



***CAMELLIA SINENSIS* (ÇAY)  
EKSTRELERİNİN *IN VITRO* ANTİOKSİDAN,  
YARA İYİLEŞTİRİCİ  
ve  
U2OS OSTEOSARKOM HÜCRELERİNDE  
ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Sinem ER**  
Yüksek Lisans Tezi

**CAMELLIA SINENSIS (ÇAY) EKSTRELERİNİN  
IN VITRO ANTIOKSİDAN,  
YARA İYİLEŞTİRİCİ  
ve  
U2OS OSTEOSARKOM HÜCRELERİNDE  
ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Sinem ER**  
Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Farmakoloji Anabilim Dalı  
Eskişehir, Mayıs 2010

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Miriş DİKMEN**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sinem ER'in "*Camellia sinensis* (Çay) Ekstrelerinin *in vitro* Antioksidan, Yara İyileştirici ve U2OS Osteosarkom Hücrelerinde Antikanser Aktivitelerinin Araştırılması" başlıklı Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek lisans tezi 11/05/2010 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Adı-Soyadı**

**İmza**

**Üye (Tez Danışmanı): Yrd. Doç. Dr. Miriş DİKMEN**

.....

**Üye : Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK**

.....

**Üye : Doç. Dr. Nilgün ÖZTÜRK**

.....

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 07.05.2010 tarih ve 10/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada, Trabzon Sürmene'den toplanmış olan *Camellia sinensis* yaprakları ile marketten satın alınmış (ticari) yeşil çaydan hazırlanan ekstrelerin NIH 3T3 fare fibroblast hücrelerinde yara iyileştirici etkileri, U2OS osteosarkom hücrelerinde de aktikanser aktiviteleri *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Yara iyileştirici aktivitenin araştırılmasında Masson's Trichrome Tekniği kullanılmış ve *Centella asiatica* ekstresi (TEKA) pozitif kontrol olarak çalışılmıştır. Antikanser aktivite araştırmasında, ekstrelerin sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle, apoptotik etkileri ise hücre akım sitometrisi ile değerlendirilmiş ve kateşin pozitif kontrol olarak çalışılmıştır.

Tez çalışmasındaki deneyler, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ve üniversitemizin Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Lisansüstü eğitimim boyunca her anlamda destek olan, farmakoloji ve hayat adına kendisinden çok şey öğrendiğim ve hocalığını örnek aldığım Anabilim Dalı Başkanımız, sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e,

Tez çalışmalarım süresince değerli fikirleriyle yol gösteren, deneyimleri ile yanımda ve destek olan, hücre kültürünü bana sevdiren çok sevgili danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Tezime sağladığı katkılardan dolayı sayın hocam Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Nilgün ÖZTÜRK'e ve Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Zerrin CANTÜRK'e,

Eczacılık Fakültesinde geçirdiğim süre zarfında birlikte olduğum ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Mediha ALKAN, Zeynep BOR, Sevdâ ER, Ayça ÇAKMAK'a,

Farmakoloji bölümündeki ve üzerimde emeği olan tüm hocalarıma,

Beni yetiştirip bu günlere getiren ve her zaman beni destekleyip, yüreklendiren canım annem ve biricik babama,

Beni daima anlayışla karşılayan ve destek olan çok sevgili eşim Serkan ER'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

**SİNEM ER**

## **CAMELLIA SINENSIS EKSTRELERİNİN *IN VITRO* ANTIOKSİDAN, YARA İYİLEŞTİRİCİ VE U2OS OSTEOSARKOM HÜCRELERİNDE ANTIKANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

### **ÖZET**

*Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (çay), polifenollerce zengin bir bitki olup, özellikle de flavan-3-ol (kateşin) ve flavonol glikozidleri içerir. *C. sinensis*'den elde edilen yeşil çayın, içerdiği polifenoller sebebiyle güçlü antioksidan, antienflamatuar, antimutajenik, antikanserojenik, antianjiyojenik, apoptotik, hipolipidemik, antiarteriosklerotik, antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral ve yaşlanmayı geciktirici etkilere sahip olduğu açıklanmıştır. Bu çalışmada, Trabzon Sürmene'den toplanan *Camellia sinensis* yaprakları ile satın aldığımız (ticari) yeşil çay'dan hazırladığımız infüzyon ve metanol ekstralarının antioksidan, yara iyileştirici ve antikanser aktiviteleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu Metodu ile, antioksidan aktivite tayini ise DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve  $\beta$ -Karateno-Linoleik Asit üzerinden tayin edilmiştir.

0.5, 1, 2.5, 5, 10  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonları hazırlanan *C. sinensis* ekstralarının 24 ve 48 saatlik yara iyileştirici etkileri NIH 3T3 hücrelerinde Masson's Trichrome Tekniği kullanılarak araştırılmıştır. 5, 10, 20, 40, 60  $\mu\text{g/ml}$  ekstre konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik antikanser aktiviteleri de U2OS osteosarkom hücrelerinde MTT (sitotoksik etki) ve akım sitometri (apoptotik etki) yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

*C. sinensis* metanol ekstralarının, infüzyon gruplarına göre total fenolik madde miktarı ve antioksidan aktiviteleri daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgulara paralel olarak metanol ekstraları kontrolle karşılaştırıldığında, hem yara iyileştirici hem de antikanser aktivitelerinin yine infüzyon gruplarına göre daha anlamlı olduğu belirlenmiştir. Yara iyileştirici etkide özellikle İYÇ-Me (işlenmiş yeşil çay-metanol), YÇ-Me (işlenmemiş yeşil çay-metanol) ve SYÇ-Me (satın alınmış yeşil çay-metanol)'nin düşük konsantrasyonlarında, total hücre sayısındaki artışa paralel olarak mitozaya giden hücre sayılarında da anlamlı artışlar belirlenmiştir. Yine metanol ekstralarının 0.5  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarında poligonal hücre sayısındaki artışlar kontrole göre önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Granül sayısı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmemiştir. Sitotoksik etki bakımından tüm ekstre gruplarında konsantrasyon ve inkübasyon zamanı arttıkça sitotoksik etkinin arttığı ve hücre proliferasyonunun azaldığı görülmüştür. Apoptotik etkinin de metanol ekstralarında infüzyon gruplarına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Özellikle apoptotik hücre oranı 60  $\mu\text{g/ml}$  İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me konsantrasyonlarında sırasıyla % 26.3, % 18.9 , % 14.7 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada *in vitro* antioksidan, yara iyileştirici ve antikanser aktivitede yüksek toplam fenolik madde içeren *Camellia sinensis* metanol ekstralarının daha etkili olduğunu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** yara iyileşmesi, *Camellia sinensis*, osteosarkom, antioksidan, antikanser

**INVESTIGATIONS of *IN VITRO* ANTIOXIDANT, WOUND HEALING  
and ANTICANCER ACTIVITIES IN U2OS OSTEOSARCOMA CELLS  
of *CAMELLIA SINENSIS* EXTRACTS**

**ABSTRACT**

*Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (tea) is a plant which is rich in polyphenols including flavan-3-ol (catechin) ve flavonol glycosides. It's been reported that green tea which is obtained from *C. sinensis* has a potent antioxidant activity and also antiinflammatory, antimutagenic, anticarcinogenic, antiangiogenic, apoptotic, hipolipidemic, antiarteriosclerotic, antidiabetic, antibacterial, antiviral and antiaging activities. In this study, methanol and infusion extracts were prepared from the leaves of *Camellia sinensis* that were gathered from Trabzon Sürmene and the green tea that we bought in order to investigate antioxidant, wound healing and anticancer activities *in vitro*. Total phenol constituents were determined by Folin-Ciocaltaeu Method and DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) and  $\beta$ -Caroten-Linoleik Acid System were used to determine antioxidant activity.

The prepared *C. sinensis* extracts were given to NIH 3T3 cells at the concentrations of 0.5, 1, 2.5, 5, 10  $\mu\text{g/ml}$  and they were incubated for 24, 48 hours to detect wound healing effects by using Masson's Trichrome Tecnique. The concentrations of extract (5, 10, 20, 40, 60  $\mu\text{g/ml}$ ) were given U2OS osteosarcoma cells to evaluate their anticancer activities at 24, 48 hours by using MTT and flow cytometry assays.

Total phenolic constituents and antioxidant activities of methonol extracts were higher than water extracts. The wound healing and anticancer activities of methanol extracts were significantly increased when compared to control. In the low concentrations of methanol extract groups in the wound healing effect, the observed numbers of mitotic cells were significantly high along with the total cell number. The 0.5  $\mu\text{g/ml}$  concentration of the methanol extract was indicated an increment in polygonal cell numbers when compared to control. There was no significance in the groups in respect to number of granule cells. In cytotoxicity test, it was observed that as the concentrations and incubation time increases the cytotoxic effect was also increased; whereas the proliferation was decreased. The apoptotic effect in methanol extracts were more potent when compared to infusion groups. Especially; the cells which were treated with 60  $\mu\text{g/ml}$  concentration of methanol extract were indicated higher apoptotic cell ratio.

As a result it was concluded that methanol extracts of *Camellia sinensis* which have high total phenolic constituents were more effective in antioxidant, wound healing and anticancer activities.

**Keywords:** wound healing, *Camellia sinensis*, osteosarcoma, antioxidant, anticancer

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	i
<b>ÖNSÖZ</b>	ii
<b>ÖZET</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	v
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xii
<b>SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xvi
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>KAYNAK BİLGİSİ</b>	3
<b>Yara ve Yara İyileşmesi</b>	3
<i>Yara iyileşmesinde tarihsel dönemler</i>	3
<i>Yara iyileşme evreleri</i>	4
<i>Hemostazis ve inflamasyon fazı</i>	4
<i>Proliferatif faz</i>	7
<i>Maturasyon (remodeling) fazı</i>	9
<b>Yara İyileşmesinde Ekstrasellüler Matriks (ECM) ve</b>	
<b>Büyüme Faktörleri</b>	10
<b>ECM ve Büyüme Faktörleri Etkileşim Tipleri</b>	11
<i>Büyüme faktörlerinin ECM'e bağlanması</i>	11
<i>İntegrin aracılı etkileşimler</i>	11
<i>Hücresinin ECM'e yapışması ve büyüme faktör cevabı</i>	11
<i>Matrikin ligand sunumunda ECM komponentlerinin rolü</i>	12
<i>Büyüme faktörüyle ECM düzenlemesi</i>	12
<b>Yara İyileşmesinde Bitkisel Tedavi</b>	14
<b><u>Camellia sinensis</u> (L.) Kuntze (çay)</b>	14
<i>Çay türleri ve kimyasal kompozisyonları</i>	15
<b><u>Centella asiatica</u> ekstresinin farmakolojik özellikleri</b>	17
<b>Yeşil Çayın Farmakolojik Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri</b>	18
<i>Yara iyileşmesinde yeşil çay ve polifenollerinin etkisi</i>	18
<b>Yara İyileştirici Etki Araştırmasında Kullanılan NIH 3T3 Fare</b>	
<b>Fibroblast Hücreleri ve Özellikleri</b>	19



<b>Hücre Kültüründe Yara İyileştirici Etkinin Masson's Trichrome Tekniği İle Değerlendirilmesi</b>	19
<b>Kanser</b>	19
<i>Kanser hücrelerinin özellikleri</i>	20
<b>Hücre Döngüsü</b>	21
<b>Apoptoz</b>	23
<i>Apoptoz mekanizmaları</i>	25
<i>Apoptoz ve kanser ilişkisi</i>	26
<i>Tümör hücrelerinin apoptozdan kaçma mekanizmaları</i>	27
<b>Yeşil Çay ve Kanser İlişkisi</b>	27
<i>Yeşil çay ve polifenollerinin antioksidan etkileri ve kanserin önlenmesi</i>	28
<i>Yeşil çay polifenollerinin, mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağını aktive edici etkisi</i>	29
<i>Yeşil çay polifenolü epigallocateşin-3-gallat (EGCG)'nin tümör hücrelerinde proteozom aktivitesini inhibe edici etkisi</i>	29
<i>Yeşil çay polifenollerinden EGCG' nin ürokinaz aktivitesini inhibe edici etkisi</i>	30
<i>Yeşil çayın apoptotik hücre ölümünü indükleyici ve hücre döngüsünü durdurucu etkisi</i>	30
<i>Yeşil çay ve polifenollerinin EGFR (epidermal büyüme faktör reseptörü) yolağı aracılığı ile hücre proliferasyonu ve tümör gelişimini inhibe edici etkisi</i>	31
<i>Yeşil çay ve polifenollerinin AP-1 (aktivatör protein-1) aktivasyonu ve hücre transformasyonu inhibe edici etkisi</i>	31
<i>Yeşil çay ve polifenollerinin, c-jun mRNA ekspresyonunu, protein tirozin kinaz ve JNK 1 aktivasyonunu inhibe edici etkisi</i>	31
<b>Osteosarkom</b>	31
<i>U<sub>2</sub>OS hücreleri ve özellikleri</i>	32
<b>Hücre Kültüründe Sitotoksik Etkilerin Değerlendirilme Yöntemleri</b>	33
<i>Mitokondriyal aktiviteye dayalı sitotoksik ölçüm yöntemi (MTT)</i>	33
<b>Hücre Kültüründe Apoptotik Etkilerin Değerlendirilme Yöntemleri</b>	34
<i>Akım sitometri yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi</i>	34
<b>Bitkilerde Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite Tayininde</b>	

<b>Kullanılan Yöntemler</b>	36
<i>DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini</i>	36
<i><math>\beta</math>-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini</i>	37
<b>GEREÇLER</b>	38
<b>Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	38
<b>Kullanılan Araç ve Gereçler</b>	38
<b>YÖNTEMLER</b>	39
<b>Ekstraksiyon Metodu</b>	39
<i>Metanol ekstraksiyonu</i>	39
<i>İnfüzyonların hazırlanması</i>	40
<b>Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini</b>	40
<b>Antioksidan Aktivite Tayini</b>	40
<i>DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki</i>	40
<i><math>\beta</math>-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini</i>	41
<b>NIH 3T3 Fare Fibroblast ve U2OS İnsan Osteosarkom</b>	
<b>Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneyle Hazırlık</b>	41
<i>Hücreleri stoklama</i>	41
<i>Stoktan hücre çıkarma</i>	42
<i>NIH 3T3 ve U2OS hücre dizilerinin pasajlanması</i>	42
<i>Yara iyileştirici etkinin araştırılması için konsantrasyonların hazırlanması</i>	42
<i>NIH 3T3 hücrelerinde yara iyileştirici aktivite öncesi, ekstrelerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi</i>	42
<i>Mitokondriyal aktivite testi (MTT)</i>	42
<i>Yara iyileştirici aktivitenin değerlendirilmesi</i>	43
<i>NIH 3T3 hücrelerinin sayımı, ekimi ve konsantrasyonlarının uygulanması</i>	43
<i>Masson's Trichrome tekniği ile yara iyileştirici aktivitenin değerlendirilmesi</i>	43
<i>I.Hücrelerin fiksasyonu ve Masson's Trichrome boyama yöntemi</i>	43
<i>II.Preparatların hücre morfolojisi ve sayımları yönünden değerlendirilmesi</i>	44
<i>U2OS hücrelerinde sitotoksik etkinin değerlendirilmesi</i>	44
<i>Mitokondriyal aktivite testi (MTT)</i>	44

<i>U2OS hücrelerinde apoptotik etkinin değerlendirilmesi</i>	44
<i>Annexin V - FITC/PI ile hücre akım sitometrisinde apoptotik etkinin saptanması</i>	44
<b>İstatistiksel Analizler</b>	45
<b>BULGULAR ve TARTIŞMA</b>	46
<b>Toplam Fenolik Madde İçeriği</b>	46
<b>DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini</b>	47
<b><math>\beta</math>-Karoten Linoleik Asit Sisteminde Antioksidan Aktivite Tayini</b>	48
<b>NIH 3T3 Fibroblastlarında Yara İyileştirici Aktivitenin Değerlendirilmesi</b>	50
<i>NIH 3T3 hücrelerinde morfometrik bulgular ve sabit preparatlardaki sayım sonuçları</i>	50
<i>NIH 3T3 fibroblastlarında mitokondriyal aktivitenin (MTT) değerlendirilmesi</i>	74
<b>U2OS Hücrelerinde Antikanser Aktivitenin Değerlendirilmesi</b>	82
<i>Farklı deney gruplarına ait U2OS hücrelerinin invert-mikroskop görüntüleri</i>	82
<i>U2OS hücrelerinde mitokondriyal aktivitenin (MTT) değerlendirilmesi</i>	99
<i>Hücre akım sitometrisi yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi</i>	106
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	128
<b>KAYNAKLAR</b>	129

## ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO VE ADI	SAYFA
Çizelge 1 Makrofajların Yara İyileşmesindeki Rolü ve Etki Mekanizmaları	5
Çizelge 2 Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Büyüme Faktörleri	13
Çizelge 3 Çay Yaprağının Bileşimi	16
Çizelge 4 Farklı Çay Tiplerinin Fenolik Madde Kompozisyonu	16
Çizelge 5 Nekroz ve Apoptoz Arasındaki Farklar	25
Çizelge 6 Apoptozu Tetikleyen Hücre İçi ve Dışı Ajanlar	26
Çizelge 7 <i>Camellia sinensis</i> Ekstrelerinin % Verimleri, Toplam Fenolik Madde Miktarları	46
Çizelge 8 <i>Camellia sinensis</i> Ekstrelerinin % İnhibisyon Değerleri	47
Çizelge 9 <i>Camellia sinensis</i> Ekstrelerinin $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Sisteminde % Antioksidan Aktivite Değerleri	49
Çizelge 10 TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Fibroblastlarında Toplam ve Mitoza Giden Hücre Sayıları Üzerine 24. Saatteki Etkileri	67
Çizelge 11 TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının Fusiform ve Poligonal Şekildeki NIH 3T3 Fibroblastları Üzerine 24. Saatteki Etkilerinin Yüzde Değerleri	68
Çizelge 12 TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının Yuvarlak Şekilli, Vakuol ve Kollajen Granülü İçeren NIH 3T3 Fibroblastları Üzerine 24. Saatteki Etkilerinin Yüzde Değerleri	69
Çizelge 13 TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Fibroblastlarında Toplam ve Mitoza Giden Hücre Sayıları Üzerine 48. Saatteki Etkileri	71

<b>Çizelge 14</b>	TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının Fusiform ve Poligonal Şekildeki NIH 3T3 Fibroblastları Üzerine 48. Saatteki Etkilerinin Yüzde Değerleri	72
<b>Çizelge 15</b>	TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının Yuvarlak Şekilli, Vakuol ve Kollajen Granülü İçeren NIH 3T3 Fibroblastları Üzerine 48. Saatteki Etkilerinin Yüzde Değerleri	73
<b>Çizelge 16</b>	Farklı TEKA Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	75
<b>Çizelge 17</b>	Farklı İYÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	76
<b>Çizelge 18</b>	Farklı YÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	77
<b>Çizelge 19</b>	Farklı SYÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	78
<b>Çizelge 20</b>	Farklı İYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	79
<b>Çizelge 21</b>	Farklı YÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	80
<b>Çizelge 22</b>	Farklı SYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	81
<b>Çizelge 23</b>	Farklı Kateşin Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	99
<b>Çizelge 24</b>	Farklı İYÇ-Me Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	100

