



**DİYABETİK YARALARDA ELAJİK ASİT VE KARNOSİK ASİTİN
FARKLI UYGULAMALARININ KARACİĞER DOKUSU OKSİDAN
OLAYLARINA ETKİSİ**

Ayşegül BERKTAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

NİSAN 2024

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.

Ayşegül BERKTAŞ

15/05/2024

DİYABETİK YARALARDA ELAJİK ASİT VE KARNOSİK ASİTİN FARKLI UYGULAMALARININ KARACİĞER DOKUSU OKSİDAN OLAYLARINA ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayşegül BERKTAŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2024

ÖZET

Diyabetik hastalarda iyileşmeyen veya geç iyileşen yaralarla birlikte oksidatif stres artmakta ve yaşam kalitesi düşmektedir. Bu çalışmadaki başlıca amacımız doğal fenolik bileşiklerden olan elajik asit (EA) ve karnosik asitin (KA) farklı uygulamalarının hiperglisemik deney hayvanlarında oluşturulan eksizyonel yaralarda yara iyileşme sürecinde meydana gelen oksidan olayların karaciğer dokusuna olan etkisini araştırmaktır. Çalışmamızda kullanılan 42 adet yetişkin erkek Wistar albino sıçanı (250-300 gr) streptozosin (STZ) (i.p, 60 mg/kg) ile hiperglisemik hale getirildi ve deney grubu, tedavi edilmemiş grup ile oral, topikal tedavi alt gruplarına ayrılmıştır. Tedavi edilen gruplarda, yaralar taşıyıcı jel içinde EA ve KA (10 mg/kg) ile hem topikal hem de oral gavaj uygulama ile tedavi edilmiştir. Uygulamanın ardından sıçanlar iyileşmenin üçüncü ve yedinci gününde sakrifiye edildi ve çıkarılan karaciğer dokularında oksidatif etkileri araştırmak amacıyla malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), glutatyon (GSH), protein karbonilleri (PC), askorbik asit (AA) ve kollajen düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. AnovaVaryans Analizi ile, sonuçlar aritmetik ortalama± standart hata şeklinde ifade edilmiştir. MDA düzeyi karaciğer dokusunda kontrol grubu ile kıyaslandığında, tedavi edilmeyen gruplarla hem 3 hem de 7 günlerde tedavi edilen gruplar arasında anlamlı bir istatistiksel fark tespit edilmiştir. Tedavisiz gruplardaki (3 ve 7 gün), artmış NO ve PC düzeyleri EA ve KA birlikte uygulandığı oral ve topikal tedavili gruplarda (3 ve 7 gün), istatistiksel olarak azalmıştır. EA ve KA'nın birlikte uygulandığı tüm tedavi gruplarında, karaciğer dokularında GSH, AA ve kollajen istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0.05$). Bu bulgular, EA ve KA'nın birlikte kullanımının karaciğer dokusu üzerine oksidatif strese neden olmadığını göstermektedir. EA ve KA kombinasyonunun iki farklı uygulama şekli ile, sinerjistik etki göstererek, karaciğer dokusu oksidan olayları azalttığı görülmektedir.

Bilim Kodu : 20317
Anahtar Kelimeler : Antioksidan, diyabetik yara, elajik asit, karaciğer, karnosik asit, oksidatif stres
Sayfa Adedi : 94
Danışman : Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

THE EFFECT OF DIFFERENT APPLICATIONS OF ELLAGIC ACID AND
CARNOSIC ACID ON LIVER TISSUE OXIDANT EVENTS IN DIABETES WOUNDS

(M. Sc. Thesis)

Ayşegül BERKTAŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

April 2024

ABSTRACT

In diabetic patients, oxidative stress increases and quality of life decreases with wounds that do not heal or heal slowly. Our main aim in this study is to investigate the effects of different applications of ellagic acid (EA) and carnosic acid (CA), which are natural phenolic compounds, on the liver tissue of oxidant events that occur during the wound healing process in excisional wounds created in hyperglycemic experimental animals. 42 adult male Wistar albino rats (250-300 g) used in our study were made hyperglycemic with streptozocin (STZ) (i.p, 60 mg/kg) and the experimental group was divided into untreated group and oral, topical treatment subgroups. In treated groups, wounds were treated with EA and CA (10 mg/kg) in carrier gel by both topical and oral gavage application. Following the application, the rats were sacrificed on the third and seventh days of recovery and in order to investigate the oxidative effects in the extracted liver tissues, malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), glutathione (GSH), protein carbonyls (PC), ascorbic acid (AA) and collagen levels were measured spectrophotometrically. With Anova Analysis of Variance, the results are expressed as arithmetic mean $\pm$ standard error. When the MDA level in liver tissue was compared with the control group, a significant statistical difference was detected between the untreated groups and the treated groups on both 3 and 7 days. Increased NO and PC levels in the untreated groups (3 and 7 days) decreased statistically in the oral and topical treatment groups (3 and 7 days), where EA and CA were applied together. In all treatment groups where EA and CA were applied together, GSH, AA and collagen in liver tissues increased statistically significantly ($p < 0.05$). These findings show that the combined use of EA and CA does not cause oxidative stress on liver tissue. It is seen that the EA and CA combination reduces the oxidant events of the liver tissue by showing synergistic effects in two different form of application.

Science Code : 20317

Key Words : Antioxidant, carnosic acid, diabetic wound, ellagic acid, liver, oxidative stress

Page Number : 94

Supervisor : Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca çok değerli katkıları, destekleri ve tecrübesiyle her daim benim yanımda olan kendisiyle tanıştığım ders döneminin ilk dersinde, keşke benim danışmanım olsa dedirten ve beni kabul ederek, yıllar sonra tekrar öğrenci olmanın heyecanını bana yaşatan, danışmanım Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER'e, çalışmalarım sırasında çalışkanlığı, pratikliği ve bilgisiyle her zaman yardımını benden esirgemeyen araştırma görevlisi Elif Naz GÜRSOY'a, her zorda kaldığımda tüm sorularıma yetişen melek kalpli, güler yüzlü Elif Büşra FİDAN'a, arı gibi çalışkanlığı, azimli olması ve pratik çözümleriyle bana ilham kaynağı olan Hicret ARSLAN'a, yüksek lisans dönemi boyunca, ders programımı kolaylaştırıcı yönde hazırlayan okul idarecilerime, manevi destekleriyle beni sürekli yüreklendirerek yanımda olan dayım, eşim, oğlum ve arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Yara ve Yara İyileşmesi.....	5
2.1.1. Yara tipleri.....	6
2.1.2. Yara iyileşmesi fazları	8
2.1.3. Yara iyileşmesi şekilleri	16
2.1.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler.....	18
2.1.5. Yara iyileşmesi ve reaktif oksijen türleri.....	21
2.2. Diyabet.....	22
2.2.1. Diyabet	22
2.2.2. Diyabet ve komplikasyonları.....	22
2.2.3. Diyabet ve yara iyileşmesi.....	23
2.3. Oksidatif Stres.....	27
2.3.1. Serbest radikaller ve kaynakları	28
2.3.2. Serbest oksijen radikalleri	28
2.3.3. Oksijen türevi olmayan serbest radikaller	30
2.3.4. Oksijen radikallerinin biyolojik reaksiyonları.....	31

	Sayfa
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Diyabetik Yaralar	37
2.4.1. Enzimatik antioksidanlar	38
2.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar	40
2.5. Karaciğer.....	42
2.5.1. Karaciğerin anatomisi ve fonksiyonları.....	42
2.5.2. Karaciğer ve detoksifikasyon	44
2.6. Çalışmada Kullanılan Maddeler ve Özellikleri	46
2.6.1. Elajik asit (EA)	46
2.6.2. Karnosik asit (CA).....	52
3. MATERYAL METOT.....	57
3.1. Deney Protokolü	57
3.2. Diyabet Modelinin Oluşturulması	57
3.3. Yara Modelinin Oluşturulması	57
3.4. Deney Gruplarının Dizaynı.....	58
3.5. Uygulama ve Karaciğer Dokularının Alınması	58
3.6. Deneyin Yöntemi.....	59
3.6.1. Dokuda MDA tayin yöntemi	59
3.6.2. Dokuda GSH tayin yöntemi	60
3.6.3. Dokuda NO tayin yöntemi.....	60
3.6.4. Dokuda AA tayin yöntemi.....	60
3.6.5. Dokuda protein karbonilleri tayin yöntemi	61
3.6.6. Dokuda kollajen tayin yöntemi	62
3.7. İstatiksel İnceleme	63
4. BULGULAR	65
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	73
KAYNAKLAR	81

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ	93
----------------	----

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinde çeşitli hücre tiplerinin rolleri	12
Çizelge 2.2. Antioksidan kaynakları.....	38
Çizelge 4.1. Karaciğer dokusu MDA, protein karbonilleri ve NOx düzeyleri	65
Çizelge 4.2. Karaciğer dokusu düzeyleri AA, GSH ve kollajen düzeyleri	66

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Yara iyileşmesi prosesindeki fizyolojik olaylar	8
Şekil 2.2. Hemostaz fazı sırasındaki hücresel değişiklikler	9
Şekil 2.3. Nötrofillerin yara iyileşmesindeki rolü	11
Şekil 2.4. Yara iyileşmesi sırasında anjiyogenez	14
Şekil 2.5. Yeniden epitelizeasyon ve fibroblast-epidermal hücre etkileşimleri.....	16
Şekil 2.6. Yara iyileşmesi tipleri	18
Şekil 2.7. Diyabetin yara iyileşme sürecine etkisi.....	26
Şekil 2.8. Normal ve diyabetik yara iyileşmesi.....	27
Şekil 2.9. Serbest radikallerin biyolojik reaksiyonları	32
Şekil 2.10. Protein oksidasyonu	34
Şekil 2.11. Lipit peroksidasyonun zincir reaksiyonları	35
Şekil 2.12. Karaciğer lobülünün temel yapısı	43
Şekil 2.13. Elajik asidin kimyasal yapısı.....	46
Şekil 2.14. Elajik asidin antioksidan etkileri	48
Şekil 2.15. Karnosik asidin kimyasal yapısı.....	52
Şekil 3.1. Deneysel tasarım	58
Şekil 4.1. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde MDA düzeyi	67
Şekil 4.2. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde GSH düzeyi.....	68
Şekil 4.3. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde NOx düzeyi	69
Şekil 4.4. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde AA düzeyi	70
Şekil 4.5. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde PC düzeyi.....	71
Şekil 4.6. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde kollajen düzeyi.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
BHT	Bütilhidroksi Toluen
CuSO_4	Bakır (II) sülfat
g	Gram
H_2O_2	Hidrojen peroksit
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
LOO-	Peroksi radikali
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
NaAsO_2	Sodyum arsenit
NaNO_2	Sodyum nitrit
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NO	Nitrik oksit
$\text{O}_2^- \cdot$	Süperoksit radikali
$\text{OH} \cdot$	Hidroksil radikali
$\text{ROO} \cdot$	Peroksil radikali
VCl_3	Vanadyum 3 klorür
μg	Mikrogram

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AA	Askorbik Asit
ALT	Alanin amino transferaz
AMPK5'	Adenozin monofosfatla aktive olan protein kinaz
AST	Aspartat amino transferaz
BSA	Bovin serum albümini
CA / KA	Karnosik Asit
CAT	Katalaz
ConA	Concanavalin
COX-2	Siklooksijenaz-2
CYP	Sitokrom P450
Cyt-P450	Sitokrom P450
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler modeller
DM	Diabetes mellitus
DNPH	2,4 dinitrofenilhidrazin
DOPA	İleri oksidasyon protein ürünleri
EA	Elajik Asit
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamin tetra asetikasit,
EGF	Epidermal büyüme faktörü
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
GAG	Glikozaminoglikan
GLUT4	Glukoz taşıyıcı tip 4
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S Transferaz
HO-1	Hem oksijenaz-1
ICAM-1	Hücreler arası adezyon molekülü-1
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IL-1	İnterlökin-1
IM	İntramüsküler
IP	İntraperitoneal

Kısaltmalar**Açıklamalar****iNOS**

Nitrik oksit sentaz

JAK-STAT

Transkripsiyon aktivatörleri

KEAP1

Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1

LPS

Lipopolisakarit

MAPK

Mitojenle aktive olan protein kinaz

MDA

Malondialdehit

MDI

Metilenilenfenil diizosiyanat

MMP

Metaloproteinaz

MPM

Peritoneal makrofaj

MTX

Metotreksat

NADPH

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NET

Nötrofil hücre dışı trap

NF-KB/I κ Ba

Nükleer faktör- kappa B inhibitörü

Nrf 2

Nükleer eritroid 2 ile ilişkili faktör 2

P-ACC

Fosfo-asetil- CoA karboksilaz

PC

Protein Karbonil

PCA/EDTA

Perklorasetik asit/etilendiamin tetra asetik asit

PDGF

Trombosit kökenli büyüme faktörü

PKC

Protein kinaz C

PUFA

Doymamış yağ asitleri

RNS

Reaktif nitrojen türleri

ROS

Reaktif oksijen türleri

Rpm

Dakikadaki devir sayısı

SOD

Süperoksit distmutazlar

STZ

Streptozotosin

TBA

Tiyobarbitürik asit

TBARS

Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri

TCA

Triklorasetik asit

TGF

Dönüştürücü büyüme faktörü

TNF- α Tümör nekroz faktörü- α **VCAM**

Vasküler hücre adezyon molekülü

VEGF

Vasküler endotelyal büyüme faktörü

Kısaltmalar**Açıklamalar****VPA**

Valproik asit

vWF

Von Willebrand faktörü

XO

Ksantin oksidaz

1. GİRİŞ

Yara, farklı nedenlerle doku veya deri bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanabilir. Derinin koruyucu etkinliğinin ortadan kalkması sonucu yara oluşabilmektedir (Malnütrisyon, 2011).

Yara oluşumunun kökeni ne olursa olsun, yaralanma karmaşık bir süreçtir ve tüm yaralar dört temel aşamada iyileşir: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma (Diegelmann ve Evans, 2004).

Yaralanmadan hemen sonra, hemostaz aşamasında trombosit degranülasyon ve pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu ile fibrin pıhtısı oluşur. Mast hücrelerinden salınan histamin de vazodilatasyonu artırarak, enflamatuar hücrelerin ekstraselüler alana göç etmesini kolaylaştırır. Daha fazla kan kaybını önleyen bir dizi süreç sonucunda, trombositlerden trombus oluşumu ve çeşitli büyüme faktörleri salgılanır (George Broughton ve diğerleri, 2006; Wang ve diğerleri, 2018). İnflamasyon evresinde ilk gelen nötrofillerden sonra büyüme faktörlerini salgılayan makrofaj hakimiyeti görülür (Demir, 2015). Epitelizasyon, revaskülarizasyon ve granülasyon dokusunun oluşumundan meydana gelen proliferasyon evresinde, fibroblastlar kolajen, fibronektin ve diğer maddelerden oluşan geçici bir matris sentezler. Granülasyon dokusu geçici matrisin yerini alarak faz tamamlanır. (George Broughton ve diğerleri, 2006; Reinke ve Sorg, 2012).

Bu fazların herhangi birinde meydana gelebilecek olan başarısızlık veya fazın uygun sürede tamamlanamaması, iyileşmede gecikmeyle veya yaranın kapanmayıp kronikleşmesiyle sonuçlanabilir (Witte, 1997). İyileşmeyi etkileyen oksijen seviyesi, hematoma, ödem vb. gibi lokal faktörlerin yanında dolaşım bozuklukları, büyüme faktörleri, hormonlar ve diyabet gibi pek çok sistemik faktör de bulunmaktadır (Çankal, 2013).

Pankreasın vücut için yeterli miktarda insülin üretememesi ya da elde ettiği insülinin vücut tarafından etkin bir şekilde kullanılamaması sonucunda açığa çıkan, şeker hastalığı ya da diyabet (Diabetes Mellitus), yüksek kan şekeri semptomu ile karakterize edilir (Association, 2021). Anjiyopatiye bağlı olarak oluşan lokal dolaşım bozukluğu, enfeksiyon ve periferik nöropati nedeniyle diyabette yara iyileşmesi bozulur. Normal yara iyileşmesi gerçekleşmediği için, serbest radikaller veya oksidanlar doku hasarını arttırmaya devam

ederler. Diyabetlilerde Reaktif oksijen türleri (ROT); DNA, protein ve lipitleri hedef alarak oksidatif stres oluşturmaktadır (Kopal ve diğerleri, 2007; Şenol, 1995; Yager ve diğerleri, 2007). Serbest radikaller, iç ve dış kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşabilen farklı kimyasal yapılara sahip moleküllerdir. Bu moleküller DNA, enzim, lipit vb. yapılara zarar verdiği için, biyolojik sistemler CAT, GSH, SOD benzeri entegre bir antioksidan savunma sistemi oluşturur (Cochrane, 1991; Janssen ve diğerleri, 1993).

Reaktif oksijen türlerinin sürekli üretilmesinden sorumlu olan mitekondirinin yanında diğer hücrel organeller de yan ürün olarak serbest radikalleri üretmektedir. Karaciğer mikrozomları NADPH'ye bağlı redoks zinciri hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri üretmektedir. Karaciğer bir seri kompleks enzimatik tepkimelerle zehirli maddeleri zehirsiz hale getirerek detoksifikasyon yapmaktadır. Detoksifikasyonun faz 1 aşamasında oluşan daha toksik ara metabolitler, faz 2 aşamasında safra, üre gibi suda çözünen bileşikler halinde atılmaktadır (Di Meo ve Venditti, 2020; Liska, 1998).

Diyabetik yaraların tedavisinde ağrı kesici, antimikrobiyeller gibi ilaçların yanında; krem, parçalayıcı ürünler gibi ekzojen faktörler yıllardır kullanılmaktadır. Bununla birlikte farklı uygulamalar gerektiren özel cihaz ve tedaviler de mevcuttur. Ancak bu tekniklerin diyabet hastalarının tedavisinde başarı oranının düşük olması ve hastaya yüklediği maliyetin fazla olması ve bu esnada gerçekleşen oksidatif stresin artmasıyla birlikte yaraların geç kapanması ya da organ kaybı oluşabilmektedir (Çalık, 2017).

Bu nedenle diyabetik yaraların tedavisinde doğal antioksidan içeriklere sahip bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Elajik asit, nar, çilek, ahududu, ceviz gibi pek çok meyve ile sebzede bulunan doğal fenolik bir antioksidandır. Elajik asitin interlökin-6, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), ve interferon- γ gibi aracı molekülleri azaltarak, antienflamatuvar etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Yine günlük tedavi diyetlerinde kullanılarak, kolonda siklooksijenaz-2 (COX-2) ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) salgısını önemli ölçüde azaltmıştır. Ellagik asit, nükleer eritroid 2 ile bağlantılı faktör 2'nin (Nrf2) transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla serbest radikalleri yok etmekte ve karaciğerdeki toksik koşullara karşı antioksidan etki göstermektedir. Yine hiperlipidemik tavşanlarda, dolaşımdaki lipitlerin seviyesini etkili bir şekilde azaltarak lipit peroksidasyonunu önlemiştir (Devipriya ve diğerleri, 2007; Singh ve diğerleri, 1999; Yu ve diğerleri, 2005).

Biberiye, adaçayı gibi aromatik bitkilerde bulunan karnosik asit, fenolik diterpen yapısında olan sekonder metabolittir (Cuvelier ve diğerleri, 1994; Nieto ve diğerleri, 2018). Karnosik asitin yüksek antioksidan ve antimikrobiyal içeriğinden dolayı yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır (Armenteros ve diğerleri, 2016; Çimen, 2012; Jasim, 2017; Lesellier ve diğerleri, 2021). MDI ile indüklenen adipozit farklılaşması sırasında zirve yapan reaktif oksijen türleri (ROS) seviyeleri, karnosik asidin, Nükleer faktör-kappa B / NF- κ B inhibitörü (NF-KB/I κ Ba) sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla NF-KB'nin çekirdeğe translokasyonuna müdahale ederek Nox4 enzim kompleksinin oluşumunu kesintiye uğrattığı düşünülmüştür (Lee ve Jang, 2021). Gıda, kozmetik endüstrisi ve sağlık alanlarında karnosik asitin kullanıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Avrupa'da gıda katkı maddelerinin ana aktif antioksidanları olarak (E392) yirmi yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Kozmetikte cilt yüzeyindeki lipitlerin oksidatif değişimini önleyerek anti aging etki göstermiştir. Ayrıca karnosik asitin antikanserojen, antiproliferatif, anti-anjiyogenik, antidiyabetik gibi özelliklerinin kanıtlandığı pek çok çalışma bulunmaktadır (Birtić ve diğerleri, 2015; Kosaka, 2012; López-Jiménez ve diğerleri, 2013; Rajasekaran ve diğerleri, 2013).

Bu çalışmanın sonucunda iki antioksidan maddenin diyabetik yaralarda etkisinin ne olabileceği araştırılacak ve başka çalışmalara ışık oluşturabilecektir. Günümüze kadar gelen çalışmalarda, bu iki etken maddenin diyabetik yara tedavisinde kullanımı sırasında karaciğerde meydana gelen oksidatif parametrelerin incelenmediği görülmüştür. Yeni tedavi yaklaşımlarına yol gösterebilecek bu çalışma ile, etkili bir doğal karışım olup olmayacağı tespit edilecektir ve diyabetik yaralar daha kötü sonuçlara ulaşmadan engellenebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara ve Yara İyileşmesi

Eski Mısır'da (MÖ 3200-300), hemostaz için papirüs parşömenlerinin kompresyon için , Hipokrat'ın yara pansuman tekniklerini irin drenajın önemini belirtmek için kullanması, insanlığın başlangıcından beri yara iyileşmesinin önemli bir sorun olduğunu göstermektedir. Anatomik yapıdaki doku bozulması ile başlayan ardışık doku kaybı yara olarak tanımlanır. Yara iyileşmesi yaralanmadan hemen sonra başlayan; moleküler, hücresel ve humoral mekanizmaların dinamik ve üst düzeyde bazen de yıllarca sürebilecek düzenlenmiş bir sürecidir (MC, 2001; Reinke ve Sorg, 2012). Bunlar içinde, çok sayıda büyüme faktörü, sitokin, farklı mediyatörler, parankimal hücreler, kan elemanları ve ekstraselüler matriks gibi lokal ve sistemik pek çok faktör bulunmaktadır (Werner ve Grose, 2003).

Yara sınıflandırılması içinde yarayı oluşturan pek çok etken ve yaranın derinliği gibi unsurlar bulunmasına karşılık yara iyileşme sürecinde zaman çok önemli bir faktör olduğu için, yaralar akut ve kronik yaralar olarak adlandırılır (Kurt, 2003; MC, 2001). Genel olarak tedavi süreci içinde sorunsuz ilerleyen , 5-30 gün içinde iyileşerek anatomik bütünlüğüne ulaşan yaralar akut yaralar olarak adlandırılır. Bu süreçte tedaviye yanıt vermeyen, iyileşmesi üç aydan daha fazla süren ve anatomik bütünlüğe ulaşamayan yaralar kronik yara olarak adlandırılır. Bunun altında yatan kişinin yaşı, bakım şartları gibi pek çok sebep bulunmakla birlikte; doku hasarı, bakteriyel enfeksiyon, yetersiz doku oksijenizasyonu ve diyabet gibi ana unsurlar belli başlı faktörler olarak dikkat çekmektedir (Baktır, 2020; Branski ve diğerleri, 2009; Kurt, 2003; Mustoe ve diğerleri, 2006; Tepebaşı ve Calapoğlu, 2017).

Bu bağlamda, 537 milyon erişkin diyabet hastasının mevcut olduğu ve bu rakamın 2045 yılında 700 milyona çıkabileceği, 2021 Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre bildirilmiştir ("Internet: Diabetes now affects one in 10 adults worldwide," 2021). Bu durum diyabetik yaraların önemini her geçen gün daha da arttırmaktadır.

2.1.1. Yara tipleri

Yaralar aşağıdaki gibi kategorize edilmiştir (Kurt, 2003; Yalçın ve Özkalp, 2005):

A) Cildin alt katmanlarının dış ortamla temasına bağlı olarak

1. Açık yaralar
 - Batıcı yaralar
 - Lasere ve ezik yaralar
 - Kesik yaralar (insizyon yaraları)
 - Yanıklar
 - Isırık ve Sokmalar
2. Kapalı Yaralar
 - Burkulma
 - Kontüzyon (ezilme)
 - Sıyrık
 - Hematom

B) Yarayı oluşturan etkene göre

1. Dışsal (ekzojen) nedenler
 - a) Mekanik Yaralar
 - Kesik
 - Bası
 - Tahriş
 - Travma
 - b) Fiziksel Yaralar
 - Isı
 - Soğuk
 - Işık
 - Radyoaktivite
 - Elektrik
 - Barotravma

c) Kimyasal Yaralar

- Asit
- Alkali
- Kimyasal Maddeler
- Alerjenler

2. İçsel (endojen) nedenler

a) Damarsal Olaylar

- Tıkanma
- Hipertansiyon
- Beslenme, kanlanma ve oksijenasyon bozukluğu
- Varis
- Derinin yapısının bozulması
- Ödem
- Staz dermatiti
- Drenajın engellenmesi

b) Sinirsel Olaylar

- Otonom bozukluk
- Duyusal bozukluk
- Motor bozukluk

c) Hastalık Kaynaklı Olaylar

- Metabolik
- Hematolojik
- Enfeksiyonal
- Malign durumlar

C) İyileşme sürecine göre yara tipleri

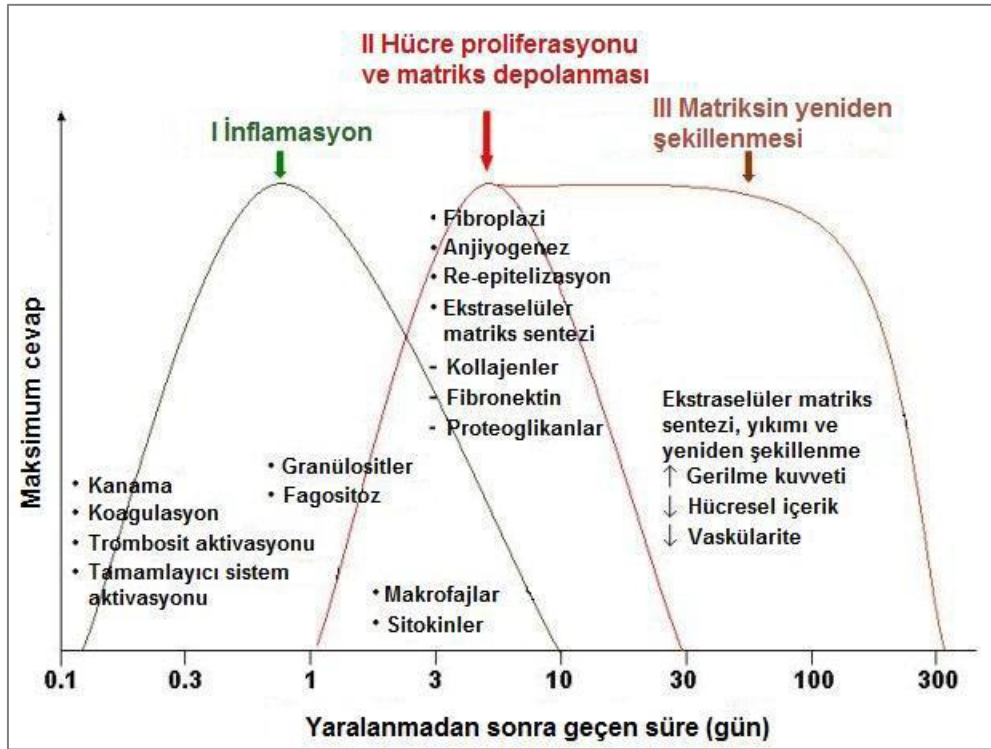
1. Akut
2. Kronik

D) Derinliğine göre

1. Yüzeysel
2. Derin

2.1.2. Yara iyileşmesi fazları

Yara iyileşmesi her aşamada, kimyasallar ve hücreler arasındaki çok sayıdaki etkileşim ve düzenlenmiş tepkimenin aktive olduğu, her aşamanın birbiriyle önemli ölçüde iç içe geçtiği keskin sınırlarla ayrılmayan dinamik ve kompleks bir süreçtir. Her yıl yeni medyatörler ve hücrel etkileşimler keşfedilse de, tüm yaralar şekil 2.1’de görüldüğü gibi 4 temel fazdan geçerek iyileşmektedir: Hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon (Clark, 2013).

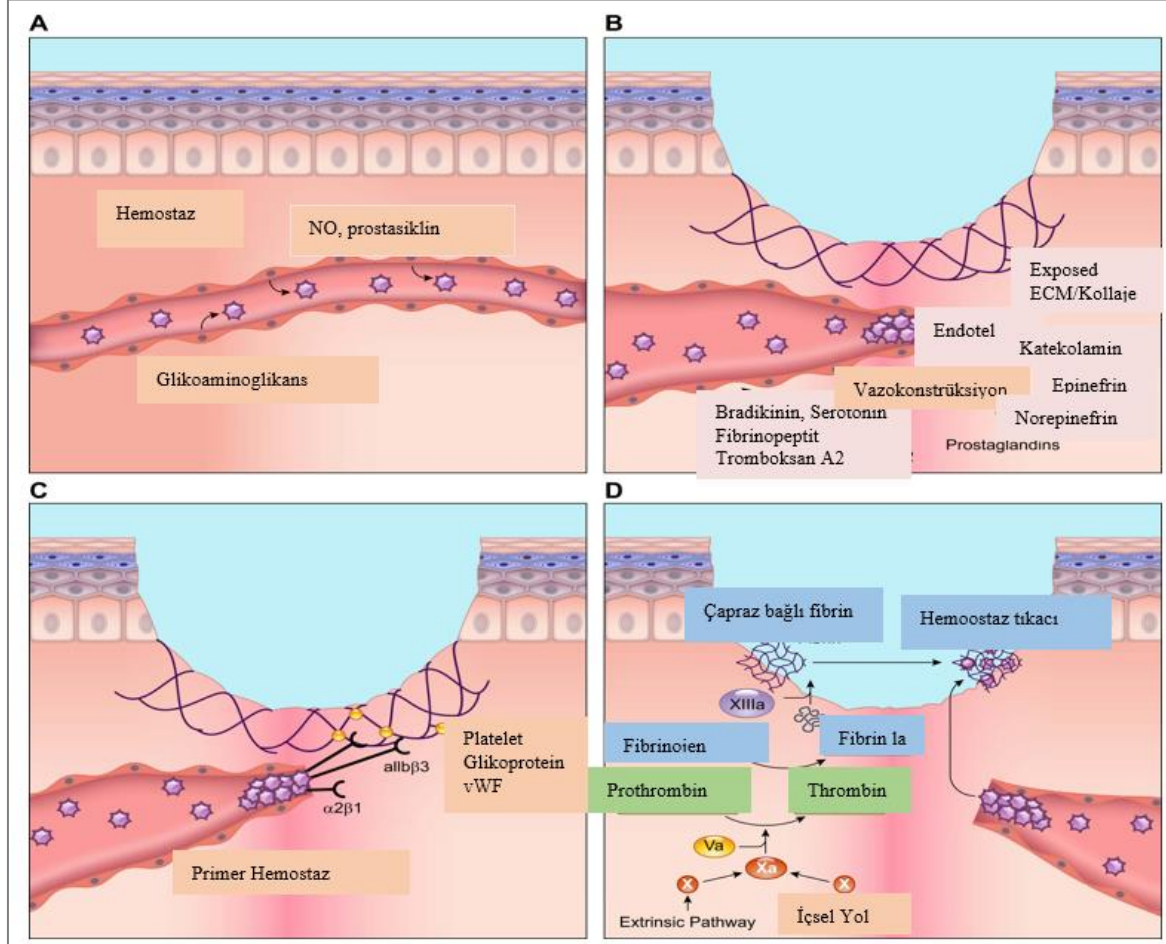


Şekil 2.1. Yara iyileşmesi prosesindeki fizyolojik olaylar (Clark, 2013)

Hemostaz

Kanamayı durdurmak amacıyla verilen bu ani ve ilk tepkide, damar düz kaslarının sitoplazmik seviyesindeki artış ile, damar iç çapının daraltılmasıdır (vazokonstrüksiyon). Kan akımının azalmasıyla birlikte açığa çıkan asidoz ve hipoksi etki nitrik oksit (NO), adenozin ve diğer vazoaaktif metabolitlerin oluşmasına, böylece de bir tepki olarak arteriyel damarların genişlemesine neden olur. Subendotelyal ekstraselüler matriks, endotelyal hasardan sonra ortaya çıkar ve aktive olmuş trombositlerin yapışarak kümelenmesine sebep olmaktadır. Mast hücrelerinden salınan histamin de vazodilatasyonu artırarak, enflamatuvar hücrelerin ekstraselüler alana göç etmesini kolaylaştırır. Daha fazla kan kaybını önleyen bir

dizi süreç sonucunda, trombositlerden trombus oluşumu ve çeşitli büyüme faktörleri salgılanır (George Broughton ve diğerleri, 2006; Khalil ve Van Breemen, 1995; Rodrigues ve diğerleri, 2019) (Şekil 2.2).



A : Trombositler damar duvarına yakın bir yerde dolaşır. Trombositlerin endotel astarına bağlanmasını ve trombosit agregasyonunu önleyen nitrik oksit (NO) ve prostasiklin gibi anti-trombotik ajanlar, endotel hücrelerinden salgılanır. **B** : Vasospazm, hasar alan bölgedeki kanamayı azaltarak, koagülasyon için gerekli olan hücreler ve kimyasalların birikimini teşvik eder. **C** : Kan damarı rüptürü ile subendotelyal matris açığa çıkar. Trombositler, subendotelyal matrisi, yüzeylerindeki G proteinine bağlı reseptörleri, glikoproteinleri ve integrinleri kullanarak birbirlerine bağlanır. Trombositlerden salgılanan von Willebrand faktörü (vWF) de, trombositlerin hasarlı bölgeye yapışmasını kolaylaştırır ve sağlamlaştırır. **D** : Faktör X'in aktivasyonu dışsal ve içsel yollarla sağlanarak, fibrinojenin fibrine dönüşmesi gerçekleşir. Çapraz bağlı fibrin, trombüs oluşturmak için, kümelenmiş trombosit tıkaçına bağlanır.

