metabolites of *Hypericum leptophyllum* Hochst., an Endemic Turkish Species. *The Scientific World Journal*, 1–4.
94. Cirak, C., Radusiene, J., Jakstas, V., Ivanauskas, L., Seyis, F., and Yayla, F. (2016). Secondary metabolites of seven *Hypericum* species growing in Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 54 (10), 2244–2253.
95. Kahraman, C., Akdemir, Z.S., and Tatlı, İ.İ. (2012). Promising Cytotoxic Activity Profile , Biological Activities and Phytochemical Screening of *Verbascum* L . Species. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 6 (2), 63–75.
96. Akdemir, Z.S., Tatlı, İ.İ., Bedir, E., and Khan, I.A. (2003). Antioxidant Flavonoids from *Verbascum salviifolium* Boiss. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 71–75.
97. Akdemir, Z.Ş., Tatlı, İ.İ., Bedir, E., and Khan, I.A. (2004). Neolignan and phenylethanoid glycosides from *Verbascum salviifolium* boiss. *Turkish Journal of Chemistry*, 28 (5), 621–628.
98. Tatlı, İ.İ., Schuhly, W., and Akdemir, Z.S. (2007). Secondary Metabolites from Bioactive Methanolic Extract of *Verbascum pycnostachyum* Boiss. & Helder Flowers. *Hacettepe University Journal Of The Faculty Of Pharmacy*, 27 (1), 23–32.

99. Ozcan, B., Esen, M., Caliskan, M., Mothana, R.A., Cihan, A.C., and Yolcu, H. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of the various extracts of *Verbascum pinetorum* Boiss. O. Kuntze (Scrophulariaceae). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15 (8), 900–905.
100. Davis, P.H. (edit. . *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh Univ. press., Edinburgh.
101. Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
102. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65 (1–2), 55–63.
103. Aliyu, A.B., Ibrahim, M.A., Musa, A.M., Musa, A.O., Kiplimo, J.J., and Oyewale, A.O. (2013). Free radical scavenging and total antioxidant capacity of root extracts of *Anchomanes Difformis* ENGL. (ARACEAE). *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*.
104. Magnusson, B., and Örnemark, U. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.
105. Felice, F., Zambito, Y., Belardinelli, E., Fabiano, A., Santoni, T., and Di Stefano, R. (2015). Effect of different chitosan derivatives on in vitro scratch wound assay: a comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 236–241.
106. Öz, B.E., İlhan, M., Özbilgin, S., Akkol, E.K., Acıkara, Ö.B., Saltan, G., Keleş, H., and Süntar, I. (2016). Effects of *Alchemilla mollis* and *Alchemilla persica* on the wound healing process. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11 (3), 577–584.
107. Alali, F.Q., Tawaha, K., Tamam, E.-E., Syouf, M., Mosa, E.-F., Khaled, A., Joy Nielsen, S., Wheaton, W., Falkinham, J., and Oberlies, N. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants : an ICBG project. 21 (12), 1121–1131.
108. Mihailovic, V., Kreft, S., Benkovic, E.T., and Ivanovic, N. (2016). Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. *Industrial Crops and Products*, 89, 141–151.
109. Zou, Y., Lu, Y., and Wei, D. (2004). Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (16), 5032–5039.
110. Çırak, C., Radusiene, J., Jakstas, V., Ivanauskas, L., Yayla, F., Seyis, F., and Camas, N. (2016). Secondary metabolites of *Hypericum* species from the Drosanthe and Olympia sections. *South African Journal of Botany*, 104, 82–90.
111. Şeker Karatoprak, G., Yücel, Ç., Kaytan, H.Ç., İlğün, S., Köngül Şafak, E., and Koşar, M. (2019). Antioxidant and Cytotoxic Activities of Aerial and Underground Parts of *Hypericum Scabrum* L. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 1–7.