<b>Çizelge 25</b>	Farklı YÇ-Me Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	101
<b>Çizelge 26</b>	Farklı SYÇ-Me Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	102
<b>Çizelge 27</b>	Farklı İYÇ-inf Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	103
<b>Çizelge 28</b>	Farklı YÇ-inf Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	104
<b>Çizelge 29</b>	Farklı SYÇ-inf Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	105
<b>Çizelge 30</b>	İYÇ-Me ve SYÇ-Me Ekstre Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilen U2OS Hücrelerinin Akım Sitometri Sonuçları	120
<b>Çizelge 31</b>	YÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Ekstre Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilen U2OS Hücrelerinin Akım Sitometri Sonuçları	121

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Ebers Papirüsleri	3
Şekil 2 Yaralanma Sırasında Meydana Gelen Değişiklikler	6
Şekil 3 Yaralanmayı Takip Eden İlk Gün	6
Şekil 4 Proliferatif Faz	8
Şekil 5 Fibroblastlarda Kollajen Sentezi ve Salgılanması	8
Şekil 6 Maturasyon Fazı	9
Şekil 7 Yara İyileşmesinin Dönemleri ve Fizyopatolojisi	9
Şekil 8 Yeşil Çay Polifenollerinin Kimyasal Yapıları	16
Şekil 9 Hücre Döngüsü	23
Şekil 10 Hücrede Nekroz ve Apoptoz Oluşumu	24
Şekil 11 Hücrelerde Eken ve Geç Apoptoz	36
Şekil 12 <i>Camellia sinensis</i> Ekstrelerinin Toplam Fenolik Madde Miktarları	47
Şekil 13 <i>Camellia sinensis</i> Ekstrelerinin Serbest Radikal Süpürücü Etkileri	48
Şekil 14 $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Sisteminde <i>Camellia sinensis</i> Ekstrelerinin Antioksidan Aktiviteleri	49
Şekil 15 SYÇ-Me 5 $\mu$ g/ml Konsantrasyonu Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	50
Şekil 16 Kontrol ve DMSO Kontrol (2 $\mu$ g/ml) Grubu NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	51
Şekil 17 Farklı TEKA ( <i>Centella asiatica</i> ekstresi) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	53

<b>Şekil 18</b>	Farklı İYÇ-Me (İşlenmiş Yeşil Çay-Metanol) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	55
<b>Şekil 19.</b>	Farklı YÇ-Me (İşlenmemiş Yeşil Çay-Metanol) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	57
<b>Şekil 20</b>	Farklı SYÇ-Me (Satın Alınmış Yeşil Çay-Metanol) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	59
<b>Şekil 21</b>	Farklı İYÇ-inf (İşlenmiş Yeşil Çay-İnfüzyon) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	61
<b>Şekil 22</b>	Farklı YÇ-inf (İşlenmemiş Yeşil Çay-İnfüzyon) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	63
<b>Şekil 23</b>	Farklı SYÇ-inf (Satın Alınmış Yeşil Çay-İnfüzyon) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	65
<b>Şekil 24</b>	TEKA Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	75
<b>Şekil 25</b>	İYÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	76
<b>Şekil 26</b>	YÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	77
<b>Şekil 27</b>	SYÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	78
<b>Şekil 28</b>	İYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	79
<b>Şekil 29</b>	YÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	80



<b>Şekil 30</b>	SYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	81
<b>Şekil 31</b>	Kontrol ve DMSO-Kontrol Grubu U2OS Hücrelerinin 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	82
<b>Şekil 32</b>	Kateşin Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	86
<b>Şekil 33</b>	İYÇ-Me (İşlenmiş Yeşil Çay-Metanol) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	88
<b>Şekil 34</b>	YÇ-Me (İşlenmemiş Yeşil Çay-Metanol) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	90
<b>Şekil 35</b>	SYÇ-Me (Satın Alınmış Yeşil Çay-Metanol) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	92
<b>Şekil 36</b>	İYÇ-inf (İşlenmiş Yeşil Çay-infüzyon) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	94
<b>Şekil 37</b>	YÇ-inf (İşlenmemiş Yeşil Çay-infüzyon) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	96
<b>Şekil 38</b>	SYÇ-inf (Satın Alınmış Yeşil Çay-infüzyon) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri	98
<b>Şekil 39</b>	Kateşin Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	99
<b>Şekil 40</b>	İYÇ-Me Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	100
<b>Şekil 41</b>	YÇ-Me Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	101
<b>Şekil 42</b>	SYÇ-Me Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	102
<b>Şekil 43</b>	İYÇ-inf Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	103

<b>Şekil 44</b>	YÇ-inf Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	104
<b>Şekil 45</b>	SYÇ-inf Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	105
<b>Şekil 46</b>	Kontrol ve DMSO-Kontrol Gruplarına Ait U2OS Hücrelerinin Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları	106
<b>Şekil 47</b>	İYÇ-Me Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları	108
<b>Şekil 48</b>	SYÇ-Me Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları	110
<b>Şekil 49</b>	Kontrol ve DMSO-Kontrol Gruplarına Ait U2OS Hücrelerinin Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları	111
<b>Şekil 50</b>	YÇ-Me Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları	113
<b>Şekil 51</b>	İYÇ-inf Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları	115
<b>Şekil 52</b>	YÇ-inf Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları	117
<b>Şekil 53</b>	SYÇ-inf Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları	119

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{M}$	: Mikromolar
AP – 1	: Aktivatör Protein 1
ARE	: Antioksidan Duyarlı Element
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
C	: Kateşin
CDI	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
c-myc	: Kuş Gribi Miyelositomları Hücresel Değişimini Belirleme Geni
CTGF	: Bağ Dokusu Büyüme Faktörü
D–MEM	: Dulbeccos Modified Eagle's Medyum
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşin gallat
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokateşin – 3 – Gallat
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	: Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntem
ERK	: Ekstraselüler Sinyal ile Düzenlenen Kinaz
FBS	: Fetal Sığır Serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FITC	: Floresanizosiyanat
GAG	: Glikozaminler
GC	: Gallokateşin
GTP	: Yeşil Çay Polifenolü
HGH	: İnsan Büyüme Hormonu
HPV	: İnsan Papilloma Virüsü
IFN	: İnterferon
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL	: İnterlökin
Iyso –PC	: Lizofosfatidil kolin
İYÇ-inf	: İşlenmiş Yeşil Çay-İnfüzyon
İYÇ–Me	: İşlenmiş Yeşil Çay-Metanol
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MAPK	: Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinaz
MMP	: Matriks Metalloproteaz
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid
NK	: Doğal Öldürücü (Natural Killer)
nm	: Nanometre (dalga boyu)
P53	: Tümör Protein 53
PBS	: Fosfat Tuzlu Tampon
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PG	: Prostaglandin
PI	: Propidyum İyodit
PTK	: Protein Tirozin Kinaz
rb	: Retinoblastoma Protein
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Enstitü
S1P	: Sphingosine – 1
St	: Standart
SV40	: Simian Virüs 40
SYÇ-inf	: Satın Alınmış Yeşil Çay-İnfüzyon
SYÇ-Me	: Satın Alınmış Yeşil Çay-Metanol
TCR	: T Hücre Reseptörü
TEKA	: <i>Centella asiatica</i> ekstresi
TGF-B	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF – $\alpha$	: Tümör Nekroz Faktör $\alpha$
TNFR	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
TRAIL	: Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ - İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
TSP	: Trombospondin
TSP1	: Trombospondin 1

TSP2	: Trombospondin 2
JNK -1	: N - terminal Protein Kinaz
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
XO	: Ksantin Oksidaz
XTT	: 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3 Benzen Disülfonat
YÇ-inf	: İşlenmemiş Yeşil Çay-İnfüzyon
YÇ-Me	: İşlenmemiş Yeşil Çay-Metanol
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
µM	: Mikromolar

## GİRİŞ ve AMAC

Yıllardır uzakdoğu ülkelerinde kullanılan, zamanla Avrupa, Amerika ve diğer bölgelere de yayılan *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (çay), dünyada sudan sonra en fazla tüketilen içecektir (Weisburger, 1997).

Çay, bileşiminde bulunan biyoaktif maddeler nedeniyle pek çok araştırmacının dikkatini çeken bir içecek olup, çayın sağlık üzerine etkilerini inceleyen yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Chen ve Dou, 2008; Kelly, 2007; Sharangi, 2009; Weisburger, 1997). Varyete farklılıkları, çevresel etkenler, işleme metodları ve üreme sıklığı gibi etkenler çay yapraklarının kimyasal kompozisyonunu değiştirirse de, çay flavonoidler bakımından zengindir. Başta koroner kalp hastalıkları ile çeşitli kanser tipleri olmak üzere, birçok hastalığa karşı koruyucu etki göstermektedir (Kuroda ve Hara, 1999).

Çayın tepe tomurcuğunun ve taze yapraklarının, işleme için uygun fiziksel özelliklere sahip ve kalite parametrelerini yoğun şekilde içeren farklı üretim aşamalarından geçirilmesi ile, başta siyah çay olmak üzere; yeşil çay, oolong çay ve beyaz çay gibi değişik çay çeşitleri elde edilmektedir. Bunlardan yeşil çay fermantasyona uğramadan, oolong çayı yarı fermente edilerek ve siyah çay tam fermantasyonla elde edilmektedir (Kuroda ve Hara, 1999; Sahin ve Özdemir, 2006; Fisunoğlu ve Besler, 2008).

Hasat edilen yaprakların, kıvrırma ile birlikte hemen ısı uygulamasına maruz bırakılarak, kurutulmasıyla elde edilen yeşil çay (*Camellia sinensis*), dünya çay tüketiminin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır ve daha çok Japonya, Çin ve diğer Asya ülkelerinde yaygın olarak tüketilmektedir. İçerik olarak birbirine benzeyen içecekler olan yeşil ve siyah çaylar, etkilerini farklı biyolojik aktif maddelerle gösterirler. Yeşil çayda polifenoller flavonoid grubundan fazladır. Polifenol grubundan kateşinler, kateşinlerden de epigallokateşin galat (EGCG) başta olmak üzere epigallokateşin (EGC), epikateşin gallat (ECG), epikateşin (EC), kateşin (C), gallokateşin (GC) ve gallokateşin gallat (GCG) değişik miktarlarda bulunmaktadır. Siyah çayın ise en önemli kateşinleri siyah çaya rengini ve buruk aromasını veren theaflavinler ve thearubiginlerdir (Fisunoğlu ve Besler, 2008; Sahin ve Özdemir, 2006).

Yeşil çayın içerdiği flavonoller sebebiyle güçlü antioksidan ve ayrıca antienflamatuar, antioksidan, antimutajenik, antikanserojenik, antianjiyojenik, apoptotik, hipolipidemik, antiarteriosklerotik, antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral, yaşlanmayı geciktirici etkilere sahip olduğu; böylece birçok hastalığın oluşum ve gelişimini önlediği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Brown, 1999; Chen ve Dou, 2008; Tosun ve Karadeniz, 2003; Fisunoğlu ve Besler, 2008; Hsu, 2005; Sahin ve Özdemir, 2006). Epidemiyolojik çalışmalar, çaydaki polifenollerin kronik hastalıklara karşı koruyucu etkisini göstermesi için, sağlıklı beslenme alışkanlıkları ile birlikte tüketilecek olan günde 5-6 fincan çayın kronik hastalık risklerinin azaltılmasına yardımcı olacağını belirtmektedir (Fisunoğlu ve Besler, 2008).

Yara iyileşmesi, yaralanma sonucu organizmada meydana gelen son derece karmaşık biyokimyasal ve hücresel olaylar zinciri olup, yaralanmış dokuyu tekrar normal durumuna getirmeye çalışan bir doku cevabı ve vücudun da bu yaralanmaya karşı oluşturduğu savunma mekanizmasıdır. Bugüne kadar yara

iyileşmesinde bitkisel tedavi amaçlı pek çok bitki örneği kullanılmış olup, *C. sinensis* de bunlar arasındadır (Nursal ve ark., 1999; http-1 ; http-2). Genel olarak yeşil çay ve polifenollerinin yara iyileştirici etki ve mekanizmaları ile ilgili *in vivo* hayvan deneyleri mevcuttur. Deney hayvanları üzerinde yürütülen çalışmalarda yeşil çayın yara iyileştirici etkisinin olduğu açıklanmıştır (Hsu, 2005; Hsu ve ark., 2003; Fu ve ark., 2000; Kapoor ve ark., 2004; Kim ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2006).

Kanser ise çağımızın en önemli sağlık sorunlarından birisidir. *In vitro* hücreler ve *in vivo* hayvan modelleri kullanılarak yapılan deneysel çalışma sonuçlarına göre, yeşil çay kolon, mide, özefagus ve akciğer kanserleri başta olmak üzere prostat, meme ve cilt kanseri gibi birçok kanser çeşidine karşı koruyucu görev yaptığı açıklanmıştır (Kayaalp 2009; Sharangi, 2009). Yeşil çay ve bileşimindeki kateşinlerin kansere karşı koruyucu etkileri; hücre çoğalmasını engelleme, hücre döngüsünü durdurma, sitokinlerin salınımını azaltma, etken reseptörleri baskılama, mitotik uyarıları baskılama, mutajenite ve genotoksisiteyi önleme, serbest radikal temizleme, detoksifikasyon enzimlerini etkinleştirme, kanser hücrelerinin apoptozunu hızlandırma ve anjiyojenezi engelleme gibi mekanizmalarla açıklanmaktadır (Koo ve Cho, 2004; Sahin ve Özdemir, 2006).

Yapılan literatür taraması sonucunda, *C. sinensis* ekstrelerinin *in vitro* yara iyileştirici etkisinin ve U2OS osteosarkom hücrelerinde de antikanser aktivitelerinin çalışılmamış ve karşılaştırılmamış olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple, yeşil çayın polifenol içeriği ve antioksidan özelliğinden yola çıkarak bu çalışmada, farklı yeşil çay ekstrelerinin yara iyileştirici ve U2OS osteosarkom hücresinde de antiproliferatif etkileri araştırılmıştır.

Tez kapsamında, ham *C. sinensis* yaprakları, *C. sinensis* yapraklarının işlenmesi ile elde edilmiş yeşil çay ve ticari yeşil çay yapraklarından %2 lik infüzyon ve metanol ekstreleri hazırlanmıştır. Yapılan literatür araştırmalarından, elde edilen ekstrelerin antioksidan aktivite gösterebileceği düşünülerek, öncelikli olarak her bir ekstrenin farklı sistemlerde antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Daha sonra, bu ekstrelerin farklı hücre kültürü deneysel modellerinde, yara iyileştirici ve antikanserojenik aktiviteleri araştırılmıştır.

## KAYNAK BİLGİSİ

### Yara ve Yara İyileşmesi

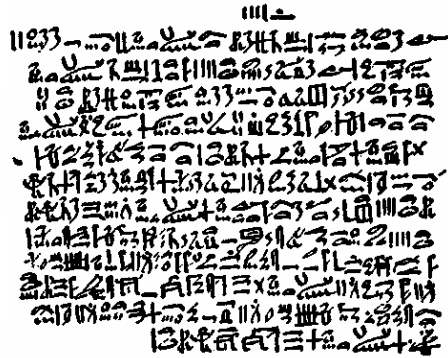
Cilt veya mukozayı oluşturan yapıların farklı nedenlerle bütünlüğünün bozulması ya da kaybı ile, var olan fizyolojik özelliklerinin geçici olarak veya tamamen kaybolmasına yara adı verilir (Kılıçoğlu ve ark., 2005).

Yaranın iyileşmesi, yaralanma sonucu organizmada meydana gelen son derece karışık biyokimyasal ve hücresele olaylar zinciri olup, yaralanmış dokuyu tekrar normal durumuna getirmeye çalışan bir doku cevabı, vücudun bu yaralanmaya karşı savunma mekanizmasıdır (http-1, http-2, Nursal ve ark., 1999). İyileşme süreci yaralanma anından itibaren başlayıp günler, aylar hatta yıllarca sürebilir (Kılıçoğlu ve ark., 2005).

### Yara iyileşmesinde tarihsel dönemler

Yara bakımının tarihi, insanlık tarihi kadar eskidir. Tarih öncesi dönemlerdeki tedavi sanatı ile ilgili bilgilerimiz yazılı belgelere değil, tarih öncesi resimlere dayanmaktadır (Köşlü, 1996).

Eski Mısır'da Ebers tarafından 1862'de bulunan papirüsler tıp tarihi bakımından ilginç bilgiler ihtiva etmektedir. Ebers papirüsleri (Şekil 1), 900 kadar reçete ihtiva etmekte ve şüphesiz bunlardan bir kısmı yara tedavisi ile ilgilidir. Örneğin, Hint yağı hem lambalarda yakıt olarak kullanılırken, aynı zamanda müşhil, yaralara ve yanıklara ilaç olarak kullanılmıştır. Yine Ebers papirüslerine göre yaralara ilk gün sargılarla taze et kapatılmıştır. Yine asilbent maddesi de, yaralara sürülebilen bir drog olarak kullanılmıştır (Köşlü, 1996).



Şekil 1. Ebers Papirüsleri

Tıbbın babası olarak kabul edilen Hipokrat yaralarda katran (goudron) kullanmakla, antisepsiyi ilk uygulayan olmuştur. Yarada primer ve sekonder iyileşmeyi ilk defa Hipokrat tanımlamıştır; ayrıca Hipokrat balı, kirli yaraların temizlenmesinde kullanmıştır. Eski Romada Celsus'un 5. kitabında yara iyileşmesinden söz edilmekte ve bu amaçla kullanılan ilaçlar arasında zambak, güherçile, safran ve susam bulunmakta olup, bunların ilk anestezi ilaçları olduğu tahmin edilmektedir (Köşlü, 1996).

Türklerde de yara tedavisi konusunda bazı ilgi çekici örneklerle rastlanılmaktadır. Osmanlı hekimleri, yaralara karşı katran kullanımının yaralara iyi geleceğinden söz etmişlerdir. Örneğin 16. yy da Nidai eserinde "el ve ayakta olan yaralara katranı birkaç kere sürseler iyi gelir" diye bildirmiştir. Yine Hekim Nidai,



incibar kökünün yaralara karşı kullanılacağını yazmaktadır. 17. yy da Salih bin Nasrullah Kantaron için, kaynatılıp şekerle içilirse öksürüğü giderir, yaralara sürülürse iyi gelir diye açıklamıştır. 17. yy da sığır dili kuyruğu yakı halinde dışardan kullanılmıştır. Salih bin Nasrullah, eserinde, drogdan "Sirke ile yapılan yakısı cerahate iyidir" diye söz ederken, asilbent olarak bilinen, 18. yy saray eczacılığında yeri olan ve eski Mısır Çarşısında da satılan bu drog dışardan sürülmek suretiyle yara iyileşmesinde kullanılmıştır (Köşlü, 1996).