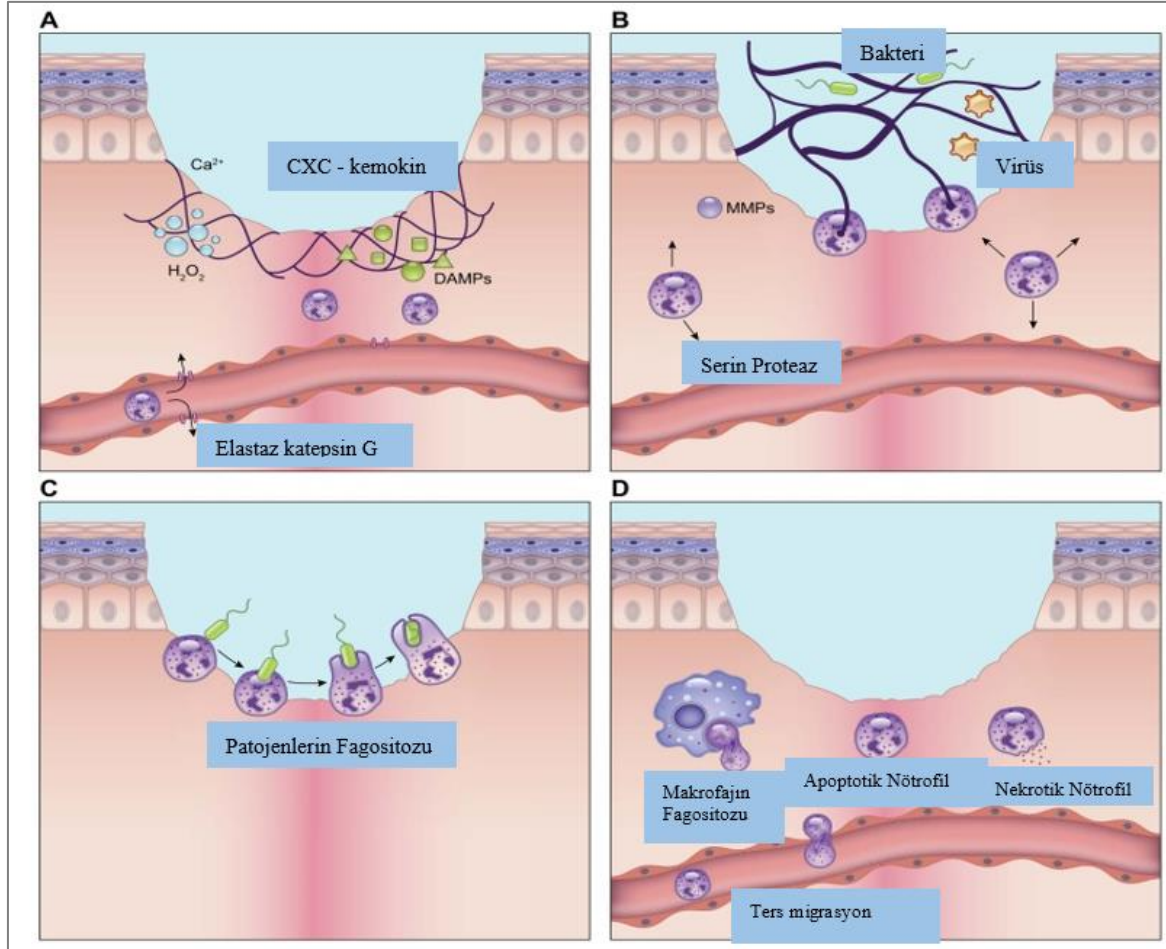
Şekil 2.2. Hemostaz fazı sırasındaki hücresel değişiklikler (Rodrigues ve diğerleri, 2019)

İnflamasyon

Yaradan patojenleri ve yabancı partikülleri temizlemek ve yaralı bölgedeki hasarı lokalize olarak kontrol altına almak için, hemostaz aşamasından kısa bir süre sonra hemen inflamasyon evresi başlar. Vasküler geçirgenliğin artması sonucu nötrofiller ve monositler

yara bölgesine göç eder. Erken inflamatuvar fazında nötrofillerin yara bölgesine infiltrasyonu sağlanarak, yabancı partiküllerin ve mikroorganizmaların fagosite edilmek suretiyle enfeksiyonun önüne geçilir (Şekil 2.3).

Nötrofiller tarafından salgılanan IL1 alfa, IL 1 beta ve TNF alfa gibi faktörler, ilerleyen dönemde büyüme faktörlerinin aktivatörü olarak rol oynar. Geç inflamasyon fazında; makrofajlar, fagositoz ve keratinosit göçü, çoğalması gibi önemli işlevler üstlenerek baskın hale gelir. Makrofajlar yaralanmadan 48-72 saat sonra maksimum sayılarına ulaşır ve patojenleri öldürmek için nötrofil aktivitesi sırasında üretilen serbest oksijen radikallerini (ROS) kullanır. İnterlökin-1'in (IL-1) etkisi ile yaklaşık 72 saat sonra bölgeye gelen lenfositler, kollojen ile ekstrasellüler matriks sentezi yapımından sorumlu olan son hücrelerdir. Yara iyileşmesinde çeşitli hücre tiplerinin rolü çizelge 2.1'de gösterilmiştir (Young ve McNaught, 2011). Hücre kalıntıları ve bakteriler temizleninceye kadar süren inflamasyon evresinin bazı sebeplerden dolayı aşırı uzaması, doku hasarına neden olarak yaranın kronikleşmesine sebep olur (Han ve Ceilley, 2017; Hart, 2002; Young ve McNaught, 2011).



Şekil 2.3. Nötrofillerin yara iyileşmesindeki rolü (Rodrigues ve diğerleri, 2019)

Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinde çeşitli hücre tiplerinin rolleri (Young ve McNaught, 2011)

Hücre Çeşiti	Aktifleşme Zamanı	İşlevi
Trombositler	Birkaç saniye içinde	Trombus oluşumu Pıhtılaşma sürecinin aktivasyonu Enflamatuvar araçların salınımı
Keratinosit	8 saat	Neovaskülarizasyon Enflamatuvar araçların salınımı
Nötrofiller	24 saatte doruk seviyeye ulaşır	Yara dedridmanı Bakteri fagositozu Proteolitik enzimlerin salınımı ROS üretimi Vasküler permeabilite artışı
Fibroblast	120 saat	Granülasyon dokusu oluşumu Kollojen sentezi Ekstraselüler matriks bileşenlerinin üretimi İnflamatuvar ve proteaz araçların salınımı
Lenfositler	72- 120 saat	Kollojen birikimi Proliferasyon fazının düzenlenmesi

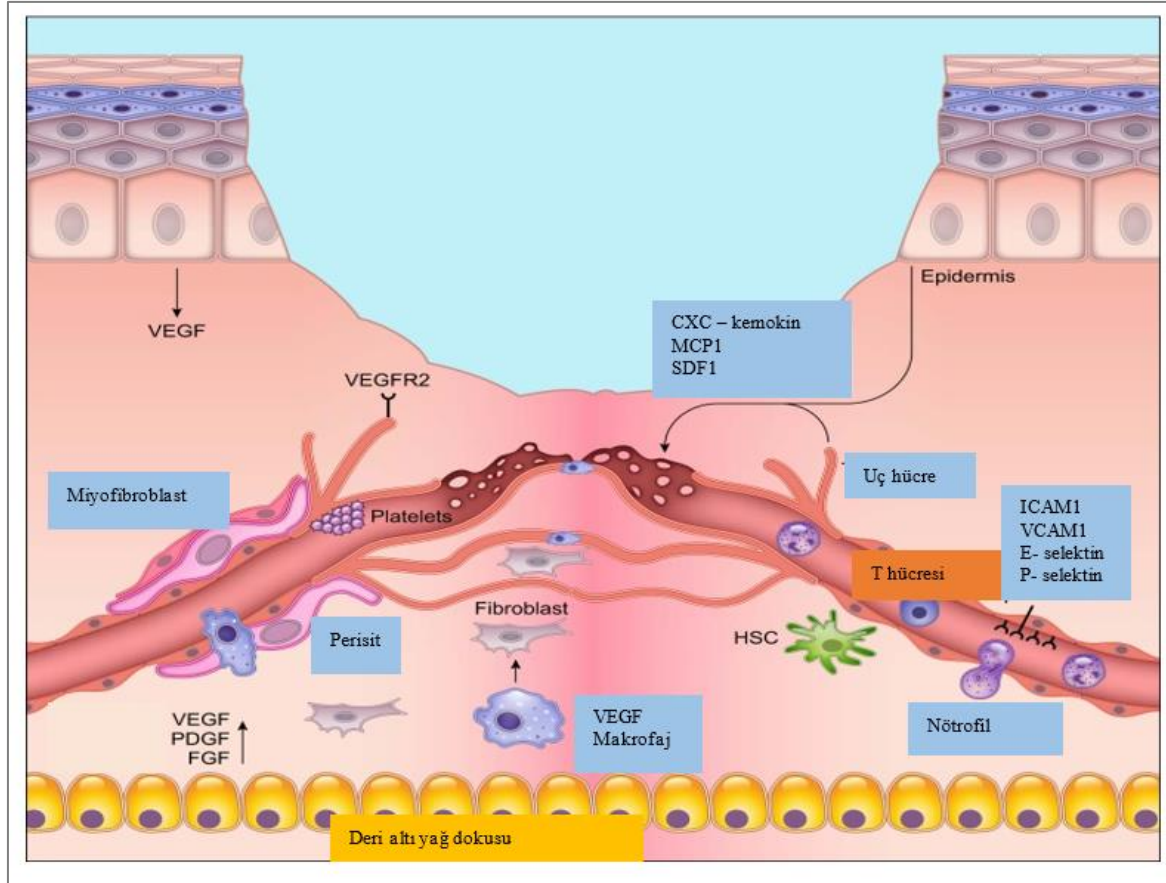
Diyabetik yaralarda sitokinler ve büyüme faktörlerinin etkisinin artması, devam eden inflamatuvar yanıtı arttırmakta ve yara iyileşme mekanizması bozulmaktadır (Van Putte ve diğerleri, 2016).

Proliferasyon

Fibroblast ve endotel hücrelerin yara bölgesinde ortaya çıkması ve inflamatuvar hücrelerin azalmasıyla proliferatif faz başlar. Bu fazda anjiyogenez, kollajen üretimi ve depolanması ile, yara kontraksiyonu görülür. Makrofajlar, çeşitli büyüme faktörlerinin kaynağını oluşturarak, fibroblastların sayısını artırır. Epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) gibi faktörler; fibroblastların yaraya geçişini sağlayarak, çok fazla miktarda hücre ile hücrelerarası madde artışına sebep olur. Bu evredeki en önemli hücrelerden olan fibroblastlar, yara tamirini sağlamak amacıyla kollajen, retikülün, elastin gibi temel bağ dokusu bileşenleri ile proteoglikanları üretir. Yeni kollajen fibrillerinin oluşumu 5 ve 7. günlerde maksimum seviyeye gelir. Granülasyon dokusu, makrofaj, mast, perisit ve endotel hücrelerinden meydana gelen vasküler bir yapıdır (Şekil 2.4). Granülasyon dokusunun oluşması yeni damarların meydana gelmesine bağlıdır ve anyiyogenetik büyüme faktörlerinin etkisiyle oluşan yeni damarlar, yara bölgesine gelen oksijenli kan ile dokunun beslenmesini düzenler. Fibroblastlar, kollajenlerin daha esnek olması ve birbirine yapışmasını proteoglikan ve fibronektin üreterek yapar. Fibronektin, çoğu başlangıçta tip 3 olan ve daha sonra tip 1'e dönüşen, hyaluronik asit bakımından zengin proteoglikanlar ve kollajenden oluşan bir

maddede depolanır. Doku oluşumunun başlaması için özellikle yeteri kadar oksijen gelmesi ve beslenmede C vitaminin yeterli miktarda alınması çok önemlidir (Kurt, 2003; Lerman ve diğerleri, 2003). Çünkü C vitamini, kollajenin yapısında olan prolin temel aminoasitinin hidroksiprolin dönüşmesi için şarttır (Hu ve diğerleri, 2008). Fibroblastların sayısının arttığı ve hücre dışı matriks (ECM) üretimi için gerekli olan kollajen sentezinin bu aşaması fibrozis olarak adlandırılır. Hücreler arası dolgu maddesi olan gevşek ekstraselüler matriks içinde kollajen, fibronektin ve hiyaluronik asit bulunur (Singer ve Clark, 1999). Ekstra ECM'in mekanik kuvvet, fiziksel koruma, sinyal sağlanması, farklılaşma gibi pek çok aktif rol oynandığı bilinmektedir (Onofri). Esasında matriksi oluşturan fibröz ve proteoglikan olmak üzere iki temel ekstrasellüler protein mevcuttur. Proteoglikanlar, kovalent bağlı peptit zincirleri olan glikozaminlerin (GAG) 7 çeşiti şeklinde bulunur. Fibröz proteinler yapısal ve yapıştırıcı proteinler olup, kollajen ile elastin yapısal proteinlere, fibronektin, integrin vb. gibi olanlar yapıştırıcı protein grubuna girmektedir (Çavdar, 2008; Lampi ve Reinhart-King, 2018)

Fibroblastların özelleşmiş şekli olan miyofibroblastlar, yara kontraksiyonu denilen çok önemli bir aşamayı gerçekleştirir. Üretilen kollajen lifleri ile gerilme kuvveti oluşur. Doku hasarı eğer doku kaybıyla birlikte büyük bir alandaysa, rejenerasyon yara kenarlarından başlar. Bazal hücrelerin göçü ve proliferasyonu ile yara içindeki hematoma granülasyon dokusu ile yer değiştirir. Epitellerin karşılıklı bir araya gelmelerine kadar migrasyon devam eder ve yara kontraksiyonu ile yara büyüklüğü azaltılır (Brissett ve Sherris, 2001; B. Kumar ve diğerleri, 2007; Parsak ve diğerleri, 2007).



Makrofajlardan, deri altı yağ dokusundan, epidermal hücrelerden gelen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile diğer büyüme faktörlerine cevap olarak, endotel hücreleri yeni damarlar oluşturmak için dallanır. Aktifleşmiş endotelial hücreler, P-selektin ve E-selektin gibi glikoprotein reseptörlerini eksprese ederek lökosit adezyonuna ve deriye infiltrasyona izin verir. Endotel hücreleri ayrıca lökosit hareketini durduran hücreler arası yapışma molekülü (ICAM)-1'i ve vasküler hücre yapışma molekülü (VCAM)-1'i up regüle eder.

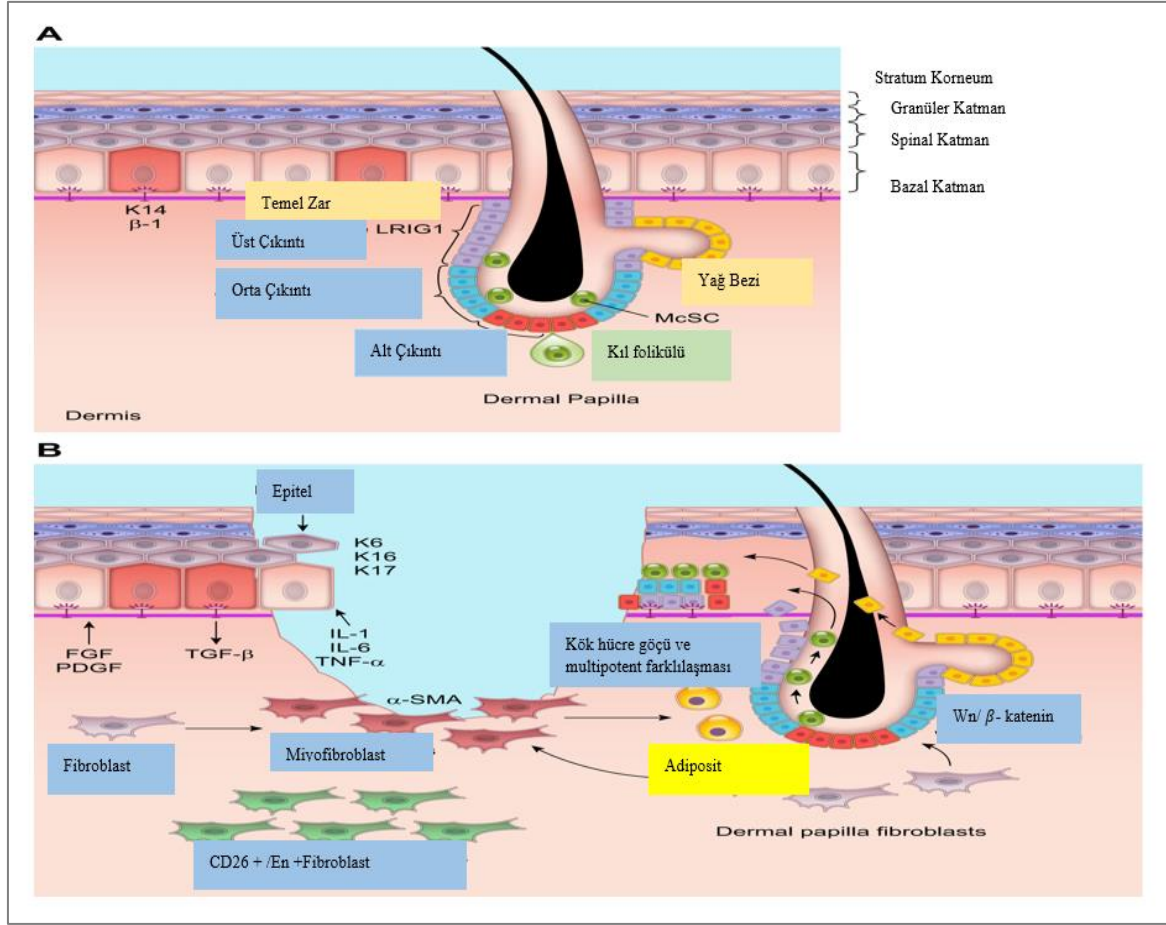
Şekil 2.4. Yara iyileşmesi sırasında anjiyogenez (Rodrigues ve diğerleri, 2019)

Matürasyon (yeniden şekillenme)

Yaralanmadan itibaren 8 gün/ 3hafta ile 1 yıla kadar devam eden ve skar dokusuyla sonuçlanıp yaranın iyileştiği kabul edilen en uzun evredir. Yara kontraksiyonu ve kollajen sentezi bir önceki evrede olduğu gibi devam etmekle birlikte, bir takım yapısal ve ayırt edici değişiklikler bulunur. Fibroblastların, miyofibroblastların, endotel hücrelerinin ve makrofajların çoğu kollajen açısından zengin hücre dışı matris sentezleyerek apoptoz denilen hücre intiharı geçirir. Granülasyon dokusunda oluşan kollajen yaralanmamış dokudaki kolajenden biyokimyasal olarak farklılık gösterir. En az 4-5 hafta süren kolajen sentezi sonucu tip III kolajen, tip ve I'e dönüştürülür ve bu durum yaklaşık 30 gün sonra dengelenir. İlk oluşan kolajen iplikleri cilde paralel olarak yerleşen ve sağlam dokununkine göre daha ince olan bir yapı gösterir. Zamanla ilk iplikler yeniden emilerek, kalın bir şekilde biriktirilmesi sağlanır. Zamanla kolajen kalınlığı ve gerilme mukavemeti arasında pozitif bir

korelasyon oluşarak gerilme kuvveti artar. Granölasyon dokusu kolajeni, lizin kalıntılarının daha fazla hidroksilasyonu ve glikosilasyonuna sahip olup, yaradaki kollajen asla, yara almamış dokudaki gibi düzenlenmez. Yara gücü, 3 haftada nihai gücün % 30'una ulaşırken, 3 ay ve sonrasında % 80'ine ulaşmaktadır. Makrofaj, fibroblast ve kan damarı yoğunluğunun azalarak skar dokusunun oluştuğu bu evrede, biyomekanik kapasitenin azalmasıyla birlikte estetik sakıncalar da oluşabilmektedir (Childs ve Murthy, 2017; Falanga, 2005; George Broughton ve diğerleri, 2006; Sculean ve diğerleri, 2014).

Sonuç olarak anjiyogenez, keratinosit göçü, yara kontraksiyonu ve ECM'nin yeniden şekillenmesi tamamlanarak, yara iyileşmesinin optimal seviyeye çıkarılması beklenir (Falanga, 2005).



A: Bazal katman, granüler ve spinal katmanlara ait keratinositleri oluşturmak için K14+/β1-integrin pozitif kök hücreleri içerir. Ayrıca epidermis kıl folikülü ve yağ bezinin özellikle ilgi çekici olduğu uzantıları da içerir. Kıl folikülünün üst, orta ve alt çıkıntılarında çeşitli tiplerde kök hücreleri bulunur. Melanosit kök hücreleri (McSCs) de kıl çıkıntısında ve germinde dağılır. Yağ bezlerini yeniden oluşturacak olan kök hücreler de dikkat çekmektedir. B : Kıl folikülü içindeki unipotent kök hücreler doğrusal bir şekilde hareket eder ve için multipotent bir farklılaşma potansiyeli kazanır. Dermal papilladaki fibroblastlar Wnt/β-katenin yoluyla kıl folikülündeki hücelere sinyal gönderirler. Yara kasılmasını sağlamak amacıyla, epidermal kök hücreler de fibroblastlara sinyal göndererek onları miyofibroblastlara dönüştürür. Miyofibroblastların bir alt grubu skar oluşumunu azaltan adiposit hücrelerine dönüşür. Fibrozdan sorumlu olan ve CD26/En1 ekspresyonuna sahip başka bir fibroblast alt kümesi, daha yüksek seviyelerde ECM biriktirir. Epidermin bazal membranındaki interfolliküler kök hücreler de çoğalarak yaraya göç eden keratinositleri oluşturur. Farklılaşmış keratinositlerin ve kök hücrelerin çoğalması ve yaraya migrasyonu birlikte yaranın yeniden epitelizeasyonu gerçekleşir.

Şekil 2.5. Yeniden epitelizeasyon ve fibroblast-epidermal hücre etkileşimleri (Rodrigues ve diğerleri, 2019)

2.1.3. Yara iyileşmesi şekilleri

Belli başlı 3 tip yara iyileşmesi görülmektedir (Şekil 2.6):

Primer yara iyileşmesi

Yara kenarlarının yaralanma öncesi anatomik durumunun değişmeyecek şekilde birleşerek doku kaybının en az olduğu iyileşme şeklidir. Diğer yara iyileşme çeşitlerine göre skar

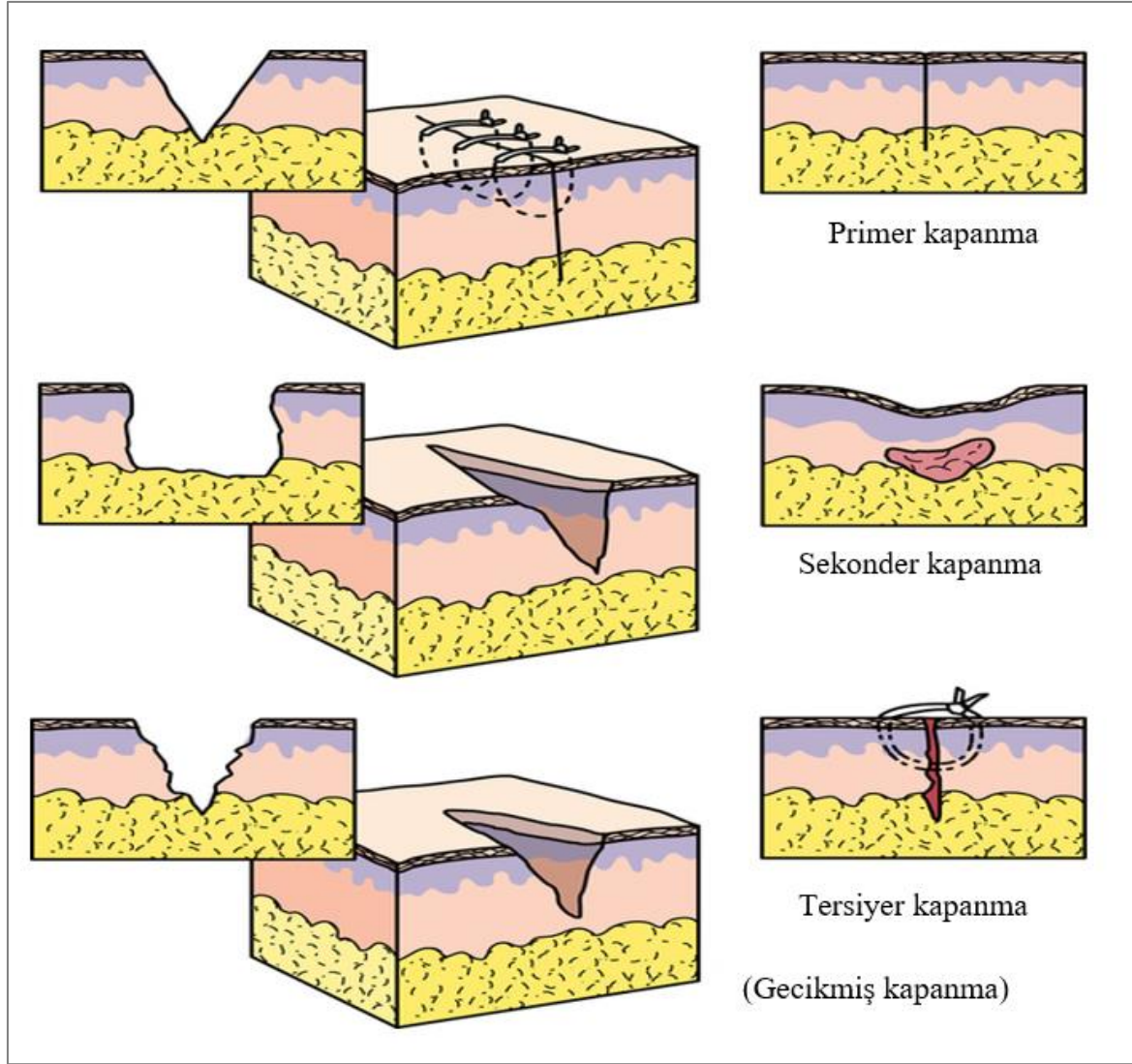
formasyonunun ve enfeksiyon riskinin azaldığı ve buna bağlı olarak da daha hızlı iyileşmenin görüldüğü bu çeşitte, yumuşak doku 3-5 en fazla 10 günde iyileşir. Matriks proteinleri ve kollajen sentezi ile kollajen lifleri arasındaki bağların oluşumu enfeksiyon görülmeden ve minimum düzeyde ödem ve ince bir skar dokusu oluşarak dengeli bir şekilde tamamlanır. İyileşme sonrasında yara, eski gücünün %85-90' ını geri kazanır. Kopan sinirlerin yeniden anastomozu, cerrahi inzisyon yaraları ve iyi repoze edilmiş fraktürler, primer yara iyileşmesine örnek olarak verilebilir (Ertoý, 1996; Parsak ve diğerkleri, 2007).

Sekonder yara iyileşmesi

Yarada doku kaybı olan, yara kenarlarının tam karşılıklı getirilemediğı, daha fazla skar oluşan ve daha yavaş gerçekleşen iyileşme tipidir. Yumuşak dokuda iyileşme zamanı 10 gün ile 1 ayı bulabilir. Doku defekti olan vakalarda, tam kat yara açık bırakılarak ve sütür konulmadan; granülasyon dokusu, yara kontraksiyonu ve epitelizasyonu ile iyileşmesi sağlanır. İnflamasyon, matris oluşumu, epitelasyon ve skar dokusu matürasyonu süreçleri bazı temel farklılıklarla primer iyileşmede görüldüğü gibi burada da görülür. Granülasyon dokusu kollajen, laminin, fibronektin, prolifer kapiller ve yeni kapiller içerir. Epitelizasyonlar skar dokusunun gerilme kuvvetini oluşturmada daha önemli olduğı için, epitelizasyonun bütünlüğü sağlayacak şekilde tamamlanmasıyla sonlanır. Derin ülserler, çekim soketleri, iyi redükte edilemeyen fraktörler ve yumuşak dokunun geniş yaralanmaları sekonder yara iyileşmesine örnek olarak verilebilir (Ertoý, 1996; Parsak ve diğerkleri, 2007).

Tersiyer yara iyileşmesi

Sekonder yara iyileşmesini takiben yara ağızlarının yenilenip dikilmesi veya geniş yaraların greftlenmesi esasına dayanır. Yabancı cisimle ciddi bakteri kontaminasyonu olan ve öncesinde debridman vb. gibi işlem gerektiren durumlarda, yara açık bırakılıp sonrasında steril serum fizyolojikli petlerle kapatılır. Yine normal yara iyileşme süreci uygulanır ve kapanmanın sonunda primer kapama sırasında elde edilen gerilme mukavemetine karşılık gelen bir değere ulaşılır (Ertoý, 1996; Parsak ve diğerkleri, 2007; Yüceyar, 2008).



Şekil 2.6. Yara iyileşmesi tipleri (Phillips, 2004)

2.1.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Yara iyileşmesini etkileyen birbiriyle ilişkili birçok faktör vardır. Bir yaranın özelliklerini doğrudan etkileyen faktörler lokal faktörler kategorisine girerken, kişinin iyileşme yeteneğini etkileyen genel sağlık veya hastalık durumları sistemik faktörler kategorisine girer. Bir yaranın iyileşmesi için, yara pansumanları ve tedavileri ile enfeksiyondan hipoksiye kadar çok sayıda engelin aşılması, pek çok iyileşme faktörünün uyum içinde çalışması gerekir (Guo ve DiPietro, 2010; Han ve Ceilley, 2017).

Lokal faktörler

Enfeksiyon

Yara iyileşme sürecinde hemen hemen tüm yaralar, mikroorganizmalarla kolonize olup, genelde klinik sonuç vermeden iyileşir. Hatta bazı mikroorganizmaların varlığı iyileşmeye bile yardımcı olmaktadır. Enfeksiyon gelişimi, konakçı ve mikroorganizmalar arasındaki karmaşık etkileşimler tarafından belirlenmekle birlikte; patojenik mikrobiyal flora ile kontaminasyon enfeksiyona ve sepsise yol açarak iyileşme süreçlerini bozabilir. Fizyolojik bir yanıt olarak ortaya çıkan enflamasyonun mikrobiyal enfeksiyon tarafından aşırı indüklenmesi sonucu ekstraselüler matriksin kusurlu olarak yeniden şekillenmesi ve yeniden epitelizasyonun başarısız tamamlanmasıyla yara kronik bir hal alır (Bigliardi ve diğerleri, 2017).

Oksijenizasyon

Oksijen hücre çoğalması ve hücre göçü, protein sentezi ve hücre metabolizmasında gerekli olduğu için yara iyileşmesinde önemli bir faktördür (Pekbilir, 1990). Bir sonraki bölümde detaylı olarak ele alınacaktır.

Yara yerinde hematoma ve seroma gelişimi

Yara kenarlarında artan dökülme, bakterilerin büyümesi için bir ortam oluşturur ve böylece yara iyileşmesi yavaşlar (Arnold ve Barbul, 2006).

Yara hidrasyonu

Optimal bir iyileşme için su ve iyi hidrasyon düzeyleri önemli olup, nemli bir ortam kuru ortama kıyasla avantajlı süreçler içermektedir. Epidermin maturasyonu ve yeniden şekillenmesi için stratum korneumdaki optimal su seviyesi önemli olup yaranın altında bir kabuk oluşmasını engeller. Stratum korneumun bozulmasından kaynaklanan epidermisteki su içeriğindeki dengesizlik, epidermal keratinosit genlerinde değişikliğe neden olur. Hidrasyon durumunun azalmasıyla epidermisteki enflamatuar sinyallerin ekspresyonu doğrudan etkilenerek çeşitli sitokinlerde artış ile birlikte inflamatuvar tepki de yükselmektedir (Ousey ve diğerleri, 2016).

Sistemik faktörler

Yaş

Yaşın ilerlemesi özellikle de 70'i geçmesiyle birlikte yara iyileşmesi gecikir. Bunun nedeni artan sistemik hastalıklarla birlikte, kollajen dışı ekstrasellüler matriks protein yapımı azalmasıdır (Sherris ve Kern, 1999). Yaşlanan cilt aynı zamanda genç kişilerin cildine kıyasla azalmış sitokin ve büyüme faktörü üretimi, azalmış sitokin reseptörleri ve artan yaşlanmış hücre sayısı ile azalmış bir inflamatuvar yanıt, ile de karakterize edilir. Hücresel yaşlanmaya bağlı olarak hücrelerin proliferatif yeteneği azalarak, fibroblastların artışında yavaşlama meydana gelir. Yaşlanmanın çapraz bağlantı teorisine göre, hücreler yaşlandıkça proteinlerin, DNA'nın ve diğer yapısal moleküllerin birbirleriyle bağlar veya çapraz bağlar geliştirdiği varsayılmaktadır. Bu hasarlı moleküller yaşlanmayla birlikte hücrelerde birikerek cilt elastikiyetini kaybetmeye ve cildin bir yarayı iyileştirme yeteneğinin yavaşlamasına neden olmaktadır (Pittman, 2007).

Beslenme

Beslenme yara iyileşmesinin önemli bir bileşeni olup, başarılı bir yara iyileşmesi için hasarlı bölgeye yeterli miktarda kan ve besinin ulaşması gerekir. Beslenme bozukluğu olan kişilerde savunma mekanizmaları yeteri kadar geliştirilemez ve enfeksiyon gelişme riski artar. Perioperatif beslenme protokolüne göre, düzenli ve dengeli alınan A ve C vitamini immün sistemi indükler, ayrıca C vitamini kollajen sentezinde rol oynayan güçlü bir antioksidandır. Glikozamin, hiyalüronik asit üretimini arttırarak yara iyileşmesini arttırır. Arjinin, glutamin gibi aminoasitler özellikle bağışıklık sistemini güçlendirir ve büyüme hormonu salgılanmasını sağlar. Glutamin, protein sentezini, hücre hidrasyonunu ve iyileşmesini arttırarak, hücrelere nitrojen taşır ve oluşan toksinleri temizler (Arnold ve Barbul, 2006; MacKay ve Miller, 2003; Nursal ve diğerleri, 1999).