112. Ccana-ccapatinta, G. V, Serrano, C., Urrunaga, E.J., Crockett, S.L., Choquenaira, J., Sa, W.G., Poser, G.L. Von, and Jimenez, C. (2014). Phytochemistry Letters Assessing the phytochemical profiles and antidepressant-like activity of four Peruvian *Hypericum* species using the murine forced swimming test. 10, 107–112.
113. Kumar, S., Yadav, A., Yadav, M., and Yadav, J.P. (2017). Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f. *BMC Research Notes*, 10 (1), 60.
114. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Ri, A., Simoni, M., and Zeljko Kne (2005). Phenols , proanthocyanidins , flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191–198.
115. Kızıl, G., Kızıl, M., Yavuz, M., Emen, S., and Hakimoğlu, F. (2008). Antioxidant Activities of Ethanol Extracts of *Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum scabroides*. 46 (4), 231–242.
116. Keskin, C. (2015). Antioxidant, Anticancer and Anticholinesterase Activities of Flower, Fruit and Seed Extracts of *Hypericum amblysepalum* HOCHST. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*.
117. Turker, A.U., Camper, N.D., and Gürel, E. (2004). High-Performance Liquid Chromatographic Determination of A Saponin from *Verbascum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 18 (1), 54–59.
118. Grigore, A., Colceru-Mihul, S., Litescu, S., Panteli, M., and Rasit, I. (2013). Correlation between polyphenol content and anti-inflammatory activity of *Verbascum phlomoides* (mullein). *Pharmaceutical Biology*, 51 (7), 925–929.
119. Klimek, B., Olszewska, M.A., and Magdalena, T. (2010). Simultaneous determination of flavonoids and phenylethanoids in the flowers of *Verbascum densiflorum* and *V. phlomoides* by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 21, 150–156.
120. Caliskan, B., Ozcan, M., and Yilmaz, M. (2010). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Various Extracts of *Verbascum antiochium* Boiss. (Scrophulariaceae). *Journal of medicinal food*, 13 (5), 1147–1152.
121. Armatu, A., Bodırlau, R., Nechita, C.B., Niculaua, M., Teaca, C.A., Ichim, M., and Spiridon, I. (2011). Characterization of biological active compounds from *Verbascum phlomoides* by chromatography techniques . I . Gas chromatography. *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (4), 6297–6304.
122. Barış, D., Kızıl, M., Aytekin, Ç., Kızıl, G., Yavuz, M., Çeken, B., and Ertekin, A.S. (2011). In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Ethanol Extract of Three *Hypericum* and Three *Achillea* Species from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 14 (2), 339–355.
123. Aligiannis, N., Mitaku, S., Tsitsa-Tsardis, E., Catherine, Harvala Ioannis, Tsaknis Stavros, L., and Serko, H. (2003). Methanolic Extract of *Verbascum macrurum* as a Source of Natural Preservatives against Oxidative Rancidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (25), 7308–7312.



124. Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.-C., Kandaswamy, E., Zhou, T., and Zuo, L. (2018). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Frontiers in Physiology*, 9, 477.
125. Çırak, C., and Kurt, D. (2014). Önemli Tıbbi Bitkiler Olarak *Hypericum* Türleri. *Anadolu Journal of Aegean Agricultural Research Institute*, 24 (1), 42–58.
126. Nahrstedt, A., and Butterweck, V. (2010). Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's wort. *J. Nat. Prod*, 73, 1015–1021.
127. Çırak, C., Radusiene, J., Janulis, V., Ivanauskas, L., and Arslan, B. (2007). Chemical Constituents of Some *Hypericum* Species Growing in Turkey. *Journal of Plant Biology*, 50 (6), 632–635.
128. Çırak, C., Radusiene, J., Jakstas, V., Ivanauskas, L., Seyis, F., and Yayla, F. (2016). Secondary metabolites of seven *Hypericum* species growing in Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 59 (10), 2244–2253.
129. Mauri, P., and Pietta, P. (2000). High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of *Hypericum perforatum* extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.
130. Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O., and Dias, A.C.P. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*, 90 (1–2), 157–167.
131. Ayan, A.K., Radušienė, J., Çırak, C., Ivanauskas, L., and Janulis, V. (2009). Secondary metabolites of *Hypericum scabrum* and *Hypericum bupleuroides*. *Pharmaceutical Biology*, 47(9): 847-853.
132. Öztürk, N., Tunçel, M., and Potoğlu-Erkara, İ. (2009). Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species: A comparative study with *H. perforatum*, compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species. *Pharmaceutical Biology*, 47(2): 120-127.
133. Bernatova, I. (2018). Biological activities of (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. *Biotechnology Advances*. *Biotechnology Advances*, 36 (3), 666–681.
134. Kim, W.-S., Park, B.-S., Sung, J.-H., Yang, J.-M., Park, S.-B., Kwak, S.-J., and Park, J.-S. (2007). Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 48 (1), 15–24.
135. Khosravitabar, F., Abrishamchi, P., Bahrami, A.R., Matin, M.M., Ejtehad, H., and Varasteh-Kojourian, M. (2017). Enhanced Cutaneous Wound Healing by the Leaf Extract of *Achillea eriophora* D.C. Using the In Vitro Scratch Assay. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 28 (4), 305–312.
136. Dikmen, M., Öztürk, Y., Sagratini, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., and Maggi, F. (2010). Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of *Hypericum perforatum* on cultured NIH3T3 fibroblasts. *Phytotherapy Research*, 25 (2), n/a-n/a.