Folklorik tıp da Türkler'de bir o kadar gelişmiştir. Çok eskilere dayanan halk tıbbının bazı yöntemleri (akapunktur, çiçek aşısı, banyolar, traksiyon gibi) bilimsel tıba geçmiştir. Birçoğu ise halkın örf, adet ve alışkanlıkları halinde devam etmektedir (Köşlü, 1996). Yara tedavisi ile ilgili olarak, Diyarbakır yöresine ait halk ilaçları ve tedavi yöntemlerinden birkaç örnek verilebilir:

- Kara merhem: iki çay bardağı mürdesenk (mürdesinç) ile yarım kilo zeytinyağı birlikte kaynatılır. Kalınlaşınca kadar zaman zaman karıştırılır. Bu süre ortalama iki saat kadar devam eder. Koyulaşınca ateşten indirilir iyice kalınlaşarak bir süre sonra donar. Kullanılmış temiz bir patiska üzerine serilerek yaraların üzerine konur (Köşlü, 1996).

- Kapanmayan yaralarda; kına, nişasta ile birlikte yoğrulur, hap haline getirilerek kurutulur. Haplar her gün bir tane ateşe atılarak yara üstüne tütsü yapılır (Köşlü, 1996).

### ***Yara iyileşme evreleri***

Yara iyileşmesi, hemostazis ve inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon olarak adlandırılan ayrı fakat birbirleriyle iç-içe olan üç aşamadan oluşur. Bu aşamalardan herhangi birinde meydana gelen gecikme veya olumsuzluk yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir (Nursal ve ark., 1999).

#### ***I. Hemostazis ve inflamasyon fazı***

İnflamasyon fazı, yara iyileşme sürecinin ilk aşamasıdır. Yaralanma anının hemen ardından işlerlik kazanır ve 2-4 gün kadar sürer. Yaralanma sırasında vasküler bütünlüğün bozulması ve kanamanın başlamasıyla birlikte sırasıyla; lokal vazokonstriksiyon, trombosit kümeleşmesi, trombosit tıkaçı, pıhtı ve fibrin oluşumu gerçekleşir. Yani, yara bölgesindeki yıkıma uğramış damarlar hemen daralır. Hasarlı dokudan, özellikle subendotelde, tromboplastik doku ürünleri dışarı salınır. Trombositler kümeleşerek ilk hemostatik tıkaçı oluşturur ve böylece pıhtılaşma ve kompleman sistemleri protrombinin trombine aktivasyonunu gerçekleştirir. Aktif durumdaki trombin ise, daha sonra polimerize olarak kalıcı pıhtıyı oluşturacak olan fibrine çevrilir (Bayraktar ve Yücesir, 2009). Fibrin olgunlaştıkça yaralanan bölge kurumuş pıhtı ile hem daha fazla elektrolit ve su kaybını önleyecek, hem de çevreden gelebilecek kontaminasyonu önleyecektir (Ciğer, 1996). Yaralanma sırasında ve yaralanmayı takip eden ilk gün yara bölgesinde meydana gelen değişiklikler **Şekil 2** ve **Şekil 3**' de görülmektedir (Diegelmann ve Evans, 2004).

Vazokonstriksiyon beş ile on dakika kadar sürer. Bu sırada meydana gelen hipoksiye ve salgılanan doku araçlarına cevap olarak vazodilatasyon gelişir. Damar geçirgenliğinde oluşan artış ve vazodilatasyon, akımı yavaşlatarak interstisyel alana sıvı kaçışına, lokal hiperemiye, başta nötrofiller olmak üzere tamir hücrelerinin interstisyel alana geçişine yol açar (Bayraktar ve Yücesir,

2009). Nötrofiller, hücresel yıkım maddelerini, bakterileri ve yabancı cisimleri yara bölgesinden uzaklaştırırlar (Beyhan, 2008). Nötrofiller görevlerini gerçekleştirdikten sonra makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Yaralanmanın 2-3. gününde yara yüzeyinde makrofaj hakimiyeti başlar. Makrofajlar, bakteri ve doku yıkım ürünlerini fagosite etmekle kalmayıp, çeşitli sitokin, büyüme faktörleri ve nitrik oksit sentezlerini (**Çizelge 1**) gerçekleştirirler (Kılıçoğlu ve ark., 2005). Makrofajlardan salınan 20' den fazla sitokin ve büyüme faktörü bilinmektedir (Kılıçoğlu ve ark., 2005; Beyhan, 2008).

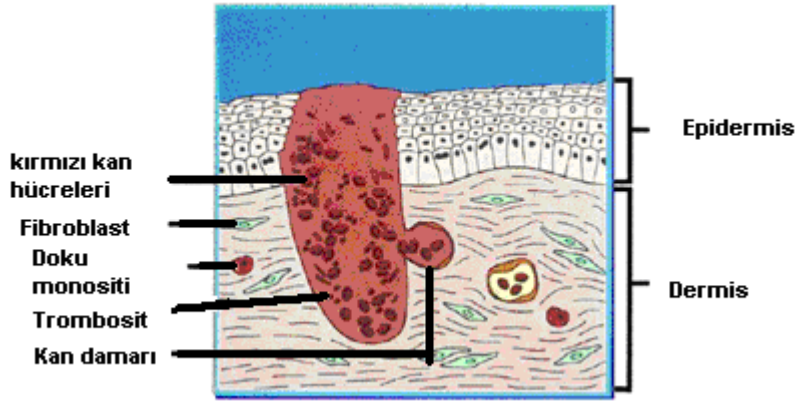
**Çizelge 1. Makrofajların Yara İyileşmesindeki Rolü ve Etki Mekanizmaları**

<b>Etki</b>	<b>Mekanizma</b>
1- Fagositoz ve antimikrobiyal etki	<u>Oksijen radikalleri</u> -H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , -O <sub>2</sub> , -OH Nitrik Oksit
2- Yara Debridmanı	Fagositoz, Enzimler, kollajenaz, elastaz
3- Matriks sentezi	<u>Büyüme Faktörleri</u> - TGF-β, EGF, PDGF <u>Sitokinler</u> - TNF-α, IL-1, INF <u>Enzimler</u> - Kollajenaz, arjinaz <u>Prostaglandinler</u> - PGE2
4- Hücre aktivasyonu	<u>Büyüme Faktörleri</u> -PDGF, TGF-β, EGF, IGF <u>Sitokinler</u> - TNF-α, IL-1, IL-6 Fibrinonektin
5- Anjiyogenez	<u>Büyüme Faktörleri</u> - bFGF, VEGF <u>Sitokinler</u> - TNF-α

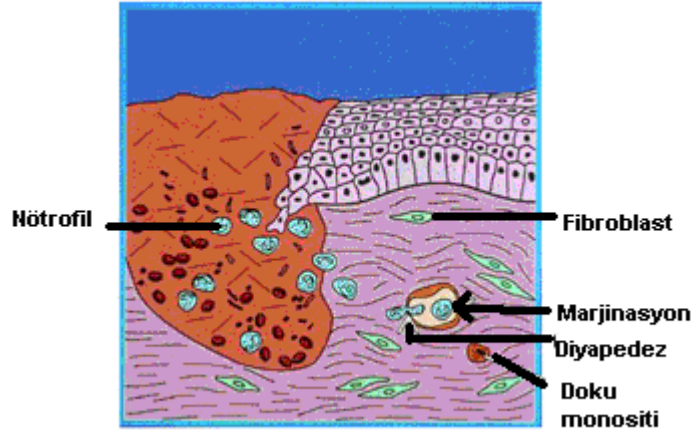
Monosit ve makrofajların yaradan uzaklaştırılması, yara iyileşmesinin önemli ölçüde yavaşlamasına, fibroblast proliferasyonunun gecikmesinde ve anjiyogenezin bozulmasına yol açmaktadır (Beyhan, 2008).

İnflamasyon; bakteri, kimyasal maddeler, travma, sıcaklık veya herhangi başka bir olay nedeniyle yaralanan dokudan; dokuda belirgin ikincil değişikliklere neden

olan çeşitli maddeler salınması ile oluşmaktadır. Lokal kan damarlarındaki vazodilatasyon sonucu, kapiller geçirgenliğinin artması ve kan akımındaki artış ile büyük miktarda sıvının interstisyel aralığa sızması ve bu sıvının kapillerlerden sızan fibrinojen ve diğer proteinler sebebiyle pıhtılaşması, çok sayıdaki granülosit ve monositin dokuya göçü, doku hücrelerinin şişmesi inflamasyonun 5 temel belirtisini oluşturur. Bunlar; yarananma bölgesinde ısı artışı, kızarıklık, şişlik, ağrı hissi ve fonksiyon kaybıdır. Burada önemli olan nokta, organizmanın yarananma oluşumundan hemen sonra, hatta eş zamanlı başlayan bu yanıtın, iyileşmeye yönelik olmasıdır. Ancak, kontrol altına alınmadığı takdirde iyileşmeyi geciktiren veya engelleyen faktörler olduğu da bilinmelidir (Bayraktar ve Yücesir, 2009).



Şekil 2. Yaralanma Sırasında Meydana Gelen Değişiklikler



Şekil 3. Yaralanmayı Takip Eden İlk Gün

## II. Proliferatif faz

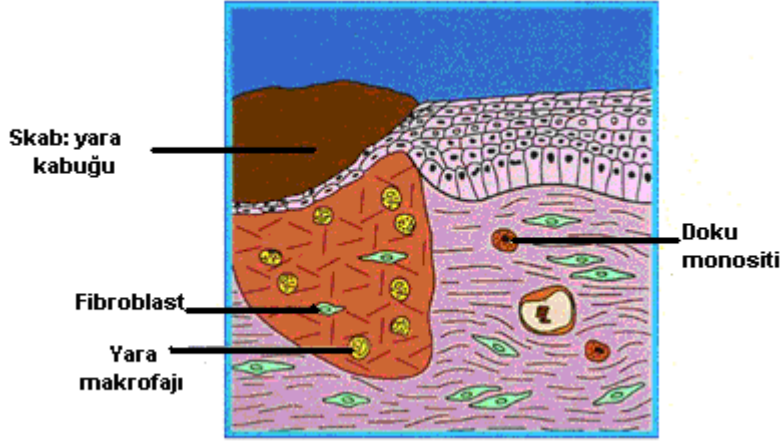
**Granülasyon dokusu:** Yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra, geçici ekstrasellüler matriks (ECM), granülasyon dokusu ile yer değiştirmeye başlar. Bu morfolojik değişim aynı zamanda dermisin kalıcı elemanlarının ( kollajen ve kan damarları) bölgede oluşmasıyla kendini gösterir. Ayrıca, granülasyon dokusu ürettiği büyüme faktörleri ve sitokinler sayesinde, inflamasyon fazı ile proliferatif faz arasında köprü görevi yapan makrofajları da içermektedir (Beyhan, 2008).

**Migrasyon:** Sitokinler ve büyüme faktörleri inflamasyon fazından proliferatif faza geçişi sağlayan faktörlerdendir. Proliferatif fazda; fibroblast, epitel ve endotel hücreleri etkindir. Fibroblastlar yara bölgesine çevre dokulardan gelirken, endotel hücreler yara kenarındaki sağlam venüllerden veya anjiyogenez sonucu oluşan yeni kapillerlerden ortaya çıkar (Kılıçoğlu ve ark., 2005; Beyhan, 2008) **Şekil 4**'de görüldüğü gibi doku makrofajları aktifleşerek hasarlanan bölgeye hareket etmekte ve daha da aktif yara makrofajlarına dönüşmektedir. Bu fagositik hücreler ayrıca fibroblastları yaralı bölgeye yönlendirmek için çeşitli büyüme faktörlerini salarak proliferatif fazı başlatmaktadır (Diegelmann ve Evans, 2004).

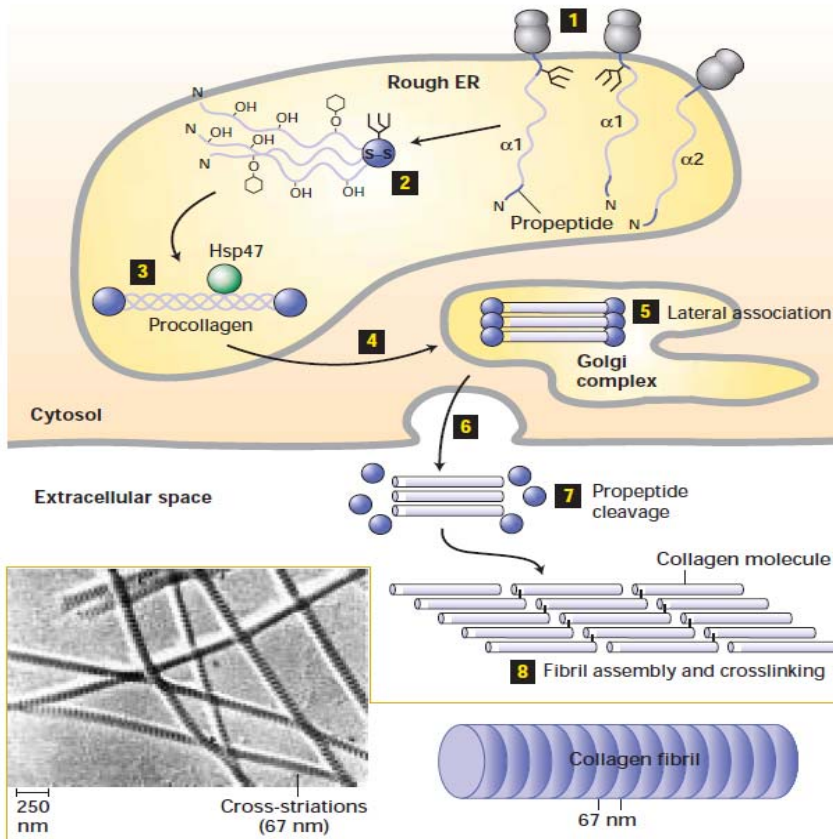
Fibroblastlar, kalıcı ekstrasellüler matriks elemanlarını ( kollajen, proteoglikan, glikozaminoglikan (GAG) ) ve büyüme faktörlerini üretmekle görevlidirler. Doku kaybı olan yaralarda, enfeksiyon oluşumuna karşı koymak ve sıvı kaybını önlemek için epitel hücre artışı önemlidir. Yaralanmadan birkaç gün sonra yara kenarında veya sağlam bölgede bulunan epitel, yara içerisine doğru proliferer olur, yeni kapillerlerin oluşumu ile yara bölgesi kırmızı-mor veya pembe renkte görülür. Kapiller vaskülarizasyon, fibroblastların yara matrisinde kalıcı destek doku oluşturmasına yardımcı olur. Kalıcı yara matrisindeki temel yapı molekülü kollajendir. Kollajen; kemik, cilt ve tüm canlı dokuların başlıca yapı proteindir. Vücutta sentez edildiği bilinen 19 tip kollajen olmasına rağmen, yarada en yüksek oranda tip 1 kollajen bulunmaktadır. Kollajen üretimi, doku hasarının yaklaşık 3-5. gününde başlar ve EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü), TGF- $\beta$  (Transforme Edici Büyüme Faktörü), IGF-1 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü), FGF-2 (Fibroblast Büyüme Faktörü), S1P (Sphingosine-1) tarafından stimüle edilirler. Kollajen sentezinde ilk aşama prokollajenin sentez edilmesidir. Prokollajen- $\alpha$  zincirlerinin sentezinde (**Şekil 5**), hidroksilasyon ve glikozilasyon granüllü endoplazmik retikulumda gerçekleşir. Prokollajen- $\alpha$  zincirlerinin üçlü sarmal oluşturmaları ise golgi cisimciğinde olur ve sekretuar vezikül içinde hücre dışına çıkarak, ekstrasellüler alanda uzantı peptidleri koparıldıktan sonra fibrillogenez ve çapraz bağlar aracılığıyla fibriller kollajen liflerini oluştururlar (Lodish ve ark., 2003). Kollajen fibrilleri arasındaki bağlar, yaranın gerilim kuvvetine ve sağlamlığına etki eder. Yani bu fazda yara gerilme gücünde belirgin bir artış meydana gelir (Kılıçoğlu ve ark., 2005; Beyhan, 2008). Kollajenin yara iyileşmesindeki açıklığa kavuşan etki mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir:

1. Hemostatik etki
2. Trombositlerle etkileşim
3. Fibronektin ile etkileşim
4. Eksüda artışı

5. Hüresel komponent (özellikle makrofaj) artışı
6. Fibroblast proliferasyonuna destek (Zeren, 1996).



Şekil 4. Proliferatif Faz



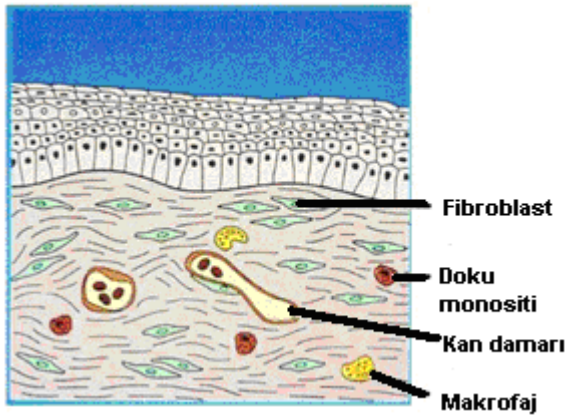
Şekil 5. Fibroblastlarda Kollajen Sentezi ve Salgılanması

### III. Maturasyon (remodeling) fazı

Fonksiyonel bütünlüğün ve tam iyileşmenin sağlandığı faz olup, en uzun iyileşme sürecini teşkil eder (Bayraktar ve Yücesir, 2009).

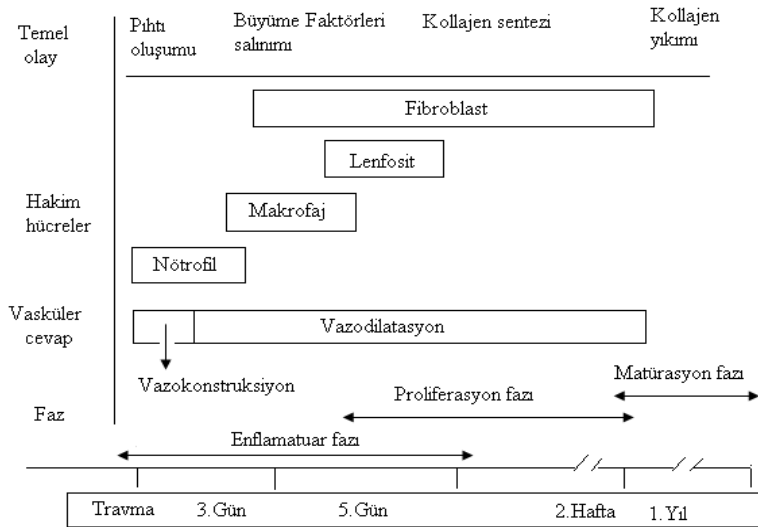
Proliferatif fazdan bu faza geçiş, kollajenin dengeye ulaştığı süreç olarak tanımlanır. Makrofaj ve fibroblastlar kaybolur. Kollajen birikimi yaralanmadan 2-3 hafta sonra en yüksek değerine ulaşır. Yara matrisinin maturasyonu süresince, kollajen sentezi ile birlikte kollajen yıkımı da devam eder. Net kollajen üretimi yaralanma sonrasında ortalama 21. güne kadar sürekli artış gösterirken, bu aşamadan sonrasında bir düşüş meydana gelir. Pembe-mor görünümlü olan yaranın rengi soluklaşır ve yara kalınlığı azalır (Kılıçoğlu ve ark., 2005; Beyhan, 2008).