Büyüme faktörleri

Genel olarak, makrofaj, epitel hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri tarafından sentezlenip salgılanan bu maddeler de yara iyileşmesinde önemli rol alırlar. Büyüme faktörleri fibroblastlar ve keratinositler gibi hücrelerin proliferasyon ile migrasyonunu, anjiyogenez, granülasyon dokusu olusumunun uyarılması, kollajenaz, nötrofil kemotaksisi,

matriks depolanmasının uyarılması ve yara kontraksiyonu gibi çok önemli işlevleri üstlendikleri için yara iyileşmesini hızlandırırlar (Lütfoğlu, 2007; Steenfes, 1994).

Diyabet

Diyabetli bireylerde yara iyileşmesi gecikmekte ve hızlandırılmış ateroskleroz ve nöropatinin neden olduğu azalan perfüzyon nedeniyle bağışıklık sistemi bozulmaktadır. Ayrıca, azalmış anjiyogenez, daha yavaş kollajen sentezi ve birikimi ve yaraların daha zayıf gerilme kuvveti nedeniyle yara iyileşme mekanizması bozulur. Son yıllarda oksidatif stresin diyabetik yara iyileşmesinde hayati bir rol oynadığına inanılmaktadır ve bu başlık bölüm 2. 1. 6'de daha ayrıntılı anlatılacaktır (Deng ve diğerleri, 2021; Gantwerker ve Hom, 2012).

2.1.5. Yara iyileşmesi ve reaktif oksijen türleri

Oksijen (O_2), yüksek mitokondriyal güdümlü adenosin trifosfat (ATP) üretimi için gereken temel substrattır ve yara iyileşmesinde hücre çoğalması, hücre göçü, protein sentezi, doku yenilenmesi gibi metabolik olaylarda artan enerji miktarını sağlar. Normal yara iyileşme yanıtının düzenlenmesinde ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (ROS), ikincil haberciler olarak ortaya çıkarlar. ROS, O_2 içeren ancak eklenen elektronlarla indirgenerek oldukça reaktif, radikal bir formata dönüşen moleküller için geçerli bir terimdir. Endojen kaynaklı ROS, mitokondriyal oksidatif fosforilasyondaki ATP üretimi sırasında, endoplazmik retikulumdan veya oksidoredüktazlar olarak bilinen bir enzim sınıfından kaynaklı üretilir. ROS molekül ailesinin iyi bilinen molekülleri arasında, Hidrojen Peroksit radikali (H_2O_2) Hidroksil radikali ($OH\cdot$), Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) vb. gibi moleküller bulunur. Akut yara iyileşmesinde hemoostatik ROS seviyesi çoklu işlevler üstlenmekte; kan akışı ve trombüs oluşumu için yerel hücre sinyalini azaltmakta, nötrofil, monosit ve diğer immünoisitleri yara bölgesine çekerek patojenlerin yok edilmesini sağlamakta, anjiyogenezi oluşturmakta, fibroblast bölünmesini ve yeni ECM oluşumu (kollajen sentezi dahil) için hücre göçünü uyarmakta ve keratinosit çoğalmasını ile göçünü desteklemektedir.

Etkili yara iyileşmesi için düşük ROS seviyeleri önemli olmakla birlikte, aşırı ROS üretimi oksidatif strese yol açarak, hücresel hasara ve bozulmuş yara onarımına neden olur. ROS aracılı transkripsiyon sonucu, sürekli proinflamatuvar sitokin salgılanması ve matris metalloproteazların indüklenmesi gerçekleşir. Aşırı ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS)

doğrudan ve dolaylı olarak (proteoliz aktivasyonu yoluyla) ECM proteinlerini değiştirebilir veya bozabilir , ayrıca bozulmuş dermal fibroblast ve keratinosit işlevine neden olur.

Canlı organizmalar, aşırı ROS seviyelerinin önlenmesi ve gecikmiş yara iyileşmesini iyileştirmek için protein yapılı bir antioksidan sistemi geliştirir. Antioksidanlar kendi elektronlarını vererek, DNA, lipit ve protein gibi önemli moleküllerin elektron almasını engelleyerek bir dizi savunma mekanizması geliştirir (Dunnill ve diğerleri, 2017; Shiekh ve diğerleri, 2020).

2.2. Diyabet

2.2.1. Diyabet

Diyabet hastası bireylerin hastalığı yönetmesi ve olası komplikasyonlarından en az zarar alacak şekilde ya da zararsız atlatması için, sürekli tedavi ve desteğe ihtiyaçları vardır. Açıklanan olağanüstü rakamlar diyabetin dünya için global bir sorun haline geldiğini ve etkin mücadele edilmediği takdirde, ortaya çıkabilecek komplikasyonlar ve sağlık harcamalarıyla birlikte önüne geçilemez bir küresel tufan haline gelebileceğini göstermektedir.

2.2.2. Diyabet ve komplikasyonları

İnsanlık tarihi kadar eski olan Diabetes Mellitus (DM) terimi, kelime anlamı olarak “tatlı suyun sifonlanması” anlamına gelmektedir. İlk bilgilerin 3000 yıl önce Mısır’da bulunan bir el yazmasında olduğu belirtilse de, “Diabetes” kelimesini Kapadokyalı Yunan bir doktor, diyabetli hastaların bir sifon gibi çok fazla idrar çıkarttığını belirtmek için kullanmıştır. Diyabet, tıbbi olarak yetersiz insülin salgılanması veya insülin salgılanması ve/veya etkisinin olmaması nedeniyle karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmasındaki bozukluklardan kaynaklanan metabolik, kronik bir endokrin hastalığı olarak tanımlanır (Soysal ve Yılmaz, 2022).

Tip 1 diyabet, sıklıkla 6-20 yaş arasındaki gençlerde gözükür ve pankreasın beta hücrelerinin otoimmün bozukluğu sonucu oluşur. Tip 2 diyabet, çoğunlukla 30 yaş üstü bireylerde gözükür, bozulmuş insülin sekresyonu ve insülin etkisine karşı gelişen direnç nedeniyle ortaya çıkan formudur. Gestasyonel diyabet, gebeliğin ikinci ve üçüncü trimesterinde

salgılanan hormonlara bağılı olarak ortaya çıkan glikoz tolerans bozukluğudur. Bunların dışında kalan genetik defektler, pankreasın ekzokrin hastalıkları, ilaçlar, immün sebepler gibi nedenlerle ortaya çıkan diyabet de, spesifik diyabet olarak adlandırılır. Hangi çeşit olursa olsun tüm tiplerinde ortaya çıkan neden, beta hücrelerin disfonksiyonu ve yıkımıdır. Otoimmünite, inflamasyon, insülin direnci, obezite, yaşlı nüfusun azalması ve fiziksel hareketsizlik gibi pek çok faktör pankreasın beta hücresi azalmasına yol açar (Soysal ve Yılmaz, 2022).

Diyabet kontrol altına alınmadığında uzun dönemde, nöropati, nefropati ve retinapati gibi mikrovasküler, periferik ve serebrovasküler hastalıklar gibi pek çok makrovasküler komplikasyonlara neden olur. Diyabete bağılı bu komplikasyonların oluşmasında, artan ROS üretimi nedeniyle meydana gelen oksidatif stres rol oynamaktadır. Mitokondriyal disfonksiyon ve prooksidan enzimlerin deregülasyonu, ROS oluşumunda rol oynayan ana etmenler olarak görülmektedir (Hamamcıoğlu, 2017; Poblete-Aro ve diğerleri, 2018). NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, siklooksijenaz ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) gibi çeşitli kaynaklardan hücre içi süperoksit üretimi, mRNA'ların bozulmuş ekspresyonu, adiponektin ve omentin-1 gibi adipokinlerin , çeşitli yollarla insülin direncini etkilemesi hiperglisemiye neden olur. NADPH oksidaz, tüm bu işlevlerin oluşumunda merkezi bir rol üstlenip, diğer oksidazların düzensizliğine yol açarak ROS üretiminin artmasına neden olur (Luc ve diğerleri, 2019). Bunun sonucunda Glukoz taşıyıcı tip 4 (GLUT4), glukoz taşıyıcılarının sitoplazmadan hücre zarına olan translokasyonunda bir bozukluk oluşur ve insülin direncini telafi etmek için artan insülin salgısı ile, pankreatik beta hücresi disfonksiyonu meydana gelir (Poblete-Aro ve diğerleri, 2018).

Sonuç itibarıyla, artan oksidatif stres, ateroskleroz, vasküler inflamasyon, endotel disfonksiyonu gibi birçok hastalığın patogeneğinde merkezi bir role sahiptir ve prediyabetin diyabete ilerlemesinde de rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, hastalığın ilerlemesini önlemek için oksidatif streste ki değişiklikleri erken tespit etmek çok önemlidir (Luc ve diğerleri, 2019).

2.2.3. Diyabet ve yara iyileşmesi

Altta yatan patolojik mekanizma veya mikrobiyal invazyon nedeniyle normal iyileşme süreci bozulduğunda, yara iyileşmez ve diyabetik yaralarda olduğu gibi kronik bir yara

haline gelir. Sorunun altında yatan mekanizma kesin olarak bilinmemekle birlikte, hızlandırılmış ateroskleroz ve nöropatinin neden olduğu azalan perfüzyon kaynaklı enfeksiyon, yavaş kollajen sentezi ve birikimi, azalmış anjiyogenez, yaranın daha zayıf gerilme kuvveti, azalmış nöropeptit sekresyonu sonucu epitel, duyuşal sinirler ve dendritik hücrelerden meydana gelen epinöroimmün fonksiyonunun bozulması, mikro RNA'ların düzenleyici işlevlerindeki dengesizlik, büyüme faktörlerinin yapım ve yıkımındaki düzensizlikler ve bozulan oksidatif denge gibi unsurlar yer almaktadır (Fu-Shin ve diğeri, 2022; Gantwerker ve Hom, 2011).

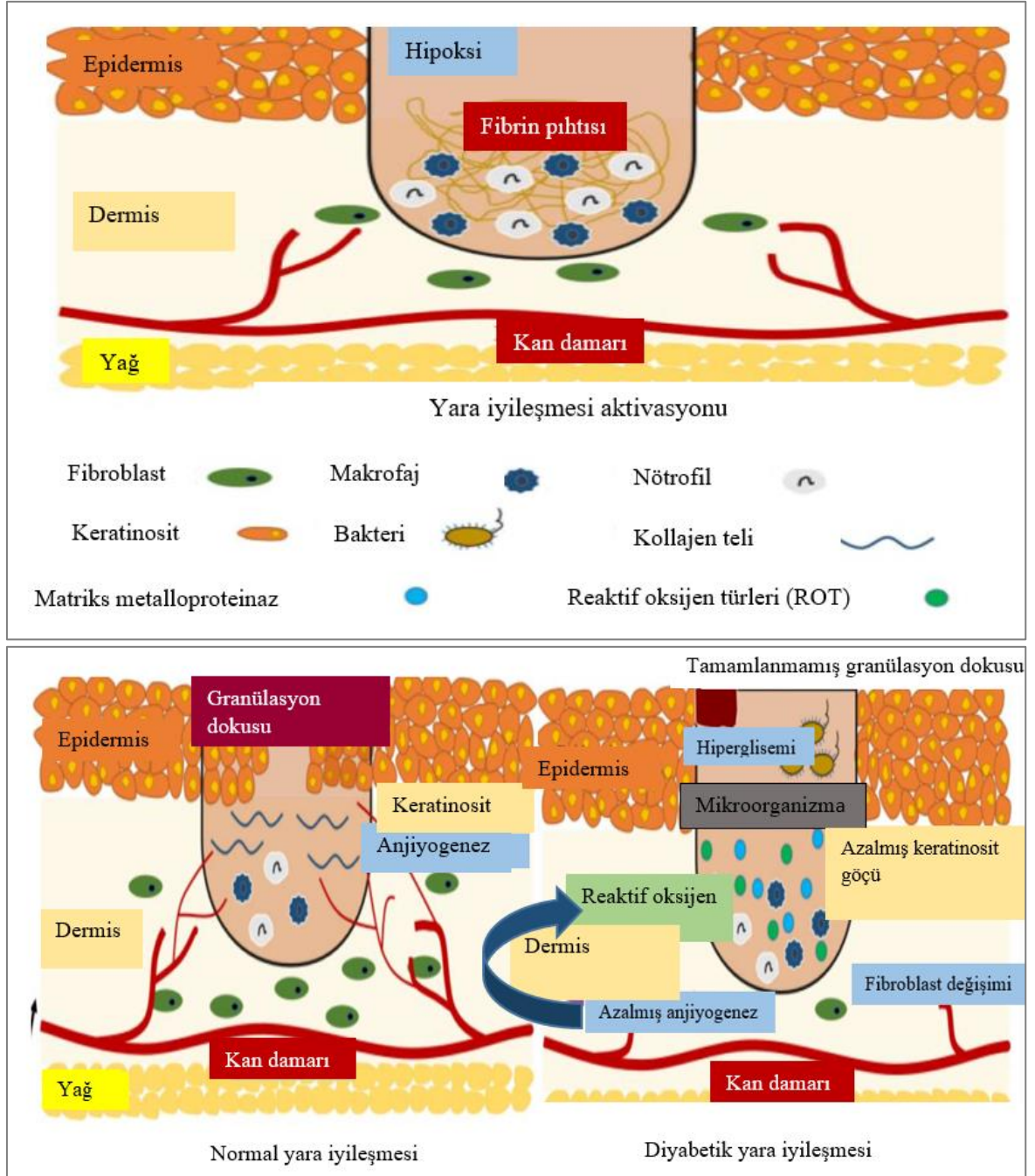
Yara iyileşme sürecinde çok önemli rol oynayan ve trombositlerden büyüme faktörü salgılanmasını sağlamak ve yabancı hücrelerin öldürülmesini sağlamak gibi işlevleri üstlenen makrofajların üç tipinin olduğu bilinmektedir. Bunlardan M1 proinflatuar makrofaj olarak adlandırılırken, M2 anti-inflatuar makrofaj tipi olarak adlandırılmaktadır. İnhibe edilmemiş M1 makrofajlarının aşırı birikimi sonucu enflatuar evresi kronikleşir (Bai ve diğeri, 2020; Süntar ve diğeri, 2010).

Büyüme faktörleri gibi anjiyogenik faktörler ve trombospondinler, endostatin, anjiyostatin gibi anjiyostatik faktörler arasındaki denge bozulur. TGF- β yara iyileşmesi sürecinde, monositlerden diğeri büyüme faktörlerinin sekresyonunu uyarmakla birlikte, hücre proliferasyonunu ve ECM oluşumunu da teşvik eder (Bai ve diğeri, 2020; Shi ve Massagué, 2003).

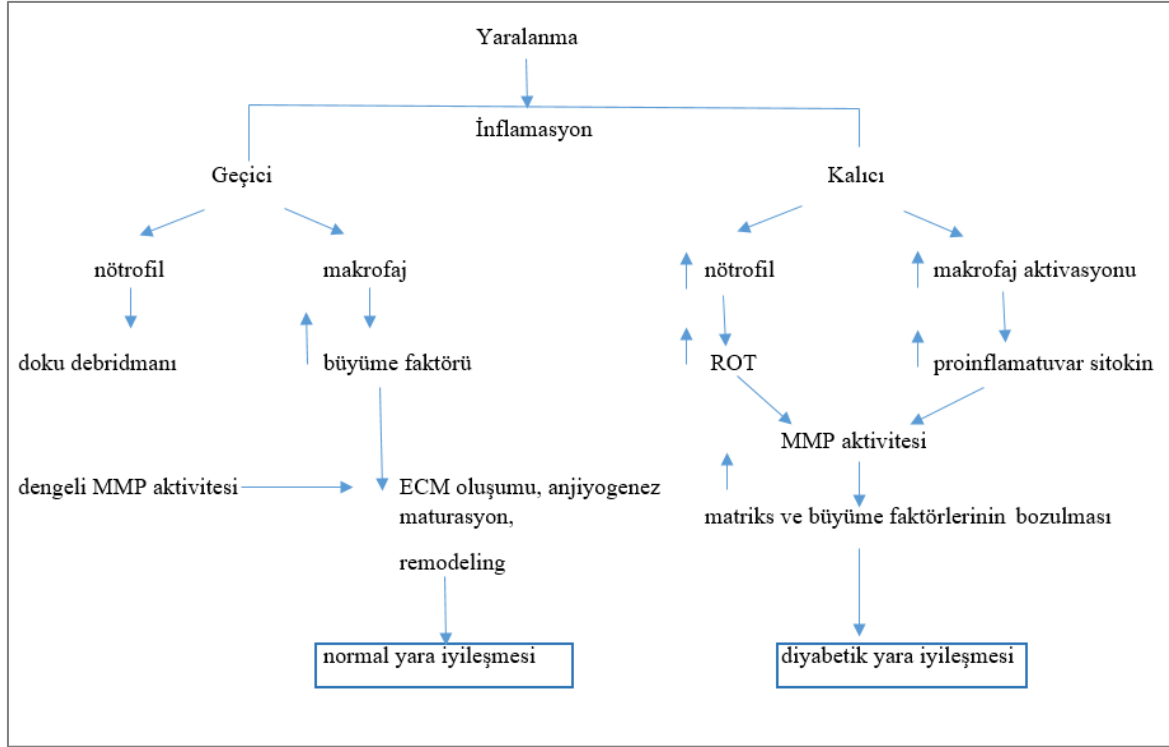
Diyabetiklerde ise TGF- β seviyesi ve yara kontraksiyonundan sorumlu olduğu bilinen miyofibroblast oluşumu azalır ve bu durum bozulmuş yara iyileşmesine neden olur (Al-Mulla ve diğeri, 2011). Bir başka önemli büyüme faktörü olan TNF- α miktarının fazla olup bazal seviyeye düşmemesi sonucu anjiogenezin, hücre çoğalmasının ve göçünün inhibisyonu gerçekleşir. Diyabetik hastalarda, proinflatuar sitokinlerden olan TNF- α ve interlökin-6 (IL-6)'nın artması ile birlikte ani-inflatuar olarak görev yapan IL-10 miktarının azalması sonucu lökosit infiltrasyonunda uzama gerçekleşir (Bai ve diğeri, 2020; Wetzler ve diğeri, 2000). Ayrıca VEGF ve diğeri faktörlerin aktivitesi azaldığı için, pek çok önemli proteinin enzimatik olmayan glikasyonu artıp, anormal hücreşel ve ECM işlevi sonucu diyabetik yaralarda anjiyogenez gerçekleşemez (Bai ve diğeri, 2020; F. Xu ve diğeri, 2013).

Yüksek glikoz seviyeleri, kollajen degradasyonundan sorumlu olan ve keratinosit göçünü düzenleyen matriks metaloproteinazların (MMP) aşırı üretimine sebep olur. Özellikle diyabetik ayak ülserlerinde TIMP-2 miktarının azalmakta ve MMP-1, MMP-9 ve MMP-8 ekspresyon miktarının artmakta olduğu dolayısıyla da yara iyileşmenin geciktiği bilinmektedir (Lobmann ve diğerleri, 2002). Tümör büyüme faktörü β tip II reseptörünün baskılanmış ekspresyonu sonucu, fibroblast çoğalması ve miyofibroblastlara farklılaşması azalarak, kollajen sentezi azalarak yara gerilim kuvveti istenen seviyeye gelmez ve yeniden şekillenme aşaması da engellenmiş olur (Bai ve diğerleri, 2020).

Vasküler disfonksiyon, nöropati ve inflamasyon sırasında yara hücrelerinin yüksek oksijen tüketimi ve büyüme faktörleri arasında artan dengesizlik hipoksiyi tetikler. Sınırlı oksijen kaynağı ve yarada yüksek oksijen tüketimi gibi iki temel faktör nedeniyle meydana gelen ve artan hipoksi de enflamatuvar yanıtı uzatarak, iyileşmenin gecikmesini sağlayan oksijen radikallerinin seviyesini arttırır. Fazla miktardaki oksidatif stres fibroblastlarda yaşlanmaya, fibroblastlardaki kontraksiyon işlevi ve büyüme faktörüne olan yanıtı azaltır (Şekil 2. 7) (Bai ve diğerleri, 2020; Xuan ve diğerleri, 2014). Diyabet ve yara iyileşmesinin mekanizması şekil 2.8'deki gibi özetlenebilir.



Şekil 2.7. Diyabetin yara iyileşme sürecine etkisi (Bai ve diğerleri, 2020)



Şekil 2.8. Normal ve diyabetik yara iyileşmesi (Abiko ve Selimovic, 2010)

2.3. Oksidatif Stres

Aerobik yaşam gereği çoğu hücre tipinde mitokondri, endoplazmik retikulum ve peroksizom gibi organeller ile NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz ksantin oksidaz), nitrik oksit sentaz, siklooksijenazlar, sitokrom P450 enzimleri gibi çok sayıda enzim kaynaklı serbest radikaller oluşur. ROS (reaktif oksijen türleri) ve RNS (reaktif nitrojen türleri) şeklinde bulunan bu moleküller; protein, lipit, DNA gibi önemli molekülleri birinci dereceden etkilerler. Bazal ROS seviyeleri, sinyal iletim yolları, patojen mikroorganizmalara karşı savunma, gen ekspresyonu ve büyüme veya ölümün teşvik edilmesi gibi çeşitli çok sayıda hücresel fonksiyonların tezahürü için gereklidir. Bu serbest radikaller çok ince bir düzen içinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemiyle dengelenir. Bu oksidan sinyalleme dengesizliği sonucu, kanser, alzheimer, multiple skleroz, hipertansiyon ve diyabet gibi çok sayıda hastalıkla bağlantılı oksidatif stres meydana gelir (Abiko ve Selimovic, 2010; de Zwart ve diğerleri, 1999).

2.3.1. Serbest radikaller ve kaynakları

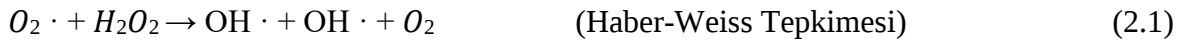
Dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve diğer maddelerle kolayca reaksiyona girebilen kararsız, yüksek enerjili atom veya moleküller olan serbest radikallerin oluşum şekilleri şu üç durumda meydana gelir: Moleküllerden elektron tutacak şekilde kimyasal bir bağın kırılması, bir radikalın başka bir radikal vermek üzere bölünmesi ve redoks reaksiyonları. Serbest radikal kaynakları arasında mitokondriyel elektron taşıma zinciri, immün sistem hücrelerindeki yanıtlar, bazı enzimler gibi iç kaynaklar ya da zararlı dalga boyu ışınları, çeşitli kirleticiler, deterjan gibi dış kaynaklar yer almaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016; Pham-Huy ve diğerleri, 2008)

2.3.2. Serbest oksijen radikalleri

Metabolik reaksiyonlar sırasında üretilen en önemli serbest radikaller oksijenden türetilen radikallerdir (ROS). Hem ROS, hem de RNS radikal ve radikal olmayan olmak üzere iki gruba ayrılır (Pham-Huy ve diğerleri, 2008).

Süperoksit iyon radikal (O_2^-)

Süperoksit anyon radikali otooksidasyon enzimatik süreçlerle ya da, bir elektronun moleküler oksijene eklendiği enzimatik olmayan süreçlerle oluşan, reaktivitesi düşük ve en yaygın radikaldır. Demir komplekslerini indirger ve askorbik asit ve tokoferolü oksitleyerek oksitleyici ajan olarak hareket edebilir (Pham-Huy ve diğerleri, 2008). Haber-Weiss tepkimesi sonucu; süperoksit radikali, oksijen ve hidrojen peroksit birlikte demir varlığında etkileşime girerek oldukça reaktif olan hidroksil meydana getirir (Phaniendra ve diğerleri, 2015).



Apoptoz, inflamasyon, nötrofil bakterisidal etkisi, vasküler fonksiyonun düzenlenmesi gibi faydalı etkileri olan süperoksit aşırı üretildiğinde ATP sentezini inhibe eder ve elektron taşıma zincirini yavaşlatır (Memişoğulları, 2005).

Hidroksil (OH•) radikal

Oldukça reaktif bir serbest radikal olan hidroksil radikali, hidroksit iyonunun nötr formudur ve DNA, proteinler, lipitler ve karbonhidratlarla reaksiyona girerek hücrelerde ciddi hasarlara neden olur. Geçiş metalleri hidroksil radikalının oluşmasında önemli rol oynar. Haber -Weiss reaksiyonu ve fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşurken, gamma radyasyona maruz kalan dokularda da meydana geldiği görülmüştür. Hidrojen peroksitin fenton reaksiyonuyla, demir veya diğer geçiş metalleri varlığında indirgenmesi sonucu oluşan hidroksil, hücredeki organik moleküllerle ve metallerle etkileşime girebilen en güçlü oksitleyici radikal olduğu düşünülmektedir (Is, 2001; Memişoğulları, 2005; Phaniendra ve diğerleri, 2015).



Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından dismutasyon reaksiyonuyla veya indirgenme reaksiyonlarıyla meydana gelir. Bu redüklenme tepkimelerinde, süperoksit çevresindeki moleküllerden bir elektron alır ya da moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksit iki proton ile birleşerek hidrojen peroksiti oluşturur. Hidrojen peroksit, serbest radikal olmamakla birlikte geçiş metallerinin oksidasyonu yoluyla Fenton reaksiyonu ve Haber -Weiss reaksiyonu sonucu OH⁻ oluşmasına neden olduğu için DNA hasarlarına neden olur. (Kohen ve Nyska, 2002; Phaniendra ve diğerleri, 2015).



Peroksil radikal (ROO•)

En basit şekli süperoksitin protonlanmasıyla oluşan ve perhidroksil radikali olarak adlandırılan formudur. Bir hücrenin sitozolündeki yaklaşık %0,3'ü protonlanmış halde bulunup, yağ asidi peroksidasyonunu başlatır ve tümör gelişimini destekleyebilir (Phaniendra ve diğerleri, 2015).

Singlet oksijen ($^1\Delta G0_2$)

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin kendi spininin tersi yönünde orbitalle yer değiştirmesi sonucu yani elektronik olarak uyarılmasıyla meydana gelen toksik bir reaktif oksijen türüdür. Nötrofillerin ve eozinofillerin aktivasyonu ile üretilebilirken, ayrıca bazı enzime dayalı reaksiyonlar tarafından da oluşturulur. DNA ve doku hasarına neden olan güçlü bir oksitleyici ajandır (Phaniendra ve diğerleri, 2015).



Ozon (O_3)

Enflamasyonda rol oynayan ve oksidasyon yoluyla üretilen güçlü bir oksidandır. Serbest radikal olmamasına rağmen biyolojik molekülleri oksitleyerek serbest radikaller ve diğer reaktif ara ürünler oluşturup lipid peroksidasyonuna neden olabilir. Proteinlerde ve nükleik asitlerdeki farklı fonksiyonel grupları oksitleyerek kromozomal anormalliklere sebep verir (Phaniendra ve diğerleri, 2015).

Hipokloröz asit (HOCl)

Tiyoller, askorbat, ürat, piridin nükleotitler ve triptofan gibi biyolojik molekülleri oksitleyen ya da aminler, kolesterol ve doymamış lipidler ve DNA'yı klorlayabilen güçlü bir reaktif türdür. Hidrojen peroksit ve klorürden kaynaklanan iltihaplanma bölgesinde miyeloperoksidaz enzimi tarafından nötrofillerce üretilen önemli bir oksidandır (Phaniendra ve diğerleri, 2015).



2.3.3. Oksijen türevi olmayan serbest radikaller

Bu grubun en önemlisi nitrik oksittir.

Nitrik oksit (NO)

Nitrik oksit sentazların yürüttüğü tepkime sonucu oluşan ve üç izoform şeklinde bulunan küçük bir moleküldür. Nitrik oksit koşullara bağlı olarak antioksidan olarak görev yapar ve bir dizi önemli hücrel işlevleri gerçekleştirir. Trombozu, kan akışını ve nöral aktiviteyi düzenleyen önemli bir hücre içi ikinci habercidir. Su ve yağda çözündüğü için, sitoplazma ve plazma zarlarından kolayca geçerek, spesifik olmayan konak savunması ve tümör ile hücre içi patojenleri yok etmekte görev alır. Vasküler endotel hücreler tarafından üretilen endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak kabul edilmiştir. Proteinleri nitrozile ederek, enzimatik aktiviteyi düzenlemesi ayrıca düz kas gevşemesi, sinir iletimi, savunma mekanizmaları, bağışıklık ve kan basıncı düzenlenmesi gibi çok sayıda biyolojik aktivitede yer aldığı için 1992 yılının molekülü kabul edilmiştir (Çaylak, 2011; Pham-Huy ve diğerleri, 2008; Phaniendra ve diğerleri, 2015).

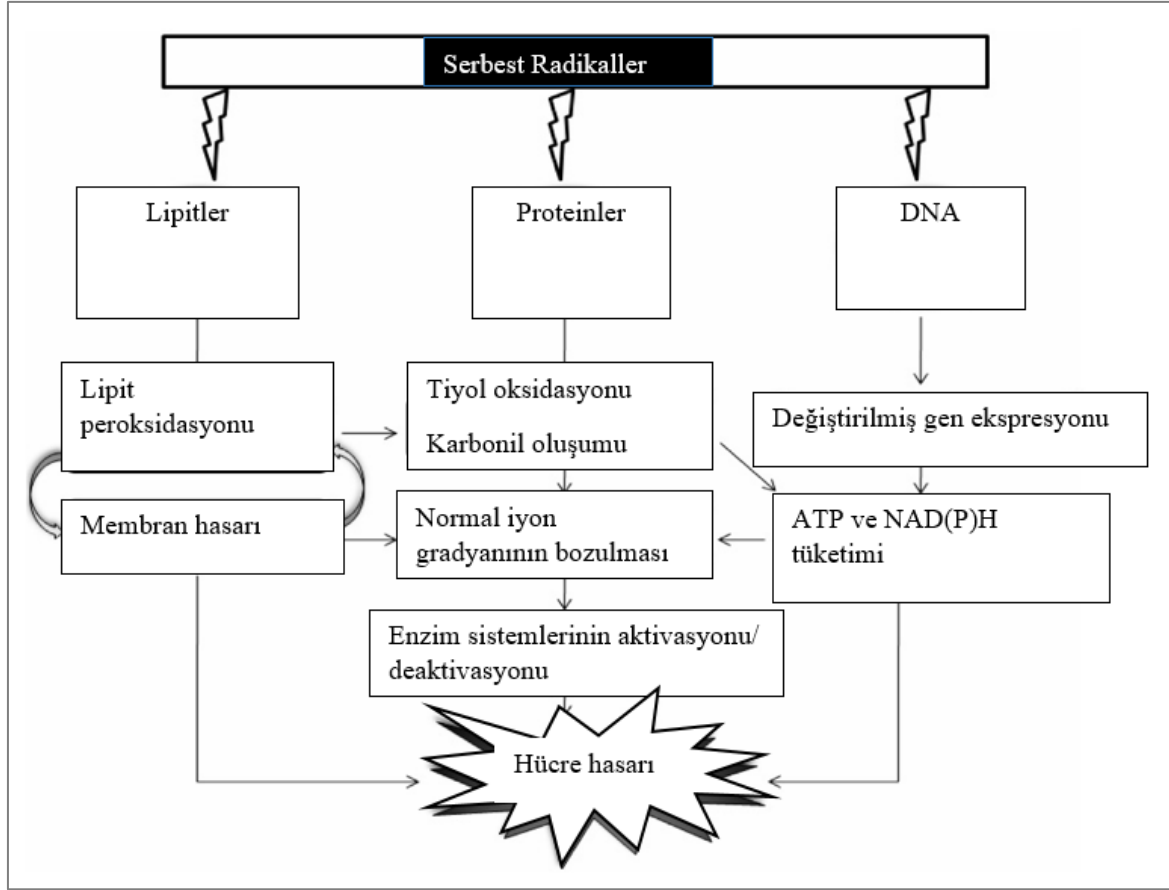


Ancak, vücuttaki reaktif oksijen türleri ile tepkimeye giren NO, güçlü oksidan etkili ONOOH oluşturmakta, bu da daha basit molekül ve atomlara parçalanarak oldukça yıkıcı olan OH⁻ radikali meydana gelmektedir (Çaylak, 2011).



2.3.4. Oksijen radikallerinin biyolojik reaksiyonları

Antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla veya gerektiğinden fazla oksijen radikalleri birikmesi sonucu oluşan radikaller, nükleik asitler, proteinler ve membran lipitleri ile büyük ölçüde spesifik olmayan bir şekilde reaksiyona girer ve çeşitli mekanizmalar yoluyla hücre hasarına neden olur (H. Kumar ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.9. Serbest radikallerin biyolojik reaksiyonları (H. Kumar ve diğerleri, 2012)

Karbonhidrat oksidasyonu

Oksijen radikalleri monosakkaritlerin oksidasyon tepkimesi sonucu oluşurlar ve diyabet, kanser, yaşlanma gibi olaylarda olumsuz etki oluştururlar. Bu maddeler, antimitotik etkiyi nükleik asitlere ve protein gibi organik moleküllere çapraz bağlarla bağlanmak suretiyle gösterirler (Yıldız, 2001).

Nükleik asit oksidasyonu

Reaktif oksijen türlerinden özellikle OH, DNA ile reaksiyona girerek, deoksiriboz molekülünde, pirimidin ve pürin bazlarında ciddi olumsuz etki oluşturup, hasar ürünleri meydana getirir.