137. Henrique Bridi, Aline Beckenkamp, Gari Vidal Ccana-Ccapatinta, Sérgio Augusto de Loreto Bordignon, Andréia Buffon, G.L. von P. (2017). Characterization of Phloroglucinol-enriched Fractions of Brazilian Hypericum Species and Evaluation of Their Effect on Human Keratinocytes Proliferation. *Phytotherapy Research*, 31 (1), 62–68.
138. Tatlı, İ., and Akdemir, Z. (2006). Cytotoxic Activity on Some Verbascum Species Growing in Turkey. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy.*, 26 (2), 77–85.
139. Tatlı, I.I., Erdoğan, T.F., Kahraman, C., Kıvcak, B., and Akdemir, Z.S. (2008). Brine Shrimp Lethality Bioassay of Some Verbascum Species Growing In Turkey. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33, 193–198.
140. Kapoor, M., Howard, R., Hall, I., and Appleton, I. (2004). Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. *American Journal of Pathology*, 165 (1), 299–307.
141. Bagdas, D., Gul, N.Y., Topal, A., Tas, S., Ozyigit, M.O., Cinkilic, N., Gul, Z., Etoz, B.C., Ziyank, S., Inan, S., Turacozen, O., and Gurun, M.S. (2014). Pharmacologic overview of systemic chlorogenic acid therapy on experimental wound healing. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387 (11), 1101–1116.
142. Seo, S.H., Lee, S.-H., Cha, P.-H., Kim, M.-Y., Min, D.S., and Choi, K.-Y. (2016). Polygonum aviculare L. and its active compounds, quercitrin hydrate, caffeic acid, and rutin, activate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and induce cutaneous wound healing. *Phytotherapy Research*, 30 (5), 848–854.
143. Sayar, H., Gergerlioglu, N., Seringec, N., Ozturk, P., Bulbuloglu, E., and Karabay, G. (2014). Comparison of efficacy of topical phenytoin with hypericin in second-degree burn wound healing: an experimental study in rats. *Medical Science Monitor Basic Research*, 20, 36–46.
144. Zanolli, P. (2006). Role of Hyperforin in the Pharmacological Activities of St. John's Wort. *CNS Drug Reviews*, 10 (3), 203–218.
145. Gill, S.E., and Parks, W.C. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40 (6), 1334–1347.
146. Tsirogianni, A.K., Moutsopoulos, N.M., and Moutsopoulos, H.M. (2006). Wound healing: Immunological aspects. *Injury*, 37 (1).
147. Martin, P. (1997). Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 276 (5309), 75–81.
148. Pierce, G.F., Tarpley, J.E., Yanagihara, D., Mustoe, T.A., Fox, G.M., and Thomason, A. (1992). Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *The American Journal of Pathology*, 140 (6), 1375–88.