Kollajen fibrillerinin yerini, daha fazla moleküller arası bantlar içeren organize fibrillerin alması ile gerilme kuvveti gittikçe artar (Kılıçoğlu ve ark., 2005).



Şekil 6. Maturasyon Fazı

Tüm bu safhaların sonunda yaralarda morfolojik olarak 3 ana özellik olan yara kontraksiyonu, epitelizasyon ve bağ doku birikimi sağlanarak, yara iyileşmesi (Şekil 7) tamamlanmış olur (Kılıçoğlu ve ark., 2005).



Şekil 7. Yara İyileşmesinin Dönemleri ve Fiziopatolojisi

## **Yara İyileşmesinde Ekstrasellüler Matriks (ECM) ve Büyüme Faktörleri**

Büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matriks (ECM) arasındaki dinamik etkileşimler, yara iyileşmesi için gereklidir. Bu etkileşimler direkt ve indirekt olarak farklı gruplara ayrılırlar (Schultz ve Wysocki, 2009).

ECM, büyüme faktörlerini parçalanmadan koruyacak veya bunların aktivitelerini arttıracak şekilde büyüme faktörlerine direkt olarak bağlanırlar ve bunların salınımını sağlarlar (fibroblast büyüme faktörü-2'ye heparan sülfatın bağlanması gibi). İndirekt etkileşimler hücrelerin ECM'e integrinler aracılığıyla bağlanmasıyla olur; böylece hücreler büyüme faktörlerine cevap verirler (integrin bağlanmasının vasküler endotelial büyüme faktörü ile indüklenen anjiyogenez için gerekli olduğu gibi) ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunu indüklerler (monositlerin ECM'e bağlanması ile, trombosit türevli büyüme faktörlerinin sentezinin uyarılması) (Schultz ve Wysocki, 2009).

Bunlara ek olarak matrikinler ya da ECM moleküllerinin alt komponentleri, sitokin, kemokin ya da büyüme faktör ailelerinin hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak, hücrel aktiviteyi uyarırlar. TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörleri de ECM komponentlerinin üretimini arttırarak ya da matriks parçalayıcı enzimlerin sentezini arttırarak ECM'i düzenlerler. Bu nedenle, büyüme faktörleri ve ECM arasındaki etkileşim iki yönlüdür (Schultz ve Wysocki, 2009).

Yara iyileşmesinde en az 4 ana ECM grubu vardır: 1) kollajen ve elastin gibi yapısal proteinler, 2) fibronektin, vitronektin ve laminin gibi çok parçalı adeziv glikoproteinler, 3)Hyalurona gibi glikozaminoglikanlar ve versikan, sindekan, glipican, perlekan gibi proteoglikanlar, 4) sisteince zengin proteinler (SPARC; osteonektin olarak da bilinir ve BM-40), trombospondin 1 (TSP1) ve 2 (TSP2), tenascin C ve X ve osteopontin (Schultz ve Wysocki, 2009).

Başta matriks metalloproteazlar (MMP) olmak üzere, proteazlarla ECM'nin parçalanması ve yeniden şekillenmesi (remodelling); lökosit influksü, anjiyogenez, reepitelizasyon ve dokunun yeniden şekillenmesi için anahtar rol oynamaktadır. MMP'ler, anjiyogenetik faktörler de dahil olmak üzere büyüme faktörleri ve onların reseptörlerini degrade ederler. Bu farklı elementlerin MMP'ler tarafından kontrol edilmesi, anjiyogenezin uyarılacağını veya inhibe edileceğini belirler. MMP'ler ayrıca büyüme faktörlerinin serbest bırakılmasında ve büyüme faktör reseptörlerini aktive eden bölgelerin açığa çıkması için ECM proteinlerinin kesilmesinde önemli rol oynar. Bu yüzden, MMP'ler ECM komponentlerini parçalamanın dışında biyoaktif olan ECM parçalarının açığa çıkmasını da sağlarlar (Schultz ve Wysocki, 2009).

Yara iyileşmesi sırasında keratinositler membranın alt kısmına bağlandıklarında MMP üretmeye başlarlar ve yara yatağı boyunca göç ederler. MMP'nin üretimi matriks ile gerçekleşen hücrel etkileşimlerle düzenlenir (Schultz ve Wysocki, 2009).

Proteazların kontrollü üretimi normal yara iyileşmesinde önemli olmasına rağmen, kronik olarak yükselmiş MMP düzeyleri matriks parçalanmasına neden olabilir ve yara iyileşmesini zorlaştırır (Schultz ve Wysocki, 2009).

## **ECM ve Büyüme Faktörleri Etkileşim Tipleri**

### ***Büyüme faktörlerinin ECM'e bağlanması***

ECM bazı büyüme faktörlerine bağlanabilir ya da bunların salınımını sağlayabilir; böylece bunların aktivitelerinde direkt bir kontrole sahip olur. Bu yol aracılığıyla ECM, büyüme faktörleri için hem sekestrasyon hem de depo bölgesi olarak görev görür ve parçalanmaktan korunmalarını sağlar (Schultz ve Wysocki, 2009).

Yara iyileşmesinde bunun bir örneği, fibroblast büyüme faktörünün (FGF-2) heparan sülfata bağlanmasıdır. FGF-2, yara iyileşmesi sırasında fibroblastların ve endotel hücrelerinin büyümesini indükler (Schultz ve Wysocki, 2009).

ECM-büyüme faktörü bağlanmasının diğer bir örneği ise, transforme edici büyüme factor  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) ile protein komponentleri olan decorin (decorin) ve betaglikan (betaglycan) arasındaki etkileşimdir. İnsanlarda farklı genler üç TGF-  $\beta$  izoformunu kodlarlar: TGF-  $\beta$ 1,2 ve 3. TGF-  $\beta$ 1 ve 2 yara oluşumunda rol alır ve antibadilerin nötralizasyonu ile birlikte bunların inhibisyonu hayvanlarda yara oluşumunu azaltır. Aksine, TGF-  $\beta$ 3, matriks moleküllerinin yeniden organize olmalarını uyarır ve bu durum dermal yapının gelişmesi ve yara izinin azalmasıyla sonuçlanır. TGF izoformlarının hepsi ECM sentezini düzenlediği gibi hücre büyümesini, proliferasyonunu ve ölümünü de düzenler (Schultz ve Wysocki, 2009).

ECM ve büyüme faktörleri arasındaki direkt etkileşimin üçüncü bir örneği de vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) heparan sülfata bağlanmasıdır. VEGF anjiyogenez, kan damarlarının oluşumunun kontrolü ve büyümesi gibi durumlarda kritik bir rol oynar. En çok eksprese edilen üç VEGF izoformundan ikisi (V145 ve V189) heparan sülfata bağlanırken, üçüncüsü olan V121 bağlanmaz. Yara sıvısının doğal bileşiği olan plazmin, V145 ve V189'un salınımını uyararak endotelial hücrelerin mitojenik aktivitesini ve vasküler geçirgenliğini artırır (Schultz ve Wysocki, 2009).

### ***İntegrin aracılı etkileşimler***

#### ***Hücrenin ECM'e yapışması ve büyüme faktör cevabı***

Bazı istisnalar dışında hücreler canlılığını korumak ve büyümek için ECM'e bağlanmalıdırlar. Bilindiği üzere, tümör oluşturan hücreleri normal hücrelerden ayıran başlıca özellik, normal hücrelerin yaşamak ve büyümek için ECM'e bağlanması gerektirir (Schultz ve Wysocki, 2009).

Hücre yüzey reseptör ailesinden integrinler, hücrelerin ECM'e bağlanmasını sağlar. Integrinler, apoptoz, hücre yaşamının devamlılığı, büyümesi ve gelişmesinde ciddi bir rol oynar. Belirli integrinler yaralarda geçici olarak eksprese edilir ve iyileşmede kritik bir rol oynar. Örneğin, integrin bağlanması keratinosit hareketliliği için gereklidir (Schultz ve Wysocki, 2009).

Anjiyogenez yara iyileşmesi sırasında meydana gelen ve hücrelerin büyüme faktörlerine cevap verebilmeleri için bunların ECM'e yapışmasını gerektiren bir durumdur. Dermal kılcal damarlanma, VEGF'in kolajene bağlanan  $\alpha_1\beta_1$  ve  $\alpha_2\beta_2$  integrinlerinin ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur.  $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$  alt ünitelerini bloke eden antikolar, aslında VEGF ile indüklenen anjiyogenez önceden var olan damarlanmayı etkilemeden inhibe ederler. Bu durum, bu integrinlerin VEGF ile



indüklenen anjiyogenez için gerekli olduğunu göstermektedir (Schultz ve Wysocki, 2009).

Hücrelerin ECM'e yapışması gen ekspresyonunu değiştirir. Katmanlaşan epiderminin büyümesinin muhafazası, *in vivo*'da, ECM'nin hücre proliferasyonuna etkisine bir örnektir. Bazal lamina ile temas eden hücreler bölünürken, bağlı olmayan hücreler ise üst kısımlara doğru göç ederler, şekil değiştirirler ve üstte epidermal katmanlara başkalaşırlar (Schultz ve Wysocki, 2009).

#### *Matrikin ligand sunumunda ECM komponentlerinin rolü*

Matrikinler sinyal elementleri olarak adlandırılmışlardır ve ECM proteinlerinin alt komponentleri olarak bilinir. Sitokin, kemokin, iyon kanalları ya da büyüme faktörü reseptör ailesine ait hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar. Matrikinler reseptörlere, büyüme faktörlerine göre daha düşük bir afinite ile bağlanırlar. Matrikiptin olarak adlandırılan bazı matrikinler de, yüzeye bağlıdır ve etkileri yerel bölge ile sınırlıdır. Bu yolla ligandların çevresindeki hücreler etkilenirler (Schultz ve Wysocki, 2009).

Tenaskin-C ve lamininin epidermal büyüme faktörü (EGF)-benzeri tekrarları matrikinlere örnektir. Tenaskin-C ve laminin bu bölgelerde EGF reseptörlerine bağlanır ve fibroblast migrasyonunu arttırırlar. Yara iyileşmesi sırasında tenaskin-c ve laminin-332 keratinositler tarafından salınırlar. Zamanla bunların salınımı ile keratinosit migrasyonu ve MMP-2 ekspresyonu arasında bir ilişki oluşur (Schultz ve Wysocki, 2009).

#### *Büyüme faktörüyle ECM düzenlemesi*

Büyüme faktörleri, ECM komponentlerinin üretimini arttırmak ya da ECM yıkımında rol oynayan MMP'lerin sentezini arttırmak için hücreleri uyararak ECM'i düzenlerler. Bu yolla büyüme faktörleri ve ECM arasındaki etkileşim iki yolda gerçekleşir (Schultz ve Wysocki, 2009).

Yara iyileşmesinde büyüme faktörünün ECM'yi düzenlediğine dair bir örnek, ECM üretiminin ve parçalanmasının TGF- $\beta$  ile kontrol edilmesidir. TGF- $\beta$  farklı hücre hatlarında kolajen ve fibronektinlerin sentezini uyardığı gibi, hiyaluronik asit, TSP, tenaskin gibi diğer ECM komponentlerini de uyarır. TGF- $\beta$  ayrıca proteazların sekresyonu ve sentezini azaltarak ve proteaz inhibitörlerinin sentezini uyararak, ECM komponentlerinin proteolitik parçalanmasını azaltır (Schultz ve Wysocki, 2009).

ECM'nin büyüme faktörleri ile düzenlendiğini gösteren diğer bir olay da yara iyileşme sürecinin erken fazlarında (yara bölgesindeki trombositlerden salınan PGDF'nin fibroblastlar için kimyasal inükleyci gibi davrandığı dönem) meydana gelir. Daha sonra PDGF, kollajen matrikste kollajenlerin bu fibroblastlar tarafından çökmesini arttırır (Schultz ve Wysocki, 2009).

**Çizelge 7'**de yara iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri ve ne şekilde yara iyileşme evrelerine katıldıkları görülmektedir (Ciğer, 1996).

**Çizelge 2. Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Büyüme Faktörleri**

<b>Büyüme Faktörü</b>	<b>Kaynağı</b>	<b>Görevleri</b>
Trombosit-kaynaklı büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor, PDGF)	Trombositler, makrofajlar endotel hücreleri, düz kas hücreleri	Fibroblast proliferasyonu nötrofil ve makrofaj kemotaksisi ve proliferasyonu, anjiyogenez
Transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming growth factor $\beta$ , TGF- $\beta$ )	Trombosit, nötrofil, lenfosit, makrofaj, birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu, kemotaksis indirekt anjiyogenez, diğer büyüme faktörlerinin etkilerine yardım
Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF)	Trombositler, tükürük, idrar, anne sütü, plazma	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunun uyarılması
Transforme edici büyüme faktörü alfa (Transforming growth factor $\alpha$ , TGF- $\alpha$ )	Aktive makrofajlar, trombosit, keratinosit, bazı dokular	EGF'ye benzer
Interlökinler (Interleukins 1-2, IL-1,2)	Makrofaj, lenfosit, birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu, kollajenaz, nötrofil kemotaksisi
Tümör nekroz faktörü (Tümör necrosis factor, TNF)	Makrofaj, mast hücresi, T lenfositler	Fibroblast proliferasyonu
Lökosit kaynaklı büyüme faktörü (Leucocyte derived growth factor, LDGF)	Makrofaj, mast hücresi T lenfositleri	Bağ dokusu hücreleri için kemoatraktan ve mitojen
Bağ dokusu büyüme faktörü (Connective tissue growth factor, CTGF)	Endotel hücreler, fibroblastlar	Bağ dokusu hücreleri için kemoatraktan ve mitojen
Fibroblast büyüme faktörleri (Fibroblast growth factors, FGF)	Beyin, pitüiter bez, makrofaj diğer doku ve hücreler	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu, matriks depolanmasını uyarır, anjiyogenez, yara kontraksiyonu
Keratinosit büyüme faktörleri (Keratinocyte growth factors)	Fibroblastlar	Epitel hücre proliferasyonu
İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (İnsülin-like growth factor-1, IGF-1)	Karaciğer, plazma, fibroblastlar	Sülfath proteoglikanlar ve kollajen sentezini, fibroblast proliferasyonunu uyarır

İnsan büyüme hormonu (Human growth hormone, HGH)	Pitüiter bez, plazma	Anabolizma, IGF-1' i uyandır
İnterferonlar (Interferons, IFN)	Lenfositler, fibroblastlar	Fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezinin inhibisyonu

### Yara İyileşmesinde Bitkisel Tedavi

**a- Aloe vera (sarı sabır):** *Aloe barbadensis* yapraklarından üretilen jel ve meyve suyu yara tedavisinde kullanılmaktadır. Radyodermitle olgularda aloe vera jelinin kaşıntı, yanma hissi ve skar oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Kronik bacak ülserleri, travmaya bağlı ülserler, yanıklar ve cerrahi yaralarda kullanılmaktadır (Durusoy ve Ulusal, 2007).

**b- Bal:** Dekubitis ülserleri, yanık yaraları ve enfekte yaraların tedavisinde etkilidir. Antibakteriyel ve antifungal etkilidir. Baldaki katalaz enzimi yaranın debridmanını yaparken, higroskopik etkisi ödemi azaltıp granülasyonu ve epitelizasyonu uyarmaktadır. Dokuz yeni doğanda yapılan bir çalışmada kültür pozitif cerrahi yaralarda uygun antibiyotiklere cevap alınmazken günde 2 kez uygulanan 5-10 ml doğal balın yara iyileşmesini beşinci günde başlattığı ve yaranın 21.günde steril olup iyileşmenin tamamlandığı saptanmıştır. Poliüretan yara örtüsü ile bal emdirilmiş gazlı bezin karşılaştırıldığı rastgele kontrollü diğer bir çalışmada ballı gazlı bez kullanılan grupta iyileşme daha erken başlamıştır (Durusoy ve Ulusal, 2007).

**c- Aynısafa çiçeği (marigold, nergis):** *Calendula officinalis*, antik çağlardan beri yara, yanık, bacak ülserleri, kundak bezi dermatiti ve herpes zosterde kullanılmıştır. İmmünomodülatör ve antimikrobiyal etkilidir. Farelerde, kollajen ve glikoprotein sentezini arttırarak granülasyon dokusunu uyardığı gösterilmiştir (Durusoy ve Ulusal, 2007).

**d- Hamamelis virginiana:** Boyu altı metreye ulaşabilen bu küçük ağacın, pürüzsüz, kahverengi bir kabuğu vardır. Bu ağacın dal ve gövde kabuklarından elde edilen ekstre Hametan® adı ile hazırlanan krem, merhem ve topik losyonların etken maddesini oluşturur (Korkmaz, 1996).

**e- Dragon's Blood (Croton spp.):** Yara iyileşiminde fibroblastlarda kollajen sentezini stimüle ettiği, epitelyumial dokuda rejenerasyonu hızlandırdığı gösterilen bir bitkidir (Korkmaz, 1996).

### **Camellia sinensis (L.) Kuntze (çay)**

Çay ilk olarak milattan önce 2737 yılında, Çin imparatoru Shen Nung tarafından kaynak suya çay yapraklarının düşmesi sonucunda tesadüfen bulunmuştur. Oluşan bu farklı renkteki karışımın tadı ve aroması beğenilmiş; böylece çay içme geleneği ilk olarak Çin'de başlamıştır. Bu gelenek Çin'den Japonya, Endonezya, Hollanda, Hindistan ve İngiltere'ye geçmiştir. 17.yy ortalarında çayın popülerleşmesi ve ticaretinde İngilizler önemli rol oynamışlardır (Fisunoğlu ve Besler, 2008; Weisburger, 1997).

*Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (çay) dünyada sudan sonra en fazla tüketilen popüler bir içecektir. Ancak, dünyada tüketilen çayın büyük kısmı (% 78) siyah çayken, yeşil çay tüketimi yalnızca % 20'lik bir kısmı oluşturur. Ülkemizde de çay üretimi ve tüketimi oldukça yaygındır (Fisunoğlu ve Besler, 2008; Hsu, 2005).