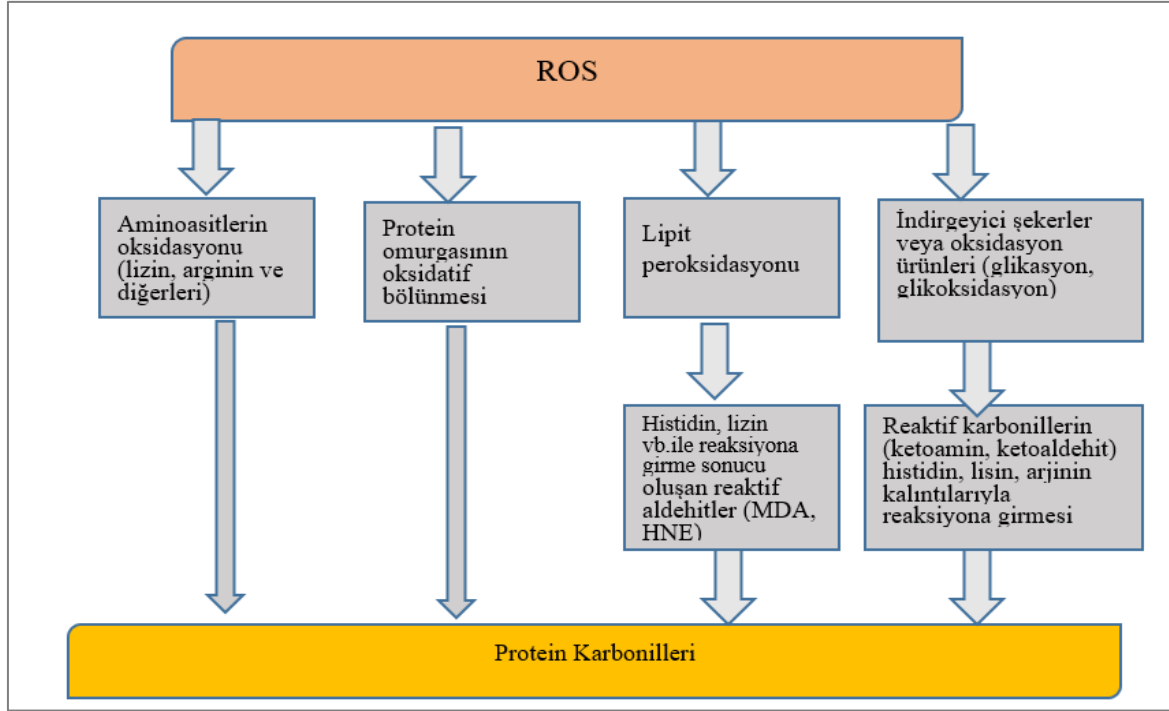
Ayrıca poli sentetaz enziminin aktivasyonu sonucu programlanmış hücre ölümü, DNA'nın parçalanması ve elektron taşıma sistemin bozulmasıyla NAD⁺ seviyelerinin hücresel düzeyde bitmesi gerçekleşir (Karabulut ve Gülay, 2016). DNA'nın sürekli olarak serbest radikaller

tarafından saldırıya uğramasının bir sonucu olarak, her hücrede günde yaklaşık 75.000–100.000 DNA hasarı meydana gelebilir (H. Kumar ve diğerleri, 2012).

Protein oksidasyonu

Proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak da tanımlanmakta olan protein oksidasyonu, serbest radikallerin proteinler üzerine olan etkisi olup, çeşitli patolojik durumlara ve gittikçe yaşlanmaya neden olur. Yaşlanmayla birlikte modifiye olmuş proteinlerin artmasıyla birlikte 80 yaşındaki bir insanda proteinlerin %50'ye kadarı oksitlenmiş hale gelebilir (Buyukguzel, 2013; H. Kumar ve diğerleri, 2012). Amino açıl yan zincirlerinin tamamı oksidatif olarak değiştirilmeye uygun olduğu için ve protein oksidasyonu pek çok farklı mekanizmayla gerçekleşebildiğinden dolayı çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonları vardır. Bunlar, aromatik amino asit bakiyelerinin nitratlaşması, tiyol gruplarının oksidasyonu, ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşması (DOPA, peroksit) ve zincir reaksiyonu şeklinde devam ettirilmesi, bazı amino asit bakiyelerinin karbonil türevlerine dönüşümü, çapraz bağ oluşumu, polipeptit zincirin yarılması, sekonder ve tersiyer yapının bozulması, gen düzenlenmesinin ve ifadesinin değişimi, yapısal ve işlevsel proteinlerde değişiklik, olarak sıralanabilir (Hawkins ve Davies, 2001; Kayalı ve Çakatay, 2004).

Reaktif oksijen türleri geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz oksidatif değişikliklere neden olur ve hücre içi proteinlerde oksidatif hasara neden olur. Protein karbonilleri, geri dönüşümsüz bir protein modifikasyonu biçimini temsil eder ve lipid peroksidasyon ürünlerinin dakikalar içinde uzaklaştırılan biçimini içerir. Protein karbonilleri, şekil 2.10.'da gösterildiği gibi lizin, prolin, arginin gibi bazı aminoasitlerin direk oksidasyonu yoluyla, protein omurgasının direk bölünmesiyle, lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen malondialdehit ile, indirgeyici şekerler veya bunların oksidasyon yolları gibi çok çeşitli olaylar sonucu meydana gelir. Belirli bir oksidan sonucu oluşmadığı ve oksidatif stres altında çok erken aşamada olduğu için protein oksidasyonunun bir belirteci olarak adlandırılabilirler. Dinitrofenol oluşumuna bağlı olarak ölçüm yöntemleri, spektrofotometrik olarak, HPLC tabanlı bir teknikle, immüno blotlamayla, ELİSA'da anti - DNP antikorları kullanarak tespit edilir (Weber ve diğerleri, 2015).

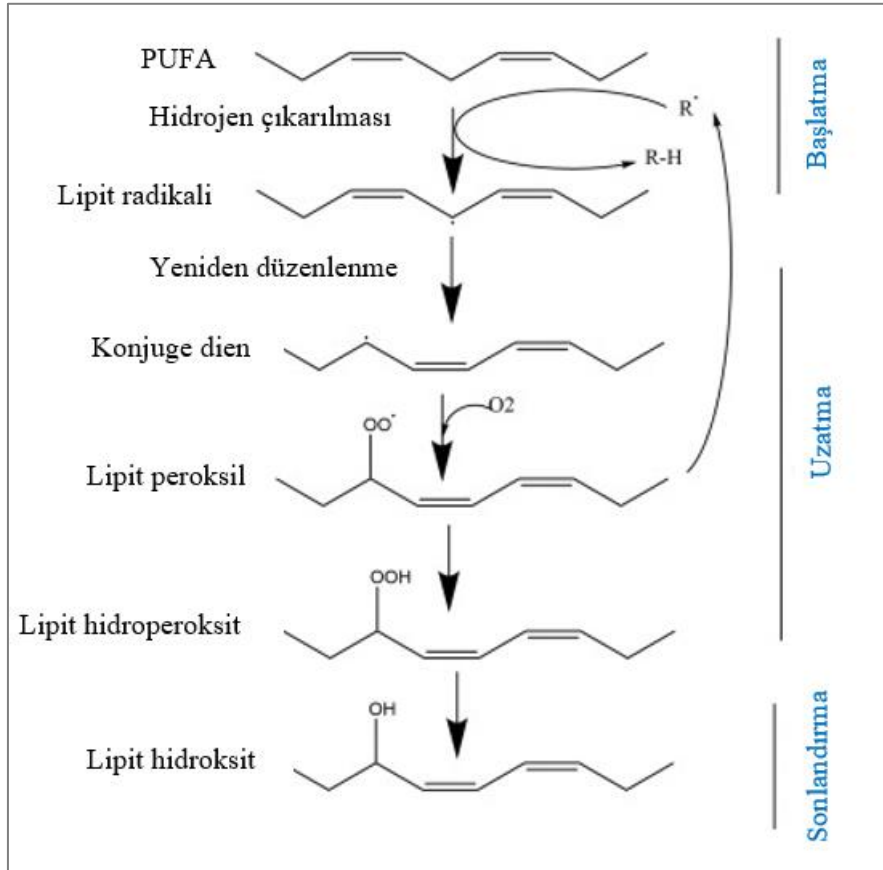


Şekil 2.10. Protein oksidasyonu (Weber ve diğerleri, 2015)

Lipit peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu geniş anlamda, fosfolipitler ve kolesterollerde bulunan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)'ne hidroperoksi grubunun bir lipide eklenmesi işlemi olarak tanımlanabilir. Esnek bir zar yapısı oluşturmamasından dolayı PUFA'lar, toplam zar yağ asitlerinin yaklaşık %50'sini meydana getiren önemli ve ana bir yağ asidi grubudur. Bununla birlikte, serbest radikal hasarına karşı çok hassastırlar ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAH'lar), metilen gruplarının (-CH₂-) karbon atomlarından hidrojen atomlarını çıkardığında peroksidasyon reaksiyonları başlar. Klasik anlamda lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonunun mekanizması başlatma, uzatma ve sonlandırma olmak üzere 3 ana evdede gösterilebilir (Şekil 2.11). Başlatma aşamasında karbon merkezli bir lipid serbest radikali oluşturmak üzere PUFA'lardan bir hidrojen atomunun çıkarılması gerçekleşir. Hidrojen uzaklaştırıldıktan sonra, karbon atomu üzerindeki eşleşmemiş elektronların yeniden düzenlenmesiyle konjuge dienler meydana gelir. Konjuge dienlerin de moleküler oksijenle tepkimeye girmesi sonucu peroksil radikali (LOO[•]) oluşur. Lipit peroksil radikali, bir hidrojen çıkararak yeni bir döngü başlatır ve böylece peroksidasyon reaksiyonunu sürdürür. Son adım veya sonlandırmada, iki radikalin kombinasyonundan bir radikal olmayanın oluşturulması gerçekleşir.

Lipit peroksidasyonu sonucu hidroperoksitlerden başka, lipid hidroksitler, izoprostanlar , nöroprostanlar , aldehitler (4-hidroksi-2-nonenal veya 4-HNE gibi), ketonlar , alkanlar , lizo-fosfolipitler ve aldehit modifiye proteinler gibi pek çok farklı madde oluşabilir (Çaylak, 2011).



Şekil 2.11. Lipit peroksidasyonun zincir reaksiyonları (Anthonymuthu ve diğerleri, 2016)

Lipit peroksidasyon çeşitleri enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere genelde 2 tipdir. Enzimatik olmayan peroksidasyon yukarıda anlatıldığı gibi reaktif oksijen türlerinin özellikle demir olmak üzere, Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} gibi diğer geçiş metali iyonlarıyla reaksiyona girmesi sonucu gerçekleşir. Hem demir hem de bakır iyonları, organik hidroperoksitlerin oluşmasını ve hidroperoksitlerin de organik peroksil radikallerine ve hidroksil radikallerine ayrışmasına yol açar. Enzimatik yollar ise, fosfolipaz A2, siklooksijenazlar (COX), lipoksijenazlar, sitokrom c ve peroksidazlar ile gerçekleştirilir. Fosfolipid oksidasyonunun birincil ürünü olarak fosfolipid hidroperoksitler enzimatik yollarla üretilir.

Lipit peroksidasyonuna karşı üretilen katalaz , süperoksit distmutazlar (SOD), glutatyon, vitamin C ve E gibi antioksidanlar yetersiz olduğu zaman, peroksit ürünleri hücrelerde birikerek toksik etki gösterir ve oksidatif stres meydana gelir. PUFA'nın oksidasyonu sonucu üretilen lipit araçları, sekonder haberci olarak hareket eder ve uzak bir bölgede etkisini gösterir, serebral kan akışının düzensizliğinde, kan beyin bariyeri hasarında, inflamatuvar yanıtın aktivasyonunda, programlanmış hücre ölüm yollarında yer alır (Anthonymuthu ve diğerleri, 2016). Peroksil radikalleri zincirleme peroksidasyon reaksiyonları sonucu birbiriyle çapraz kovalent bağlar kurarak, membran yapısını bozar; zarın iyon geçirgenliğini arttırarak organel içeriğinin sitoplazmaya salınmasına, hücre hasarına veya hücre ölümüne sebebiyet verir (Özcan ve diğerleri, 2015).

Lipit peroksidasyon son ürünleri olarak, Malondialdehit (MDA), 4-Hidroksinonenal (4-HNE) ve izoprostanlar spektrofotometrik ve florometrik gibi çeşitli yöntemlerle tespit edilir. MDA ve lipit hidroperoksitleri ile aldehytlerin adlandırıldığı tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), spesifiklik eksikliği yapay üretim konusundaki eleştirilere rağmen, en yaygın kullanılan belirteçler olmaya devam etmektedir (Anthonymuthu ve diğerleri, 2016; Özcan ve diğerleri, 2015).

PUFA'lardan hem kimyasal reaksiyonlarla hem de enzimler tarafından katalize edilen reaksiyonlarla üretilen MDA, kimyasal formülü 1,3-propandial (OHC) şeklinde olan, oda sıcaklığında katı, TBARS'ın bir prototipidir (Tsikas, 2017). Normal koşullar altında MDA, Krebs döngüsünde malonat veya asetata parçalanır ve CO₂ şeklinde atılır. Ancak PH'a bağlı olarak çeşitli formlarda gereğinden fazla bulunan MDA, dokulara zarar verir. Fizyolojik PH'da, totomerik MDA molekülü ağırlıklı olarak enolat formunda stabilize olurken, asidik pH'ta MDA, α , β -doymamış aldehit yapısını benimser ve çoklu doymamış yağ asitleri ile ilave reaksiyonlara giren güçlü bir elektrophil haline gelir MDA, protein yıkımını ve DNA hasarını teşvik ederek nöronal hasara yol açar ve bu da hücre sel apoptoza, endotel hasarına ve sonuçta kan beyin bariyeri geçirgenliğine neden olur. Çok sayıdaki in vivo ve in vitro çalışmada MDA'nın toksikolojik, mutajenik ve kanserojenik potansiyeli araştırılmıştır (Moazamian ve diğerleri, 2015; Piastra ve diğerleri, 2020; Tsikas, 2017).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Diyabetik Yaralar

Aerobik organizmaların enerji ihtiyaçlarının çoğunu karşılayan biyolojik oksidasyonların temeli olan oksijenin aynı zamanda toksik bir madde olarak hayatı tehdit etmesi kimi bilim insanları tarafından "aerobik hayatın paradoksu" olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı organizmalarda ister azot ,ister oksijen türevli olsun oluşan radikaller, hücrede yapısal ve fonksiyonel hasara neden olmadan önce hızla bir antioksidan sistemi tarafından ortadan kaldırılır (Di Meo ve Venditti, 2020). Az yoğunluklarda okside edilebilen antioksidanlar, diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan veya engelleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır (Çaylak, 2011).

Diyabette, serbest radikallerin artan üretimi veya antioksidan sistemlerin azalmış aktivitesi sonucu redoks dengesi bozulur ve oksidatif stres meydana gelir. Hiperglisemik durumda, dört farklı yolla artan serbest radikal üretimi artar (Phaniendra ve diğerleri, 2015). Bunlar:

1. Glikolizin artması NADH/NAD oranının artmasına neden olur.
2. Aktive edilmiş sorbitol (veya poliol) yolu, hem sorbitol hem de fruktoz birikimine neden olur; GSH'nin azalması ve NADH/NAD + oranının artmasıyla sonuçlanır.
3. Glikozun otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , $OH^\bullet$, $O_2^{\bullet-}$, ketoaldehitler gibi farklı serbest radikaller oluşur.
4. Enzimatik olmayan protein glikasyonu sonucu oluşan son ürünler hücresel spesifik reseptörlere bağlanarak oksidatif stres oluşturur.

Vücut doğal olarak üretilen (endojen antioksidanlar) veya dışarıdan gıdalar yoluyla sağlanan savunma maddeleri meydana getirerek oksidatif stresle baş etmek için farklı mekanizmalar üretir. Serbest radikallerin fazlalığını nötralize ederek hastalıkların önlenmesine katkıda bulunan antioksidanların bir serbest radikali yok ettiğinde, kendisi de okside olacağı için, sürekli olarak yenilenmesi gerekir. Etki mekanizmalarını başlıca dört farklı tipde gösteren antioksidanların işlevleri aşağıdaki gibi sıralanır (Memişoğulları, 2005; Pham-Huy ve diğerleri, 2008):

1. Oksidanları zayıf bir moleküle çeviren ve enzimlerle gerçekleştirilen temizleme etkisi
2. Vitaminler ile flavonoidler tarafından yapılan baskılama etkisi ile oksidanlara hidrojen aktarılması

3. Tamir etme etkisi
4. C, E vitamini, karotenoidler tarafından yapılan zincir kırıcı etkiye lipid peroksidasyonun engellenmesi örnek verilebilir.

Canlılardaki antioksidanları, enzimatik endojen, enzimatik olmayan endojen ve vücutta üretilmeyen eksojen besleyici antioksidanlar şeklinde sınıflandırabiliriz (Çaylak, 2011). Bunlardan bazıları aşağıda açıklanacaktır.

Çizelge 2.2. Antioksidan kaynakları (Çaylak, 2011)

Başlıca enzimatik endojen antioksidanlar	SOD, GSH-Px, GR, GST, CAT
Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar	Glutasyon, L-ariginin, melatonin, koenzim Q10,
Eksojen besleyici antioksidanlar	Tokoferol, Askorbik asit, Koenzim Q

2.4.1. Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit anyon radikalının ROS'lerden elektron alarak indirgenmesi ve hidrojen peroksit oluşumuyla sonuçlanan dismutasyon tepkimesini gerçekleştiren SOD, ilk bağışıklık hattıdır. H_2O_2 de CAT ve GPx tarafından indirgenerek H_2O 'ye dönüşür. SOD'un antioksidan etkisi demir indirgenmesi yapılarak, hidroksil radikalının oluşmasının engellenmesi şeklinde olmaktadır.



Her hücre için zorunlu bir enzim olan SOD, doğada beş ayrı şekilde mevcuttur. Mangan-SOD, mitokondrilerde yer alırken, bakır çinko-SOD sitoplazmada bulunan organizmada en çok rastlanan tipidir. Fe-SOD ve Ni-SOD bazı bakterilerde özel bir sistem şeklinde bulunur. Yalnızca fibroblast ve endotelial hücreler tarafından sentezlenen ekstraselüler SOD ise endotelial heparin gevşetici faktörü nötralize ettiği için, damar tonusunun düzenlenmesinde muhtemel rol oynadığı düşünülmektedir (Çaylak, 2011).

Katalaz (CAT)

Katalazdan ilk kez 1818'de Louis Jacques Thénard tarafından bitki ve hayvanlarda, H_2O_2 'in parçalanmasına neden olan madde olarak bahsedilmiştir. Katalaz, protein özelliğinde olmayan 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoprotein şeklinde çok önemli bir antioksidandır. Özellikle peroksizomlarda lokalize olmakla birlikte, hayvansal hücrelerin eritrosit, karaciğer ve böbrek hücrelerinde yoğun CAT aktivitesi vardır. Hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene parçalanmasında katalaz ve glutatyon peroksidaz rol oynar. Düşük konsantrasyonlarda glutatyon peroksidaz aktif olurken, yüksek konsantrasyonlarda katalaz aktivite kazanarak H_2O_2 'yi suya parçalar (Di Meo ve Venditti, 2020; Memişoğulları, 2005).



Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Hidrojen peroksit tarafından hemoglobinin parçalanmasına karşı insan eritrositlerinin korunmasını sağlamak amacıyla glutatyonun indirgeyici özelliklerini kullanan bir enzim olarak glutatyon peroksidaz ilk kez 1957'de keşfedilmiştir. Dört atom selenyum bağlayarak katalitik özellik gösteren bu antioksidan, glutatyonu okside ederek H_2O_2 'yu H_2O 'ya indirger. Glutatyonun okside formunun (GSSG) tekrar GSH'ya indirgenmesinde glutatyon redüktaz etkindir. GPx, selenyum geçiş metalinin kofaktörlüğü ile çalışır ve glutatyonu oksitlerken, hidroperoksitlerin azalmasına sebep olur (Çaylak, 2011; Di Meo ve Venditti, 2020).



GR (glutatyon redüktaz)

Aktif glutatyonun oksitlenmiş formu olan GSH'ı nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) varlığında üreten ve GPx ile birlikte redoks homeostazını korumada görevli olan bir flavoprotein enzimidir. Bu enzimlerin birleşik etkisi dokuların indirgenmiş glutatyon (GSH) içeriğinin ana belirleyicisi olduğu için yapılan çalışmalarda diyabette aktivitelerinin azaldığı görülmüştür (Di Meo ve Venditti, 2020; Memişoğulları, 2005).

GST (glutatyon S transferaz)

Glutatyonla toksik metabolitlerin konjugasyonunu katalizleyerek, detoksifikasyonu yapan diğer bir antioksidan enzimdir. Çalışmalar diyabette antioksidan enzimlerin bir şekilde arttığını veya azaldığını ancak bu mekanizmaların ve oksidan/antioksidan dengesinin açıkça bozulduğunu göstermiştir (Memişoğulları, 2005).

2.4.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Melatonin

Epifiz bezi tarafından salgılanan indol yapılı molekül olan melatonin, tek hücreli organizmalardan memelilere kadar tüm canlılarda bulunur. En önemli özelliği kendisi ve metabolitlerinin güçlü antioksidan özelliklerinin bilinmesidir. Doğrudan serbest radikal temizleme, antioksidatif enzimlerin uyarılması, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun etkinliğini artırma ve elektron sızıntısını azaltma işlevlerini gerçekleştirerek antioksidan özellik gösterir. Yapılan çalışmalarda melatoninin lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA düzeylerini düşürdüğü ve SOD, katalaz, GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu da düzenleyerek arttırdığı görülmüştür. Melatoninin kollajen üzerindeki etkisinin araştırıldığı yara iyileşmesi çalışmalarında, veriliş zamanı ve dozu arasında ilişkiler bulunmuştur (Ozler ve diğerleri, 2010; Reiter ve diğerleri, 2003).

Glutatyon (GSH)

Glisin, sistein, ve glutamattan karaciğerde sentezlenen çok önemli bir antioksidan olan glutatyon üretiminde genetik bilgiye gerek kalmaz. Oksitlenmiş formu olan glutatyondisülfid ile indirgenmiş formu olan glutatyon arasındaki oran bozulduğunda antioksidan denge bozulur. Reaktif oksijen molekülü ve hidroksil radikalini direk süpürücü etkisi olan en önemli antioksidanlardandır. GSH'nın safraya salgılanan % 40'luk bölümünün bağırsak boşluğundaki ve epitelindeki oksidanlarla savaştığı düşünülmektedir. Pek çok enzim için kofaktör olup çeşitli metabolik yollarda görev alan GSH iç dengesinin bozulması sonucu çeşitli hastalıklarla bağlantı açığa çıkabilmektedir. GSH'nin C ve E vitamini yenilenmesinde, DNA onarımında ve gen ifadesinde önemli protein sülfidrillerin korunmasında etkin işlevleri olduğu bilinmektedir (Çaylak, 2011; Valko ve diğerleri, 2007).

Askorbik asit (Vitamin C)

Nörotransmitter, kollajen, karnitin biyosentezi için gerekli olan ve suda çözünen C vitamini, antioksidan, antiaterojenik, antikanserojen, immünomodülatör özelliklere sahiptir. Serbest radikalleri süpürücü etkisini suda çözünen ve zincir kesen özelliğiyle gösterir. Askorbatın oksijeni indirgemesi sonucu veya süperoksit ve hidroksil radikalleriyle tepkimeye girmesi sonucu vitamin C kaynağı olan semidehidroaskorbat (DHA) oluşur.



E vitaminiyle de görevdaş olarak çalışan vitamin C, hem E vitamininin indirgenmiş şeklini üretir hem de serbest radikalleri etkisiz hale getirir. Ayrıca demir ve bakır tuzlarını indirgeyici rol alıp, oluşturduğu Fe^{2+} 'in hidrojen peroksidin hidroksil radikaline çevrilmesine neden olmasından dolayı, günde 2000 mg veya daha fazla alınması sonucu prooksidan veya kanserojen etkisi de tartışmalıdır (Çaylak, 2011; Pham-Huy ve diğerleri, 2008).

Alfa- tokoferol (vitamin E)

Vitamin E, yüksek antioksidan içeriğine sahip, yağda çözünen, esansiyel bir vitamin olup, doğada sekiz stereoizomer içeren kiral bir bileşiktir. Sadece α -tokoferol insanlarda en biyoaktif formdur. Yağda çözünür olduğu için α -tokoferol, hücre zarlarını serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan koruyarak antioksidan işlevini esas olarak lipid peroksidasyonuna karşı koruyarak gerçekleştirir. Tokoferol-OH, elektronu serbest radikallere aktarmak için H atomunu kullanarak, bunların hücre zarı proteinleriyle reaksiyona girmesini ve lipid peroksidasyonuna neden olmasını önleyerek zincir kırıcı etki yapar. Şayet ortamda yeterli miktarda askorbat bulunursa, güçlü radikal maddenin etkisi zayıf radikal oluşturularak yok edilir ve bir taraftan da tokoferol-OH tekrar kazanılmış olur.

Alfa-tokoferol, güçlü bir prooksidan olduğu için günlük 400 IU veya daha fazla dozun alınması halinde, ölüm riskini artırabileceğini ve bundan kaçınılması gerektiğini ortaya koyan bir çalışma yayınlanmıştır. E vitamini bazı kalp-damar hastalıklarına, çeşitli kanserlere ve sinirsel bozukluklara karşı koruma için önerilmiş olup, ancak tartışmalı olduğu için uzun

sürelili yüksek dozda E vitamini takviyesi kullanımına dikkatle yaklaşılmalıdır (Çaylak, 2011; Pham-Huy ve diğerleri, 2008).

Fenolik bileşikler

Polifenoliklerin askorbat ve tokoferollere göre, in vitro ortamda antioksidan özelliklerinin daha iyi olduğu gösterilmiştir. Membranların akıcılığını azaltarak serbest radikallerin hücreye difüzyonunu engelleyip peroksidasyon reaksiyonlarını keserler. Bir diyet antioksidan flavonoid olan quercetinin, lipopolisakarit (LPS) kaynaklı oksidatif stresi azalttığı, eNOS ekspresyonunu arttırarak nitrat/nitrit seviyesini düşürdüğü ve GSH/ (GSSG) redoks oranının önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir.

Flavonoidler, çoğu bitkide bulunan ve kimyasal yapısına göre 4000’den fazla tipi tanımlanan polifenolik bileşiklerdir. Alfa-tokoferol radikallerinin hafifletilmesi, NO kaynaklı oksidatif stresin azaltılması, ürik asit seviyelerinde artış, hidrojen veya elektronu kolay kaybetmeleri gibi işlevleri nedeniyle güçlü antioksidan olan bu maddeler, nörodejeneratif, kanser gibi pek çok hastalığı önler ya da geciktirir. Sonuç itibariyle, her bitki benzersiz bir flavonoid kombinasyonu içermekte olup, bu maddeler açısından zengin olan farklı bitkilerin vücut üzerinde çok farklı etkileri bulunmaktadır (Çaylak, 2011; Pham-Huy ve diğerleri, 2008; Senoner ve Dichtl, 2019).

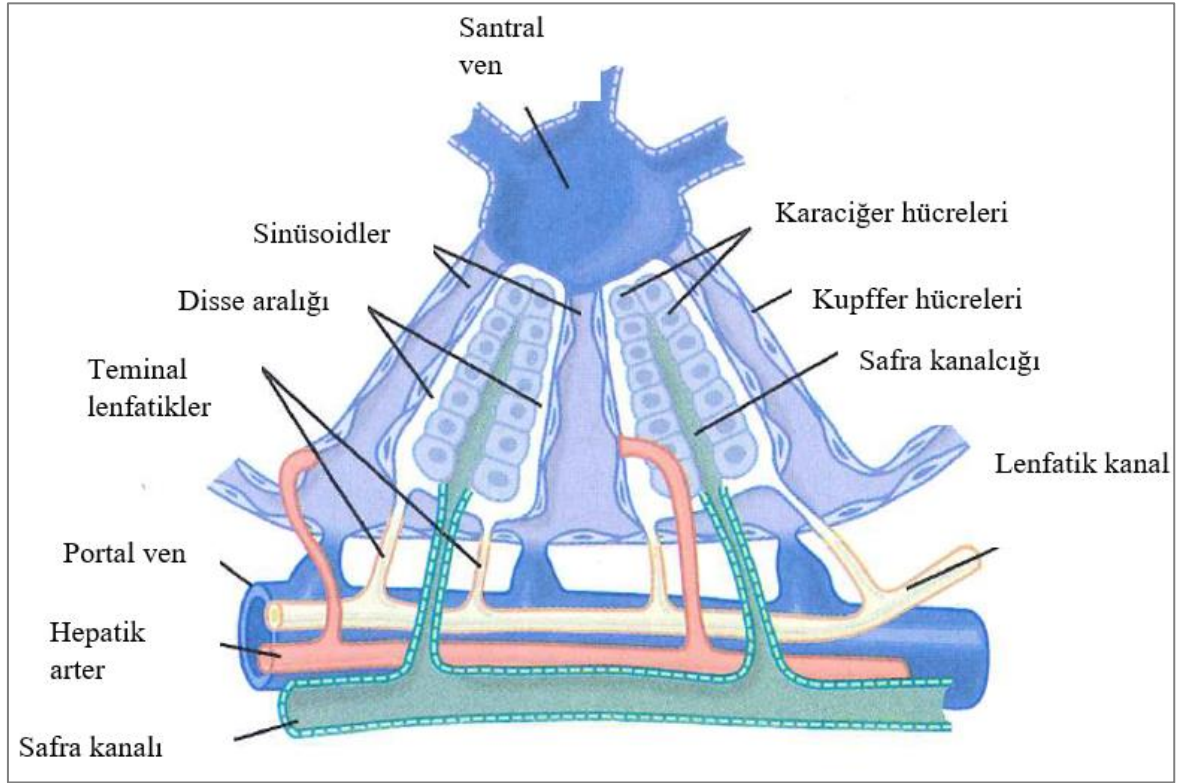
2.5. Karaciğer

2.5.1. Karaciğerin anatomisi ve fonksiyonları

Erişkinde yaklaşık olarak 1,5 kg olan, vücudun en büyük organı karaciğer birbiriyle bağlantılı çok önemli işlevler yürütür. İşlevsel birimi olan karaciğer lobülü, birkaç milimetre uzunluğunda, 0,8 mm çapında ve silindirik yapıdadır (Şekil 2.12). İnsan karaciğerinde 50 bin ile 100 bin adet lobül bulunur. Hepatik venler, ana toplardamara boşalan bir santral ven ve etrafındaki yapılar karaciğer lobüllerini oluşturur. Hücresel plaklar, kan damarları, lenf kanalları, disse aralığı, safra toplama kanalları ve çeşitli makrofaj tipi hücreler bir lobülün temelini oluşturur.

İnterlobüler septalarda, miyonlarca disse aralığının lenfatik damara bağlı olması sayesinde, lenf sistemi rahat çalışır. Endotelin büyük porları plazmadaki maddelerin ve plazma

proteinlerinin büyük bölümünün disse aralığına difüzyonla geçişi endoteldeki büyük boşluklar ile olur (Guyton ve Hall, 2017).



Şekil 2.12. Karaciğer lobülünün temel yapısı (Guyton ve Hall, 2017)

Birbiriyle bağlantılı pek çok işlevleri olan karaciğerin fonksiyonları şu başlıklar halinde özetlenebilir. Bunlar;

1. Kanın süzülmesi ve depolanması
2. Önemli organik moleküllerin ve yabancı kimyasalların metabolize edilmesi
3. Safra salgısının oluşması
4. Vitaminlerin ve demirin depolanması
5. Trombotik elemanların yapımı

Karbonhidrat ve yağ metabolizması içinde, pekçok önemli kimyasal maddelerin oluşturulması yer alır. Protein metabolizması içinde; aminoasitlerin deaminasyonu, üre oluşumu, plazma proteinlerinin oluşumu ile aminoasitlerin ve diğer maddelerin birbirlerine dönüşümleri gibi işlevler bulunur.

Ayrıca karaciğer, A, D, B12 vitaminlerini ve demiri ferritin şeklinde depo etmekle birlikte, fibrinojen, protombin, akselerator globülin, Faktör VII gibi önemli koagülasyon faktörlerinin senteziyle kanın pıhtılaşmasında görev alır (Guyton ve Hall, 2017).

Karaciğer bir seri kompleks enzimatik tepkimelerle zararlı maddeleri zararsız hale getirerek detoksifikasyon görevinde bulunur ki, en önemli işlevlerinden biri de budur (Dıraman, 2021).

2.5.2. Karaciğer ve detoksifikasyon

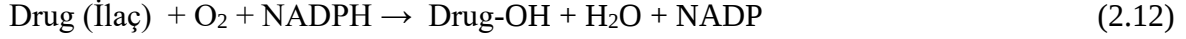
Karaciğer, endojen ve eksojen kaynaklı oluşan serbest radikalleri temizlemek için detoksifikasyon enzimlerinin toplandığı en önemli organdır. Çünkü, gastrointestinal sistem, en büyük antijen ve ksenobiyotik yükünü içeren gıdayı işleyerek başlangıçta fiziksel bir bariyer sağlar. Toksik yükün azaltılmasında, sağlıklı bağırsak mukozasının sunduğu en önemli fırsatlardan biri de, enterohepatik adlı bir süreçte sağlanır. Bu devridaim şeklinde ilerleyen süreçte, dolaşıma giren patojen bakteriler, toksik yükü artırabilen toksinler meydana getirir ve bazı konjugasyon bölümler giderilir. Bağırsak mikrobiyotası, bağlantılı genleri up down regülasyonlar geliştirerek, enzim sistemlerini optimum seviyede tutar (Liska, 1998).

Enzimatik antioksidanlardan olan GSH-Px aktivitesinin en yoğun olduğu yerler eritrosit ve karaciğerken yine H_2O_2 i oksijen ve suya parçalayan CAT enzimi, sitoplazmada % 20 ve peroksizomlarda % 80 oranında yerleşmiştir. Bu enzimin özellikle de karaciğer olmak üzere, kan, kemik iliği, mukoz zarları ve böbrek gibi pek çok dokuda bulunan peroksizomlarda konsantrasyonu oldukça yüksektir (Dıraman, 2021; Liska, 1998).

Faz I ve Faz II olarak iki aşamada gerçekleşen detoksifikasyonun ilk aşamasında karaciğer spesifik enzimlerle, daha toksik ürün olan ara metabolitlerden daha az toksik maddeler meydana getirir. Faz II'de ise bu çok daha toksik olan ara metabolitler enzimler kullanılarak, suda çözünen, daha zararsız, safra ve üreyle atılan maddelere dönüştürülürler (Dıraman, 2021).