149. Çiçek, M., Yilmaz, G., Demirci, B., and Başer, K.H.C. (2014). Essential Oil Compositions of Subspecies of *Scutellaria brevibracteata* Stapf from Turkey. *International Journal of Secondary Metabolite*, 1 (1).
150. Ganeshkumar, M., Ponrasu, T., Krithika, R., Iyappan, K., Gayathri, V.S., and Suguna, L. (2012). Topical application of *Acalypha indica* accelerates rat cutaneous wound healing by up-regulating the expression of Type I and III collagen. *Journal of Ethnopharmacology*, 142 (1), 14–22.
151. Park, J.J., Hong, Y., Kwon, S.H., Park, J.J., and Lee, H. (2016). Anti-aging effects of *Piper cambodianum* P. Fourn. extract on normal human dermal fibroblast cells and a wound-healing model in mice. *Clinical Interventions in Aging*, Volume 11 (August), 1017–1026.
152. Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P.Y.G., and Wu, Y. (2008). Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PLoS ONE*, 3 (4), 1886.
153. Paegeon, H., Zucchi, H., and Asselineau, D. (2012). Distinct and complementary roles of papillary and reticular fibroblasts in skin morphogenesis and homeostasis. *European Journal of Dermatology*, 22 (3), 324–332.
154. Lafosse, A., Dufey, C., Beauloye, C., Horman, S., and Dufrane, D. (2016). Impact of Hyperglycemia and Low Oxygen Tension on Adipose-Derived Stem Cells Compared with Dermal Fibroblasts and Keratinocytes: Importance for Wound Healing in Type 2 Diabetes. *PLOS ONE*, 11 (12), e0168058.
155. Niu, J., Chang, Z., Peng, B., Xia, Q., Lu, W., Huang, P., Tsao, M.-S.M.-S., and Chiao, P.J. (2007). Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (9), 6001–6011.
156. Robson, M.C., Phillips, T.J., Falanga, V., Odenheimer, D.J., Parish, L.C., Jensen, J.L., and Steed, D.L. (2001). Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 9 (5), 347–352.
157. Werner, S., Peters, K.G., Longaker, M.T., Fuller-Pace, F., Banda, M.J., and Williams, L.T. (1992). Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (15), 6896–6900.
158. Frank, S., Hbner, G., Breier, G., Longaker, M.T., Greenhalgh, D.G., and Werner, S. (1995). Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Cultured Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (21), 12607–12613.
159. David-Raoudi, M., Tranchepain, F., Deschrevel, B., Vincent, J.-C., Bogdanowicz, P., Boumediene, K., and Pujol, J.-P. (2008). Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: Relation to wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16 (2), 274–287.

160. Ashcroft, G.S., Dodsworth, J., Boxtel, E. Van, Tarnuzzer, R.W., Horan, M.A., Schultz, G.S., and Ferguson, M.W.J. (1997). Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- $\beta$ 1 levels. *Nature Medicine*, 3 (11), 1209–1215.
161. Lee, H.-S., Kooshesh, F., Sauder, D., and Kondo, S. (1997). Modulation of TGF-beta 1 production from human keratinocytes by UVB. *Experimental Dermatology*, 6 (2), 105–110.
162. Wu, L., Yu, Y.L., Galiano, R.D., Roth, S.I., and Mustoe, T.A. (1997). Macrophage Colony-Stimulating Factor Accelerates Wound Healing and Upregulates TGF- $\beta$ 1 mRNA Levels through Tissue Macrophages. *Journal of Surgical Research*, 72 (2), 162–169.
163. Mani, H., Sidhu, G.S., Kumari, R., Gaddipati, J.P., Seth, P., and Maheshwari, R.K. (2002). Curcumin differentially regulates TGF-beta1, its receptors and nitric oxide synthase during impaired wound healing. *BioFactors (Oxford, England)*, 16 (1–2), 29–43.
164. Eppley, B.L., Woodell, J.E., and Higgins, J. (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 114 (6), 1502–1508.
165. Rolfe, K.J., Richardson, J., Vigor, C., Irvine, L.M., Grobbelaar, A.O., and Linge, C. (2007). A Role for TGF- $\beta$ 1-Induced Cellular Responses during Wound Healing of the Non-Scarring Early Human Fetus. *Journal of Investigative Dermatology*, 127 (11), 2656–2667.
166. Werner, S., Krieg, T., and Smola, H. (2007). Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 127 (5), 998–1008.
167. Igotz, R., and Massagué, J. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry*, 261 (9), 4337–4345.
168. Raghow, R., Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L., and Kang, A.H. (1987). Rapid Publication Transforming Growth Factor- $\alpha$  Increases Steady State Levels of Type I Procollagen and Fibronectin Messenger RNAs Posttranscriptionally in Cultured Human Dermal Fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation*, 79, 1285–1288.
169. Kane, C.J.M., Hebda, P.A., Mansbridge, J.N., and Hanawalt, P.C. (1991). Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, 148 (1), 157–173.
170. Colwell, A.S., Phan, T.-T., Kong, W., Longaker, M.T., and Lorenz, P.H. (2005). Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 116 (5), 1387–1391.

171. Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D.M., and Grotendorst, G.R. (1993). Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Molecular Biology of the Cell*, 4 (6), 637–645.
172. Grotendorst, G.R., Okochi, H., and Hayashi, N. (1996). A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 7 (4), 469–80.
173. Gopalakrishnan, A., Ram, M., Kumawat, S., Tandan, S.K., and Kumar, D. (2016). Quercetin accelerated cutaneous wound healing in rats by increasing levels of VEGF and TGF- $\beta$ 1. *Indian Journal of Experimental Biology*, 54, 187–195.
174. Liu, H., Lin, S., Xiao, D., Zheng, X., Gu, Y., and Guo, S. (2013). Evaluation of the Wound Healing Potential of Resina Draconis (*Dracaena cochinchinensis*) in Animal Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–10.
175. Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M.S., Ehrlich, H.P., and Brem, H. (2009). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, 153 (2), 347–358.
176. Chakroborty, D., Sarkar, C., Lu, K., Bhat, M., Dasgupta, P.S., and Basu, S. (2016). Activation of Dopamine D1 Receptors in Dermal Fibroblasts Restores Vascular Endothelial Growth Factor-A Production by These Cells and Subsequent Angiogenesis in Diabetic Cutaneous Wound Tissues. *The American Journal of Pathology*, 186 (9), 2262–2270.
177. Brown, B.L.F., Yeo, K.T., Berse, B., Yeo, T., Senger, D.R., and Dvorak, H.F. (1992). Expression of Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) by Epidermal Keratinocytes during Wound Healing. *Journal of Experimental Medicine*, 176, 1376–1379.
178. Nissen, N.N., Polverini, P.J., Koch, A.E., Volin, M. V, Gamelli, R.L., and DiPietro, L.A. (1998). Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American Journal of Pathology*, 152 (6), 1445–52.
179. Hurley, J.R., Balaji, S., and Narmoneva, D.A. (2010). Complex temporal regulation of capillary morphogenesis by fibroblasts. *AJP: Cell Physiology*, 299 (2), C444–C453.
180. Iijima, E., Daichi Toyoda, D., Yamamoto, A., Kuroyanagi, M., and Yoshimitsu Kuroyanagi, Y. (2014). In Vitro Analysis of VEGF and HGF Production by Fibroblast in Cultured Dermal Substitute Combined with EGF-Incorporating Top Dressing. *Open Journal of Regenerative Medicine*, 03 (01), 13–21.
181. Senger, D.R., Ledbetter, S.R., Claffey, K.P., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C.A., and Detmar, M. (1996). Stimulation of Endothelial Cell Migration by Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor through Cooperative Mechanisms Involving the  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 Integrin, Osteopontin, and Thrombin. *American Journal of Pathology*, 149 (1), 293–305.

182. Shukla, A., Dubey, M.P., Srivastava, R., and Srivastava, B.S. (1998). Differential Expression of Proteins during Healing of Cutaneous Wounds in Experimental Normal and Chronic Models. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244 (2), 434–439.
183. Banks, R.E., Forbes, M.A., Kinsey, S.E., Stanley, A., Ingham, E., Walters, C., and Selby, P.J. (1998). Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *British journal of cancer*, 77 (6), 956–64.
184. Takeshita, S., Zheng, L.P., Brogi, E., Kearney, M., Pu, L.-Q., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J.F., and Isner, J.M. (1994). Therapeutic Angiogenesis A Single Intraarterial Bolus of Vascular Endothelial Growth Factor Augments Revascularization in a Rabbit Ischemic Hind Limb Model. *The Journal of Clinical Investigation*, 93, 662–670.
185. Bauters, C., Asahara, T., Zheng, L.P., Takeshita, S., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J.F., and Isner, J.M. (1995). Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *Journal of Vascular Surgery*, 21 (2), 314–325.
186. Galiano, R.D., Tepper, O.M., Pelo, C.R., Bhatt, K.A., Callaghan, M., Bastidas, N., Bunting, S., Steinmetz, H.G., and Gurtner, G.C. (2004). Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. *The American Journal of Pathology*, 164 (6), 1935–1947.
187. Detmar, M., Brown, L.F., Berse, B., Jackman, R.W., Elicker, B.M., Dvorak, H.F., and Claffey, K.P. (1997). Hypoxia Regulates the Expression of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor (VPF/VEGF) and its Receptors in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 108 (3), 263–268.
188. Lerman, O.Z., Galiano, R.D., Armour, M., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. (2003). Cellular Dysfunction in the Diabetic Fibroblast. *The American Journal of Pathology*, 162 (1), 303–312.
189. Khanna, S., Roy, S., Bagchi, D., Bagchi, M., and Sen, C.K. (2001). Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (1), 38–42.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KAPTANER İĞCİ, Bahar  
 Uyruğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 23.04.1988, Van  
 Medeni hali : Evli  
 Telefon : 0 (534) 393 98 02  
 e-mail : baharkaptaner123@gmail.com