Türkiye'de çay yetiştirilmesi için ilk girişim 1888 yılında yapılmıştır. Çin'den getirilen çay fidanları ve tohumlar Bursa bölgesinde denenmiş; fakat iklim ve ekolojik koşulların uygun olmaması sebebiyle sonuç alınamamıştır. Daha sonra, Doğu Karadeniz Bölgesi'nin çay yetiştiriciliği için uygun ekolojik koşullara sahip olduğunu belirten bir rapor üzerine, bu bölgelerde ekim çalışmaları yapılmış ve Rize bölgesinde 1939 yılında çay eldesi başlamıştır (Fisunoğlu ve Besler, 2008; Baytop, 1999).

### ***Çay türleri ve kimyasal kompozisyonları***

Günümüzde, *C. sinensis*'den ticari amaçla üretimi yapılan, birbirinden farklı 3 çeşit çay vardır. Bunlar: yeşil, siyah ve oolong çaydır (Tosun ve Karadeniz, 2003).

Yeşil çay fermentasyona uğramadan, oolong çayı yarı fermante edilerek, siyah çay ise tam fermentasyonla elde edilmektedir (Fisunoğlu ve Besler, 2008).

Çay yapraklarının kimyasal kompozisyonu klimatolojik, kültürel ve genetik faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Tosun ve Karadeniz, 2003). Farmakolojik etkilerinden dolayı çayda bulunan en önemli kimyasal maddeler polifenoller ve kafeindir. Polifenoller, içeceğin kalitesini belirler ve kuru yaprak ağırlığının % 30 – 35'ini (**Çizelge 3**) oluşturmaktadır (Tosun ve Karadeniz, 2003). Genetik yapı, iklim, ısı, ışık, beslenme gibi çevresel faktörlere, yaprağın yaşına bağlı olarak polifenollerin miktarı değişiklik göstermektedir (Kuroda ve Hara, 1999).

Polifenoller: flavonoidler ve fenolik asitler olarak iki gruba ayrılır. Çayda bulunan başlıca flavonoidler ise flavon ve flavonollerdir. Yeşil çay, özellikle kateşinler ve kateşin türevlerini kapsayan flavonollerce zengindir (kuru ağırlık üzerinden % 30). Epigallokateşin-3-gallat (EGCG), Epigallokateşin (EGC), Epikateşin (EC) ve Epikateşin gallat (ECG) yeşil çaydaki başlıca kateşinlerdir. Miktar olarak EGCG > EGC > EC ≥ ECG şeklinde sıralanırlar (Khokhar ve Magnusdottir, 2002).

Yeşil çay kateşinlerinin antioksidan gücünün vitaminlere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek antioksidan aktiviteye sahip çay kateşini EGCG dir. Yeşil çaydaki başlıca flavonoller ise kersetin, kamferol, mirsetin ve rutin'dir. (Tosun ve Karadeniz, 2003; Sahin ve Özdemir, 2006).

Siyah çay üretimi esnasında, çay yaprağındaki polifenol oksidaz enziminin etkisiyle kateşinler okside olarak, siyah çaya özgün renk ve lezzet katan teafavinlere ve tearubiginlere dönüşmektedir (Sahin ve Özdemir, 2006). Farklı çay tiplerindeki fenolik madde kompozisyonu **Çizelge 4**'de görülmektedir (Tosun ve Karadeniz, 2003).

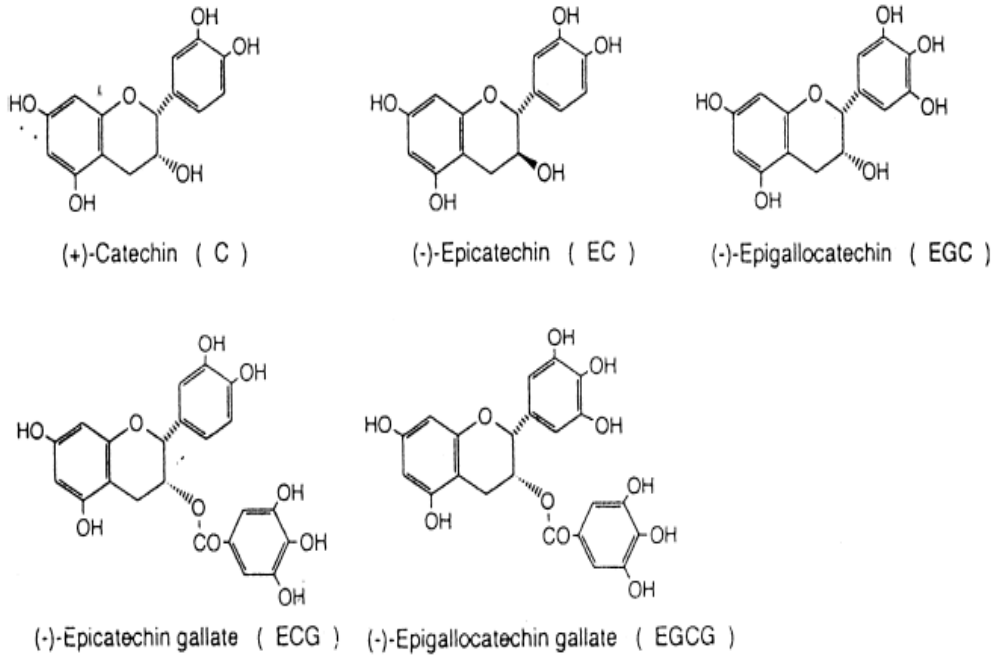
**Çizelge 3. Çay Yaprağının Bileşimi**

Bileşen	(%, kuru maddede)	Bileşen	(%, kuru maddede)
<i>Flavanoller (kateşinler)</i>	17-30	Kafein	3-4
Epikateşin (EC)	1-3	Aminoasit ve protein	15-19
Epikateşin gallat (ECG)	3-6	Basit karbohidratlar	4
Epigallokateşin (EGC)	3-6	Polisakkaritler	13
Epigallokateşin gallat (EGCG)	9-13	Kül	5
Kateşin (C)	1-2	Selüloz	7
Gallokateşin (GC)	3-4	Lignin	6
Flavonoller ve flavanol glikozitleri	3-4	Lipitler	2-3
Leykoantosiyeninler	2-3	Organik asitler	0.5-1.5
Polifenolik asitler ve depsitler	5	Pigmentler	0.5
Toplam polifenoller	30-36		

**Çizelge 4. Farklı Çay Tiplerinin Fenolik Madde Kompozisyonu**

	Yeşil çay	Siyah çay	Oolong çay
Epikateşin	6.06a; 1.0-9.54b; 7.22-13.3c; 0.55-0.87e	4.0 b; 4.1d; 0.04e	1.75a; 0.34e
Epikateşin gallat	5.34a; 3-4.92b; 1.42-4.54c; 1.95-2.91e	1.19-11b; 8.0d	3.58a; 0.63e
Epigallokateşin	36.53a; 2.0-36.2b; 3.94-7.92c; 0.44-0.88e	0.9-6.0b; 10.5d; 0.19e	7.70a; 0.38e
Epigallokateşin gallat	18.10a; 6.0-32.6b; 5.55-10.4c; 13.37-13.74e	0.95-12.0b; 16.6d; 0.3e	8.99a; 3.62e
Gallokateşin gallat	0.26-0.38e	-	0.11e
Gallokateşin	2.57-2.81b	0.40-1.57b	-
Gallik asit	0.74-0.78b; 0.23-0.52e	2.79-3.33b; 1.83e	0.58e
Teaflavin	-	2.5d	0.66a
Tearubigin	-	59.4d	-

\* a mg/g; b mg/100 mL; c %; d mg/g (kuru maddede); e % (kuru maddede)



**Şekil 8. Yeşil Çay Polifenollerinin Kimyasal Yapıları**

### **Centella asiatica ekstresinin farmakolojik özellikleri**

*Centella asiatica*, Hindistan, Sri Lanka, Madagaskar, Güney Afrika, Avustralya, Çin ve Japonya'da yetişen, narin, çok yıllık, yelpaze yapraklı ve adeta yerde sürünen otsu bir bitki olup; gölgeli, nemli ve bataklık alanları tercih eder (Kelly, 2007). Geleneksel Çin ve Hint tıbbında uzun süredir kullanılmaktadır. Bitki, İngilizcede Gotu Kola olarak bilinir ve Asya, Avustralya, Afrika yerlilerince eski zamanlardan beri terapötik kullanımı ile halk arasında önemli, şifalı bir bitki olarak değerlendirilir (Zheng ve Qin, 2007).

*C. asiatica*, sağlık için pek çok yararları olan bitkilerden birisidir. İçeriğindeki asyatikozit, kıkırdak ve kemiklerdeki kollajen dokuyu destekler, kan damarlarını açıp güçlendirir ve beyinde nörotransmitterlerin üretimine yardımcı olur. Kan damarlarını güçlendirici ve kan akımını arttırıcı etkisiyle varise karşıdır. Yapılan araştırmalar sonucunda, Gotu kola varisli hastalarda çeşitli düzeylerde düzelmeler sağlamıştır ve varis, selülit gibi sorunlara karşı koruyucu olarak ve bacaklardaki yetersiz kan akımını arttırmak amacıyla kullanılmaktadır. Kan akımı ve nörotransmitterler üzerindeki etkisi sayesinde hafıza zayıflığı, unutkanlık ve konsantrasyon sorunları için de kullanılmaktadır. *C. asiatica* üzerine yapılan araştırmalarda, sağlıklı ve güzel görümlü bir cilt, diğer bağ dokuları, lenf dokuları, kan damarları ve hücre zarı üzerinde önemli etkileri olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar bu bitkinin yaraları iyileştiren ve iltihap giderici etkileri olan çeşitli glikozitler içerdiğini de bulmuşlardır. Bu bileşiklerden asyatikozitler sağlıklı bir cilt için gerekli olan lipit ve protein oluşumunu teşvik etmektedirler. *C. asiatica*, doku gelişiminin çeşitli aşamalarını da olumlu yönde etkilemektedir. Bunlar arasında; yara veya ülserlerden sonra cilt veya derinin yenilenme işlemi olan keratinizasyon, dokuların onarılmasında ilk basamak olan kollajen sentezi, saç ve tırnak gelişimi ile kıkırdak onarımının desteklenmesi sayılabilir. Ayrıca, ikinci ve üçüncü derece yanıklarda da etkili bir şekilde kullanılabilir. Araştırmalarda iyileşme süresinin ve yara izi diyebileceğimiz doku oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (http-3)

*C. asiatica*'nın, yara iyileşme fazlarında farklı etkiler ortaya koyduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. *C. asiatica*, çeşitli aktif bileşenler içermektedir: asyatikozit, sentellozit, madekassozit ve asiatik asit de dahil olmak üzere, triterpenik saponinler bunların en önemlileridir (Kelly, 2007). *C. asiatica*'daki triterpenlerin, farelerde oluşturulan yaralarda ekstraselüler matriks birikimini uyardığı, ayrıca insan dermal fibroblastlarıyla yapılan *in vitro* deneylerde gen ekspresyon değişimlerine neden olduğu kanıtlanmıştır. Madekassozit, kollajen 3 salınımını önemli derecede arttırırken, asiatik asit kollajen sentezinin uyarılması için görevli olan tek komponenttir. Yapılan çalışmalarda asyatikozit'in tip 1 kollajen sentezini TGF- $\beta$  reseptör 1 kinazdan bağımsız Smad yolağı aracılığı ile indüklediği belirtilmektedir (Zheng ve Qin, 2007).

Son zamanlarda yapılan bir araştırmada ise, *C. asiatica*'nın dolaşım sistemi üzerinde de pozitif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Vücuttaki kılcal damarlar dâhil tüm damarları güçlendirerek kan akışını olumlu yönde etkilemektedir. Özellikle hareketsiz veya bir hastalık nedeni ile sürekli olarak yatağa bağlanmak (yatalak) zorunda olan kişiler için de faydalı olduğu gözlenmiştir (http-3)

## **Yeşil Çayın Farmakolojik Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri**

Yeşil çay; antiinflamatuvar, antioksidan, antimitojenik, antikanserojenik, antiangiyojenik, apoptotik, hipolipidemik (kolesterol düşürücü), antiarteriosklerotik (damar sertleşmesini önleyici), obeziteyi önleyici, antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral ve yaşlanmayı geciktirici etkilere sahip olup; doku nakillerinde dokunun bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesini engellemede yardımcı tedavi unsuru olarak kullanılabilir (Chen ve Dou, 2008; Tosun ve Karadeniz, 2003; Fisunoğlu ve Besler, 2008; Hsu, 2005; Sahin ve Özdemir, 2006).

Yeşil çayın sağlığımız üzerindeki yararlı etkileri, özellikle yapısındaki kateşinlerden kaynaklanmaktadır (Sahin ve Özdemir, 2006). Epidemiyolojik çalışmalar, çaydaki polifenollerin kronik hastalıklara karşı koruyucu etkisini göstermesi için günde dört fincandan az çayın yeterli olmadığını, sağlıklı beslenme alışkanlıkları ile birlikte tüketilecek olan günde 5-6 fincan çayın kronik hastalık risklerinin azaltılmasına yardımcı olacağını göstermektedir (Fisunoğlu ve Besler, 2008).

Günde 5 fincan yeşil çay tüketerek, günlük riboflavin, niasin, folik asit ve pantotenik asit gereksiniminin % 5 ila % 10'u kazanılmış olur. Yaklaşık olarak, günlük magnezyum ihtiyacının % 5'i, potasyum ihtiyacının % 25'i, mangan ihtiyacının % 45'i karşılanmış olmaktadır. Ayrıca yeşil çay florür bakımından da oldukça zengindir (Shukla, 2007).

### ***Yara iyileşmesinde yeşil çay ve polifenollerinin etkisi***

En yaygın yeşil çay polifenolu olan EGCG'nin, yapılan çalışmalarda tümör hücreleri ve normal hücrelerde farklı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Vergote ve ark., 2002; Chen ve ark., 1998). Buna rağmen, tümör hücrelerini apoptoza götüren konsantrasyonlardaki polifenole, normal epitel hücrelerinin nasıl karşılık verdiği belirlenmemiştir (Hsu ve ark., 2003).

Hsu ve ark., (2003); yaptıkları çalışmada EGCG ve diğer yeşil çay polifenollerinin karışımına karşı, sürekli çoğalan ve yaşlı insan epidermal keratinositlerin yanıtını araştırmışlardır. 24 saat içinde çoğalmış keratinositlerde EGCG, P57/KIP2 indüksiyonunu gerçekleştirerek, keratinositlerin farklılaşmasını sağlamıştır. 25 gün kadar besiyerinde yetiştirilmiş, düşük bazal hücresel aktivite gösteren yaşlanmış keratinositler ise EGCG veya polifenollere maruz kalınca, DNA sentezini yenilemiş ve süksinat dehidrogenazı aktive etmiştir. Bu sonuçlar, çay polifenollerinin hücresel aktivite veya metabolizma değişikliği ile karakterize cilt durumlarında veya yaraların tedavisi için kullanılabilirliğini destekler niteliktedir.

EGCG veya yeşil çay polifenol karışımının belli konsantrasyonları, yeni hücre bölünmesi için, DNA sentezi ve biyolojik enerji üretmek için yaşlanmış keratinositleri uyatarak; daha kısa sürede iyileşmeyi sağlayıp, yara oluşumunu engellemektedir. Bu nedenle, yeşil çay bileşenlerinin, yara iyileşmesi, deride rejenerasyon, aftöz ülser, sedef hastalığı, aktinik keratoz gibi bazı cilt hastalıklarında yararlı olabileceği açıklanmıştır (Hsu ve ark., 2003).

## **Yara İyileştirici Etki Araştırmasında Kullanılan NIH 3T3 Fare Fibroblast Hücreleri ve Özellikleri**

S.A. Aaronson tarafından stoklanan NIH 3T3, Swiss fare embriyosundan elde edilen kontakt inhibisyona duyarlı adherent fibroblast hücreleridir. Özellikle DNA transfeksiyonu ve transformasyon çalışmaları için kullanılmaktadır (http-4, Jainchill ve ark., 1969).

3T3 hücre hattı geniş spektrumlu araştırmalarda ve endüstriyel biyomedikal uygulamalarda standart olarak kullanılan bir fibroboslat hücre hattıdır. Başlangıç hücre hattının varyantları *ectromelia* virüsüne (mousepox) karşı test edilmiş ve sonuçlar negatif çıkmıştır. Ancak çoğu polyoma ve simian virus 40 (SV40)'a karşı duyarlıdırlar. Bunlara ek olarak 3T3 hücreleri viral enzim revers transkriptaz içermezler ve bu durum da integral retrovirus genomlarının olmayışının bir göstergesidir. Sitoplazmada lizofosfatidilkolin (lyso-PC), AP-1 aktivitesini ve c-jun N-terminal kinaz (JNK1) aktivitesini protein-kinaz C yolağı aracılığıyla indükler. Hücrelerin kontakt inhibisyonu sonucunda birleşen monolayer 3T3 hücreleri, santimetre kare başına yaklaşık 40,000 hücre üretirler (http-5).

## **Hücre Kültüründe Yara İyileştirici Etkinin Masson's Trichrome Tekniği İle Değerlendirilmesi**

Trichrome boyama genellikle tümörlerdeki düz kas ve kollajeni ayırt etmek ve siroz gibi hastalıklarda kollajenöz dokudaki artışı tanımlayabilmek için kullanılmaktadır (http-6).

Adından da anlaşıldığı gibi trichrome prosedüründe kas, kollajen lifleri, fibrin ve eritrositleri seçici olarak boyamada kullanılan 3 tip boya vardır. Trichrome boyamada genel kural, çok küçük boya molekülü ile daha az geçirgen dokuların boyanmasıdır. Kesitler ilk olarak biebrich kırmızısı gibi asit bir boya ile boyanır. Sitoplazma, kas ve kollajen gibi bütün asidofilik doku elemanları asit boyası ile bağlanır. Kesitler daha sonra fosfotungustik veya fosfomolibdik asit ile muamele edilir; çünkü sitoplazma kollajenden daha az geçirgendir ve fosfotungustic/fosfomolibdik asitler biebrich kırmızısının kollajenden dışarı difüze olmasına neden olurken, sitoplazma dışına difüzyona izin vermezler. Kollajenin kırmızısı uzaklaşırken daha az geçirgen komponentler boyayı tutarlar. Fosfotungustik/fosfomolibdik asitler, boyanmamış kollajen ve anilin mavisi (kollajen boyası) arasında daha çok bağlantı gibi görev yapan pek çok asidik grup içerirler. Muhtemelen fosfotungustik/fosfomolibdik asit solüsyonunun pH'sı selektif kollajen boyanmasını artırır ve içeri difüzyona yardım eder veya biebrich kırmızısını uzaklaştırır (http-6, http-7).

## **Kanser**

Kanser, tıp dilinde, yayılma eğiliminde olan kötü huylu ve genelde tedaviye dirençli (malignant, habis) tümörler için, hücre kökeni gözetilmeksizin kullanılan genel bir sözcüktür (Bertram, 2001).

Latince yengeç anlamına gelmekte ve tümörün bedeninin herhangi bir bölgesine yengeç gibi ayrılmaz bir şekilde yapıştığını tanımlamak üzere kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2003).