Sitokrom P450 (Cyt-P450) enzim sistemiyle gerçekleştirilen faz I'de ve çoğu ilaç ya da yabancı bileşiklere karşı savunma sistemini oluşturur. Bu enzimler karaciğer parankima

hücresinin mikrozomal enzimleri olup, hemoglobin ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi oksijene ve CO'e bağlanma özelliği olan, Fe ⁺³ ihtiva eden ve en az 10 enzim ailesi grubundan biridir. Pek çok sayıdaki hidroksilasyon reaksiyonlarını gerçekleştiren Cyt-P450, enzime özgüllük kazandıran ve farklı formları bulunan kısmıdır.



Faz I aşamasında, oksidasyondan farklı olarak indirgenme, hidroliz, hidratasyon, detiyoasetilasyon ve izomerizasyon gibi toksifikasyon ve biyoaktivasyon açısından önemli reaksiyonlar gerçekleşebilmektedir. Faz II döngüsüyle tam metabolizma olamayan daha toksik reaktifler, hücrede önemli organiklerin hasarına ve ciddi hastalıkların oluşmasına zemin hazırlar. Faz II tepkimeleri konjugasyon şeklinde olup; bir radikal veya iç molekül ilaç ya da onun metabolitine kovalent bağla bağlanır. Meydana gelen ürün olan konjugatlar, suda çözünebilen, idrar veya safra yoluyla kolay atılan polar maddelerdir. Faz I reaksiyonundan gelen ürün hidrofilik X grubu ile birleşince suda çözünür ve rahat atılabilir hale gelir (Dıraman, 2021; Liska, 1998).



Detoksifikasyon enzimlerinin indüklenmesi tek fonksiyonel yada çok fonksiyonel şeklinde gerçekleşir. Yalnız bir fazı ya da bir enzimin etkilendiği tek indükleyici veya çok sayıdaki aktivitenin etkilendiği çok indükleyici ile enzim sentezi artar.

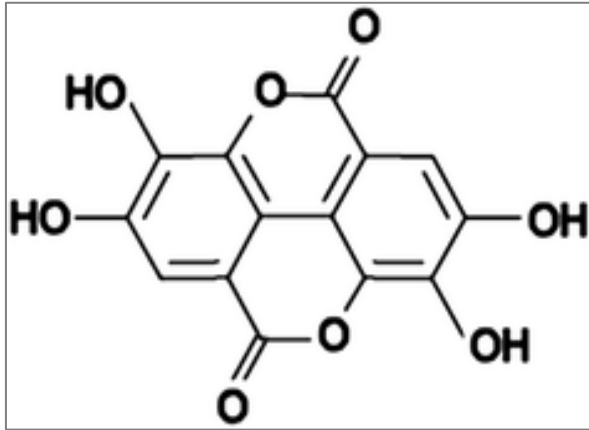
Örneğin, faz I aktivitesindeki ciddi artış, sigara dumanı ve kömürde pişmiş yiyeceklerdeki indükleyiciler ile sağlanır. Kırmızı üzümde bulunan ellajik asit ise, pek çok flavinoid molekül gibi faz II enzimlerinin çoğunu indükleyerek, çok fonksiyonel etki gösterir.

İki ya da daha fazla bileşik arasında bir mücadele sonucu aynı enzim için toksik madde birikimi ve enzim inhibasyonu oluşabilir. Örneğin, Quinidine, rekabetle Cyt-P2D6 aktivitesini engelleyerek, seçici olarak sadece bir detoksifikasyon aktivitesini inhibe eder. Detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesi çok çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir. Bunlar; yaş, cinsiyet, hormonlar, farklı nedenlerle karaciğer fonksiyonlarında bozulma, genetik farklılıklar, diyabet ve obezite gibi etkenlerdir (Dıraman, 2021; Liska, 1998).

2.6. Çalışmada Kullanılan Maddeler ve Özellikleri

2.6.1. Elajik asit (EA)

Kimyasal adı 2,3,7,8-tetrahidroksi-kromeno[5,4,3-cde]-kromene5,10-dion olan elajik asit, gallik asitin dimerik bir türevi olup, ellagitanninlerin bir parçasını oluşturur. Nar, hurma, ahududu, çilek, şeftali, erik, ceviz, badem gibi besinlerde bulunan biyoaktif polifenol ellagitaninler, kolonik gastrointestinal flora tarafından ellagik aside hidrolize edildikten sonra emilebilir. 302.197 g/mol moleküler ağırlığa sahip, 350 °C erime noktasına sahip, su, alkol ve eterde az çözünen fizyolojik pH'ta iyonize olan zayıf bir asittir (Derosa ve diğerleri, 2016). İki hidrokarbon halkalı lipofilik bir parça ile birlikte dört hidroksil grubu ve iki lakton içeren bir hidrofilik parçaya sahiptir. (Şekil. 2.13) Bu yapısı sayesinde elajik asitin hem farklı substratlardan elektronları kabul etme hem de antioksidan redoks reaksiyonlarına katılma kapasitesi oluşur (Ríos ve diğerleri, 2018).

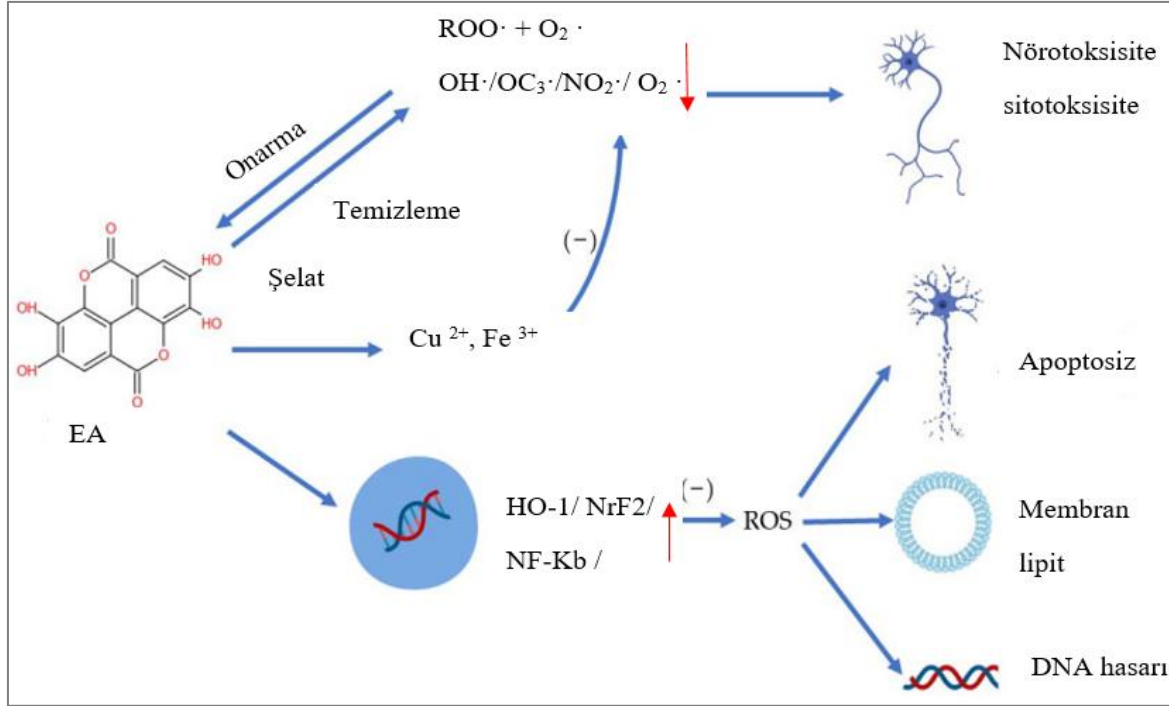


Şekil 2.13. Elajik asidin kimyasal yapısı (Derosa ve diğerleri, 2016)

Elajik asitin antioksidan, anti-enflamatuar, nöroprotektif, hepatoprotektif, antidiyabetik ve antikanserojenik özelliklerinin ispatlandığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu özellikleri sayesinde diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom, ülseratif kolit, Cronh hastalığı, Alzheimer, Parkinson gibi çok sayıdaki hastalığı koruduğu ya da tedavi edebileceği bildirilmiştir. Ayrıca antibakteriyel, antiviral ve antimalarial özellikleri de bulunmaktadır (Derosa ve diğerleri, 2016; Ríos ve diğerleri, 2018).

EA'nın antioksidan özellikleri, temel vitaminlerinkine benzer olduğu öne sürülen serbest radikal süpürme aktivitesine atfedilmiştir. Bir sistemde bakır veya demir gibi iyonik

metallerin varlığı, o sistemdeki oksidasyon oranını hızlandırabilir. Demir ve bakır gibi metal iyonlarını şelatlayarak ve çeşitli sinyal yollarını düzenleyerek, serbest radikalleri temizleyip antioksidasyonda belirgin bir rol oynar. EA'nın fizyolojik PH'a sahip sulu çözeltilerde, döngü başına iki serbest radikali (bir ROO $\cdot$ ve bir O $_2$ $\cdot$) yakalayabildiği, hidroksil, metoksi ve nitrojen dioksiti verimli bir şekilde temizlediği, lipidlerin peroksidasyonunu azaltmak için O $_2$ - ve OH $\cdot$ 'yi de yakalayabildiği ve aşırı $\cdot$ ONOO $^-$ üretiminden kaynaklanan nörotoksiteyi ve sitotoksiteyi azaltmak için peroksinitrit reaksiyonlarını düzenleyebildiği bulunmuştur (Şekil 2.14). Araştırmalarda, ellagik asidin, genel olarak, reaktif nitrojen türlerinden daha verimli bir ROS temizleyicisi olması gerektiği öne sürülmüştür. Bunu tek elektron, hidrojen ve proton transferi, ardışık proton kaybı elektron transferi gibi karmaşık mekanizmalarla yapmaktadır. EA'nın μ mol (Mikromol) konsantrasyonda bile, özellikle lipid peroksidasyonu inhibe ettiği, streptozotosin kaynaklı lipid peroksidasyonunda bir azalmaya neden olduğu, linoleik asit emülsiyonunun lipid peroksidasyonu üzerindeki koruyucu etkisinin askorbik asitinkine (%60) benzer olduğu bulunmuştur. Yine EA'nın dolaylı bir antioksidan etki yoluyla CYP ekspresyonunun up regülasyonunu önlediğini, mitokondriyal fonksiyon yoluyla süperoksit üretimini azalttığını, NADPH oksidaz kompleksinin zar düzeneğini baskılayarak, böylece süperoksit radikallerinin aşırı üretimini azaltarak oksitlenmiş LDL ile indüklenen endotel disfonksiyonu üzerindeki yararlı etkisini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca başka bir çalışmada, Hem oksijenaz-1 (HO-1) ,nükleer faktör eritroid 2 ile bağlantılı faktör (Nrf-2) ve SOD ekspresyonunu up regüle ederek insan keratinosit hücrelerini ultraviyole A kaynaklı oksidatif stres ve apoptozdan koruyabildiği gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarda, sıçan karaciğerlerinde antioksidan glutatyon S -transferaz ve glutatyon sentezinde yer alan enzim olan glutamat-sistein ligaz seviyelerini birkaç kat arttırarak hem birçok karsinogen tarafından üretilen oksidatif hasara karşı koruma sağlayabildiği, hem de strese yanıtta yer alan redoks-duyarlı sinyal yollarını etkileyebildiği yer almıştır. Yine sıçanlarda, EA takviyesinin D-galaktoz kaynaklı SOD, CAT ve GPX gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı, insan alveolar A94 hücrelerinde paraquat kaynaklı oksidatif streste LDH salınımını azalttığı ve Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve HO-1 seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Ríos ve diğerleri, 2018; Zhu ve diğerleri, 2022).



Şekil 2.14. Elajik asidin antioksidan etkileri (Zhu ve diğerleri, 2022)

Enflamasyon ve oksidatif stres, birbiriyle sıkı bir şekilde bağlantılı olan, yakından ilişkili patofizyolojik olaylardır. EA'nın iyi bilinen antioksidan özelliklerinden başka güçlü anti-enflamatuar aktiviteler sergilediği pek çok çalışma gösterilmiştir. Enflamasyonda, dış uyaran ve hücre hasarı, enflamatuar hücreleri aktive edebilir ve NF- κ B, Mitojenle aktiveleşen protein kinaz (MAPK) ve Janus kinaz/sinyal dönüştürücüleri ve transkripsiyon aktivatörleri (JAK-STAT) yolları dahil olmak üzere inflamasyon sinyal yollarının aktivasyonunu indüklenir.

Sitokinler, radyasyon, ağır metaller ve virüslerin aktive olmasına yol açan Nf- κ B'ye İnhibitör kappa B (I κ B)'nin bağlanmasıyla; Nf- κ B, enflamasyonla ilgili genleri düzenlemek için çekirdeğe transfer olmak üzere serbest olur. EA'nın, Nf- κ B p105'in öncü proteinlerinden biri ile bağlanabileceği böylece Nf- κ B'nin spesifik bir DNA alanına bağlanmasını engellediği gösterilmiştir. Yine EA'nın tüm MAPK'lerin aktivasyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe edebildiği ve başka bir sinyal yolu olan JAK1, JAK2 ve STAT1'in fosforilasyonunu inhibe ederek, enflamatuar yanıt yolunu bloke ettiği kanıtlanmıştır (Zhu ve diğerleri, 2022).

Elajik asit ve karaciğerle ilgili yapılmış çalışmalar

Karaciğer hastalıklarının sayısı son yıllarda yaklaşık olarak 2 milyon vakaya tekabül etmekte ve bu durum küresel olarak endişe verici hale gelmektedir. Hepatoselüler karsinoma, hepatit enfeksiyonları, alkollü veya alkolsüz karaciğer hastalığı, çevresel ajanlar ve ilaca bağlı toksisite gibi kronik durumlarda, mevcut tedavi seçeneklerinin kısıtlayıcı olması, elajik asit gibi doğal fenolik bileşiklerle karaciğerin ilişkisini ortaya çıkarmaya yönlendirmiştir (Aishwarya ve diğerleri, 2021).

Navarro ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, karaciğer karsinomuna neden olan hepG2 hücrelerine nar çekirdeği ekstresinden elde edilmiş 100 µg/ml konsantrasyonda EA 180 dakika uygulanmış ve tert-butil hidroperoksidin neden olduğu ROS aracılı oksidatif stresin tamamen azaldığı gösterilmiştir (Navarro ve diğerleri, 2014). Hwang ve arkadaşları EA'nın in vitro oksidatif stres kaynaklı hepatosit hasarı ve in vivo olarak Concanavalin (ConA) kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu özelliklerini ölçmüşler ve çeşitli oksidatif stres türlerinin neden olduğu karaciğer hasarını önlediğini göstermişlerdir. Vitamin K3 kaynaklı apoptozdan sonra ROS üretiminden, hücre hasardan ve mitokondriyal depolarizasyondan koruma yeteneğini değerlendirmek amacıyla hepatosit hücreleri 10 µM EA ile kültürlenmiştir. EA, ROS üretimini, mitokondriyal membran potansiyel kaybını ve apoptoz indüksiyonunu önlemiştir. Vahşi tip erkek Balb/C farelerine karaciğer hasarı oluşturmak için intravenöz ConA uygulaması yapılmış ancak EA'nın ConA kaynaklı karaciğer hasarı üzerindeki etkisini değerlendirmek için, pozitif kontrol grubu uygulamadan iki gün önce EA içeren bir diyetle beslenmiştir. EA ile desteklenmiş diyetle beslenen farelerde serum GSH seviyelerindeki artış gözlenmiş ve ConA'nın neden olduğu ALT ve AST yükselmesini de azalttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak EA'nın oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun hepatosit toksisitesinde kritik roller oynadığına dair ciddi kanıtlar sunulmuştur (Hwang ve diğerleri, 2010). Devipriya ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, dişi albino Wistar sıçanlara 45 gün boyunca ağızdan yüzde 20 alkol uygulanarak prooksidan ve antioksidan dengesizliği sonucu toksisite oluşturulmuştur. Sıçanlara intragastrik entübasyon yoluyla üç farklı dozda (30, 60 ve 90 mg/kg vücut ağırlığı) EA ile uygulama yapıldığında, EA'nın antioksidanların durumunu önemli ölçüde iyileştirdiği; TBARS, hidroperoksitler, NO, PC ve karaciğer belirteç enzimlerini azalttığı kanıtlanmıştır (Devipriya ve diğerleri, 2007). Abdelkader ve arkadaşları da, birçok psikiyatrik hastalıkta yaygın kullanılan bir ilaç olan valproik asidin (VPA) neden olduğu karaciğer toksisitesinde

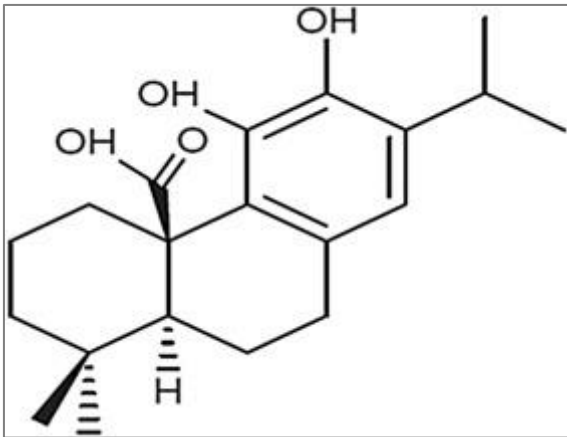
EA'nın etkisini araştırmıştır. Sprague-Dawley farelerine 14 gün eşzamanlı valproik asit enjeksiyonu (250 mg/kg/gün; ip) uygulanmış ve ardından bir hafta süreyle EA, 60 mg/kg/gün olacak şekilde oral gavaş olarak verilmiştir. Karaciğer dokularında, yapılan immünohistokimyasal inceleme sonucu, EA ile tedavi edilen grupta, VPA sıçanlarına kıyasla ASMS protein ekspresyonunda ve hidrokspirolin içeriğinde önemli bir azalma olduğu gösterildi. Histopatolojik incelemede de, VPA grubuna ait karaciğer kesitlerinde oluşan Glisson kapsülündeki fokal kalınlaşma, ödem ve karaciğer hücrelerinde dejenerasyonunun EA uygulanan gruplarda önemli ölçüde iyileştiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada kan serumlarında ölçülen oksidan/antioksidan değerlerin histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemelerle uyumlu sonuçlar verdiği gösterilmiş ve EA ile tedavinin ,sıçanlarda valproik asit kaynaklı hepatik hasarı önemli ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır (Abdelkader ve diğerleri, 2020). Çelik ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada EA 30 mg/kg olacak şekilde 14 gün boyunca intragastrik olarak uygulanmış ve hepatik faz I, II ve antioksidan enzimleri modüle etme potansiyeli açısından değerlendirilmiştir. Düşük EA doz (10 mg/kg/gün), konsantrasyonu etki bölgesine ulaşmak ve üretilen tüm serbest radikalleri söndürmek için yeterli olarak görülmezken, daha yüksek EA dozun (30 mg/kg/gün) etkin olabileceği gösterilmiştir (Celik ve diğerleri, 2013). EA aktivitesine ilişkin bu kanıt, karaciğer enzimlerinin ksenobiyotikleri olumlu bir şekilde modüle etme yeteneğini göstermektedir. Karimi ve arkadaşları, Wistar sıçanlarında akrilamid kaynaklı oluşturulan hepatotoksistide EA'nın karaciğer dokusunda oksidatif stres, enflamasyon ve histopatolojik değişiklikleri önleme gücünü ölçmüşler ve bu amaçla tüm bileşikleri 30 gün boyunca oral gavaj olarak vermişlerdir. EA uygulamasının (30 mg/kg), akrilamidin neden olduğu karaciğer dokusundaki inflamatuvar ve oksidatif hasarı tersine çevirerek, GPx aktivitesini ve GSH içeriğini arttırdığını ispatlamışlardır. Yine yapılan histopatolojik incelemede, akrilamid kaynaklı eritrosit konjesyonları, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, yağ birikimi ve piknoz oluşumunun, EA uygulanan gruplarda önemli bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Karimi ve diğerleri, 2020). EA'nın sitokin (TNF- α , IL-6 ve IL-1 β) ekspresyonunu kontrol ederek hepatik dokuda akrilamid aracılı proinflamatuvar yanıtı baskıladığı ispatlanmıştır (Karimi ve diğerleri, 2020). Farelerde lipopolisakarit (LPS) ve D-galaktozamin tarafından indüklenen bir akut karaciğer hasarı modelini içeren Gu ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, EA'nın NF- κ B'yi baskıladığı ve böylece karaciğer hasarı bölgesinde nötrofiller ve makrofajlardan gelen inflamatuvar yanıtı düzenlediği ispat edilmiştir. Ayrıca EA'nın Nükleer Eritroid 2 Bağlantılı Faktör 2 (Nrf-2) ve Hem Oksijenaz-1 (HO-1) ekspresyon aktivasyonunu destekleyerek,

antioksidan enzim seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Gu ve diğerleri, 2014). Nuri ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, yüksek şekerli ve yüksek yağlı diyet uygulanan farelerde alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer modeli oluşturulmuştur. Diyetle birlikte %40 EA içeren altmış mililitre nar suyu ile beslenen deney grubunda, EA'nın, sitokinlerin ve transforme büyüme faktörü- β 'nin (TGF- β) ekspresyonunu azaltarak karaciğerde portal ve lobüler inflamasyonu kontrol etmeye neden olduğu belirtilmiştir (Noori ve diğerleri, 2017). İn vivo tabanlı İbrahim ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, sitotoksik ilaç olan metotreksat (MTX) aracılı oksidatif strese karşı EA'nın etkisi araştırılmış ve bu amaçla Wistar ratlara 10 gün süreyle oral EA (5 mg/kg ve 10 mg/kg) ve üçüncü günün sonunda tek doz MTX (20 mg/kg ip) verilmiştir. EA'nın MTX tarafından indüklenen oksidatif stresi, mitokondriyal disfonksiyonu, apoptozu ve enflamasyonu önemli ölçüde önlediği, Nrf2'nin artırılması ve NF- κ B sinyal yolunun baskılanması yoluyla metotreksat aracılı karaciğer toksisitesini azalttığı tespit edilmiştir (Ebrahimi ve diğerleri, 2019). Farelerde aşırı demir yüklenmesinin neden olduğu karaciğer toksisitesine karşı *Clerodendrum viscosum*'un yapraklarından izole edilen EA'nın koruyucu etkisi Shendge ve arkadaşları açısından araştırıldı. EA uygulamasının serum belirteçleri, ROS ve antioksidan enzimlerin seviyesini dengeleyerek oksidatif stres aracılı karaciğer hasarından koruduğu ve aynı zamanda kaspaz-3 ve poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) proteinleri gibi apoptotik araçların ekspresyonunun artmasına da neden olarak aşırı demir yüküne bağlı toksisiteye karşı hepatoprotektif aktivite ortaya çıkarılmış oldu (Shendge ve diğerleri, 2018). Mishra ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, EA'nın lenfoma taşıyan farelerin karaciğerinde hücre çoğalmasına, farklılaşmasına ve apoptoza aracılık ettiği bilinen Protein kinaz C (PKC) izoenzimlerine olan etkisini araştırmışlardır. EA (15 gün boyunca günlük 40-80 mg/kg vücut ağırlığı) uygulanması sonucu hepatoik lenfoma olan farelerin tümör boyutunun azaldığı ve PKC δ ve kaspaz-3'ün ekspresyonunu up regüle ederek apoptozu pozitif olarak indüklediği belirtilmiştir (Mishra ve Vinayak, 2015). Ramachandran ve arkadaşları EA'nın, ECM proteinlerinin inflamatuvar mediatörlerine, yanıt hücrelerine ve çözünür mediatörlerine müdahale ederek karaciğer fibrojenizini önlediğini bildirmişlerdir (Ramachandran ve diğerleri, 2015).

Sonuç olarak yapılan çalışmalar, EA'nın karaciğer hastalıklarını tedavi etmek için umut verici bir ajan olduğunu göstermektedir.

2.6.2. Karnosik asit (CA)

Karnosik asit, kimyasal formülü $C_{20}H_{28}O_4$ olan, terpenoidler, izoprenoidler veya terpenler olarak da adlandırılan, 50.000'den fazla bitki ikincil metabolitinin en büyük sınıfındaki fenolik diterpen yapısındaki bileşiktir (Şekil 2.15). Esas olarak Lamiaceae familyasından adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ve biberiyede (*Rosmarinus officinalis* L.) bulunan bir diterpendir. Karnosik asitin oksidasyona uğramasıyla karnosol, rosmanal gibi diğer türevler oluşabilmektedir. Aromatik özelliği olan bu maddelerin, antioksidan, antienflamatuar, antianjiyojenik, antiobezite, antikanser, antimikrobiyal, karaciğer koruyucu, nörodejeneratif hastalıklardan koruyucu gibi olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir. Gıda, kozmetik, ilaç endüstrisi, gıda katkı maddelerinin ana aktif antioksidanları olarak oldukça geniş kullanım alanı giderek yaygınlaşmaktadır (Birtić ve diğerleri, 2015; de Oliveira, 2018).



Şekil 2.15. Karnosik asidin kimyasal yapısı (Nieto ve diğerleri, 2018)

Karnosik asitin oksidan etkisi dolaylı veya doğrudan olabilmektedir. CA'da bulunan iki O, C₁₁ ve C₁₂'de -fenolik hidroksil parçası doğrudan antioksidan etkiler de gösterir. CA'nın ROS varlığında, katekolün bir orto -kinona dönüştürüldüğü düşünülmektedir. CA, oksidatif stres altında aktif olmayan (pro-elektrofilik) bir durumdan aktif (elektrofilik) bir duruma dönüşebilir ve elektrofilik durum, sistein tiyolları ile reaksiyona girer. Bu reaksiyon için, bir sistein tiyol, bir eklenti oluşturmak üzere elektrofilik bileşiğin nükleofilik saldırısını tetikler. CA, serbest radikallerle reaksiyona girdikten sonra bir elektrofil haline gelerek, memeli hücrelerinde redoks biyolojisinin ana modülatörü olan Nrf2 transkripsiyon faktörünü aktifleştirir. Oksidatif strese karşı ana hücrel savunma sistemlerinden biri Keap1/Nrf2 yolunun aktivasyonu olup, Nrf2, faz 2 antioksidan enzimleri indükleyen bir transkripsiyon

faktörüdür. Normal koşullar altında, Kelch benzeri ECH ile bağlantılı protein 1 (KEAP1) , Nrf2 'ye bağlanarak, transkripsiyonel aktivitesi güçlü bir şekilde inhibe edilir. Keap1, elektrofilik dönüşümden sonra CA ile reaksiyona giren kritik sistein tiyollerini içerir. Böylece Keap1/Nrf2 ile sitoplazmik kompleksten ayrışır, çekirdeğe girer ve koordineli bir antioksidan ve antienflamatuar enzimler sistemini kodlayan , faz 2 genlerinin ARE'lerine bağlanarak gen ekspresyonunu up regüle eder. Bu proteinler, ana hücrel antioksidan olan glutatyonu (GSH) üreten, enzimleri içerir. Sonuç olarak, Faz II enzimlerinin dönüşümü ile Nrf2-Keap-1-ARE sinyal yolu tetiklenerek antioksidan ve antienflamatuar etkilerinin gösterilmesi sağlanır. Ayrıca, CA'nın faz 2 antioksidan enzimlerin indüklenmesi yoluyla lipopolisakkarit (LPS veya bakteriyel enfeksiyonda bulunan endotoksin) kaynaklı karaciğer hasarından da koruduğu da bildirilmiştir (de Oliveira, 2018; Satoh ve diğerleri, 2022). Adiposit farklılaşması sırasında yapılan başka bir çalışmada, NF-κB inhibitörü sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla Nox4 enzim kompleksinin oluşumunu kesintiye uğrattığı, ROS seviyelerini düşürerek faz II antioksidan enzimlerin uyarılmasını arttırdığı bildirilmiştir (Lee ve Jang, 2021). Karnosik asitin metal iyon şelatörleri olarak hareket edebileceği, özellikle peroksil radikallerinin güçlü temizleyicileri olarak işlev görüp, membran lipidlerinin peroksidasyonu üzerindeki etkisinin yapay antioksidanlar tarafından bildirilen etkiden daha yüksek olduğu açıklanmıştır (Nieto ve diğerleri, 2018). Çeşitli sağlık bozukluklarının tedavisi için CA'nın yararlı etkisine dair çok sayıda kanıt yayınlanmıştır. Diğer doğal bileşiklerle sinerji oluşturan CA'nın deneysel hastalık modellerinin çoğunda yararlı etkileri olduğu doğrulanmaktadır. İlgili mekanizmalar arasında oksidatif stresin inhibisyonu, inflamasyonun ve kanserin zayıflaması gibi durumlar dikkat çekmektedir (Bahri ve diğerleri, 2016).

Karnosik asit ve karaciğerle ilgili yapılmış çalışmalar

Biberiyenin temel bileşeni olan karnosik asidin (CA), sıçanlarda lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı oksidatif/nitrozatif stres ve hepatotoksisite üzerindeki koruyucu etkileri Xiang ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır. CA'nın LPS uygulanmasından önce sıçanlara 15, 30 ve 60 mg/kg dozlarında oral olarak verilmesiyle; lipid peroksidasyonunu, protein karbonilasyonunu ve serum nitrik oksit seviyelerini azaltarak LPS'nin neden olduğu oksidatif/nitrozatif stresi de inhibe ettiği gösterilmiştir. Yaptıkları histopatolojik incelemede, CA'nın patolojik anormallikleri iyileştirebileceğini ve karaciğer dokularındaki enflamatuar hücrelerin göçünü azaltabileceğini belirtilmiştir (Xiang ve diğerleri, 2013). Zuo ve

arkadaşlarının, CA'nın alkolik kaynaklı hepatosteatozu iyileştirebileceğini ortaya attıkları çok yakın tarihli bir çalışmada, elde edilen sonuçlar umut verici olmuştur. Farelere kronik etanol beslemesi ve tek bir aşırı etanol yüklemesi esasına dayalı olarak oluşturulan alkolik karaciğer hastalığı (ALD) modeli oluşturulmuş ve karaciğer lobüler kısımlarından histolojik analiz ve peritoneal makrofajların (MPM) izolasyonu yapılmıştır. Etanol ile beslenen grubun farelerindeki hepatik ve serum trigliserit seviyeleri, diğer gruptaki farelerdekine kıyasla önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. CA ile 10 günlük tedavinin, inflamatuvar infiltrasyonu ve lipid inflamatuvar faktörlerin eğilimini azalttığı ve kitlesel bir lipid birikimini tersine çevirdiği tespit edilmiştir. Yaptıkları immünohistokimyasal analizde de, lipid alımı ve lipogenez ile ilişkili grubunda Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1 (SREBP1)'in Etanol grubunda önemli bir artışını ölçmüşlerdir. CA ile ön beslenen fare karaciğerinde, m RNA'ya karşılık gelen proteinde azalma görülmesi ile, CA'nın alkol kaynaklı lipid birikiminin azaltılmasına, lipid sentezi ile ilgili genlerin ekspresyonunun düzenlenmesine neden olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada CA'nın fare karaciğerlerinde Purinerjik ligand kapılı iyon kanalı 7 reseptörü- Nükleotit bağlama alanı benzeri reseptör proteini 3 (P2X7R-NLRP3) eksenine dayalı Nötrofil hücre dışı traptarı (NET) oluşumunu bloke ettiği ve makrofaj aktivasyonunu azalttığı belirtilmiştir. Aynı eksen yoluyla fare hepatositinde alkol kaynaklı oluşan İnterlökin-1 β (IL-1 β) salınımını CA'nın bastırdığı ve enflamatuvar faktörlerin salınmasının etkili bir şekilde engellenerek ALD sürecini geciktirebileceği sonucuna varılmıştır (Zuo ve diğerleri, 2023). CA'nın çözünürlüğünü ve stabilitesini arttırmak için Liu ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada, CA yüklü lipozomlar (LP-CA) etanol enjeksiyon yöntemiyle hazırlanmış ve transferrin tümör hedefleme etkisini elde etmek amacıyla, LP'lerle konjuge edilmiştir. Tf-LP-CA etkisi ile CA'nın karaciğer kanseri hücrelerini hedefleyebildiği gösterilmiş ve karaciğer kanseri hücresi transplante edilmiş farelerin tümör büyümesini bastırarak, mitokondri aracılı apoptozu indüleyip karaciğer kanseri büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Liu ve diğerleri, 2021). Xu ve arkadaşları, CA'nın sıçanlarda alkolsüz yağlı karaciğer kaynaklı dopaminerjik nöron hasarını araştırdıkları bir çalışmada, HFD'nin (yüksek yağlı diyet) neden olduğu karaciğer hasarı ve lipid birikiminin derecesini de ölçmüşlerdir. Histolojik sonuçlara göre, HFD ile beslenen sıçanlarda hepatosit, nükleer pleomorfizm, hepatik kord dejenerasyonu ve lipid damlacık birikimi görülürken, CA uygulaması yapılan gruplarda ve HFD'nin neden olduğu lipid birikimi zayıflamıştır. Yine HFD ile beslenen sıçanların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksek MDA seviyeleri ve azalmış SOD seviyeleri sergilediklerini; bununla birlikte, CA uygulaması karaciğer

dokusunun SOD seviyesini önemli ölçüde iyileştirdiğini ve MDA seviyesini azalttığını belirterek, uyumlu kan serumu sonuçlarıyla da karaciğer hasarı ve karaciğer yağlanması korumada etkili bir ajan olduğunu ortaya koymuşlardır (T. Xu ve diğerleri, 2017). Razavi ve arkadaşları, CA'nın AMPK aktivasyonu yoluyla antipsikotik ilaç olan olanzapinin neden olduğu metabolik bozuklukları önlemedeki etkisini ölçmüşlerdir. Sıçan karaciğerinde AMPK (5' adenosin monofosfatla aktive olan protein kinaz), P-AMPK ve P-ACC (fosfoasetil-CoA karboksilaz) protein seviyeleri için yapılan Western blot analizinde olanzapin uygulanan gruplarda azalmış olan P-AMPK/AMPK oranı ve P-ACC'nin CA uygulanan gruplarda arttığını ve buna bağlı olarak da, olanzapinin neden olduğu metabolik bozukluklara karşı CA'nın etkili olduğunu tespit etmişlerdir (Razavi ve diğerleri, 2020). CA'nın emilim ve biyoyararlanım durumuyla ilgili de çeşitli dokularda çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan biri de, Doolaege ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, intravenöz veya oral tek doz CA alan tüm sıçanların plazma, karaciğer, bağırsak içeriği, idrar ve dışkılarında emilim ve dağılımını ölçen in vivo deneyler oluşturulmuştur. Kanda % 100'lük bir emilim tespit edilmiş ve biyoyararlanım oranının (0-360 dakika) %40,1 olduğu tahmin edilmiştir. Sıçanların karaciğer, bağırsak içeriğinde, karın, bacak kas dokusunda CA izlerine rastlandığını ve ana eliminasyon yolunun fekal yol olduğu belirtilerek, oral uygulamadan sonra kan dolaşımına emildiği için biyoyararlı olduğu sonucuna varılmıştır (Doolaege ve diğerleri, 2011). Başka bir çalışmada, Zhang ve arkadaşları, ROS aracılı mitokondriyal yolla oluşan hepatoselüler karsinom hücrelerinin apoptozuna CA'nın etkisini araştırmışlardır. HepG2 ve SMMC-7721 HCC hücrelerinde CA'nın neden olduğu apoptozun, ROS aracılı mitokondriyal apoptoz yoluyla tümör büyümesini inhibe ettiği ve hepatoselüler karsinom tedavisinde CA'nın kullanılabilecek yeni bir ajan olabileceği sonucuna ulaşmışlardır (X. Zhang ve diğerleri, 2017). Dastotic ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, fare karaciğerinde Arsenik zehirlenmesine karşı CA'nın profilaktik rolü in vitro ve in vivo prelinik analizler kullanılarak araştırılmıştır. CA (10 ve 20 mg/kg) uygulanan farelerin hepatik dokusundaki lipid peroksidasyonunu ve protein karbonilasyonunu normale yakın duruma getirebildiğini, NaAsO₂ uygulanan hepatik dokuda GSH ve endojen antioksidan enzimlerin azalmasıyla oksidatif stresi güçlendirdiğini ve arsenik ile CA'nın eş zamanlı uygulanmasıyla GSH ve endojen antioksidan enzimleri arttırarak oksidatif stresi azalttığını tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada yapılan karaciğer histolojik kesitlerinde, NaAsO₂ uygulanan dokulardaki yaygın portal damarlar, infiltre lökositler, apoptoz indüksiyonu, hasarlı hepatosit oluşumunun, CA uygulanan grupta düzelerek karaciğer histolojisini normal seviyeye getirdiği belirtilmiştir. Ayrıca CA'nın Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağı

aktivasyonunu ve apoptotik hücre ölüm yolunu azaltarak arsenik kaynaklı hepatotoksisiteyi azalttığı bildirilmiştir (Das ve diğerleri, 2018).