### Eğitim

| Derece        | Eğitim Birimi                                           | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|---------------------------------------------------------|------------------|
| Doktora       | Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü                     | Devam ediyor     |
| Yüksek lisans | Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü                     | 2013             |
| Lisans        | Yüzüncü Yıl Üniversitesi / Biyoloji Öğretmenliği Bölümü | 2010             |
| Lise          | Vali Haydar Bey Lisesi                                  | 2005             |

### Yabancı Dil

İngilizce

### İş Deneyimi

-

### Yayınlar

Kaptaner İğci B., Aytaç Z. (2020). An investigation on the in vitro wound healing activity and phytochemical composition of *Hypericum pseudolaeye* Robson growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17 (5) (BASKIDA).

Kandemir A., Kaptaner İğci B., Aytaç Z. ve Fişne A. (2019). Contributions to the systematics of the genus *Adonis* L. (Ranunculaceae) in Turkey. *Gazi University Journal of Science*, 32(4):1105-1111.

Ateş, M.A., Körüklü, T.S., Kaptaner İğci, B., Fişne, A. ve Aytaç, Z. (2019). Morphologic, Palinologic and Phylogenetic Relationship of *Acantholimon* Boiss. Species Sharing Similar Habitats. *Commagene Journal of Biology*, 3(1):48-52.

Kaptaner İğci B., Aytaç Z. ve Körüklü S.T. (2017). A new species of *Acantholimon* (Plumbaginaceae) from Turkey. *Annales Botanici Fennici*, 54(1–3):83-88.

Kaptaner İğci B. ve Aytaç Z. (2016). Karatepe (Karabük-Türkiye) ve çevresinin liken florası. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 3(1).

Kaptaner İğci B. (2013). Likenlerin Antimikrobiyal Etkileri Üzerine Türkiye’de Yapılan Çalışmalar. *Liken Araştırmaları Derneği Bülteni*, 2.

### **Editörlük Yaptığı Kitaplar**

Aytaç Z. ve Kaptaner İğci B. (Editörler). (2012). *Bitki Sistematiği*. Nobel Akademik Yayıncılık.

### **Ödüller**

TÜBA Bilimsel Telif ve Çeviri Eser Ödülleri Programı (TEÇEP) Ödülü. 2015.

### **Kitap ve Kitapta Bölüm**

Aytaç Z. ve Kaptaner İğci B. (Editörler). (2012). *Bitki Sistematiği*. Nobel Akademik Yayıncılık. Aytaç Z., Kaptaner İğci B., Çevirilen Bölüm: Sözlük.

Aytaç Z. ve Kaptaner İğci B. (Editörler). (2012). *Bitki Sistematiği*. Nobel Akademik Yayıncılık. Aytaç Z., Ekici M., Kaptaner İğci B., Çevirilen Bölüm: Herbaryumlar ve Bilgi Veri Sistemleri.

Aytaç Z. ve Kaptaner İğci B. (Editörler). (2012). *Bitki Sistematiği*. Nobel Akademik Yayıncılık. Kaptaner İğci B., Çevirilen Bölüm: Ek 1: Bitki Tanımı.

Aytaç Z. ve Kaptaner İğci B. (Editörler). (2012). *Bitki Sistematiği*. Nobel Akademik Yayıncılık. Kaptaner İğci B., Çevirilen Bölüm: Ek 2: Bitkisel Çizimler.

Aytaç Z. ve Kaptaner İğci B. (Editörler). (2012). *Bitki Sistematiği*. Nobel Akademik Yayıncılık. Kaptaner İğci B., Çevirilen Bölüm: Ek 3: Bitki Sistematiğindeki Bilimsel Dergiler.

Aytaç Z. ve Kaptaner İğci B. (Editörler). (2012). *Bitki Sistematiği*. Nobel Akademik Yayıncılık. Kaptaner İğci B., Çevirilen Bölüm: Ek 4: Bitki Sistematiğinde İstatistik ve Morfometri.