Epidemik boyutta ortaya çıkması ve gerek hastanın, gerekse yakın çevresinin morali ve davranışı üzerinde olumsuz yansımalar oluşturması nedeniyle kanser, çağımızın en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerine göre kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada görülen ölüm nedenidir. Sağlık Bakanlığınca yapılan çalışmalarda, Türkiye’de yıllık kanser insidensinin yüz binde yaklaşık 150 olduğu ve her yıl yaklaşık 90.000-100.000 civarında yeni kanser olgusunun görüleceği bildirilmiştir. Bu verilere göre de, kanser bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (Kayaalp, 2009).

Kanserler temel yapılarına göre karsinom (karsinoma) ve sarkom (sarkoma) olarak iki şekilde ayrılabilir. Karsinomlar vücudu kaplayan deri ile meme, solunum ve sindirim yolları, iç salgı bezleri, üreme organları ve boşaltım sisteminin iç yüzünü döşeyen epitelyum dokudan türerken; sarkomlar bağ doku, yağ dokusu, kan damarları, kemik ve kıkırdak gibi dokulardan türerler (Johnson, 1991).

Kanser, bir seri genetik hasarın birikimi ile çevresel etmenlerin bağımsız ya da işbirliği sonucunda meydana gelmektedir. Genetik hasar olarak adlandırılan mutasyonların bazıları hücre çoğalmasının kontrolünü etkilerken, bazıları da tümör hücrelerini buldukları yerden uzak mesafelere taşımakta ve gelişebilmeleri için gerekli işlemleri uyarmaktadır (Klug ve Cummings, 1983). Mutasyon olasılığı, bireylerin belirli fiziksel, kimyasal ya da biyolojik faktörlere maruz kalmaları ile artabilir. Mutasyon meydana getirerek kansere sebep olan kimyasal maddelere ise karsinojen adı verilmektedir (Guyton, 1986).

Karsinojenler 3 temel grupta sınıflandırılabilir.

1. Genotoksik karsinojenler: nükleik asitlerle reaksiyona giren karsinojenlerdir.
2. Prokarsinojenler: Karsinojenezi başlatmak için metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan karsinojenlerdir.
3. Epigenetik karsinojenler: Genotoksik değildir, metallerden kompleks organik kimyasallara varıncaya kadar olan kanser başlatıcı bileşenlerden meydana gelirler (Reddy ve ark., 2003).

### ***Kanser hücrelerinin özellikleri***

İnsan kanser hücrelerinin davranışları ile ilgili elde edilen bilgilerin çoğu, *in vitro* ortamda geliştirilmiş hücrelerle yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Karp, 2005).

Kanser hücresiyle normal hücre arasında iki büyük fark bulunur:

- 1) Normal hücrelerin büyümesi için gerekli olan büyüme faktörlerine kanser hücreleri gerek duymaz; bu nedenle kanser hücresi hücre büyümesinin normal sınırlarına bağlı kalmadığından, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalır. Malignant hücreler, normal hücrelerin büyüme ve bölünmesinin kesilmesini sağlayan düzenleyici sinyal tiplerine cevap vermediğinden bu kontrolsüz büyüme ölümcül tehdit yaratmaktadır. Normal hücrelerin büyümesi için gerekli büyüme faktörlerine kanser hücrelerinin ihtiyacı olmadığı için kanser hücreleri sonsuz olarak çoğalarak sayıları günden güne kat kat artar. Böylece vücut için gerekli bütün besinleri kullanırlar. Sonuçta normal doku hücreleri yetersiz besinden yavaş yavaş ölmektedirler (Guyton, 1986).

2) Kanser hücreleri birbirlerine normal hücrelerden çok daha az tutunduklarından dokularda kolaylıkla dolaşarak kan dolaşımına girip, tüm vücuda taşınarak çok sayıda yeni kanser odakları yaratırlar (Guyton, 1986).

Kanser hücreleri normal hücrelerden mikroskop ile ayırt edilebilirler. Spesifik bir dokuda kanser hücreleri hızlı büyümeleriyle karakterizedir. Çekirdekleri sitoplazmalarına oranla büyüktür. Normal bir hücre, genellikle iyi organize olmuş mikroflamentler, mikrotübüller ve intermediate filamentleri içerirken, kanser hücrelerinin hücre iskeleti azalmış ve/veya organizasyonu bozulmuştur. Kanserleşmiş hücre, dokuya özgü olan yapısal özelliğini ve morfolojik yapısını kaybetmiştir. Hücre sitoplazmaları normal hücrelere göre daha küçüktür ve bu nedenle mikroskopla ayırt edilebilirler (Karp, 2005).

### **Hücre Döngüsü**

Hücre döngüsü, çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış bir hücrede meydana gelen, bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir siklusa katılan hücre, genetik ve morfolojik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Hücre proliferasyonu, hücre döngüsü içinde bulunan bazı kontrol noktaları (“check-points”) tarafından düzenli bir şekilde kontrol edilir. Hücre döngüsü proliferasyon, farklılaşma (diferansiyasyon) ve apoptoz gibi temel hücre fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku “turnover”ıyla yakın bir ilişki içindedir. Böyle bir düzenleyici özelliğinin olması, organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik (örneğin doku homeostazisi) ve patolojik durumlarda (örneğin tümör oluşumu) hücre döngüsünün ne derece kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim, kanser tiplerinde hücre döngüsünün regülör proteinleri olan siklinler veya siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI)’nin düzeylerinde anormallikler belirlenmiştir (Engin ve Özyardımcı, 2001).

Bir hücrede canlılık göstergesi olan en anahtar noktalardan biri, onun birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücreye bölünmesidir. Genelde, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre döngüsünün (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, S ve M) aktif fazlarına girmezler ve G<sub>0</sub> denilen istirahat fazında beklerler. Hücrelerin ikiye bölünmesi mitozis (veya gonadlarda mayozis)’le gerçekleşir. Hücreyi bölünmeye sevkeden sinyaller (örneğin, sitokinler, büyüme faktörleri veya mitojenler) çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyalini aldığı anda, sinyal ileti kaskadı “signal transduction cascade” adı verilen bir ileti mekanizması (örneğin, MAP kinaz, Protein Kinaz C veya JAK/STAT yolları) devreye girer. Bu ileti mekanizması sayesinde, hücre döngüye sokularak bölünmeye (mitozise) sevk edilmiş olur. Mitozise girmeden önce hücreler bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasında, bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (Örn. siklinler) ve makromoleküller (Örn. deoksiribonükleik asitler) sentezlenir. Bu hazırlık safhasına da interfaz adı verilir. İnterfaz kendi içinde G<sub>1</sub>, S, ve G<sub>2</sub> olmak üzere çeşitli alt fazlardan oluşur. Mitozis ve interfaz beraberce hücre döngüsü dediğimiz süreci oluştururlar. Dolayısıyla, fazların işleyiş sırasına göre bir hücre döngüsü; G<sub>1</sub> S, G<sub>2</sub> ve M fazlarından (**Şekil 9**) oluşmaktadır (http-8). Genel olarak, G<sub>1</sub> fazı DNA sentezine (S fazına) ve G<sub>2</sub> fazı ise mitozise (M fazına) hazırlık fazlarıdır. Bu fazlarda RNA ve protein sentezleri yapılır ve ayrıca hücre kendisini bölünme için yeniden organize eder. G<sub>1</sub> fazı, hücre döngüsünün süresi açısından en değişkenlik gösteren fazıdır. Bu fazın süresi döngünün en önemli belirleyicisidir. Bu fazda hücre

ya bölünmek, ya diferansiye olmak, ya da ölmek için karar verir ve bazı genlerde değişiklikler başlar. G<sub>2</sub> fazında, bir önceki (S) fazda replike olmuş DNA ve kromatin proteinleri kondanse olurlar ve “sister” kromatidler halinde paketlenirler. Tamir mekanizmalarından kaçmış hasarlı DNA veya replike olmamış DNA bu fazda kontrol edilir. M fazında, “sister” kromatidler düzgün bir şekilde bir hizaya gelirler ve ardından çeşitli aşamalardan geçilerek (profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez) hücre ikiye bölünür. Telofazda sitoplazmik bölünme tamamlanır ve aynı genetik materyalli iki yeni hücre meydana gelir. G<sub>0</sub> fazı ise normalde hücre döngüsü içinde yer almayan ve döngüsünü tamamladıktan sonra döngüden çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır. Hücreler bölünme uyarısı aldıkları zaman G<sub>0</sub> fazından ayrılıp G<sub>1</sub> fazına; yani döngünün ilk fazına girmiş olurlar. Bölünmeye devam etmeyip G<sub>1</sub> fazından ayrılan hücreler ise diferansiye olmak üzere farklı bir yöne kayarlar. (Engin ve Özyardımcı, 2001).

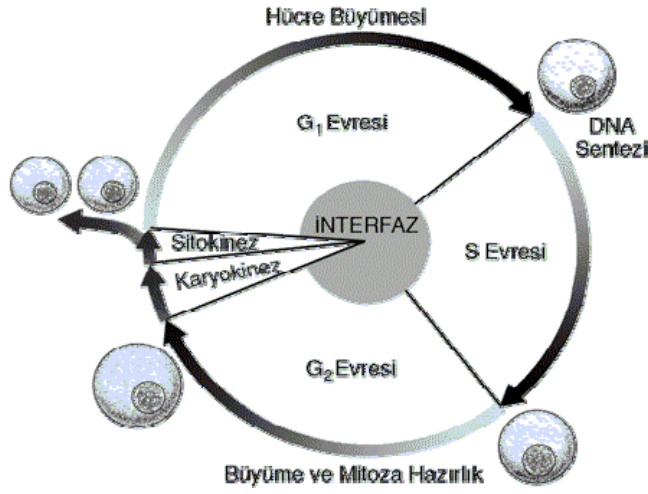
Hücre döngüsünde bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse, genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için, hücrede hasar meydana gelebilmektedir. Hücre döngüsünde G<sub>1</sub> – S geçişinde, G<sub>2</sub> – M geçişinde ve metafaz–anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktalarında hücrenin döngüye devam edip etmeyeceğinin kararı verilir (Cabadak, 2008).

Hücre döngüsü, döngüye özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. Hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında siklinlerin, CDK ve CDI’lerin düzeyleri farklılık gösterir ve oldukça komplike bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. CDK’lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin’e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör subüniteleri, CDK’lar ise katalitik alt üniteleridir. Döngünün çeşitli fazlarında bir taraftan siklinler (A, B1, D ve E) periyodik olarak sentez edilirlerken diğer taraftan yıkılırlar. Bu yüzden de siklinler olarak isimlendirilmişlerdir. Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, ilişkide buldukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)’ların aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. CDK’ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir. CDI’leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinler, ya CDK’ların kendisi ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak, CDK’ların aktivitelerini inhibe ederler (Engin ve Özyardımcı, 2001).

Siklin E en yüksek seviyeye G<sub>1</sub> fazının geç döneminde; Siklin A ve B ise G<sub>2</sub> ve M’de çıkar. Siklin D ise G<sub>1</sub> fazının erken döneminde artmaya başlar ve fazın sonuna doğru gittikçe artar. Her bir siklin özellikle spesifik CDK’ına bağlanır. Değişik fazlarda spesifik siklinlerin ve CDK’ların varlığı veya yokluğu herhangi bir fazda hangi kinazın aktifleşeceğini belirler (Engin ve Özyardımcı, 2001).

Biyokimyasal olarak ifade etmek gerekirse, bu proteinler, birbirleriyle protein:protein kompleksleri (interaksiyonları) oluşturarak birbirlerinin aktivitelerini düzenlerler. Bu aktivitelerin düzenlenmesi, fosforillenme yoluyla gerçekleşir. CDK’lar, siklinlerle interaksiyon sonucu aktive olurlarken, CDI’leriyle interaksiyon yapmaları halinde ise inhibe olurlar. CDK’ların aktif formları, substratları fosforilleyerek onları aktif hale getirir. Böylece substrat, aktivasyon

durumuna göre hücre döngüsü ya durur ya da bir sonraki aşamaya geçer (Engin ve Özyardımcı, 2001).



Şekil 9. Hücre Döngüsü

### Apoptoz

Apoptoz birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş, sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir. Biyolojik bilimler literatüründe apoptoz terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış olup, canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da bilinir. Her hücre doğar, belli bir süre yaşar ve sonra ölür. Bu durum fizyolojik olarak her saniye yaklaşık bir milyon hücremizin ölmesiyle bir ömür boyu sürer. Buradaki ölüm mekanizması apoptozdur. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptoz/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının ("tissue remodelling") günde yaklaşık  $1 \times 10^{11}$  hücreyi bulduğu hesaplanmaktadır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı, yetişkin bir insanın vücut ağırlığının her 18-24 ayda bir yeniden yapım ve yıkımı anlamına gelmektedir. (Engin ve Özyardımcı, 2001; Akşit ve Bildik, 2008, Ulukaya, 2003).

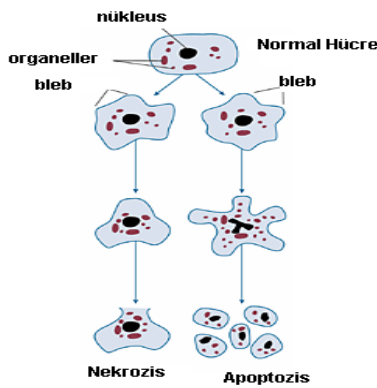
Apoptoz, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağladığı gibi organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Hasarlı DNA da apoptoz yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar, kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptoz yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır. (Bildik ve Akşit, 2008).

Apoptozdaki ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması, parçalara ayrılmasıdır. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılmışken, apoptozda yaklaşık olarak 300000 kırılma meydana gelmekte ve hücre onarımı yapılamamaktadır (Öktem ve ark., 2001). DNA, internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları

oluşturacak şekilde parçalanır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının “ladder pattern” ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo bazçifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir (Ulukaya, 2003).

Apoptoz, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülerek, bir kaç dakikada hacimlerinin 1/3’ünü kaybederler. Hüresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilirler. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyardırmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler (http-9). Apoptoz 30 – 60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Elektron mikroskopunda apoptoz esnasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan Apoptoz İndükleyici Faktör salınımı, bildirilen morfolojik değişikliklerdendir (Öktem ve ark., 2001; Bildik ve Akşit, 2008).

Apoptoz klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekroz’dan birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır (**Şekil 10**). Nekroz fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle apoptoz hem sağlıklı hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır (Ulukaya, 2003). Nekroz, hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir (**Çizelge 5**). Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu, hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir (Ulukaya, 2003, Öktem ve ark., 2001). Oysa apoptozda hücre parçalanmadığı, kendi membranı içinde yok olup içindeki iltihap tetikleyicisi bileşenleri etrafa saçmadığı için apoptoza iltihabi reaksiyon eşlik etmez (Kayaalp, 2009).



**Şekil 10. Hücrede Nekroz ve Apoptoz Oluşumu**

**Çizelge 5. Nekroz ve Apoptoz Arasındaki Farklar**

<b>ÖZELLİK</b>	<b>NEKROZİS</b>	<b>APOPTOZİS</b>
<b>Yol açan nedenler</b>	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Bütyüne faktörü eksikliği Hücre yaşlanması "Senescence" HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
<b>Morfolojik özellikler</b>	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin "flocculation"u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
<b>Biyokimyasal özellikler</b>	Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C'de gerçekleşmez) DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci) Preolitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
<b>Diğer özellikler</b>	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

### ***Apoptoz mekanizmaları***

Apoptoz, **Çizelge 6**'da da görüldüğü gibi hücre dışı ve hücresele seviyede oluşan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir (Erdoğan ve Uzaslan, 2003). Hücresele düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligant (FasL) ve Tümör nekroz faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir. Bunun dışında apoptoz viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon gibi bazı faktörler ile de bafllatılabilir. Ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan p53 geni, reaktif oksijen radikalleri (hem mitokondri, hem plazma membranı, hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak) apoptozu tetikleyebilmektedir (Erdoğan ve Uzaslan, 2003). İnsan tümörlerinin %50'den fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilen p53 geninin, kanser oluşumunu önlemede kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin geç G<sub>1</sub> fazında kalarak,

S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre döngüsü durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre döngüsündeki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni *bax* proteinini (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptoza giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (Öztürk, 2002).