Sonuç olarak yapılan çalışmalar, CA'nın karaciğer hastalıklarını tedavi etmek için umut verici bir ajan olduğunu göstermektedir.

3. MATERİYAL METOT

3.1. Deney Protokolü

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınan çalışma için doku örneklerinin toplanmasına kadar olan tüm aşamalar Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM) laboratuvarında gerçekleştirildi.

Deneylerde GÜDAM'dan temin edilen 42 adet yetişkin erkek Wistar albino sıçan (250-300 g) kullanıldı. Hayvanlar deney öncesinde ve sırasında istenildiği kadar beslendi ve deney süresince ortam sıcaklığı 20 ± 2 °C olan, gün ışığı döngüsüne paralel aydınlatmaya sahip bir ortamda bireysel kafeslerde barındırıldı. Karaciğer dokusunun oksidatif stresi ve antioksidan durumunu 3 ve 7 gün boyunca karşılaştıran deneylerde, 10 mg/kg'da ellagik ve karnosik asitlerin oral gavaj ve topikal terapötik uygulaması kullanıldı. Sıçanlar yedi gruba ayrıldı. Hayvan deneyleri GÜDAM'da, geri kalan deney adımları ise Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Fiziyojji ve Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.2. Diyabet Modelinin Oluşturulması

Diyabeti tetiklemek için sıçanlara tek bir intraperitoneal (IP) 60 mg/kg streptozotosin (STZ) enjeksiyonu (S0130, Sigma-Aldrich, ABD) uygulandı.

3 gün sonra kan şekeri ölçüldü (Accu-Chek Performa Nano, Roche Diagnostics, GER) ve 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi.

3.3. Yara Modelinin Oluşturulması

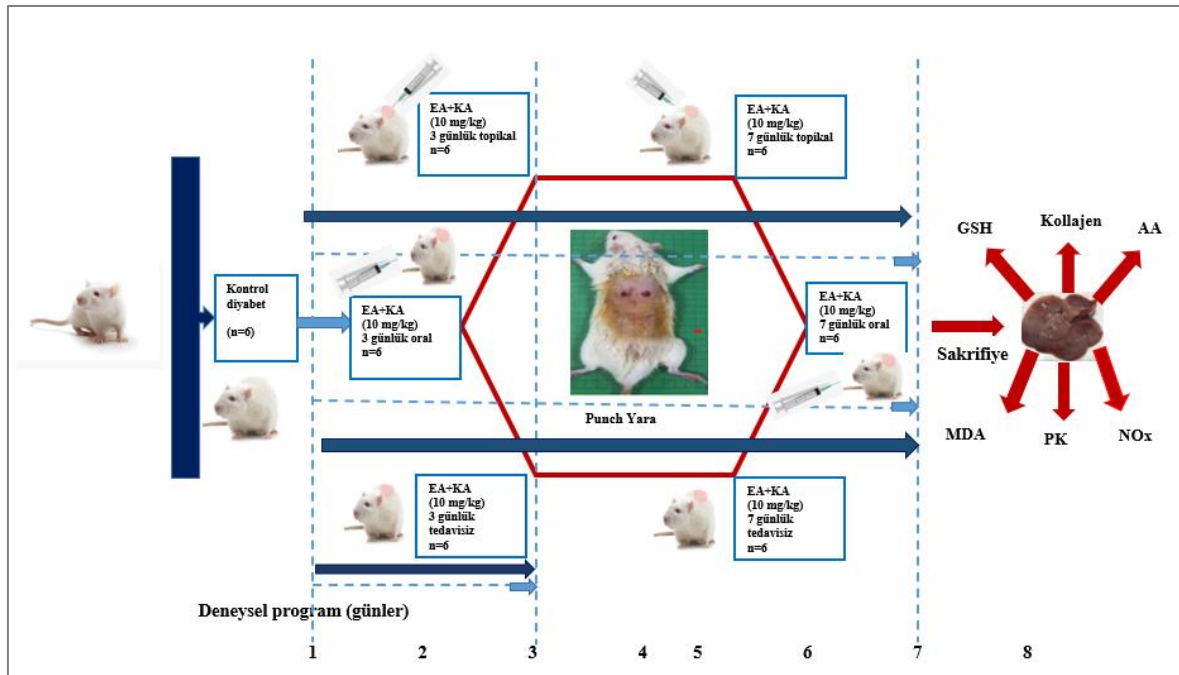
İlk olarak test hayvanları tartıldı ve anestezi uygulandı. Anestezi, ketamin (Alfamin, Alfasan, NED 50 mg/kg) ve ksilazin (Alfazin, Alfasan, NED 5 mg/kg) kas içi (İM) enjeksiyonu ile sağlandı. Anestezinin ardından derinin zarar görmemesi için hayvanın sırtı tıraş edildi ve hayvan yüzü aşağı bakacak şekilde zaptedildi. Kontrol grubu dışındaki tüm hayvanların sırtında, omurganın her iki tarafında birbirine paralel, 8 mm'lik punch biyopsileri (Acu-punch, Acuderm, ABD) kullanılarak altı adet düzgün tam kalınlıkta eksizyonel yara oluşturuldu.

3.4. Deney Gruplarının Dizayını

Her grupta altışar sıçandan oluşan yedi grup oluşturuldu ve her gruba aşağıdaki prosedür uygulandı.

Kontrol grubu:

1. Diyabet oluşturulup, başka bir uygulama yapılmadı (n=6)
2. Tedavi uygulanmayan diyabetli yara grubu: 3. gün sakrifiye edildi (n=6)
3. Tedavi uygulanmayan diyabetli yara grubu: 7. gün sakrifiye edildi (n=6)
4. Topikal tedavi grubu: 3 gün boyunca uygulanıp, 3. gün sakrifiye edildi (n=6)
5. Topikal tedavi grubu: 7 gün boyunca uygulanıp, 7. gün sakrifiye edildi (n=6)
6. Oral gavaj tedavi grubu: 3 gün boyunca uygulanıp, 3. gün sakrifiye edildi (n=6)
7. Oral gavaj tedavi grubu: 7 gün boyunca uygulanıp, 7. gün sakrifiye edildi (n=6)



Şekil 3.1. Deneysel tasarım

3.5. Uygulama ve Karaciğer Dokularının Alınması

Altışar sıçan olacak şekilde her grupta düzenleme yapıldı ve çalışma sırasında yapılan tüm uygulamalar üniversitenin etik kurallarına uygun olarak davranıldı. Ortam sıcaklığı 20 ± 2 'ye, nem ise %50- 60'a ayarlandı. Hayvanlar deney öncesinde ve sırasında her zamanki gibi ad

libitum beslendi. Topikal olarak açık yaraya uygulanmak üzere Elajik asit ve Karnosik asit içeren jel formülasyonu Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD laboratuvarlarında Doç. Dr. Fatma Nur Tuğcu Demiröz tarafından hazırlandı. Topikal Jel hazırlanırken %2 oranında karbopol 974P kullanıldı. Karnosik asit içeren 98 g distile suda disperse edildi ve 800 rpm'de 60 dakika karıştırıldı. Bu karışımın üzerine %10 NaOH çözeltisi damla damla ilave edilerek transparan jel oluşması sağlandı (Kim ve diğerleri, 2010). Elajik asit ve Karnosik asit dozu 10 mg/kg olacak şekilde ayarlandı. Jel oluşan hava kabarcıklarının çıkması için +4 °C'de 24 saat bekletildikten sonra UV altında sterilize edilerek topikal in vivo uygulama için hazır hale getirildi.

Elajik asit ve karnosik asit içeren jel formülasyonu ince bir tabaka halinde petri kabına serilerek ve laminar akış kabininde (Euroflow Class IIA, Clean Air Techniek, Holland) UV lambası (254 nm) altında 2 saat süreyle sterilize edildi. Ayrıca hazırlanan jel formülasyonunun viskozite, akış, pH, yapı profil analizi gibi tüm farmasötik karakterizasyon çalışmaları sterilizasyon işleminden önce ve sonra değerlendirildi. Elajik asit ve Karnosik asit (10 mg/kg) oral gavaj yoluyla su içerisinde çözülerek verildi.

Deneyde kullanılan hayvanların vücut ağırlıkları standart terazide ölçüldü. Genel anestezi sağlamak amacıyla vücut ağırlığıyla orantılı olarak ketamin (50 mg/kg Alfamine) ve ksilazin (5 mg/kg Alfamine) intramüsküler olarak enjekte edildi. Uygulama sonrasında kurban edilen hayvanların karaciğer dokularındaki MDA (malondialdehid), GSH (glutasyon), NO (nitrik oksit), protein karboniller, askorbik asit ve kollajen konsantrasyonları spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

3.6. Deneyin Yöntemi

3.6.1. Dokuda MDA tayin yöntemi

Buege ve Aust'un yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Buege, 1978). Doku numuneleri hassas bir terazide tartıldı ve bir cam Teflon homojenleştirici kullanılarak 10 hacim (w /v) buz soğukluğunda 150 mM KCl içerisinde 5000 rpm'de (Heidolph 8F rpm x 1000) 3 dakika boyunca homojenleştirildi. Doku örnekleri, proteinleri çöktirmek için iki hacim soğuk TCA (trikloroasetik asit) içerisinde homojenleştirildi. Daha sonra (w/v) TCA ile karıştırıldı. Ortaya çıkan çöktiriyi santrifüjlenerek ve eşit hacimlerde %0,67 (w/v) TBA (tiyobarbitürik

asit) ve &1 (w/v) BHT (etanol) içeren süpernatantı kaynar su banyosunda 1 dakika boyunca tepkimeye sokuldu. Soğutma işlemi gerçekleştirildikten sonra absorbans, boş numuneye karşı bir spektrofotometrede 532 nm'de okundu. Dokulardaki MDA konsantrasyonu nmol/g doku olarak hesaplandı.

3.6.2. Dokuda GSH tayin yöntemi

Dokulardaki GSH, değiştirilmiş bir Ellman yöntemi kullanılarak ölçüldü. Doku numuneleri soğuk 0,15 M potasyum klorür içerisinde homojenleştirildi ve 0,5 ml'ye kadar deproteinize edilmiş homojenata bir metafosforik asit/etilendiamintetraasetik asit/sodyum klorür karışımı ilave edildi. 4,000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra, 0,5 ml'nin üstüne 2 ml 0,3 M disodyum hidrojen fosfat ve 0,2 ml ditiyobisnitrobenzoik asit çözeltisi (0,4 mg/ml %1 sodyum sitrat) ilave edildi. Tüm numunelerin optik yoğunluğu, bir spektrofotometre kullanılarak boş bir numuneye karşı 412 nm'de okundu. Doku GSH düzeyleri doku gramı başına μ mol cinsinden hesaplandı (Ellman, 1959).

3.6.3. Dokuda NO tayin yöntemi

Toplanan yara dokusu numunelerindeki NO_x konsantrasyonları Griess yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Miranda ve diğerleri, 2001). Doku, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda (pH: ,7) (1:,9) homojenleştirildi ve ardından 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

500 μ l süpernatanta 0,25 ml 0,3 M NaOH ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyondan sonra, ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi için eşit hacimde VCl₃ ilave edildi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra eşit miktarlarda karışık Grease I+II reaktifleri ilave edildi. 37 °C'de 10 dakika inkübasyonun ardından değerler, 540 nm'deki boş değerle karşılaştırılarak spektrofotometrede okundu. 6,4 mM sodyum nitrit (NaNO₂) stok standardı, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 μ M konsantrasyonlara sahip standartlar elde etmek için günlük olarak seyreltilti. Numunelerdeki NO_x konsantrasyonu, oluşturulan standart eğriden μ mol/g doku cinsinden hesaplandı.

3.6.4. Dokuda AA tayin yöntemi

Berger tarafından modifiye edilen Roe ve Kuether yöntemi kullanıldı (Berger ve diğerleri, 1989). Dokular buz üzerinde soğutuldu ve bir perkloroasetik asit ve etilendiamintetraasetik

asit (PCA/EDTA) karışımı içerisinde homojenleştirildi. 15000 g'de (RCF) 3 dakika homojenize edin.

4°C'de santrifüj edildi. Bir tüpe standart AA çözeltisi, başka bir tüpe boş değer PCA çözeltisi ve numunenin hazırlandığı tüpe süpernatant eklendi. Her tüpe renk reaktifi eklendi, vortekslendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Numune sıcaklığı 0 °C'ye getirildi ve her tüpe H₂SO₄ eklenerek karıştırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Numuneler bir spektrofotometrede 515 dalga boyunda boş bir numune ile karşılaştırıldı.

3.6.5. Dokuda protein karbonilleri tayin yöntemi

PC grubu, 2,4-dinitrofenilhidrazinin (DNPH) bir proteinin karbonil grubu ile reaksiyonu sonucu hidrazinin olduğu kuralına dayanarak 370 nm'de ve toplam protein olarak 280 nm'de spektrofotometrik olarak analiz edildi (Levine ve diğerleri, 1990).

Reaktifler

1,5 M HCl 10 mM 2,4-DNPH (1,5 M HCl'de hazırlanmıştır), %20'lik ve %10'luk TCA,

6 M Guanidine-HCl (20 mM KH₂PO₄ tamponunda hazırlanmıştır, pH=2,3). Etanol/Etil Asetat 1: 1 (v/v)

Protein standart eğrisi çalışması

40 mg sığır serum albümini (BSA), 20 ml 6 M guanidin HCl içerisinde çözündürüldü. PC için protein standartları standart eğri grafiklerine dayandırıldı.

Dokunun hazırlanması

Dokular %1,17 KCL, pH 7,4 içeren 0,1 M fosfat tamponunda 1/10 oranında homojenleştirildi. Elde edilen homojenat +4 °C'de ve 10.000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant, spektrofotometrik PC tespiti için kullanıldı.

Numunenin hazırlanması

Proteinlerin karbonil içeriği Reznick ve Packer'ın yöntemi kullanılarak belirlendi (Reznick ve Packer, 1994). PC içeriğini tespit etmek için biri DNPH'li ve diğeri DNPH'siz olmak üzere iki test tüpü toplandı. Her iki tüpe 0,5 mL homojenat eklendi, ardından DNPH'li tüpe 2 mL DNPH, DNPH'siz tüpe ise 2 mL HCL eklendi. Tüpler her 15 dakikada bir çalkalandı ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

Her iki tüpe de 2,5 ml TCA eklendi, tüpler 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve pellet bölümüne devam edildi. 2 ml TCA eklendikten sonra tüp 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve pelet kısmı işlendi. Tüpe 2 ml etanol/etil asetat eklendi, süpernatant tüpten atıldı, 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve pelet kısmı ile çalışmaya devam edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. İki tüpe 1 mL guanidin HCL eklendi, 10 dakika vortekslendi ve ardından numuneler bir süre çözünmeye bırakıldı. Daha sonra örneklerin guanidin-HCl'ye karşı absorban değerleri 370 nm ve 280 nm'de kaydedildi.

Levine ve diğeri tarafından yapılan hesaplamalara göre işlem yapıldı (Levine ve diğeri, 1990).

A) $CA_{370} = DNPH'li A_{370} - DNPH'siz A_{370}$. Protein karbonil (nmol/ml) = $CA_{370} \times 45,45$

B) Protein (mg/ml) = Standart eğri değeri x seyreltme faktörü. DNPH'siz HCL 280 nm'de okundu. Seyreltme oranı 500 µl/1000 µl'dir.

3.6.6. Dokuda kollajen tayin yöntemi

Dokulardaki kollajen konsantrasyonunun ölçümü, değiştirilmiş bir Lowry yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Komsa-Penkova ve diğeri, 1996).

Standartların hazırlanması

Stok solüsyonu: 2 mg/ml kolajeni (veya jelatini) 0,05 M asetik asit** (MA = 60,05 g/ml; d = 1,05 g/ml) içinde çözdürüldü.

** : 0,05 M asetik asit için: 0,286 ml/100 ml Seri seyreltme, stok çözelti 1: 1'in 0,05 M asetik asitte seyreltilmesiyle gerçekleştirilir:

2→1→0,5→ 0,5→0,25→0,125→0,06→0,03→0,015

180 µL A çözeltisi ve 200 µL örnek/standart/dH₂O (bir çözelti: %0,4 sodyum potasyum tartarat →0,4 g/100 ml (4H₂O için: 0,54 g), Na₂CO₃ 10 g/→ 100 ml, 0,5 M NaOH → 2 g/100 ml, 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığına soğutuldu, 20 µL B çözeltisi (B çözeltisi: %2 sodyum potasyum tartarat → 2 g/100 ml (4H₂O için: 2,69 g)), %3 CuSO₄. 5H₂O → 3 g/100 ml, 0.1 M NaOH (0.4 g/100 ml)) ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

600 µl Folin çözeltisi (1:x15 dilüsyon (≈0.15N)x1 Folin:x14 dH₂O) eklendi ve vortekslendi.

Daha sonra 50°C'de 10 dakika inkübe edildiler, oda sıcaklığına soğutuldular ve boş bir numuneyle karşılaştırıldılar.

*** : Boş = kolajen hariç her şeyi içeren çözelti.

Numune adımı dH₂O pipetlendi.

3.7. İstatiksel İnceleme

Tüm sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Ortalamalardaki farklılıklar, varyans testinin ANOVA analizi (post hoc Tukey testi) ile değerlendirildi.

p <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 250-300 g ağırlığındaki erkek sıçanlarda diyabet ve yara modeli oluşturduk ve EA ve CA tedavilerini topikal ve oral olarak uyguladık. Bu uygulamanın amacı diyabetik yaralarda oksidatif stresin karaciğer dokusunda oluşturduğu hasar üzerine EA ve CA'nın etkilerini ortaya koymaktır. EA ve CA'nın daha önce bu tür çalışmalarda kullanılmamış olması çalışmamızı benzersiz kılmaktadır. Kontrol grubu, tedavi edilmeyen 3.ve 7.gün sakrifiye edilen gruplar, topikal ve oral gavaj tedavi edilen 3. ve 7.gün sakrifiye edilen grupların karaciğer dokusunda yapılan analizlerde MDA, GSH, NOx, AA, Protein karbonilleri ve Kollajen düzeyleri Çizelge 4.1. ve 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Karaciğer dokusu MDA, protein karbonilleri ve NOx düzeyleri

GRUPLAR	MDA Değerleri (nmol/g)	Protein Karbonilleri (PC) (nmol/mg)	NOx Değerleri (μmol/g)
Kontrol (n=6)	46,02 ± 4,57	13,59±1,63	27,24 ± 3,58
3 Günlük Tedavisiz (n=6)	57,29 ± 3,60 ^a	14,82±2,41	32,79 ± 1,81 ^a
7 Günlük Tedavisiz (n=6)	62,37 ± 4,22 ^a	28,38±3,52 ^{a, b}	35,06 ± 3,86 ^a
3 Günlük Topikal Tedavili (n=6)	16,39 ± 3,51 ^{a, b, c}	23,52±2,54 ^{a, b, c}	11,39 ± 3,30 ^{a, b, c}
7 Günlük Topikal Tedavili (n=6)	14,83 ± 2,03 ^{a, b, c}	12,02±1,81 ^{c, d}	6,72 ± 1,65 ^{a, b, c}
3 Günlük Oral- Gavaj Tedavili (n=6)	13,48 ± 1,40 ^{a, b, c}	18,01±2,04 ^{a, c, d, e}	4,94 ± 1,97 ^{a, b, c, d}
7 Günlük Oral Gavaj Tedavili (n=6)	12,88 ± 2,02 ^{a, b, c}	10,14±1,43 ^{b, c, d, f}	3,81 ± 1,08 ^{a, b, c, d}

a: p<0,05: Kontrol grubu ile kıyaslandığında

b: p<0,05: 3 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında

c: p<0,05: 7 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında

d: p<0,05: 3 günlük topikal tedavili grup ile kıyaslandığında

e: p<0,05: 7 günlük topikal tedavili grup ile kıyaslandığında

f: p<0,05: 3 günlük oral-gavaj tedavili grup ile kıyaslandığında

g: p<0,05: 7 günlük oral-gavaj tedavili grup ile kıyaslandığında

Çizelge 4.2. Karaciğer dokusu düzeyleri AA, GSH ve kollajen düzeyleri

GRUPLAR	Askorbik Asit (AA) Değeri (μg/ml)	GSH Değerleri (μmol/g)	Kollajen (mg/g)
Kontrol (n=6)	14,51±0,73	5,13 ± 1,21	42,80± 2,00
3 Günlük Tedavisiz (n=6)	8,33±0,22 ^a	3,81 ± 0,55	26,13± 4,21 ^a
7 Günlük Tedavisiz (n=6)	8,03±0,52 ^a	4,68 ± 1,01	20,82± 1,80 ^{a, b}
3 Günlük Topikal Tedavili (n=6)	14,26±0,55 ^{b, c}	9,39 ± 2,10 ^{a, b, c}	27,18± 2,77 ^{a, c}
7 Günlük Topikal Tedavili (n=6)	14,13±0,41 ^{b, c}	11,29 ± 1,33 ^{a, b, c}	31,73± 1,94 ^{a, b, c, d}
3 Günlük Oral- Gavaj Tedavili (n=6)	11,71±0,45 ^{a, b, c, d, e}	9,78 ± 1,06 ^{a, b, c}	30,23± 1,61 ^{a, c}
7 Günlük Oral Gavaj Tedavili (n=6)	14,26±2,10 ^{b, c, f}	12,10 ± 0,48 ^{a, b, c, d, f}	34,28± 1,95 ^{a, b, c, d}

a: p<0,05: Kontrol grubu ile kıyaslandığında

b: p<0,05: 3 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında

c: p<0,05: 7 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında

d: p<0,05: 3 günlük topikal tedavili grup ile kıyaslandığında

e: p<0,05: 7 günlük topikal tedavili grup ile kıyaslandığında

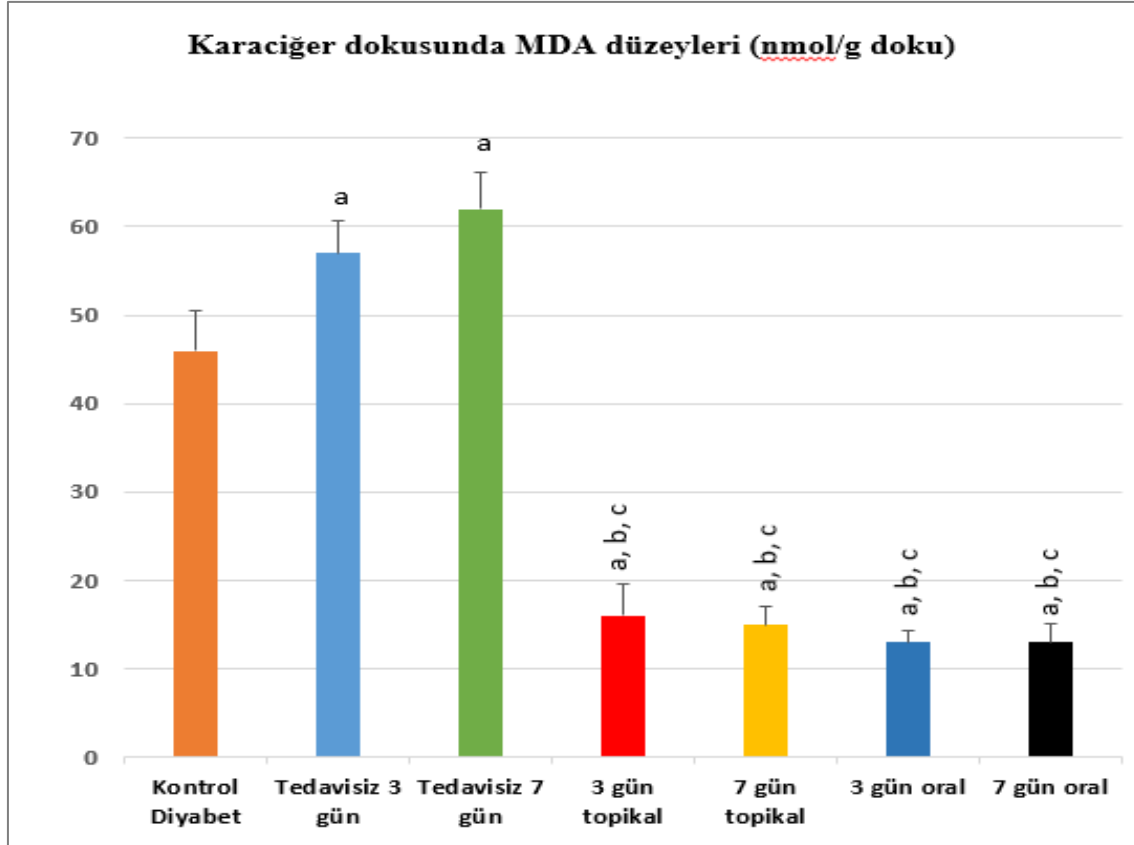
f: p<0,05: 3 günlük oral-gavaj tedavili grup ile kıyaslandığında

g: p<0,05: 7 günlük oral-gavaj tedavili grup ile kıyaslandığında

Gruplar arasındaki anlamlı MDA, GSH, NOx, AA, PC ve kollajen değişikliklerini ölçmek için oluşan farklılıklar istatistiksel olarak yorumlandı. Sonuç olarak, karaciğer dokusundaki MDA ve NOx seviyeleri, K grubu ile karşılaştırıldığında; tedavisiz ve hem topikal hem de oral tedavili gruplarda anlamlı istatistiksel fark tespit edilmiştir (p < 0.05). GSH ve AA değerleri, tüm tedavili gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (p < 0.05). Protein karbonil değerlerinde daha çok zamana bağlı olarak oluşan anlamlı istatistikler açığa çıkmıştır. Tedavili gruplarda, 7 günlük tedavide, tedavisiz 7 günlük ve topikal 3 günlük gruba göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p < 0.05). Kollajen seviyeleri tüm tedavili gruplarda, tedavisiz gruplara göre anlamlı bir artış sergilemiştir (p < 0.05).

MDA düzeyleri

Karaciğer MDA düzeylerinin gruplara göre analizi Şekil 4.1'de gösterilmektedir. MDA düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında anlamlı fark bulundu (p<0,05). Tedavi edilmeyen grup (3 gün ve 7 gün) tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında, tedavi edilen grupta MDA düzeylerinde önemli bir azalma gözlemlendi (p<0,05). Tedavi grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı. Tedavi grubundaki düşük MDA seviyeleri, karaciğerde EA ve CA'nın lipid peroksidasyonunu azalttı. Bu bulgular göz önüne alındığında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



a $p < 0,05$: Kontrol grubu ile kıyaslandığında

b $p < 0,05$: 3 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında

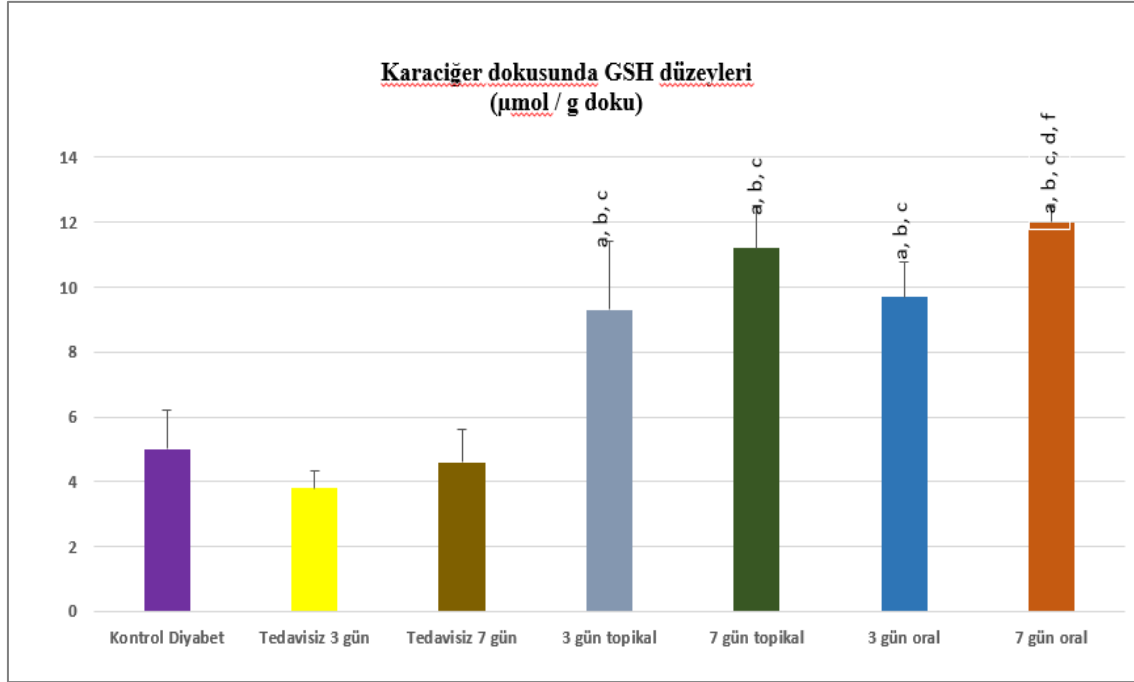
c $p < 0,05$: 7 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında

Şekil 4.1. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde MDA düzeyi

GSH düzeyleri

Karaciğer GSH düzeylerinin gruplara göre analizi Şekil 4. 2'de gösterilmektedir.

GSH düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tedavi ve kontrol grupları arasında anlamlı farklar bulundu ($p < 0,05$). Tedavi grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında, 7 gün boyunca oral uygulama verilen grupta anlamlı bir artış görüldü ($p < 0.05$). İki maddenin oral ve topikal uygulaması, oksidatif strese karşı antioksidan kapasiteleri nedeniyle karaciğer dokularında GSH üretimini artırdı. EA ve KA'nın sinerjistik antioksidan özellikler ürettiği düşünülmektedir. Sonuçların artması, uygulamada kullanılan bileşiklerin (EA ve KA) antioksidan kapasiteye sahip olması ve lipid peroksidasyonunu ve dolayısıyla oksidatif hasarı azaltmasından kaynaklanmıştır.