## Projeleri

*Hypericum pseudolaeye* Robson ve *Verbascum stachydifolium* Boiss. & Heldr. subsp. *stachydifolium* Bitki Ekstrelerinin Yara İyileştirme Üzerine Etkilerinin In Vitro Çalışmalar ile Değerlendirilmesi (Gazi Üniversitesi- Bap Birimi) (Yardımcı Araştırmacı) (Devam). Yeşilirmak Peyzaj Atlası Projesi, Çevre ve Orman Bakanlığı, Danışmanlık, Aks Planlama, Ankara (Bitki Çeşitliliği Uzmanı) (Tamamlandı), 2016.

Karatepe'nin (Karabük) Liken Florası (Gazi Üniversitesi- Bap Birimi 05-2010/07 Kodlu Proje) (Yardımcı Araştırmacı) (Tamamlandı), 2014.

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kampüsü'nde Yayılış Gösteren Fabaceae (Baklagiller) Familyasının Yem Bitkisi Olarak Kullanılacak Bitkilerinin Araştırılması (Proje Yürütücüsü) (Tubitak-2209 Sayılı Destekleme Programı) (Tamamlandı), 2008.

## Sertifikalar

HPLC (YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFI) SERTİFİKASI, Sertifika No: LTLC061117007, 18-19 Kasım 2017, Ankara.

GC (GAZ KROMATOGRAFI), Sertifika No: LTGC061117007, 18-19 Kasım 2017, Ankara.

TS EN ISO/IEC 17025:2017 Deney Laboratuvarlarında Ölçüm Belirsizliği Eğitimi, 10-11.01.2019, Nevşehir.

TS EN ISO/IEC 17025:2017 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yetkinliği İçin Genel Gereklilikler Eğitimi, 27-28.12.2018, Nevşehir.

TS EN ISO/IEC 17025:2017 Laboratuvar Akreditasyonu İç Tetkikçi Eğitimi, 03.01.2019, Nevşehir.

TS EN ISO/IEC 17025:2017 Laboratuvar Akreditasyonu Dökümantasyon Eğitimi, 04.01.2019, Nevşehir.

TS EN ISO/IEC 17025:2017 Metot Validasyon/Verifikasyon Eğitimi, 09-10.01.2019, Nevşehir.

## Katıldığı Bilimsel Toplantılar ve Eğitimler

“Nevşehir Yenilikçi Girişimcilik Günü Eğitimi”, 06- 23 Şubat 2018, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Nevşehir.

“Uygulamalı Girişimcilik Eğitimi”, 2017, Nevşehir, KOSGEB.

Çevre Sorunları ve Ekoloji Sempozyumu, 18 Nisan 2015, Uludağ Üniversitesi, Bursa. (Davetli konuşmacı Olarak- Bitki Çizerliği Üzerine).

TEMA Dünya Biyoçeşitlilik Günü Kutlaması, Zübeyde Hanım Kız Meslek Lisesi, 2015, Ankara. (Davetli Konuşmacı Olarak).

22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 23- 27 Haziran 2014, Eskişehir.

TÜBİTAK BİDEB "PROJE HAZIRLAMA, YAZMA VE YÜRÜTME EĞİTİMİ 2014", TÜBİTAK, Ankara Üniversitesi, 2014, Ankara.

ODTÜ Biyokimya Konferansı, 21 Aralık 2014, ODTÜ, Ankara.

Biyogüvenlik Eğitimi, 22 Temmuz 2014, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

Yeşilirmak Havzası Peyzaj Atlası'nın Hazırlanması Projesi Toplantısı, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü, 28-29 Ocak 2014, Ankara.

Mikroskop ve Kontrast Yöntemleri, Floresan Mikroskopi Yöntemleri ve İleri Görüntüleme Teknikleri "Olympus Mikroskopi Semineri", 10.04.2013, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Tasarımdan Üretime Biyomalzemenin Öyküsü, 16 Aralık 2013, ODTÜ.

Every Science, Avrupa Bilim Eğlence Günü, 27 Eylül 2013, Ankara Üniversitesi, Ankara.

PARİS 6, Floristik araştırma Çalıştayı, 20-23 Eylül 2013, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir (Düzenleme Komitesi Üyesi).

Yeni Biyosfer Rezervleri Belirleme Çalıştayı, 07 Mart 2013, UNESCO, Ankara.

First International Biology Congress in Kyrgyzstan, 24-24 Eylül 2012, Bişkek, Kırgızistan.