Apoptozu tetikleyen diğer hücresel düzeyde ve hücre dışı ajanlar Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 6. Apoptozu Tetikleyen Hücre İçi ve Dışı Ajanlar**

Fizyolojik aktivatörler	Hasara bağlı indüklenme	Tedavi ajanları	Toksinler
TNF ailesi (FasL, TNF)	Isı şoku	Kemoterapötikler Sisplatin, Bleomisin	Etanol
Transforming growth factor beta (TGF-β)	Viral infeksiyonlar	Gama Radyasyon	Beta-amiloid peptid
Nörotransmitterler; Glutamat, dopamin	Bakteriyel toksinler	UV radyasyon	
Büyüme faktörünün seviyesinde düşüş	Onkogenler (myc, rel, E1A)		
Kalsiyum	Tümör süpresör gen (p53)		
Glukokortikosteroidler	Sitotoksik T hücreler		
	Oksidanlar		
	Serbest radikaller Besin eksikliği ve antimetabolitler		

### ***Apoptoz ve kanser ilişkisi***

Apoptoz, DNA’ları onarılamayacak kadar hasar görmüş hücreleri bunlar çoğalmadan önce tahrip ederek organizmayı mutasyonların olumsuz etkilerine karşı korur (Smith ve ark., 2007). Apoptoz/proliferasyon dengesindeki bozulma tümör gelişiminde rol oynadığı için, apoptoz bloke edilirse hücre sayısındaki artış kansere neden olabilir. Apoptoz mekanizmasının tetiklenmemesi (p53 gen defektleri) veya mekanizmanın herhangi bir basamağında meydana gelen bir değişiklik (Bcl-2’nin artışı, Fas gen defektleri gibi) tümör gelişiminde rol almaktadır. Ayrıca tümör hücrelerinin doğal immün mekanizmalarla ortadan kaldırılamamasının da tümör gelişiminde özellikle tümör hücrelerinin yayılımında önemli olduğu düşünülmektedir. Genellikle tümör hücreleri sitotoksik T lenfositler veya natural killer hücreler tarafından Fas/FasL bağımlı apoptoz yoluyla ortadan kaldırılır. Fakat tümör hücrelerinin, tam ters bir biçimde immün sistemden kaçabildiği de bilinmektedir. Malign hücrelerin, konak immünitesinden kaçışı ve sitotoksik immün sistem hücrelerinin tümör hücreleri tarafından ortadan kaldırılması kanser gelişimi ve progresyonu açısından çok önemlidir. Bu olgularda tümör hücrelerinin, ölüm faktörü üreterek (FasL) sitotoksik T lenfositlerde ve NK hücrelerde apoptozu başlattığı düşünülmektedir (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

Kansere neden olan bazı virüsler enfekte ettikleri hücrelerde fizyolojik apoptozu engellerler. Bu şekilde davranan iki tip insan papilloma virüsü (HPV)’nin serviks kanseri oluşturdukları saptanmıştır. HPV virüslerinden biri E6 adında bir protein üreterek apoptozu başlatan P53’e bağlanır ve apoptozu inaktive eder. Burkitt

lenfoma ve Mononükleosise neden olan Epstein-Barr virüsü de Bcl-2'ye benzer bir protein salgılar veya salgıladığı bir diğer proteinle hücrenin Bcl-2 protein üretimini arttırmasını indükler. İki olay da hücreyi apoptoza karşı daha dirençli kılar. Bu şekilde çoğalmaya devam eden hücre kanser hücresi haline gelir. Melanoma (deri kanserlerinden en tehlikelisi), Apaf-1'i kodlayan genin ekspresyonunu engelleyerek apoptoza direnç gösterir (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

Bazı kanser hücreleri (özellikle akciğer ve kolon) sitotoksik T-hücrelerinin FasLigand kısımlarını bağlayan bir molekül salgılayarak T-hücrelerinin apoptoz mekanizmalarını başlatmalarına izin vermezler. Dolayısıyla bozulan bu mekanizma kanser hücrelerinin fizyolojik apoptozunu engeller (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

FasL'nin melanoma, akciğer kanser hücreleri, kolon, tiroid, böbrek ve pankreas kanser hücrelerinde arttığı bilinmektedir. Tümör hücrelerinin membran yüzeyinde FasL artmasına rağmen Fas reseptör düzeyinin azaldığı gözlenmiştir ve bu olay tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışında rol oynar (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

Tümör hücrelerinin apoptoza rezistans geliştirmesinin sebebi olarak sitoplazmik membranda FasL artışı ve Fas reseptör düzeyinde azalmanın yanı sıra, Fas gen defektleri de tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasını engeller (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

Fas-FasL bağımlı apoptoz mekanizması doğru regüle edildiği takdirde viral enfeksiyonların ve kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasında görev alır. Sistemin yeterli çalışmaması, tümör hücrelerinin ortadan kaldırılamaması nedeni ile kanser gelişimi ve yayılımına neden olurken sistemin fazla çalışması ise doku hasarına neden olur (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

#### *Tümör hücrelerinin apoptozdan kaçma mekanizmaları*

- Fas ve Fas Ligand (Fas-L) interaksiyonları
- p53 mutasyonu
- Aşırı Bcl-2 ekspresyonu
- Azalmış Bax ekspresyonu
- Kaspaz inhibitörlerinin aşırı ekspresyonu (IAP, survivin)
- Telomeraz aktivitesinin devam etmesi (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

#### **Yeşil Çay ve Kanser İlişkisi**

*In vitro* hücreler ve *in vivo* hayvan modelleri kullanılarak yapılan deneysel çalışma sonuçlarına göre, yeşil çay kolon, mide, özefagus ve akciğer kanserleri başta olmak üzere prostat, meme ve cilt kanseri gibi birçok kanser türüne karşı koruyucu görev yapmaktadır ( Fisunoğlu ve Besler, 2008; Sharangi, 2009).

1986 yılında başlayan ve 10 yıl boyunca 8552 kişi üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, günlük olarak yüksek dozda tüketilen yeşil çayın kanser üzerine etkisi araştırılmıştır. Günlük 10 fincandan fazla çay tüketenlerle, 3 fincandan az çay tüketenler karşılaştırıldığında, kanser gelişiminin erkeklerde 3.2 yıl, kadınlarda 7.3 yıl geciktiği görülmüştür. 419 kanser vakasında yeşil çay tüketimine bağlı



olarak, kanser türlerinin relatif etkileri hesaplanmış ve günde 10 fincandan fazla yeşil çay tüketen kişilerde kolon, akciğer ve karaciğer kanseri için oldukça düşük relatif risk elde edilmiştir (Fujiki ve ark., 2000).

Yeşil çay ve bileşimindeki kateşinlerin kansere karşı koruyucu etkileri; hücre çoğalmasını engelleme, hücre döngüsünü durdurma, sitokinlerin salınımını azaltma, etken reseptörleri baskılama, mitotik uyarıları baskılama, mutajenite ve genotoksisiteyi önleme, serbest radikal temizleme, detoksifikasyon enzimlerini etkinleştirme, kanser hücrelerinin apoptozunu hızlandırma ve anjiyogenezin engelleme gibi mekanizmalarla açıklanmaktadır (Sahin ve Özdemir, 2006).

Yeşil çay polifenolleri proteinlere bağlanma özellikleriyle belirli enzim ve reseptörleri etkileyebilir. Örneğin; EGCG, siklooksijenaz-2 ve nitrik oksit sentaz gibi prooksidan enzimleri inhibe ederek, iltihap ve tümör oluşumunda aracılık yapan nitrik oksit ve prostoglandinlerin salınımını kısıtlamaktadır. Güçlü antioksidan özelliği olan yeşil çay polifenolleri, reaktif oksijen ve nitrojen türlerini bağlar, ayrıca da süperoksit dismutaz, glutasyon-S-redüktaz, katalaz gibi hücre içindeki antioksidan enzimlerin sentezini tetikleyerek de dolaylı olarak antioksidan aktivite gösterir. Bu etkileriyle de, lipid peroksidasyonunu ve DNA yapısında oluşabilecek hasarları engeller (Koo ve Cho, 2004).

#### ***Yeşil çay ve polifenollerinin antioksidan etkileri ve kanserin önlenmesi***

Oksidasyonun doğal sürecinde, insan vücudu serbest radikaller oluşturmaktadır. Oluşan bu aktif oksijen formları engellenmediği takdirde proteinler, lipidler, karbohidratlar ve DNA'da yapısal bozulmalar oluşabilmektedir; fakat antioksidan olarak adlandırılan maddeler ve antioksidan enzim sistemleri aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksidasyonun teşvik etmiş olduğu zararlanmaları hücre düzeyde engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır (Chen ve Dou, 2008; Tosun ve Karadeniz, 2003). Kanseri, kalp hastalıkları, diyabet, Alzheimer gibi bazı hastalıkların ve yaşlanmanın, dokulardaki oksidatif hasar ile güçlü bir bağı vardır (Chen ve Dou, 2008).

Beslenmede yeşil çay önemli bir antioksidandır. İçerdiği flavanoller sebebiyle güçlü antioksidan aktiviteye sahip olup birçok hastalığın oluşum ve gelişimini önlemektedir. Yapılan çalışmalarda da, yeşil çayın yüksek miktarda flavanoller içermesi nedeniyle, yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmektedir (Chen ve Dou, 2008; Tosun ve Karadeniz, 2003).

Rah ve ark. 2005, insan mikrovasküler endotel hücrelerinde (HUMVEC), reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı yeşil çay polifenollerinin koruyucu rolünü araştırmışlardır. Önceden 1 saat 10 µg/ml yeşil çay polifenolleri (GTP) ile inkübe edilen endotel hücrelerinde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen değişikliklerin tamamen önlendiği sonucuna varmışlardır. Ksantin oksidaz (XO) ile oksidatif stres indüklendiğinde, hücre canlılığı ve morfolojisi yine aynı GTP konsantrasyonunda (10 µg/ml) etkili bir şekilde korunmuştur. Bu sonuçlar, yeşil çay polifenollerinin hücre kültürü deneysel modelinde biyolojik bir antioksidan olarak rol alabileceğini ve endotel hücrelerinde oksidatif stres ile indüklenen sitotoksisiteyi önleyebileceğini göstermektedir.

### ***Yeşil çay polifenollerinin, mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağını aktive edici etkisi***

Karsinogenlerin biyoaktivasyonlarında rol alan sitokrom P450 gibi enzimlerin inhibisyonuna katılan yeşil çay polifenollerinin koruyucu etkileri bulunmaktadır. Ayrıca yapılan *in vivo* çalışmalarda, yeşil çayın biyolojik cevap sürecinde, faz II detoksifikasyon enzimlerinin de katılımının olduğunu gösterilmektedir. Faz II enzimlerinin indüksiyonunu düzenleyen bölge olan ARE (antioksidan duyarlı element)'in faz II genlerinde bulunmasından dolayı, yeşil çay polifenollerine olan biyolojik cevap çalışmalarında MAPK yolağı mekanizma yolak olarak kullanılmıştır (Mukhtar ve Ahmad, 1999a; Mukhtar ve Ahmad, 1999b)

Mukhtar ve Ahmad (1999a), yapmış oldukları çalışmada ARE aracılı faz II enzim gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile ilgili olarak MAPK yolak aktivasyonunun etkili bir sinyal yolağı olabileceğini göstermişlerdir. ARE'ler aracılığıyla, faz II detoksifikasyon enzimlerinin transkripsiyonu yeşil çay polifenollerinden uyarılmaktadır. Ayrıca, yeşil çay polifenollerile yapılan tedaviler, MAPK, ERK2 (ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz 2), JNK1 (c-jun N-terminal kinaz 1) yolaklarının aktivasyonu ve c-jun, c-fos gibi erken cevap genlerinin mRNA düzeylerinde artış ile sonuçlanmıştır.

### ***Yeşil çay polifenolu epigallocateşin-3-gallat (EGCG)'nin tümör hücrelerinde proteozom aktivitesini inhibe edici etkisi***

İlaç rezistans gelişimi ve tümör hücre proliferasyonu için, proteozom aktivitesi önemli bir husustur. Bu sebepten, proteozoma aracılık eden degradasyon yolağı, kanser önlenmesi ve terapisi için göz önünde bulundurulması gereken önemli bir hedefdir. Apoptoz ve hücre döngüsü gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer alan düzenleyici proteinlerin yapısal katlanmalarını ubiquitin/proteozom sistemi kontrol etmektedir (Chen ve Dou, 2008).

Normal şartlar altında, lizozomal yolak; endositoz veya pinositoz ile hücrede önemli olan ekstraselüler proteinleri azaltırken, proteozom ise intraselüler proteinlerin degradasyonunu kontrol eder. Ökaryotik proteozom, bilinen en az 3 katalitik aktiviteye sahiptir: kimotripsin-benzeri, tripsin-benzeri, kaspaz benzeri veya peptidil-glutamil peptid-hidrolize edici (PGPH)-benzeri aktiviteler. Hemen hemen tüm çalışmalarda, tümör hücrelerinde apoptozun indüksiyonu ile proteozomun kimotripsin benzeri aktivitesinin inhibisyonu arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Chen ve Dou, 2008).

Chen ve Dou (2008), yapmış oldukları çalışmada, EGCG'nin etkili ve spesifik bir şekilde *in vitro* (IC<sub>50</sub>= 86-194 nM), *in vivo* (1-10 µM) konsantrasyonlarda, proteozomun kimotripsin benzeri aktivitesini inhibe ettiğini ve hücre döngüsünün G<sub>1</sub> fazında tümör hücre büyümesinin durdurulmasını indüklediğini göstermişlerdir. Ayrıca, EGCG yapısındaki ester bağı, proteozomun inhibitör aktivitesinde kritik rol oynamaktadır.

EGCG, yeşil çaydaki en etkili polifenoldür. A ve C-halkalarında veya ester bağlarında değişiklik yapılarak üretilen sentetik EGCG amidleri ve EGCG analogları, Jurkat lösemi T hücrelerinin G<sub>1</sub> fazında büyümesini durdurmuştur ve insan prostat kanser hücresi olan LNCaP hücrelerinde koloni oluşumunu baskılamıştır (Chen ve Dou, 2008).

EGCG'nin B ya da D halkasında OH gruplarının azaltılması sonucunda *in vitro* olarak, proteozom inhibitör aktivitesi azalmıştır. Halbuki; EGCG'nin yapısı korunmuş olan analogları, % 97 civarında proteozomal kimotripsin benzeri aktiviteyi inhibe etmiştir (Chen ve Dou, 2008).

#### ***Yeşil çay polifenollerinden EGCG'nin ürokinaz aktivitesini inhibe edici etkisi***

İnsan kanserlerinde çoğunlukla eksprese edilen enzimlerden biri olan ürokinazın inhibisyonuyla ilgili olarak EGCG'nin antikanser aktivitesinin olduğu ileri sürülmektedir (Mukhtar ve Ahmad, 1999a).

Bilgisayar destekli moleküler modellemenin kullanılması ile EGCG'nin ürokinaza bağlandığı ve ürokinazın katalitik üçlü gruplarından serin 195 ve histidin 57'yi bloke ettiği ortaya konmuştur (Mukhtar ve Ahmad, 1999a).

#### ***Yeşil çayın apoptotik hücre ölümünü indükleyici ve hücre döngüsünü durdurucu etkisi***

Hem normal hem de kanser hücrelerinin yaşam döngüsü apoptoz hızıyla etkilendiğinden dolayı, apoptozu düzenleyen kemopreventif ajanlar, sabit hücre populasyonlarını da etkileyebilir. Diğer bir taraftan, birçok kanserde kemopreventif ajanlar apoptozu indüklerken, tümör-uyarıcı ajanlar apoptozu inhibe etmektedir. Bu yüzden, kemopreventif ajanlar, tümörlü deney hayvan modellerinde ve insan epidemiyolojisinde kanıtlanan etkilerinden ve kanser hücrelerinde apoptozu indüklemelerinden dolayı, kanser tedavisinde geniş kullanıma sahiptirler (Mukhtar ve Ahmad, 1999a).

Mukhtar ve Ahmad (1999a); yapmış oldukları çalışmada insan epidermoid karsinoma (A431) hücrelerinde EGCG'nin apoptozu ve hücre döngüsünün durmasını indüklediğini göstermişlerdir.

Chen ve ark. (1998), çalışmalarında EGCG'nin SV40 virüsüyle değiştirilmiş insan fibroblast hücreleriyle (W138VA), normal W138 hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. EGCG, W138VA hücrelerinde büyümeyi engellerken, normal W138 hücrelerinde büyümeyi engellememiştir. EGCG'nin benzer şekilde büyümeyi inhibe edici etkisi, insan kolorektal kanser hücreleri (Caco-2), göğüs kanseri hücreleri (Hs578T) ve onların normal hücre eşlerinde yapılmış olan başka bir çalışma ile desteklenmektedir. Aynı zamanda EGCG tedavisi, değiştirilmiş W138VA hücrelerinde apoptozu indükleyip c-fos ve c-myc genlerinin ekspresyonunu artırırken, normal W138 hücrelerinde böyle bir etkisi görülmemiştir. Bu çalışmaya göre, c-fos ve c-myc gibi genlerin değişimi, EGCG'nin farklı cevaplarından sorumlu olabilmektedir.

Fujiki ve ark. (1998), yapmış olduğu çalışmada, EGCG ve diğer çay polifenolleri insan akciğer kanser hücrelerinin (PC-9) büyümesini G<sub>2</sub>/M fazında durdurmuştur ve tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) yolağının, EGCG aracılı biyolojik cevapta mekanizma olarak rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

Yang ve ark (1998), yeşil çay polifenollerinin büyümeyi durdurucu etkilerini 4 farklı insan kanser hücre hattı kullanarak araştırmışlardır. Bunlar H661, H1299, H441 akciğer kanseri hücreleri ve HT-29 kolon kanseri hücreleridir. EGC (Epigallokateşin), H661 hücresine karşı güçlü inhibisyon göstermiş; fakat H1299 hücresinde aynı şekilde güçlü inhibe edici etkisi görülmemiştir. EGCG

(Epigallokateşin-3-gallat)'ın, H661 hücreleri ile inkübasyonu sonucunda doza bağımlı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumu gözlenmiştir. H661 hücrelerine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin eklenmesi EGCG'nin verdiği apoptotik cevaba benzer bir etki göstermiştir. H661 hücrelerinde EGCG ile indüklenen apoptoz, dışardan eklenen bir katalaz ile tamamen inhibe edilmiştir. Bu inhibisyon, çay polifenol aracılı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminin hücrelerin apoptozu ile sonuçlandığını göstermektedir.

***Yeşil çay ve polifenollerinin EGFR (epidermal büyüme faktör reseptörü) yoluyla aracılığı ile hücresel proliferasyonu ve tümör gelişimini inhibe edici etkisi***

EGFR tirozin kinazın, ligandıyla aktivasyonunun, hücre proliferasyonu ile ilgili olarak birçok hücresel cevabı başlattığına inanılmaktadır. EGFR'nin fazla ekspresyonunun ise neoplastik bir fenotip oluşturduğu belirlenmiştir (Mukhtar ve Ahmad, 1999a).

Liang ve ark. (1997), EGCG'nin DNA sentezini, EGFR'nin protein tirozin kinaz aktivitesini ve FGFR (Fibroblast büyüme faktör reseptörü) nin aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada, EGCG'nin tümör gelişimini EGFR yoluyla bloke ederek inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

***Yeşil çay ve polifenollerinin AP-1 (aktivatör protein-1) aktivasyonu ve hücre transformasyonu inhibe edici etkisi***

Birçok çalışma AP-1'in aktivasyonunun tümör gelişiminde rol oynadığını gösterdiğinden, bu transkripsiyon faktörünün down-regülasyonunun kansere karşı terapötik bir etkinliğinin olabileceği düşünülmektedir (Mukhtar ve Ahmad, 1999a).

Dong ve ark.(1997), JB6 fare epidermal hücre hattında (tümör gelişim çalışmalarında en çok kullanılan *in vitro* model sistemi), EGCG ve teaflavinlerin, EGF ya da TPA ile indüklenen hücre transformasyonunu; ayrıca da AP-1 bağımlı transkripsiyon aktivitesini ve DNA bağlanma aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. AP-1 aktivasyonunun inhibisyonu ise, JNK-bağımlı yolağın inhibisyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir.

***Yeşil çay ve polifenollerinin, c-jun mRNA ekspresyonunu, protein tirozin kinaz ve JNK 1 aktivasyonunu inhibe edici etkisi***

Lu ve ark. (1998), sıçan aortik düz kas hücrelerinde (A7r5), PTK'ın EGC (Epigallokateşin) ile inhibe edildiğini göstermişlerdir. EGC, c-jun mRNA düzeylerini, fosforile olmuş JNK1 ve JNK1 kinaz aktivasyonunu azaltır. Bu bulgular, EGC'nin antiproliferatif etkinliğinin, tirozin kinaz aktivasyonunun inhibisyonu, c-jun mRNA ekspresyonunun azalması ve JNK1 aktivasyonunun inhibisyonu aracılığı ile olduğunu göstermektedir.