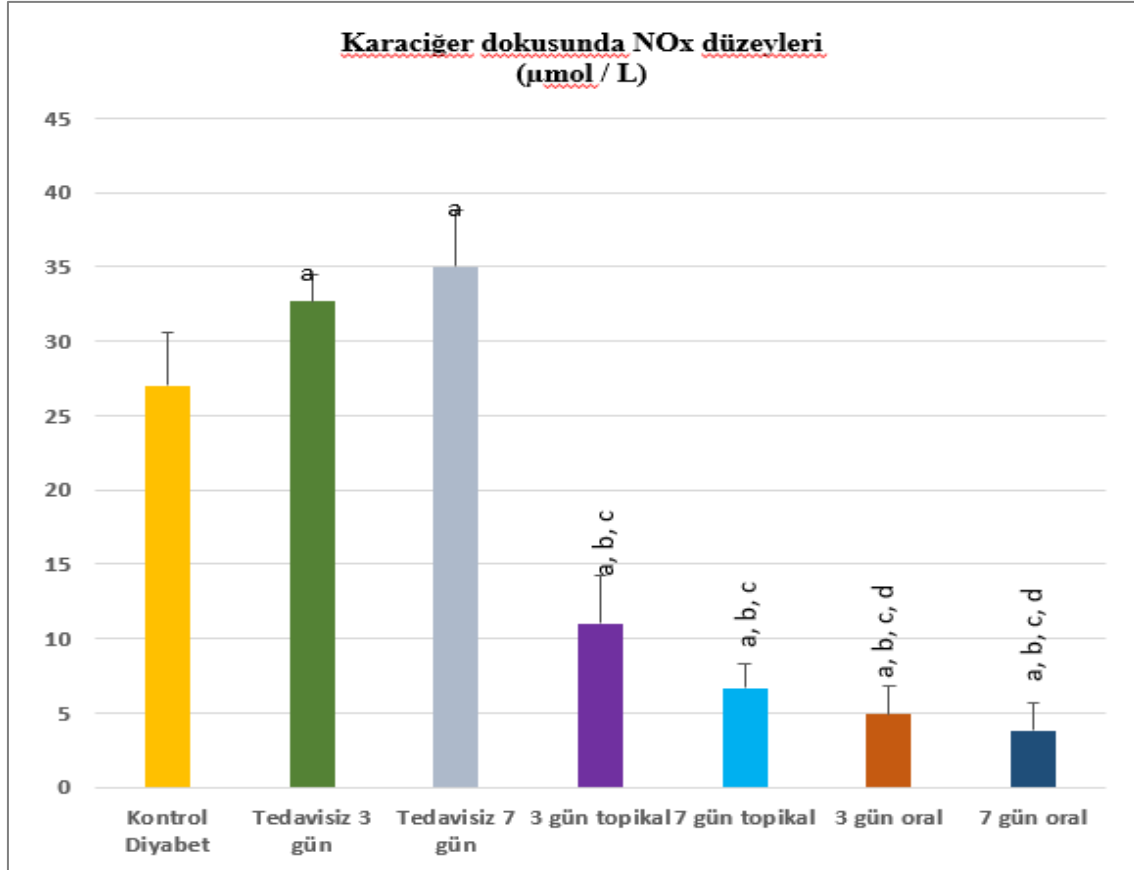


a $p < 0,05$: Kontrol grubu ile kıyaslandığında
b $p < 0,05$: 3 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında
c $p < 0,05$: 7 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında
d $p < 0,05$: 3 günlük topikal tedavi grup ile kıyaslandığında
f $p < 0,05$: 3 günlük oral-gavaj tedavi grup ile kıyaslandığında

Şekil 4.2. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde GSH düzeyi

NOx düzeyleri

Karaciğer NOx düzeylerinin gruplara göre analizi Şekil 4.3.'de gösterilmektedir. Lipit peroksidasyonuna bağlı olarak oluşan NOx düzeyleri, tedavi yapılmayan 3 ve 7 günlük diyabetik yara gruplarında anlamlı olarak arttı. Oral ve topikal tedavi alan tüm grupların NOx içeriği, tedavi görmeyen gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi. Oral tedavi gruplarının NOx düzeyleri, 3 günlük topikal tedavi grubuna göre anlamlı şekilde azalma gösterdi ($p < 0.05$). Daha düşük sonuçlar, tedaviye dahil edilen bileşiklerin antioksidan aktivite sergilemesi ve oksidatif hasarı azaltmasından kaynaklanmıştır.

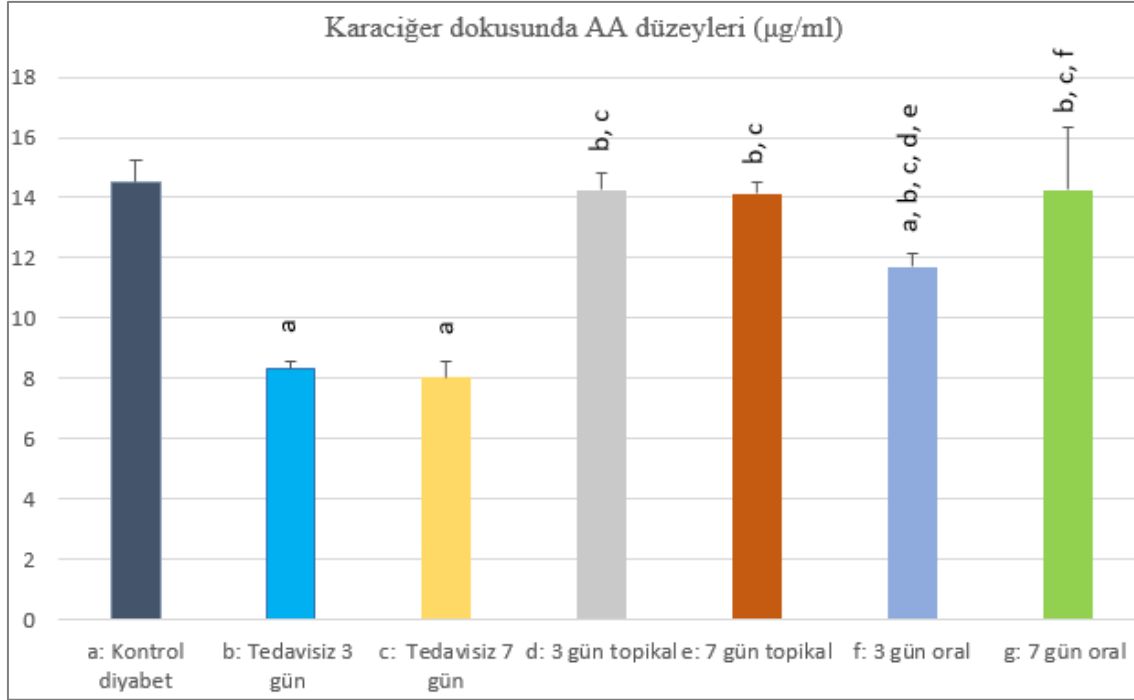


a $p < 0,05$: Kontrol grubu ile kıyaslandığında
 b $p < 0,05$: 3 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında
 c $p < 0,05$: 7 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında
 d $p < 0,05$: 3 günlük topikal tedavi grup ile kıyaslandığında

Şekil 4.3. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde NO_x düzeyi

Askorbik asit (AA) düzeyleri

Karaciğer AA düzeylerinin gruplara göre analizi Şekil 4.4'te gösterilmektedir. EA ve CA'nın birlikte uygulandığı tüm tedavi gruplarında karaciğer dokularındaki AA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi. Tedavisiz gruplar kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Topikal tedavi gruplarında kendi aralarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. 7 günlük oral gavaj tedavi grup, 3 günlük oral gavaj tedavi gruba göre anlamlı bir artış gösterirken, 3 günlük oral gavaj grupta, topikal tedavi gruplarına göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). EA ve CA'nın antioksidan özelliğinden dolayı tüm tedavi gruplarında, AA'nın artış göstermesi beklenen bir olgu olmakla birlikte, bu iki maddenin uygulanma şekli ve süresiyle ilgili daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

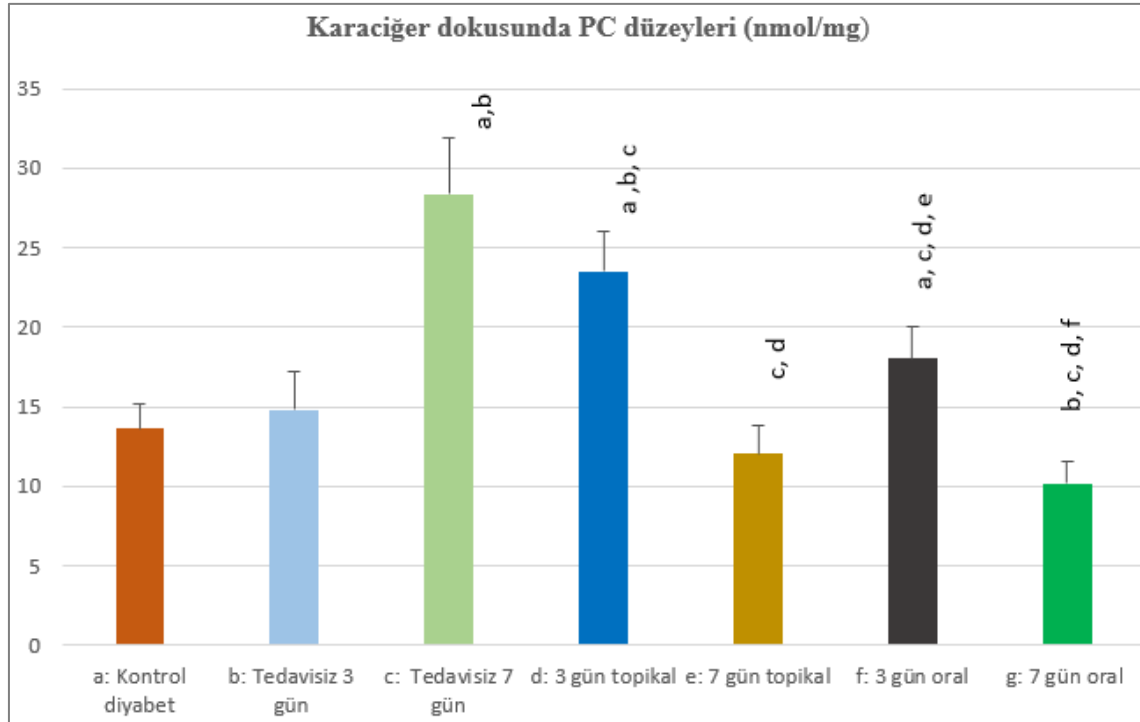


- a $p < 0,05$: Kontrol grubu ile kıyaslandığında
 b $p < 0,05$: 3 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında
 c $p < 0,05$: 7 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında
 d $p < 0,05$: 3 günlük topikal tedavi grubu ile kıyaslandığında
 e $p < 0,05$: 7 günlük topikal tedavi grubu ile kıyaslandığında
 f $p < 0,05$: 3 günlük oral-gavaj tedavi grubu ile kıyaslandığında

Şekil 4.4. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde AA düzeyi

Protein karbonil (PC) düzeyleri

Karaciğer PC düzeylerinin gruplara göre analizi Şekil 4.5.'de gösterilmiştir. Tedavisiz gruplar kendi aralarında kıyaslandığında, 3 günlük tedavisiz grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmazken, 7 günlük tedavisiz grup anlamlı bir artış göstermiştir. Topikal tedavi gruplarına kendi aralarında bakıldığında, 3 günlük topikal tedavi grubunda, kontrol grubu ve tedavisiz gruba göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. 7 günlük topikal tedavi grubu ise, 7 günlük tedavisiz ve 3 günlük topikal gruba göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Oral gavaj tedavi gruplarında ise, 3 günlük oral tedavi grubunda anlamlı bir artış gözlenirken, 7 günlük grupta anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p < 0.05$). Protein karbonilleri, geri dönüşümsüz bir protein modifikasyonu biçimini temsil ettiği, çok erken safhada ve çeşitli yollarla ROS'tan oluşturulabildiği için, 7 günlük tedavisiz grupta yüksek çıkması beklenen bir durumdur. 7 günlük iki tedavide de, 7 günlük tedavisiz ve 3 günlük topikal tedavi grubuna göre anlamlı bir azalmanın çıkması, CA ve EA ikilisinin kullanım şekli ve süresiyle ilgili daha çok araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir.

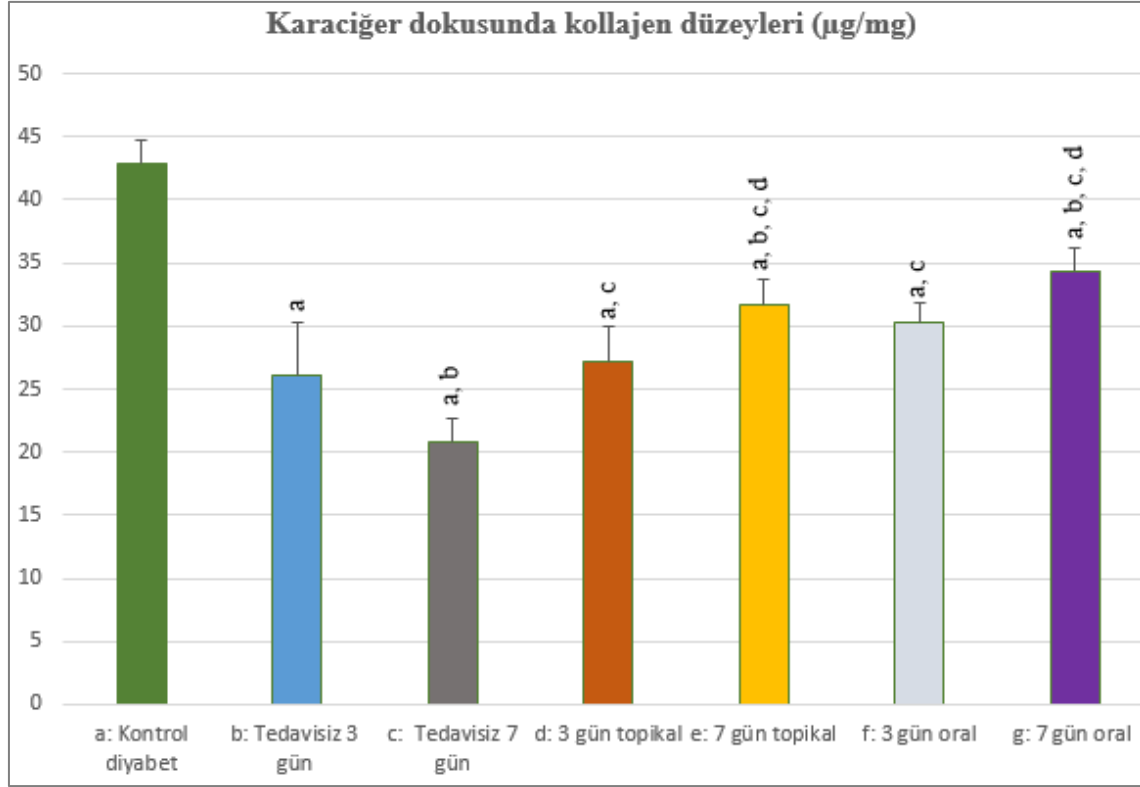


a $p < 0,05$: Kontrol grubu ile kıyaslandığında
 b $p < 0,05$: 3 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında
 c $p < 0,05$: 7 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında
 d $p < 0,05$: 3 günlük topikal tedavi grup ile kıyaslandığında
 e $p < 0,05$: 7 günlük topikal tedavi grup ile kıyaslandığında
 f $p < 0,05$: 3 günlük oral-gavaj tedavi grup ile kıyaslandığında

Şekil 4.5. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde PC düzeyi

Kollajen düzeyleri

Gruplara göre yapılan Karaciğer kollajen düzeylerinin gruplara göre analizi Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. EA ve CA'nın beraber tatbik edildiği tüm tedavi gruplarında, karaciğer dokusunda kollajen miktarının tedavisiz 7 günlük gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır. Tedavisiz ve tedavi tüm gruplarda, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 3 günlük topikal ve 3 günlük oral uygulamalı gruplar kendi arasında anlamlı bir fark göstermemiştir. Aynı şekilde 7 günlük topikal ve 7 günlük oral uygulamalı gruplar da kendi arasında anlamlı bir fark göstermemiştir ($p < 0.05$). EA ve CA uygulamaları, tedavinin uygulandığı tüm gruplarda karaciğer dokusundaki kollajen seviyesini arttırmış ve en ciddi artış ister topikal ister oral gavaj uygulama olsun, 7 günlük uygulamalarda bulunmuştur.



a $p < 0,05$: Kontrol grubu ile kıyaslandığında

b $p < 0,05$: 3 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında

c $p < 0,05$: 7 günlük tedavisiz grup ile kıyaslandığında

d $p < 0,05$: 3 günlük topikal tedavi grup ile kıyaslandığında

Şekil 4.6. Hiperglisemik ratların karaciğerlerinde kollajen düzeyi

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Yara iyileşmesi, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon fazları ile karakterize olan, dinamik, komplike ve interaktif bir süreçtir. Yara iyileşmesini sağlayan faktörler içinde lokal ve diyabet gibi çok önemli olan sistemik faktörler mevcuttur. Diyabetik yaraların kronikleşmesinde, hızlandırılmış ateroskleroz ve nöropatinin neden olduğu azalan perfüzyon nedeniyle bağışıklık sistemi bozulması, azalmış anjiyogenez, daha yavaş kollajen sentezi ve birikimi, yaraların daha zayıf gerilme kuvveti, bozulan oksidatif denge gibi unsurlar yer almaktadır (Deng ve diğerleri, 2021; Gantwerker ve Hom, 2011). Diyabette, serbest radikallerin artan üretimi veya antioksidan sistemlerin azalmış aktivitesi sonucu redoks dengesi bozulur ve oksidatif stres meydana gelir. Karaciğer ise, oluşan bu serbest radikalleri temizlemek için 2 aşamalı bir detoksifikasyon işlemi yapmak üzere spesifik enzimlerinin toplandığı en önemli organdır (Dıraman, 2021; Phaniendra ve diğerleri, 2015). Diyabet komplikasyonlarıyla birlikte etkili bir şekilde kontrol altına alınmadığında, bozulan oksidatif denge ile birlikte diyabetik yaralar kronikleşmekte ve sonuçları çok daha kötüye giden bir tablo ile karşılaşabilmektedir. Diyabetik yaralarda iyileşmeyi hızlandırmak, bozulan hayat kalitesini yükseltmek için dünyada ve ülkemizde odaklanılan bir yeşil kimya stratejisine dayalı pek çok çalışma bildirilmiştir.

EA ve CA'nın antioksidan, antienflamatuar özelliklerinin kanıtlandığı ve oksidatif stres dengelediği yönünde pek çok çalışma bulunmaktadır. Karaciğer, serbest radikalleri temizlemek için detoksifikasyon enzimlerinin toplandığı en önemli organ olduğu için, yapılan bu çalışma ile, EA ve CA'nın farklı uygulamalarının diyabetik yaralarda meydana gelen oksidatif hasar üzerine olan etkisi gösterilmiştir.

Abdelkader ve arkadaşlarının karaciğer toksisitesi üzerine yaptığı bir çalışmada EA'nın oral gavaj tatbik edilmesiyle lipid peroksidasyonu ve oksidanlara karşı önleyici özellikleri, karaciğerdeki MDA, NOx ve GSH seviyelerinin ölçülmesiyle gösterilmiştir (Abdelkader ve diğerleri, 2020). Çalışmamızın sonuçlarına göre, oksidatif stres üzerindeki inhibe edici etkiyi, EA ve CA'nın birlikte uygulandığı gruplarda, MDA ve NOx seviyesinde belirgin azalma oluşturmaktadır. Tedavili grupların MDA seviyesinde oral ve topikal uygulamada anlamlı bir fark gözlenmezken, NOx açısından oral uygulamalı gruplarda belirgin azalmanın olması bu iki maddenin antioksidan etkisinin gastrointestinal yolla daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Xiang ve ekibinin yaptığı çalışmada, CA'nın serbest

oksijen radikalleri, NO_x ve sitokinlerin sitotoksik etkilerini önlediği ve karaciğer glutatyon seviyelerini eski haline getirerek vücudun hücrel antioksidan savunma sistemini belirgin şekilde geliştirdiği tespit edilmiştir (Xiang ve diğerleri, 2013).

NO_x, anjiyogenez, epitel hücrelerinin migrasyonu, keratinosit proliferasyonu ve fibroblastlar tarafından kollajen salgılanması yoluyla yara iyileşmesinin her aşamasında rol oynayan bir moleküldür. Fizyolojiye uygun optimum dozlarda koruyucu etkisi varken yüksek konsantrasyonda sitotoksik etki göstererek, vücuttaki ROS'lar ile tepkimeye girip radikaller meydana getirmektedir (Çaylak, 2011; Pattani ve diğerleri, 2009). Tedavisiz gruplardaki anlamlı NO_x artışı ve oral tedavili gruplardaki anlamlı düşüş iki maddenin nitrozatif stresi düşürdüğünü göstermektedir. Xiang ve ekibinin bulgularıyla bizim bulgularımız paralellik göstermektedir (Xiang ve diğerleri, 2013). Bagheri ve ekibi, diyabetik sıçanlarda kronik yarada yağdan türetilmiş kök hücre ilişkili fotobiyomodülasyon uygulaması yaparak antioksidan ve oksidatif stres faktörlerinin gen ekspresyonunu tespit etmişlerdir. Uygulamanın inflamatuvar yanıtı, NO_x1 ve 4'ü azaltarak yara iyileşmesinin inflamatuvar ve proliferatif aşamalarını önemli ölçüde hızlandırdığını tespit ettiler (Bagheri Tadi ve diğerleri, 2022). Bagheri ve ekibinin bulgularına dayanarak, çalışmada kullandığımız farklı EA ve CA uygulamaları ile karaciğer dokusundaki azalmış NO_x oranı, yara iyileşmesinin inflamatuvar ve proliferatif aşamalarını hızlandırmış ve granülasyon dokusu oluşumunu arttırmış olabilir.

MDA, çoklu doymamış yağ asitlerinden hem kimyasal reaksiyonlarla hem de enzimler tarafından katalize edilen reaksiyonlarla üretilen, lipid peroksidasyon metabolizmasının son ürünlerinden bir moleküldür (Tsikas, 2017). Hem oral gavaj, hem topikal uygulanan tedavili gruplarda MDA'nın düşük çıkması, karaciğerde EA ve CA'nın lipid peroksidasyonun azalmasına sebep olarak oksidatif stresi düşürdüğünü göstermektedir. Zhu ve ekibinin beyin dokusunda yaptığı çalışmada, EA'nın serbest radikalleri temizlediğini, ROS üretimini azaltarak anti-enflamatuvar mekanizmasını Nf-κB, MAPK'ler ve JAK/STAT yollarının düzenlenmesinde gösterdiğini ortaya koyması bizim çalışmamızı da ispatlar niteliktedir (Zhu ve diğerleri, 2022). Zira karaciğer endojen ve eksojen kaynaklı oluşan serbest radikalleri temizlemek için detoksifikasyon enzimlerinin toplandığı en önemli organdır (Dıraman, 2021). Çalışmamızda topikal ve oral tedavili grupların karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde kendi aralarında anlamlı bir fark çıkmaması EA'nın zayıf suda çözünür olması ve düşük biyoyararlanım kapasitesinden kaynaklı olabilir. EA, gastrointestinal sistemde ve diğer bölgelerde, özellikle karaciğerde, faz I ve faz II enzimleri tarafından tekrar

metabolize edilerek daha fazla suda çözünür, dokularda depolanabilir veya idrar yoluyla elimine edilebilir metabolitler haline dönüşür (Gupta ve diğerleri, 2021). Espín ve arkadaşları İber domuzlarıyla yaptığı bir çalışmada EA'dan üretilen ürolitin metabolitinin yalnızca safra kesesi ve idrar kesesine ulaşarak yüksek konsantrasyonlarda depolandığını ancak böbrek, kas, kalp, yağ dokusu ve karaciğer gibi test edilen dokuların hiçbirinde depolanmadığını tespit etmişlerdir (Espín ve diğerleri, 2007).

Tedavisiz gruplarda, hidroksil ve peroksil radikalleri, lipid peroksidasyonunun başlatılmasında ve ilerlemesinde rol oynayarak MDA artışına sebep olmuştur. EA ve CA'nın uygulandığı gruplarda, MDA'nın düşük çıkmasının sebebini, Priyadarsini'nin çalışmasındaki gibi, EA'nın μM konsantrasyonlarında bile lipid peroksidasyonunu inhibe etmede etkili olabileceği şeklinde düşünüyoruz (Espín ve diğerleri, 2007).

EA ile birlikte CA kullanmamızın amacı, CA'nın ; antiinflamatuvar, antioksidan gibi etkilerinin olması ve çeşitli sağlık bozukluklarının tedavisi için CA'nın yararlı etkisine dair çok sayıda kanıtın yayınlanmasıdır (Bahri ve diğerleri, 2016; de Oliveira, 2018). Ayrıca EA'nın biyoyararlanım oranının düşük, CA'nın ise biyoyararlanım oranının yüksek olması sebebiyle bu iki etken maddeyi birlikte ve farklı uygulamalarla kullanarak, diyabetik yaralarda karaciğer dokusundaki oksidatif olayları ilk kez değerlendirdik (Chen ve diğerleri, 2021; Espín ve diğerleri, 2007; Gupta ve diğerleri, 2021). Chen ve ekibi, 2021 tarihli bir çalışmada CA'nın emilim ve taşıma mekanizmalarını araştırmak amacıyla karaciğer, mide gibi farklı dokular ve sindirim içeriklerinde dağılımını tespit ettiler. 7 günlük oral gavaj uygulamadan sonra yaptıkları ölçümde, CA'nın sistemik olarak biyoyararlı olduğu, sindirim sisteminde, özellikle de çekum ve kolonda lokal olarak mevcut bulunduğu, bağırsak mikrobiyomunun CA'nın sindirimi ve emiliminde önemli bir rol oynayabileceği sonucuna ulaştılar (Chen ve diğerleri, 2021).

Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, CA uygulanan grupların karaciğerin dokusunda diğer gruplardaki yüksek MDA seviyesi düşürülmüş ve lipid peroksidasyonu en az orana indirgenmiştir (T. Xu ve diğerleri, 2017). EA ve CA'nın kombine uygulandığı gruplarda, MDA'nın düşük çıkmasının bir başka sebebini; CA'nın metal iyon şelatörleri olarak hareket edebileceği, peroksil radikallerinin güçlü temizleyicileri olarak işlev görüp, lipid peroksidasyonu üzerinde güçlü etki yapmış olabileceği şeklinde değerlendiriyoruz (Nieto ve diğerleri, 2018).

Çalışmamızda kullanılan tedavileri diğer gruplarla karşılaştırmak için protein karbonil seviyelerini de kullandık. Çünkü sadece lipit, nükleik asitler gibi bileşikler oksidatif reaksiyonlardan etkilenmez; protein gibi çok önemli bileşikler de radikallerle reaksiyona girerek çeşitli biyolojik sorunlara neden olurlar. Çok farklı tipde oksidatif protein modifikasyonları bulunmakla birlikte, Protein karbonilleri, geri dönüşümsüz bir protein modifikasyonu biçimini temsil eder ve lipid peroksidasyon ürünlerinin dakikalar içinde uzaklaştırılan biçimini içerir. Belirli bir oksidan sonucu oluşmadığı ve oksidatif stres altında çok erken aşamada oluştuğu için protein oksidasyonunun bir belirteci olarak protein karbonil seviyelerini kullandık (Weber ve diğerleri, 2015).

Yaptığımız çalışmada tedavisiz gruplara bakıldığında, 7 günlük tedavisiz grupta Protein karbonil seviyesi anlamlı bir şekilde artmış bulunmuştur. Bu durum, bize oksidatif stresin diğer belirteçlerine göre protein karbonillerinin daha fazla süre kan dolaşımında bulunması dolayısıyla gerçekleştiğini ve herhangi bir tedavi uygulanmadığında zamanla oksidatif stresin artarak protein işlev bozukluğunun ilerlediğini düşündürmektedir. Sıçanlarda endotoksemi oluşturan Balaban ve Balabanlı'nın yaptığı bir çalışmada, endotoksin uygulanan grupta PC seviyesinin yüksek çıkması bulgumuzu desteklemektedir (Balaban, 2015). Çalışmamızda Protein karbonil seviyelerinde, uygulama şekillerinden ziyade zamanlamaya bağlı olarak oluşan anlamlı istatistikler açığa çıkmış olabilir. Çünkü ister topikal ister oral gavaj uygulama olsun, her ikisinde de 7 günlük tedavide, tedavisiz 7 günlük ve topikal 3 günlük gruba göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Dokudaki PC seviyelerinin EA ve CA ile anlamlı olarak azalmasının sebebinin hem topikal hem de oral daha uzun süren uygulamada, bu iki etken maddenin aminoasitlerin karboksil grupları ile etkileşmesi sonucunda proteinleri karboksilasyondan koruduğu ve antioksidan / oksidan dengesinde etkili bir rol oynadığı düşünülmektedir. 7 günlük tedavi gruplarının kendi arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemesine rağmen, en güçlü antioksidan etki 7 günlük oral gavaj uygulamada kendisini göstermiştir.

Nitekim Xiang ve arkadaşları da, yaptıkları çalışmada, LPS kaynaklı karaciğer hasarında CA'nın oral uygulamasında artmış olan protein karbonillerini azalttığını ve antioksidan etki gösterdiğini açığa çıkarmışlardır (Xiang ve diğerleri, 2013). Yine Karimi ve arkadaşlarının 2019'da yayınladıkları bir çalışmada, toksin kaynaklı oluşturulan hepatotoksistide, artmış MDA, NOx ve protein karbonil seviyelerinin özellikle EA'nın 30 mg/kg oral uygulandığı gruplarda ciddi şekilde düştüğü ve oksidatif hasarı tersine çevirdiği ispatlanmıştır (Karimi

ve diğerleri, 2020). Ayrıca sonuçların inhibe edici etkisinin konsantrasyona bağlı bir şekilde değiştiğini göstermesi, CA ve EA ikilisinin kullanım şekli ve süresiyle ilgili daha çok araştırma yapılması gerektiğini düşündürmektedir.

Antioksidan savunma sistemi, reaktif oksijen ve nitrojenin neden olduğu serbest radikal kaynaklı hücre hasarına karşı korunmada kritik öneme sahiptir. Glutatyon da karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sistein, glisin ve glutamattan sentezlenen ve hücre ve dokuların oksidatif strese korunmasında oldukça önemli bir antioksidandır (Çaylak, 2011; Di Meo ve Venditti, 2020).

Çalışmamızda tüm tedavili gruplarda; kontrol grubu ve tedavisiz gruplara göre GSH'nin anlamlı artış göstermesi, tedavili grupların hepsinde antioksidan kapasitenin yükseldiğini göstermektedir. Nisari tarafından yürütülen bir çalışmada, diyabetik sıçanların karaciğer dokusundaki antioksidan enzimler üzerindeki koruyucu etki araştırılmış ve GSH aktivitesinde önemli bir artış bulunmuştur (Nisari, 2019). İki maddenin hem oral, hem de topikal olarak uygulanması sonucunda, GSH miktarının artması, karaciğer dokusunda oksidatif strese karşı antioksidan kapasitenin yükseldiğini göstermektedir. Yaptığımız çalışmada, en ciddi GSH artışını 3 günlük topikal ve 3 günlük oral uygulamalı tedaviye karşılık, 7 günlük oral tedavili grupta tespit ettik. Bu durum iki maddenin biyoyararlanım açısından uzun sürede oral yolla alındığında daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Shendge ve arkadaşlarının aşırı demir yükünün neden olduğu hepatotoksisitede EA'nın oksidatif stres üzerine buldukları olumlu sonuçlar, bizim bulguları da desteklemektedir. EA'nın in vitro antioksidan kapasitesini tespit ettikten sonra, yaptıkları in vivo çalışmada da, karaciğer dokusu örneklerinde EA ile oral tedavi edilen gruplarda yaptıkları ölçümde ROS seviyesinin düştüğünü ve SOD, Katalaz, GST, GSH'nin arttığını tespit etmişlerdir. Yine Shendge'nin çalışmasındaki EA uygulanmış gruplardaki MDA ve PC sonuçları bizim yukarıda bahsettiğimiz sonuçlarla da uyum göstermektedir (Shendge ve diğerleri, 2018).

Aynı parametre için, CA uygulamasına baktığımızda, Das ve arkadaşları da, bizim bulgulara paralel sonuçlar tespit etmişler ve CA (10 ve 20 mg/kg) tedavisinin hepatik dokusundaki lipid peroksidasyonunu ve protein karbonilasyonunu normale yakın duruma getirerek, GSH ve diğer endojen antioksidan enzimlerin artışını göstermişlerdir (Das ve diğerleri, 2018).

Çalışmada araştırdığımız bir diğer değişken de AA olmuştur. Çünkü AA de GSH gibi enzimatik olmayan antioksidan özelliği gösteren önemli bir maddedir. EA ve CA'nın beraber uygulandığı tüm tedavi gruplarında karaciğer dokularında AA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmesi, tedavinin antioksidan kapasiteyi arttırdığını göstermektedir.

Devipriya ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da bizim bulgulara uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. EA'nın alkol kaynaklı hasara karşı etkilerini değerlendirmek amacıyla 3 farklı EA konsantrasyonu intragastrik uygulama yoluyla verilmesi sonucu plazmadaki AA diğer antioksidanlarla birlikte artmış, ve karaciğer belirteç enzimlerini azaltılarak , oksidatif stres iyileştirilmiştir (Devipriya ve diğerleri, 2007). Yine CA'nın daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi, özellikle lipid peroksid radikallerini temizleyerek, antioksidan etki göstermesinde etkili olabileceğini de düşünmekteyiz (Nieto ve diğerleri, 2018). Zira tüm tedavili gruplarda hem topikal hem oral gavaj uygulanmasıyla, tedavisiz gruplara göre GSH'nin de anlamlı artış göstermesi yine antioksidan kapasitenin yükseldiğini ispatlamaktadır. AA takviyesinin GSH ile pozitif ve anlamlı korelasyon gösterdiği daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Lei ve diğerleri, 2022). Tedavili gruplar kendi arasında değerlendirildiğinde, topikal tedavili gruplarda anlamlı bir ilişki bulunamazken, oral tedavili gruplarda, 7 günlük oral gavaj tedavili grup, 3 günlük oral gavaj tedavili gruba göre anlamlı bir AA artışı göstermiştir. Bu durum daha önce bahsettiğimiz gibi, iki antioksidanın biyoyararlanım açısından uzun sürede oral yolla alındığında daha etkili olabileceği fikrini oluşturmaktadır. 3 günlük oral grupta, topikal tedavili gruplar ve kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma çıkması, oksidatif stresi yok etmek için AA' in kullanılabileceğini göstermektedir. Bir başka açıdan da AA'nın yara iyileşmesinin nötrofillerin apoptoz ve fagositozu, kollajenin sentezi, sekresyonu gibi tüm aşamalarda kullanılıyor olması sebebiyle, yaralanmanın 3.günüdeki oral uygulamada, topikal uygulamaya göre düşük çıkmış olabilir (Moore, 2013). Esasen bulgularımıza baktığımızda, EA ve CA'nın karaciğer dokusundaki AA'ya olan etkisi daha çok uygulama şekliyle ilgili olabilir.