2. Nadir ve Endemik Bitki Türleri Biyolojisi Uluslararası Sempozyumu, 24-27 Nisan 2012, Fethiye, MUĞLA.

20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 25-28 Ekim 2011, Türk Elektron Mikroskopi Derneği, Kemer, ANTALYA.

VII. Liken Toplantısı ve Araştırma Gezisi, 1-3 Temmuz 2011, Liken Araştırmaları Derneği, BURSA.

8. Ankara Biyoteknoloji Günleri, 08-10 Kasım 2010, Ankara Üniversitesi, ANKARA.

17. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 14-17 Temmuz 2010, ANKARA.

İleri Düzey Bitki Resim (İllüstrasyon) Kursu, 27-07/07-08 2009, Kuzey Doğa Derneği, KARS.

16. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 1-4 Temmuz 2009, NİĞDE.

Sivil Toplum Forumu, 19 Haziran 2009, TÜSEV-Kadir Has Üniversitesi, İSTANBUL.

Van Gölü Havzasında Ekoloji Temelli Doğa Eğitimi, 14-23 Ağustos 2008, TUBİTAK, VAN.

Temel Bitki Resim (İllüstrasyon) Kursu, 25-08/07-09 2008, Kuzey Doğa Derneği, KARS.

15. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 27-30 Ağustos 2008, GAZİANTEP.

Ulusal Leguminosae (Baklagiller) Çalıştayı, 11-13 Nisan 2008, Tubitak, ŞANLIURFA.

“Real-Time PCR” Çalıştayı, 2007, İstanbul (Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi).

Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 8-11 Eylül 2007, İSTANBUL.

14.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 3-6 Eylül 2007, KONYA.

13.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 20-23 Eylül 2006, İZMİR.

Avrupa Birliği Natura 2000 Alanları Belirleme Eğitimi, Doğa Derneği, 2005, VAN.

### **Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulmuş Bildirileri**

İğci, N., Kaptaner İğci, B. “Liken Kemotaksonomisinde Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Tekniğinin Uygulanmasına Yönelik Bir Ön Çalışma”. 1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi, 2- 4 Eylül 2015, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu. (Poster Sunumu).

Kaptaner İğci, B., “Bilimsel Bitki Çizerliği”, Çevre Sorunları ve Ekoloji Sempozyumu, 18 Nisan 2015, ULUDAĞ Üniversitesi, Bursa. (Davetli konuşmacı Olarak- Bitki Çizerliği Üzerine).

Kaptaner, B., Halıcı M. G., Suludere Z., Aytaç Z., Microscopic Characteristics of Four Taxa Belong To Genus *Rinodina* (Ach.) Gray, First International Biology Congress in Kyrgyzstan, 24-27 Eylül 2012, Bişkek, Kırgızistan (Sözlü Sunum).

Aytaç Z., Kaptaner, B., Ten Endemic Taxa Growing In Only Muğla Province and Their Conservation Categories, 2. Nadir ve Endemik Bitki Türleri Biyolojisi Uluslararası Sempozyumu, 24-27 Nisan 2012, Fethiye, Muğla (Poster Sunumu).

Kaptaner, B., Aytaç Z., Ten Endemic Geophyte Taxa From Turkey and Their Conservation Categories, 2. Nadir ve Endemik Bitki Türleri Biyolojisi Uluslararası Sempozyumu, 24-27 Nisan 2012, Fethiye, Muğla (Poster Sunumu).

Kaptaner, B., Suludere Z., Aytaç Z., *Peltigera rufescens* ve *Peltigera neckeri* Liken Türlerinin Ultrastrüktürü, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 25-28 Ekim 2011, Antalya (Poster Sunumu).

Kaptaner, B., Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kampüsünde Yayılış Gösteren Bazı Fabaceae Üyelerinin Tohum Morfolojileri, 16. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 1-4 Temmuz 2009, Niğde (Poster Sunumu).

Kaptaner, B., Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kampüsünde Yayılış Gösteren Bazı Fabaceae Üyelerinin Palinolojisi, 15. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 27-30 Ağustos 2008, Gaziantep (Poster Sunumu).

Kaptaner B., Şeker, A., Gündoğdu, S. Klonlama ve Klon Canlıların Sağlığı. Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, 8-11 Eylül 2007, İstanbul (Poster Sunumu).



*GAZİ GELECEKTİR...*