Doku oluşumunun başlaması ve kollajen sentezi için çok gerekli olan AA, kollajenin yapısında olan prolin temel aminoasitinin hidrokisproline dönüşmesini sağlar (Hu ve diğerleri, 2008). Kollajen, normal yara iyileşmesi sürecinde hücre proliferasyonu ve göçünde görev alan en önemli karakteristik matris bileşenlerinden biridir. ECM oluşumu için gerekli olan kollajen sentezinin gerçekleştiği fibrozis döneminde miyofibroblast sayısı artar. Fibrojeniz sırasında hücre dışı matris oluşumuna katkıda bulunan karaciğer, böbrek,

akciğer, kalp ve deride çok çeşitli hücreler ile mekanizmalar vardır. ECM üreten kaynakların başında; hepatik yıldızlı hücreler, portal miyofibroblastlar, yerleşik fibroblastlar, kemik iliğinden türetilen miyofibroblast öncüleri gibi daha çok sayıda hücre kaynağı olan karaciğer gelmektedir. Çalışmamızda EA+CA uygulamalarının karaciğerdeki kollajen düzeyine etkisini araştırmamızın sebebi, kollajen sentezini gerçekleştiren hepatik yıldızlı hücreler ve portal miyofibroblastlar gibi hücrelerin karaciğer kaynaklı olmasıdır (Weiskirchen ve diğerleri, 2019).

EA'nın kollajenle bağlantısı ve fibroblastların göçünün araştırıldığı çalışmaların başında deri gelmektedir. EA'nın kollajen ve elastin üretimi üzerindeki etkisi 2023 yılında insan dermal fibroblastlarına retinoik asit birlikte farklı periyotlarla verildiğinde, Duckworth ve arkadaşları tarafından araştırılmış ve anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. EA'nın cildin elastin ve kollajen üretimini arttırarak ciltteki ince kırışıklıkları iyileştirebileceği sonucuna ulaşmışlardır (Duckworth ve diğerleri, 2023).

Darawsha ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada oksidatif stres altında karotenoidler, polifenoller ve estradiolün dermal fibroblastlar üzerindeki koruyucu etkisi, diğer bileşiklerle birlikte %20,2 CA kullanılarak araştırılmıştır. Dermal hücrelerde bileşiklerin ön inkübasyonu sonucu H_2O_2 'nin oluşturduğu ROS seviyesinin azaldığı, hücre ölümünün inhibisyonu ve oksidatif stresin neden olduğu MMP-1 salgısındaki artışın ve pro-kollajen seviyelerindeki azalmanın tersine çevrildiği tespit edilmiştir (Darawsha ve diğerleri, 2021). Bizim çalışmamızda da tedavi gruplarında tedavisiz gruplara göre tespit edilen kollajen seviyelerindeki anlamlı artış Duckworth ve Darawsha'nın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. EA+CA uygulamalarının yapıldığı gruplarda kollajen artışının, ROS'u azaltan antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artıran Nrf2 transkripsiyon sisteminin aktive edilmesi sonucu olduğu söylenebilir (Darawsha ve diğerleri, 2021).

Kollajen seviyesindeki en az artışın olduğu 3 günlük topikal grupta yine AA seviyesi açısından anlamlı azalmanın tespit edilmesi, oksidatif stresi ortadan kaldırmak için kollajen sentezi için gerekli olan AA'nın kullanıldığını ve bundan dolayı da kollajen seviyesindeki artışın az olduğu sonucuna ulaştırmaktadır (Hu ve diğerleri, 2008).

Abdelkader ve ekibinin VPA kaynaklı karaciğer toksisitesi üzerine yaptığı çalışmada EA'nın oral gavaş uygulanması sonucu tedavi gruplarında kollajen bileşenlerinden olan

hidroksiprolin içeriğinde önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir (Abdelkader ve diğerleri, 2020). Bizim çalışmamızda da hiperglisemik şartlardan dolayı kontrol grubunda karaciğer dokusundaki kollajen düzeylerinin yara uygulaması yapılmış gruplara göre yükselmiş olması, EA ve CA'nın hiperglisemik şartları ortadan kaldırdığı ve hücrelerin normal koşullardaki gibi kalmasına katkı sağladığı sonucunu düşündürmektedir.

EA'nın kollajen seviyesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı hipertrofik skarda, karaciğer dokusu şistozomada ve miyokard enfarktüsü gibi pek çok çalışmada, kollajen I, kollajen III, MMP-2, MMP-9'un protein ekspresyonunu ve ECM birikimini önleyerek fibroblastlarının çoğalmasını ve göçünü engellediği ve kollajen lif birikimin büyük oranda azalmış olduğu tespit edilmiştir (Allam ve diğerleri, 2016; Lin ve diğerleri, 2019; Zhao ve diğerleri, 2023). Zhang ve ekibi, CA'nın karaciğer fibrozu üzerindeki etkisini araştırdığı bir çalışmada da, safra kanalı ligasyonu ile oluşturulan sıçanlarda, oluşan yoğun kollajen birikiminin intragastrik olarak uygulanan CA gruplarında, α -SMA (α -düz kas aktini) ve Col-1'in (kollajen 1) karaciğerdeki ekspresyonunun azaltıldığı tespit edilmiştir (S. Zhang ve diğerleri, 2018).

EA ve CA'nın iki farklı uygulama şekli totalde düşünüldüğünde, özellikle 7 günlük oral gavaj ve 7 günlük topikal uygulamada, GSH, AA ve kollajen artışı ile birlikte; MDA, NOx, PC'nin azalması, EA ve CA uygulamalarının lipit peroksidasyonu ve protein modifikasyonunu azaltarak, antioksidan kapasiteyi arttırıp oksidatif dengeye ulaştırdığının göstergesidir. EA ve CA birlikte sinerjistik etki göstererek, hem inflamasyonu azaltmış, hem de hücrelerin normo glisemik şartlardaki gibi davranış sergilemesine katkı sağlamış olabilir. Böylece, karaciğer dokusunda azalmış inflamasyon nedeniyle, EA ve CA'nın oksidatif stresi azaltarak, bütün sistemin metabolizma anlamında kontrolünü gerçekleştiren karaciğer dokusunda pozitif bir etki yapmış olduğu bu çalışma sonuçlarının literatüre bu anlamda olumlu bir katkısı olduğu görülmektedir.

EA ve CA birlikte aynı pathway üzerinden etki yaparak oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltarak başarı sağlamış olabilir. Bizim çalışmamızda da, EA ve CA'nın birlikte uygulandığı karaciğer dokusunda, Nrf2 ekspresyonunu arttırarak antioksidan aktiviteye katkı sağladıkları söylenebilir. Zaten çoğu endojen antioksidanlar Nrf2 / Keap1 sistemi tarafından kodlanmaktadır. Bu çalışmada da, EA ve CA'nın Nrf2 pathwayini kullanarak, antioksidan kapasiteyi arttırdığı, oksidatif stresi azalttığı sonuçlara bakılarak söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Abdelkader, N. F., Elyamany, M., Gad, A. M., Assaf, N., Fawzy, H. M. and Elesawy, W. H. (2020). Ellagic acid attenuates liver toxicity induced by valproic acid in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 143(1), 23-29.
- Abiko, Y. and Selimovic, D. (2010). The mechanism of protracted wound healing on oral mucosa in diabetes. Review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 10(3), 186.
- Aishwarya, V., Solaipriya, S. and Sivaramakrishnan, V. (2021). Role of ellagic acid for the prevention and treatment of liver diseases. *Phytotherapy Research*, 35(6), 2925-2944.
- Al-Mulla, F., Leibovich, S. J., Francis, I. M. and Bitar, M. S. (2011). Impaired TGF- β signaling and a defect in resolution of inflammation contribute to delayed wound healing in a female rat model of type 2 diabetes. *Molecular BioSystems*, 7(11), 3006-3020.
- Allam, G., Abuelsaad, A. S., Alblihed, M. A. and Alsulaimani, A. A. (2016). Ellagic acid reduces murine schistosomiasis mansoni immunopathology via up-regulation of IL-10 and down-modulation of pro-inflammatory cytokines production. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38(4), 286-297.
- Anthonymuthu, T. S., Kenny, E. M. and Bayır, H. (2016). Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. *Brain Research*, 1640(6), 57-76.
- Armenteros, M., Morcuende, D., Ventanas, J. and Estévez, M. (2016). The application of natural antioxidants via brine injection protects Iberian cooked hams against lipid and protein oxidation. *Meat Science*, 116(2), 253-259.
- Arnold, M. and Barbul, A. (2006). Nutrition and wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7), 42-58.
- Association, A. D. (2021). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care*, 44(1), 15-33.
- Bagheri Tadi, F., Noori Mougehi, S. M., Mostafavinia, A., Moheghi, A., Amini, A., Rezaei, F., Chien, S. and Bayat, M. (2022). Photobiomodulation isolated or associated with adipose-derived stem cells allograft improves inflammatory and oxidative parameters in the delayed-healing wound in streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers in Medical Science*, 37(8), 3297-3308.
- Bahri, S., Jameleddine, S. and Shlyonsky, V. (2016). Relevance of carnosic acid to the treatment of several health disorders: Molecular targets and mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84(9), 569-582.
- Bai, Q., Han, K., Dong, K., Zheng, C., Zhang, Y., Long, Q. and Lu, T. (2020). Potential applications of nanomaterials and technology for diabetic wound healing. *International Journal of Nanomedicine*, 15(10), 9717-9743.
- Baktır, G. (2020). Wound repair and experimental wound models. *Experimed*, 9(3), 130-137.

- Balaban, T. (2015). *Borun Endotoksemide Karaciğer Dokusu Protein Karbonil, MDA, Glutasyon Düzeylerine Etkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 8-23.
- Berger, J., Shepard, D., Morrow, F. and Taylor, A. (1989). Relationship between dietary intake and tissue levels of reduced and total vitamin C in the nonscorbutic guinea pig. *The Journal of Nutrition*, 119(5), 734-740.
- Bigliardi, P. L., Alsagoff, S. A. L., El-Kafrawi, H. Y., Pyon, J. K., Wa, C. T. C. and Villa, M. A. (2017). Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. *International Journal of Surgery*, 44(8), 260-268.
- Birtić, S., Dussort, P., Pierre, F. X., Bily, A. C. and Roller, M. (2015). Carnosic acid. *Phytochemistry*, 115(7), 9-19.
- Branski, L. K., Gauglitz, G. G., Herndon, D. N. and Jeschke, M. G. (2009). A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns*, 35(2), 171-180.
- Brissett, A. E. and Sherris, D. A. (2001). Scar contractures, hypertrophic scars, and keloids. *Facial Plastic Surgery*, 17(4), 263-272.
- Buege, J. A. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(7), 302-310.
- Buyukguzel, E. (2013). Protein oksidasyonun biyokimyasal ve moleküler mekanizması. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 3(1), 40-51.
- Celik, G., Semiz, A., Karakurt, S., Arslan, S., Adali, O. and Sen, A. (2013). A comparative study for the evaluation of two doses of ellagic acid on hepatic drug metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Biomed Research International*, 358945, 1-9.
- Chen, X., Huang, M., Liu, D., Li, Y., Luo, Q., Pham, K., Wang, M., Zhang, J., Zhang, R. and Peng, Z. (2021). Absorption and transport characteristics and mechanisms of carnosic acid. *Biology*, 10(12), 1278.
- Childs, D. R. and Murthy, A. S. (2017). Overview of wound healing and management. *Surgical Clinics*, 97(1), 189-207.
- Clark, R. A. (2013). *The molecular and cellular biology of wound repair*. Berlin: Springer Science & Business Media, 145-176.
- Cochrane, C. G. (1991). Cellular injury by oxidants. *The American Journal of Medicine*, 91(3), 23-30.
- Cuvelier, M. E., Berset, C. and Richard, H. (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 665-669.
- Çalık, A. (2017). Diyabet tedavisinde kullanılan tamamlayıcı ve alternatif tedaviler: Literatür derlemesi. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 1(2), 79-84.

- Çankal, D. A. U. (2013). Yara iyileşmesini etkileyen faktörler içerisinde beslenmenin yeri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 23(7), 135-141.
- Çavdar, Z. (2008). *Kolon ve rektum kanserlerinde endostatinin matriks metalloproteinaz-2 üzerine gösterdiği etkinin araştırılması*. Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Çaylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
- Çimen, T. (2012). *Hatay yöresindeki çeşitli Bitkilerden Elde Edilen doğal bileşiklerin Oksidatif Stres üzerine Etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Darawsha, A., Trachtenberg, A., Levy, J. and Sharoni, Y. (2021). The protective effect of carotenoids, polyphenols, and estradiol on dermal fibroblasts under oxidative stress. *Antioxidants*, 10(12), 2023.
- Das, S., Joardar, S., Manna, P., Dua, T. K., Bhattacharjee, N., Khanra, R., Bhowmick, S., Kalita, J., Saha, A. and Ray, S. (2018). Carnosic acid, a natural diterpene, attenuates arsenic-induced hepatotoxicity via reducing oxidative stress, MAPK activation, and apoptotic cell death pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1421438, 1-3.
- de Oliveira, M. R. (2018). Carnosic acid as a promising agent in protecting mitochondria of brain cells. *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6687-6699.
- de Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N. and Vermeulen, N. P. (1999). Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2), 202-226.
- Demir, O. Ü. (2015). *Nörofibromatozisli hastalarda görülen atrofik skar ile yara iyileşmesi ve ekstrasellüler matriks elemanlarının ilişkileri, nörofibromlu dokudaki damar endoteli ve damar düz kasındaki değişikliklerin değerlendirilmesi*. Uzmanlık Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kırıkkale.
- Deng, L., Du, C., Song, P., Chen, T., Rui, S., Armstrong, D. G. and Deng, W. (2021). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic wound healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 8852759, 1-11.
- Derosa, G., Maffioli, P. and Sahebkar, A. (2016). Ellagic acid and its role in chronic diseases. *Anti-Inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*, 473-479.
- Devipriya, N., Sudheer, A. R. and Menon, V. P. (2007). Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21(6), 621-630.
- Di Meo, S. and Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9829176(4), 1-32.
- Diegelmann, R. F. and Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9(1), 283-289.

- Diraman, E. (2021). Karaciğerde detoksifikasyon. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 12(32), 1156-1161.
- Doolaege, E. H., Raes, K., De Vos, F., Verhé, R. and De Smet, S. (2011). Absorption, distribution and elimination of carnosic acid, a natural antioxidant from *Rosmarinus officinalis*, in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(7), 196-202.
- Duckworth, C., Stutts, J., Clatterbuck, K. and Nosoudi, N. (2023). Effect of ellagic acid and retinoic acid on collagen and elastin production by human dermal fibroblasts. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 34(5), 473-480.
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., Leaper, D. and Georgopoulos, N. T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, 14(1), 89-96.
- Ebrahimi, R., Sepand, M. R., Seyednejad, S. A., Omid, A., Akbariani, M., Gholami, M. and Sabzevari, O. (2019). Ellagic acid reduces methotrexate-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction via up-regulating Nrf2 expression and inhibiting the I κ B α /NF κ B in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(11), 721-733.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Ertoý, U. D. D. (1996). Yara iyileşmesinin histopatolojisi. C. Erdem ve C. Çelebi (Ed.). *Tüm yönleriyle yara iyileşmesi* (1.Baskı). Ankara: Türk Dermatopatoloji Derneği, 85-89.
- Espín, J. C., González-Barrio, R., Cerdá, B., López-Bote, C., Rey, A. I. and Tomás-Barberán, F. A. (2007). Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10476-10485.
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 366(9498), 1736-1743.
- Fu-Shin, X. Y., Lee, P. S., Yang, L., Gao, N., Zhang, Y., Ljubimov, A. V., Yang, E., Zhou, Q. and Xie, L. (2022). The impact of sensory neuropathy and inflammation on epithelial wound healing in diabetic corneas. *Progress in Retinal and Eye Research*, 101039(7), 89-110.
- Gantwerker, E. A. and Hom, D. B. (2011). Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 19(3), 441-453.
- Gantwerker, E. A. and Hom, D. B. (2012). Skin: histology and physiology of wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*, 39(1), 85-97.
- George Broughton, I., Janis, J. E. and Attinger, C. E. (2006). Wound healing: an overview. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7), 1-32.
- Gu, L., Deng, W.-s., Liu, Y., Jiang, C.-h., Sun, L.-c., Sun, X.-f., Xu, Q. and Zhou, H. (2014). Ellagic acid protects Lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute hepatic injury in mice. *International Immunopharmacology*, 22(2), 341-345.

- Guo, S. a. and DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229.
- Gupta, A., Singh, A. K., Kumar, R., Jamieson, S., Pandey, A. K. and Bishayee, A. (2021). Neuroprotective potential of ellagic acid: a critical review. *Advances in Nutrition*, 12(4), 1211-1238.
- Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2017). *Guyton ve hall tıbbi fizyoloji* (12. Baskı). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 837-840.
- Hamamcıoğlu, A. C. (2017). Diyabette oksidatif stres ve antioksidanların rolü. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi*, 1(1), 7-13.
- Han, G. and Ceilley, R. (2017). Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in Therapy*, 34(3), 599-610.
- Hart, J. (2002). Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care*, 11(6), 205-209.
- Hawkins, C. L. and Davies, M. J. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1504(2-3), 196-219.
- Hu, C. A. A., Khalil, S., Zhaorigetu, S., Liu, Z., Tyler, M., Wan, G. and Valle, D. (2008). Human Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase: function and regulation. *Amino Acids*, 35(4), 665-672.
- Hwang, J. M., Cho, J. S., Kim, T. H. and Lee, Y. I. (2010). Ellagic acid protects hepatocytes from damage by inhibiting mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(4), 264-270.
- İnternet: Diabetes now affects one in 10 adults worldwide. (2021). URL: <https://www.idf.org/news/240:diabetes-now-affects-one-in-10-adults-worldwide.html>, Son Erişim Tarihi: 10.12.2023.
- Is, Y. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.
- Janssen, Y., Van Houten, B., Borm, P. and Mossman, B. (1993). Cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 69(3), 261-274.
- Jasim, A. J. (2017). Reversed phase high performance liquid chromatography method for quantification of antioxidants in fresh rosemary leaves. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 8(4), 1015-1020.
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 1-8.
- Karimi, M. Y., Fatemi, I., Kalantari, H., Mombeini, M. A., Mehrzadi, S. and Goudarzi, M. (2020). Ellagic acid prevents oxidative stress, inflammation, and histopathological alterations in acrylamide-induced hepatotoxicity in wistar rats. *Journal of Dietary Supplements*, 17(6), 651-662.

- Kayalı, R. ve Çakatay, U. (2004). Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35(2), 83-89.
- Khalil, R. and Van Breemen, C. (1995). Mechanisms of calcium mobilization and homeostasis in vascular smooth muscle and their relevance to hypertension. J. H. Laragh and B. M. Brenner (eds.) *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, (2nd ed.) New York, NY: Raven Press Publishers, 523-540.
- Kim, S., Nishimoto, S. K., Bumgardner, J. D., Haggard, W. O., Gaber, M. W. and Yang, Y. (2010). A chitosan/ β -glycerophosphate thermo-sensitive gel for the delivery of ellagic acid for the treatment of brain cancer. *Biomaterials*, 31(14), 4157-4166.
- Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- Komsa-Penkova, R., Spirova, R. and Bechev, B. (1996). Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 32(1), 33-43.
- Kopal, C., Deveci, M., Öztürk, S. and Sengezer, M. (2007). Effects of topical glutathione treatment in rat ischemic wound model. *Annals of Plastic Surgery*, 58(4), 449-455.
- Kosaka, K. (2012). Anti-ageing effect of rosemary by the biophylaxis mechanism: activation of Nrf2 biophylaxis mechanism and suppression of the glycation stress. *Food Style*, 21(16), 46-49.
- Kumar, B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R. and Pushpangadan, P. (2007). Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(2), 103-113.
- Kumar, H., Lim, H. W., More, S. V., Kim, B. W., Koppula, S., Kim, I. S. and Choi, D. K. (2012). The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 10478-10504.
- Kurt, N. (2003). *Akut ve kronik yara bakımı* (2. Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 34-35.
- Lampi, M. C. and Reinhart-King, C. A. (2018). Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials. *Science Translational Medicine*, 10(422), eaao0475.
- Lee, D.-K. and Jang, H.-D. (2021). Carnosic acid attenuates an early increase in ROS levels during adipocyte differentiation by suppressing translation of Nox4 and inducing translation of antioxidant enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6096.
- Lei, T., Lu, T., Yu, H., Su, X., Zhang, C., Zhu, L., Yang, K. and Liu, J. (2022). Efficacy of vitamin C supplementation on chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 17(4), 2201-2216.

- Lerman, O. Z., Galiano, R. D., Armour, M., Levine, J. P. and Gurtner, G. C. (2003). Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *The American Journal of Pathology*, 162(1), 303-312.
- Lesellier, E., Lefebvre, T. and Destandau, E. (2021). Recent developments for the analysis and the extraction of bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* and medicinal plants of the Lamiaceae family. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135(2), 1-33.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., and Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. Illinois: Academic Press, 186, 464-478.
- Lin, C., Wei, D., Xin, D., Pan, J. and Huang, M. (2019). Ellagic acid inhibits proliferation and migration of cardiac fibroblasts by down-regulating expression of HDAC1. *The Journal of Toxicological Sciences*, 44(6), 425-433.
- Liska, D. (1998). The detoxification enzyme systems. *Alternative Medicine Review*, 3(3), 187-198.
- Liu, X., Dong, S., Dong, M., Li, Y., Sun, Z., Zhang, X., Wang, Y., Teng, L. and Wang, D. (2021). Transferrin-conjugated liposomes loaded with carnosic acid inhibit liver cancer growth by inducing mitochondria-mediated apoptosis. *International Journal of Pharmaceutics*, 607, 121034.
- Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S. and Lehnert, H. (2002). Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*, 45(2), 1011-1016.
- López-Jiménez, A., García-Caballero, M., Medina, M. Á. and Quesada, A. R. (2013). Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *European Journal of Nutrition*, 52(4), 85-95.
- Luc, K., Schramm-Luc, A., Guzik, T. and Mikolajczyk, T. (2019). Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *Journal of Physiology & Pharmacology*, 70(6), 809-824.
- Lütfoğlu, D. M. (2007). Periodontal rejenerasyon ve büyüme faktörleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 17(3), 35-43.
- MacKay, D. and Miller, A. L. (2003). Nutritional support for wound healing. *Alternative Medicine Review*, 8(4), 359-377.
- Malnütrisyon, S. B. Y. H. (2011). *Geriatrik Hasta ve Sorunları*. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi. İstanbul: Doyuran Matbaası, 75(1), 147-161.
- Witte, M. B., and Barbul, A. (1997). General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 509-528.
- Mc, R. (2001). Wound healing; biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery*, 38(4), 61-140.

- Memişoğulları, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Duzce Medical Journal*, 7(3), 30-39.
- Miranda, K. M., Espey, M. G. and Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71.
- Mishra, S. and Vinayak, M. (2015). Role of ellagic acid in regulation of apoptosis by modulating novel and atypical PKC in lymphoma bearing mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-8.
- Moazamian, R., Polhemus, A., Connaughton, H., Fraser, B., Whiting, S., Gharagozloo, P. and Aitken, R. J. (2015). Oxidative stress and human spermatozoa: Diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 21(6), 502-515.
- Moore, J. (2013). Vitamin C: a wound healing perspective. *British Journal of Community Nursing*, 18(2), 6-11.
- Mustoe, T. A., O'shaughnessy, K. and Kloeters, O. (2006). Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: A unifying hypothesis. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7), 35-41.
- Navarro, M., Amigo-Benavent, M., Mesias, M., Baeza, G., Gökmen, V., Bravo, L. and Morales, F. J. (2014). An aqueous pomegranate seed extract ameliorates oxidative stress of human hepatoma HepG2 cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1622-1627.
- Nieto, G., Ros, G. and Castillo, J. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*, 5(3), 98.
- Nisari, M. (2019). Civan perçemi (*Archilia millefolium*)'nin diyabetik sıçanların karaciğer dokusundaki antioksidan enzimler üzerine koruyucu etkisinin araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 28(3), 172-176.
- Noori, M., Jafari, B. and Hekmatdoost, A. (2017). Pomegranate juice prevents development of non-alcoholic fatty liver disease in rats by attenuating oxidative stress and inflammation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2327-2332.
- Nursal, T. Z., Baykal, A. and Hamaloğlu, E. (1999). Yaşlılarda yara iyileşmesi: Fark var mı. *Turkish Journal of Geriatrics*, 2(1), 29-32.
- Onofri, F. (2016). *Development of an extracellular matrix hydrogel for intestine tissue engineering*. Tesi di Laurea Magistrale, Università Degli Studi Di Padova Dipartimento Di Ingegneria Industriale, Padova, İtalya.
- Ousey, K., Cutting, K., Rogers, A. A. and Rippon, M. G. (2016). The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. *Journal of Wound Care*, 25(3), 122-130.
- Ozler, M., Simsek, K., Ozkan, C., Akgul, E. O., Topal, T., Oter, S. and Korkmaz, A. (2010). Comparison of the effect of topical and systemic melatonin administration on delayed

- wound healing in rats that underwent pinealectomy. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 70(6), 447-452.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.
- Parsak, C. K., Sakman, G. ve Çelik, Ü. (2007). Yara iyileşmesi, yara bakımı ve komplikasyonları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 16(2), 145-159.
- Pattani, A., Patravale, V. B., Panicker, L. and Potdar, P. D. (2009). Immunological effects and membrane interactions of chitosan nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 6(2), 345-352.
- Pekbilir, A. (1990). Yara iyileşmesi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8(1), 231-240.
- Pham-Huy, L. A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B. and Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(7), 11-26.
- Phillips, N. F. (2004). *Operating room technique*. New York: Mosby, 55.
- Piastra, M., Caresta, E., Massimi, L., Picconi, E., Luca, E., Morena, T., Conti, G. and Eaton, S. (2020). Lipid peroxidation and antioxidant consumption as early markers of neurosurgery-related brain injury in children. *Neurocritical Care*, 33, 124-131.
- Pittman, J. (2007). Effect of aging on wound healing: current concepts. *Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing*, 34(4), 412-417.
- Poblete-Aro, C., Russell-Guzman, J., Parra, P., Soto-Munoz, M., Villegas-Gonzalez, B., Cofre-Bolados, C., and Herrera-Valenzuela, T. (2018). Efecto del ejercicio físico sobre marcadores de estrés oxidativo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [Exercise and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus]. *Revista Medica de Chile*, 146(3), 362-372.
- Rajasekaran, D., Manoharan, S., Silvan, S., Vasudevana, K., Baskaran, N. and Palanimuthu, D. (2013). Proapoptotic, anti-cell proliferative, anti-inflammatory and antiangiogenic potential of carnosic acid during 7, 12 dimethylbenz [a] anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(1), 102-112.
- Ramachandran, P., Iredale, J. P., & Fallowfield, J. A. (2015). Resolution of liver fibrosis: basic mechanisms and clinical relevance. *Seminars in Liver Disease*. 35(2), 119-131.
- Razavi, B. M., Abazari, A. R., Rameshrad, M. and Hosseinzadeh, H. (2020). Carnosic acid prevented olanzapine-induced metabolic disorders through AMPK activation. *Molecular Biology Reports*, 47(9), 7583-7592.

- Reinke, J. and Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35-43.
- Reiter, R. J., Tan, D.-x., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Leon, J. and Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1129-1146.
- Reznick, A. Z., and Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233, 357-363.
- Ríos, J. L., Giner, R. M., Marín, M. and Recio, M. C. (2018). A pharmacological update of ellagic acid. *Planta Medica*, 84(15), 1068-1093.
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A. and Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological Reviews*, 99(1), 665-706.
- Satoh, T., Trudler, D., Oh, C. K. and Lipton, S. A. (2022). Potential therapeutic use of the rosemary diterpene carnosic acid for Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and long-COVID through NRF2 activation to counteract the NLRP3 inflammasome. *Antioxidants*, 11(1), 124.
- Sculean, A., Gruber, R. and Bosshardt, D. D. (2014). Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *Journal of Clinical Periodontology*, 41, 6-22.
- Senoner, T. and Dichtl, W. (2019). Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target? *Nutrients*, 11(9), 2090.
- Shendge, A. K., Basu, T., Panja, S., Chaudhuri, D. and Mandal, N. (2018). An ellagic acid isolated from *Clerodendrum viscosum* leaves ameliorates iron-overload induced hepatotoxicity in Swiss albino mice through inhibition of oxidative stress and the apoptotic pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106(9), 454-465.
- Sherris, D. and Kern, E. (1999). The wound. *Basic Surgical Skills, Mayo Foundation for medical. Education and Research, Rochester*, 8-12.
- Shi, Y. and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685-700.
- Shiekh, P. A., Singh, A. and Kumar, A. (2020). Exosome laden oxygen releasing antioxidant and antibacterial cryogel wound dressing OxOBand alleviate diabetic and infectious wound healing. *Biomaterials*, 249(8), 120020.
- Singer, A. J. and Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, 341(10), 738-746.
- Singh, K., Khanna, A. and Chander, R. (1999). Hepatoprotective activity of ellagic acid against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37(10), 1025-1026.
- Soysal, G. E. ve Yılmaz, A. A. (2022). Diyabetli hastanın perioperatif yönetimi. E. Akbaş (Ed). *Sağlık & Bilim 2022: Hemşirelik-III* (1.Baskı) Efe Akademik Yayıncılık, 141-145.

- Steenfos, H. H. (1994). Growth factors and wound healing. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, 28(2), 95-105.
- Süntar, I. P., Akkol, E. K., Yılmaz, 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.
- Yüceyar, S. (2008). Cerrahi yaraların takip ve tedavisi. Yara bakımı ve Tedavisi, *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, 67, 17-24.
- Şenol, M. (1995). Yara iyileşmesi. *Türkiye Klinikleri Journal of Dermatology*, 5(1), 49-53.
- Tepebaşı, M. Y. and Calapoğlu, N. Ş. (2017). Yara iyileşmesinin hücresel ve moleküler mekanizması (Cellular and Molecular Mechanism of Wound Healing). *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 23(4), 140-146.
- Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524(5), 13-30.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Van Putte, L., De Schrijver, S. and Moortgat, P. (2016). The effects of advanced glycation end products (AGEs) on dermal wound healing and scar formation: A systematic review. *Scars, Burns & Healing*, 6828(2), 1-14.
- Wang, P. H., Huang, B. S., Horng, H. C., Yeh, C. C. and Chen, Y. J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94-101.
- Weber, D., Davies, M. J. and Grune, T. (2015). Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biology*, 5(6), 367-380.
- Weiskirchen, R., Weiskirchen, S. and Tacke, F. (2019). Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Molecular Aspects of Medicine*, 65(2), 2-15.
- Werner, S. and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3), 835-870.
- Wetzler, C., Kämpfer, H., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J. and Frank, S. (2000). Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(2), 245-253.
- Xiang, Q., Liu, Z., Wang, Y., Xiao, H., Wu, W., Xiao, C. and Liu, X. (2013). Carnosic acid attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in rats via fortifying cellular antioxidant defense system. *Food and Chemical Toxicology*, 53(3), 1-9.

- Xu, F., Zhang, C. and Graves, D. T. (2013). Abnormal cell responses and role of TNF-in impaired diabetic wound healing. *BioMed Research International*, 754802(9), 1-9.
- Xu, T., Zhou, J., Zhu, J., Zhang, S., Zhang, N., Zhao, Y., Ding, C., Shi, X. and Yao, J. (2017). Carnosic acid protects non-alcoholic fatty liver-induced dopaminergic neuron injury in rats. *Metabolic Brain Disease*, 32(12), 483-491.
- Xuan, Y. H., Huang, B. B., Tian, H. S., Chi, L. S., Duan, Y. M., Wang, X., Zhu, Z. X., Cai, W. H., Zhu, Y. T. and Wei, T. M. (2014). High-glucose inhibits human fibroblast cell migration in wound healing via repression of bFGF-regulating JNK phosphorylation. *PloS One*, 9(9), e108182.
- Yager, D. R., Kulina, R. A. and Gilman, L. A. (2007). Wound fluids: a window into the wound environment? *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 6(4), 262-272.
- Yalçın, H. ve Özkalp, B. (2005). *Vücut hijyeninin önemi ve yara bakımında yeni gelişmeler*. 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Samsun, 288-306.
- Yıldız, M. (2001). *Serbest radikaller oksidatif hasar ve antioksidan savunma*. Yüksek Lisans Semineri, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 42.
- Young, A. and McNaught, C.-E. (2011). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 29(10), 475-479.
- Yu, Y. M., Chang, W. C., Wu, C. H. and Chiang, S. Y. (2005). Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(11), 675-681.
- Zhang, S., Wang, Z., Zhu, J., Xu, T., Zhao, Y., Zhao, H., Tang, F., Li, Z., Zhou, J. and Gao, D. (2018). Carnosic acid alleviates BDL-induced liver fibrosis through miR-29b-3p-Mediated inhibition of the high-mobility group box 1/toll-like receptor 4 signaling pathway in rats. *Frontiers in Pharmacology*, 8(1), 976.
- Zhang, X., Chen, Y., Cai, G., Li, X. and Wang, D. (2017). Carnosic acid induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via ROS-mediated mitochondrial pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 277(11), 91-100.
- Zhao, Z. J., Wu, D. J., Lv, D. L., Zhang, B. D., Chen, L., and Sun, Y. Q. (2023). Ellagic acid inhibits the formation of hypertrophic scars by suppressing TGF- β /Smad signaling pathway activity. *Chemical Biology & Drug Design*, 102(4), 773-781.
- Zhu, H., Yan, Y., Jiang, Y. and Meng, X. (2022). Ellagic acid and its anti-aging effects on central nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10937.
- Zuo, R. M., Jiao, J. Y., Chen, N., Jiang, X. L., Wu, Y. L., Nan, J. X. and Lian, L. H. (2023). Carnosic acid suppressed the formation of NETs in alcoholic hepatosteatosis based on P2X7R-NLRP3 axis. *Phytomedicine*, 110(2), 154599.



Gazili olmak ayrıcalıktır