**Osteosarkom**

Osteosarkom, osteokondrom ve Ewing ailesi tümörleri 20 yaş altında görülen en sık 3 tümördür. Bunlar içinde en sık görüleni osteosarkomdur. Ergenlik döneminde görülmesi doruğa ulaşan bu tümör, iskelet büyümesinin hızlı olduğu yaşlarda sıktır. Dolayısıyla ergenlik öncesi osteosarkom olguları daha az beklenmektedir. Hastalar genelde erkek çocuklar olup uzun boyludurlar. Onüçüncü kromozomdaki Rb genindeki (tümör supresör gen, resesif onkogen) delesyonlar ve yeniden gen düzenlenmeleri osteosarkoma yol açabilir. Bir diğer

resesif onkogen olan 17. kromozomdaki p53 geninin germline mutasyon sonucu inaktivasyonu (% 25) hastalığın gelişmesinden ve ilerlemesinden sorumlu tutulmuştur. Osteosarkom, ailesel kanser sendromu da denilen Li-Fraumeni sendromunda p53'ün etkilenmesine bağlı görülebilmektedir. Çevresel etmenlerin osteosarkoma yol açabildiğine dair güçlü kanıtlar yoktur. Ancak kemiği ışınlanmış hastalarda ileri dönemde ikincil osteosarkomlar görülebilmektedir. Alkilleyici ilaçlar da nadiren osteosarkoma yol açabilmektedir. Osteosarkom, osteoid üreten bir tümördür. Klasik tip osteosarkom, osteoblastik (% 50-78), kondroblastik (% 4-25), fibroblastik (% 4) olarak görülür. En sık olarak ağrı (% 90), kemikte şişlik (% 50), hareket kısıtlılığı (% 45) ve patolojik kırık (% 8) görülür. Bazen uzun kemiklerin hızlı büyümesi ve eklem efüzyonu nedeniyle eklem şişliği de görülebilir. En önemli tutulan alanlar yük binen eklem yakın tübüler kemiklerin metafizleridir: Femur distali (% 50), tibia proksimali (% 25) ve humerus proksimali (% 10), fibula proksimali (% 5). Nadiren diafizlerden de tümör başlayabilir. Ülkemizde hastaların çoğunda (% 91) osteosarkom ekstremitelere yerleşmektedir (Kantar, 2007).

Osteosarkom olgularında bilgisayarlı tomografi (BT) yararlı olmakla birlikte, hastaların ayrıntılı değerlendirmesinde (yumuşak doku uzanımı, eklem uzanımı, sinir-damar komşuluğu vs) manyetik rezonans görüntüleme (MRG), özellikle dinamik MRG çok değerlidir. Bu şekilde tüm değerlendirmeleri yapılan hastaya osteosarkom ön tanısıyla tru-cut biyopsi yapılır. Osteosarkom, cerrahi ve kemoterapi ile sağaltılır. İkisi de mutlaka yapılmak zorundadır. Günümüzde izlenen sıra önce kemoterapi (neoadjuvan veya pre-operatif), cerrahi ve sonra tekrar kemoterapi şeklindedir (adjuvan veya post-operatif). Osteosarkomda radyoterapinin sağaltıcı özelliği yoktur. Olabilmesi için 80 Gy ve üzeri dozlar gerekir ki, bu da olası değildir (Kantar, 2007).

### ***U2OS hücreleri ve özellikleri***

U2OS insan osteosarkom hücre hattı p53 ve Rb genlerini eksprese eder ancak p16 geninden yoksundur. Aslında 2T hattı olarak bilinen U2OS hücre hattı, osteosarkom hastalığı olan 15 yaşındaki bir kızın kemik dokusundan kültüre edilmiştir. J. Ponten ve E. Saksela 1964 yılında orjinal hücreleri tibianın başkalaşmış sarkomasından alarak üretmişlerdir. U2OS hücreleri epitele bağlı bir morfoloji sergilerler ve SV40, RSV ya da adenovirüslere karşı uygulanan CF testlerinde ya da WI-38 hücreleriyle kültüre edildiğinde U2OS hücrelerinde virüslere rastlanmamıştır. U2OS hattında mikoplazma kontaminasyonu tespit edilmiş ve 1972 yılında ortadan kaldırılmıştır. Hücreler insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) ve insülin benzeri büyüme faktörü II (IGF-II) reseptörleri için pozitifdir ve kan grubu A, Rh+, HLA A2, Aw30, B12, Bw35, ve B40(+/-)'da dahil olmak üzere birçok antijen eksprese ederler (http-5).

İnsan osteosarkom U2OS hücre hattı ilk üretilen hücre hatlarından biridir ve biyomedikal araştırmaların birçok alanında kullanılmaktadır. Bu hücrelerin protein ekspresyonları ile ilgili bilgiler sınırlıdır ve bu zamana kadar bu hücre hattının protein metabolizmasıyla ilgili kapsamlı bir çalışma bildirilmemiştir. Proteomik teknolojisi U2OS hücre hattının proteinlerini analiz etmek için kullanılmıştır. Sonuçlara göre, 11 tane protoonkogen (FKBP4, SRC8, PSD10, FUBP1, PARK7, NPM, PDIA1, OXRP, SET, TCTP and GRP75) U2OS hücre

hattının kanserli yapısıyla ilişkilendirilmiştir. U2OS 2-DE veritabanını gelecek protein çalışmaları için temel bilgileri içermektedir (Niforou ve ark., 2008).

### **Hücre Kültüründe Sitotoksik Etkilerin Değerlendirilme Yöntemleri**

Bu yöntemler, membran bütünlüğüne dayanan yöntemler ve metabolik aktiviteye dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır. Membran bütünlüğüne dayalı yöntemler, hücrelerin tripan mavisi, naftalin siyahı gibi boyalarla boyanarak, mikroskopta hemositometre ile sayımına dayanan, boya atılım yöntemidir. Diğer bir yöntem ise, Laktat Dehidrogenaz (LDH) salınım testidir. LDH, hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir enzim olup, hücre membran bütünlüğü bozulması sonucunda ortama salınır (Şahin ve ark., 2007).

Metabolik aktiviteye dayalı yöntemler ise, canlı hücrelerin metabolik aktivitelerinin ölü hücrelerden daha fazla olduğu prensibine dayanır. Kültür ortamına tetrazolyum tuzları eklenerek MTT, XTT yöntemi metabolik aktivite ölçümü yapılabilmektedir (Şahin ve ark., 2007).

### ***Mitokondriyal aktiviteye dayalı sitotoksik ölçüm yöntemi (MTT)***

İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan, daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) yöntemi hücrelerin verimlilik, uygulanabilirlik ve aktivasyonunu ölçen hassas, nicel ve güvenilir bir kolorimetrik yöntemdir. Yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine dayanmaktadır. Canlılığı azaltan; fakat öldürmeyen özellikteki, sarı renkli, suda çözünebilir tetrazolium boyası (MTT), hücrelere aktif olarak absorbe olur ve suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazana indirgenir. Formazan miktarı, direk olarak hücre hatlarındaki hücre sayısı ile orantılıdır. Yani; hücrelerin MTT indirgeme özelliği, hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir (Freshney, 2005; Griffiths ve Doyle, 1998).

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Proliferasyon ve hücre aktivasyonu MTT yöntemiyle ayırt edilebilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Üstün tarayıcı özelliğindeki spektrofotometre (micro- ELIZA reader), sayıca çok olan örneklerin yüksek doğruluk derecesiyle okunmasına olanak sağlamaktadır (Yaka ve ark., 2006).

## **Hücre Kültüründe Apoptotik Etkilerin Değerlendirilme Yöntemleri**

Apoptozu saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Apoptoz terimi 1972 yılında, ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Günümüzde ise morfolojik değerlendirmenin yanı sıra, apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn, aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de apoptoz saptanabilmektedir. Bu yöntemler şu şekilde sıralanabilir:

### I. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

#### 1. Işık Mikroskobu

- Hematoksilen Boyama
- Giemsa Boyama

#### 2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop

#### 3. Elektron Mikroskobu

#### 4. Faz Kontrast Mikroskobu

### II. İmmunohistokimyasal yöntemler

#### 1. Anneksin V Yöntemi

#### 2. Tunnel Yöntemi

#### 3. M30 Yöntemi

#### 4. Kaspaz 3 Yöntemi

### III. Biyokimyasal yöntemler

#### 1. Agaroz Jel Elektroforezi

#### 2. Western Blot

#### 3. Akım Sitometri

### IV. İmmunolojik yöntemler

#### 1. ELIZA

#### 2. Florimetrik Yöntem

### V. Moleküler Biyoloji yöntemleri (DNA Microarrays)

Günümüzde pekçok çalışmada bu yöntemlerden bir veya birkaçından birlikte faydalanılmakta ve gerek çeşitli çevresel toksinlerin gerekse birtakım hastalıkların dokulardaki etkisini göstermek amacıyla kullanılmaktadır (Yüksel ve ark., 2009).

### ***Akım sitometri yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi***

Sitometri hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Akım sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir (Taneli, 2007). Akım sitometrisi ile bir süpansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin

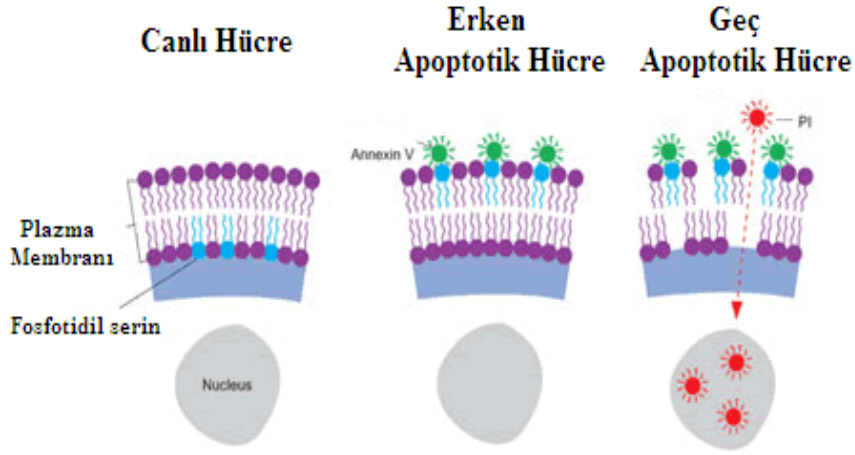
büyükük, granularite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikül immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (Karaboz 2008).

Akım sitometrisi, hücrelerin hücre çapı ile orantılı olarak düşük açıda ileri saçılma yoğunluğunu, hücre içindeki granül sayısı ile orantılı olarak saçılma yoğunluğunu ve birçok dalga boyundaki floresan yoğunluğunu ölçer. Aynı zamanda hücreler arası serbest kalsiyum, zar potansiyeli, pH veya serbest yağ asitlerindeki hızlı değişiklikleri de izleyebilir (Karaboz 2008).

Akım sitometri ışık mikroskopi ile kıyaslanınca çok daha fazla hücreyi daha kısa sürede inceleme fırsatı vermesiyle avantaj sağlamaktadır. Akım sitometrik teknik ile 1 saniyede 500 hücre sayılır ve ortalama 10 000 hücreyi 20 saniyede analiz edebiliriz. Bu analiz hücre süspansiyonunun hazırlanması, hücrelere monoklonal antikor eklenmesi, cihazın kalibrasyonu, kontrol ve örneklerin cihazda çalışılması, veri analizi ve veri yorumu ve raporu aşamalarından oluşur (Taneli, 2007).

Normal hücrelerde, fosfotidil serin (PS) bölgeleri sitoplazmik membranın iç kısmında bulunurlar. Apoptoz sürecinde, PS bölgeleri yer değiştirir ve dış membrana yönelir. Annexin-V, PS bölgelerine bağlanan spesifik bir proteindir ve apoptoz hücrelerini ayırt etmek için kullanılır. Propidium iyodür (PI) ise geç apoptoz (nekroz) olan hücrelerin belirlenmesinde kullanılan bir boyadır. **Şekil 11**'de fosfotidil serinin hücrenin stoplazmik iç membranında olduğu görülmektedir ([http-11](http://11)). Hücre erken apoptoza gittiğinde fosfotidil serin bölgeleri hücrenin dış kısmına geçmekte ve Annexin-V proteini tarafından tanınmaktadır. En sağdaki şekilde ise hücreler geç apoptoza gittiğinde (nekroza) ;yani iyice zarar gördüklerinde PI boyası hücre içine girebilmekte ve nekrotik hücreleri bu şekilde işaretlemektedir. Bu çalışmada kullanılan kit Annexin-V –PI kitidir. Yani nekrotik ve apoptotik hücreler belirlenmektedir. FITC (floresanizosiyanat), Annexin V proteine bağlı olan ve apoptoza uğrayan hücreleri akış sitometrisindeki lazer yardımıyla sayılmasını sağlayan floresan özellikte bir boyadır. PI ise dış koşullar nedeniyle parçalanmış hücreleri boyayan bir boyadır. Apoptoza uğrayan hücreler Annexin V-FITC boyası ile boyanır ve akış sitometrisinde hücre popülasyonundaki erken apoptoza uğrayan hücrelerin sayısı belirlenir (Q4), nekroza uğramış hücreler PI boyası ile boyanır ve akış sitometrisinde nekrotik hücrelerin sayısı belirlenir (Q1), Annexin V-FITC ve PI boyaları birlikte hücreleri boyarsa akış sitometrisinde hücrelerin apoptoza ve sonra nekroza uğradığı gösteren geç apoptoz değeri belirlenir (Q2) ve her iki boyanın da bağlanmadığı hücreler ile sağlıklı hücre sayısı belirlenmektedir (Q3) ([http-10](http://10)).





Şekil 11. Hücrelerde Eken ve Geç Apoptoz

### Bitkilerde Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Yöntemler

Fenolik maddeler, bitki türlerini tanımlama ve sınıflandırma amacıyla kemotaksonomik çalışmalarda kullanılmaktadır (Nayir, 2008).

Bitkinin fenolik madde konsantrasyonu Folin-Ciocalteu yöntemiyle gallik asite eşdeğer olarak tayin edilmektedir (Tekeli, 2008).

Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek vücudun onlardan etkilenmemesini veya kendini yenilemesini sağlar. Yani, oksijen ile reaksiyona girerek gıdalar içindeki olumsuz etkileri engelleyen maddeler olarak tanımlanabilirler. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC)' nun tanımında ise antioksidanlar gıdada yağın acılaşması ve renk değişimleri gibi oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatan maddeler olarak ifade edilmektedir. Pek çok gıda maddesinin bozulmasının önemli bir kaynağının oksijen olduğu bilinmektedir. Bitki dokularında gerçekleşen oksidatif bozulmalar yağların parçalanmasına, acılaşmaya, kötü tat ve kokuların oluşmasına ve ürünün raf ömrü ve besin değerini azaltan diğer reaksiyonlara neden olur. Antioksidan kullanımı ile bu tür reaksiyonların oluşması engellenmektedir. Ayrıca gıdaların raf ömürleri uzatılırken besin ögesi kayıpları da azaltılmaktadır (Demiray ve Tülek, 2008).

Antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi için ise birçok *in vitro* ve *in vivo* metod geliştirilmiştir. Bunun yanında, tek bir antioksidanın antioksidan kapasitesini tam olarak belirleyici bir sistem bulunmamaktadır. Doğal antioksidanların çoğu bitkilerden elde edilmekte olup, yüksek bitkilerde genellikle fenolik ve polifenolik bileşikler olarak bulunmaktadırlar (Shahidi, 2000). Doğal antioksidanlar; indirgeyici ajanlar, serbest radikal süpürücüler, prooksidan metallerin kompleks oluşumunu engelleyiciler ve singlet oksijen oluşumunu önleyiciler olarak etki etmektedirler (Pratt, 1992).

#### **DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini**

Genel olarak, kimyasal maddelerin elektron verme yetenekleri lipid oksidasyona karşı gösterdikleri antioksidan aktivitelerinin sonucudur. DPPH serbest radikal

süpürücü etki tayini; hidrojen verme potansiyelinin araştırılması için en kısa, en ucuz yöntemlerden birisidir (Kikuzaki ve ark. 2002). Oksidasyona sebep olan serbest radikalleri ortamdan süpürme veya etkisiz kılma kapasitesi bu yöntemle belirlenebilmektedir (Tekeli, 2008).

Doğadaki birçok radikal iyonu değişik kimyasal reaksiyonlarla bazı bileşikler tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Kararlı bir organik radikal olan DPPH farklı bitki ekstreleri gibi bileşiklerin antioksidan aktivitesini belirlemede kullanılmaktadır. Son zamanlarda DPPH yöntemi sonuçlarını yorumlamak için etkin konsantrasyon veya EC<sub>50</sub> ifadesi (diğer deyimle inhibisyon konsantrasyonu, IC<sub>50</sub> değeri) kullanılmaktadır. Bu, DPPH aktivitesinin % 50 kaybına neden olan substrat konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır (Brand-Williams ve ark., 1995). Dolayısıyla; en düşük IC<sub>50</sub> değeri en yüksek antioksidan aktivitenin göstergesidir.

#### ***β-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini***

Vücutta depolanarak A vitaminine de dönüştürülen, kırmızımsı turuncu bir pigment olan β-karoten çok güçlü bir antioksidandır (Nayir, 2008).

β-karoten-linoleik asit yöntemi, emülsiyondaki linoleik asit oksidasyonu sonucu oluşan radikallerin, β-karoten'le reaksiyonundan oluşan sarı rengin, zaman içerisinde kaybolmasına dayanmaktadır. Antioksidan madde varlığı rengin açılmasını önlemektedir. β-karoten-linoleik asit sisteminde test süresi olan 3 saat boyunca β-karotenin solmasının önlenmesi yüksek potansiyel antioksidan aktivitenin varlığını göstermektedir (Kulisic ve ark., 2004).

## GEREÇLER

### Kullanılan Kimyasal Maddeler

Absolü etanol (Riedel-de Haen,Almanya); aneksin V-PI apoptoz kiti (Millipore, U.S.A); asetik asit (Sigma-Aldrich, Fransa); asit fuksin solüsyonu (Sigma-Aldrich, U.S.A); BHT (Sigma – Aldrich, Fransa); borik asit (Applichem, Almanya);  $\beta$ -karoten (Sigma–Aldrich,Fransa); kateşin (Sigma–Aldrich, Fransa); dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma–Aldrich, Fransa); DPPH (2.2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich, Fransa); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) (Sigma-Aldrich, Fransa); etidyum bromid (Applichem, Almanya); etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma–Aldrich, U.S.A); entellan (Merck, Almanya); Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya); Folin Ciocaltaeu reaktifi (Sigma-Aldrich, Almanya); fosfomolibdik asit (Merck, Darmstadt, Almanya); gallik asit (Sigma-Aldrich, U.S.A); glasiyel asetik asit (Merck, Almanya); hematoksin (Merck, Almanya); kloroform (Merck, U.S.A); L-glutamin (Sigma-Aldrich, Almanya); linoleik asit (Sigma-Aldrich, Almanya); metanol (Merck, U.S.A); metilen mavisi (Merck, Darmstadt, Almanya); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) (Sigma-Aldrich, Almanya); penisilin-streptomisin solüsyonu (Biochrom, Almanya); potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck, U.S.A); Roswell Park Memorial İnstitute medyum (RPMI-1640) (Sigma - Aldrich, Almanya); sodyum karbonat (Merck, U.S.A); sodyum bikarbonat (Merck, U.S.A); sodyum dihidrojen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck, U.S.A); sodyum hidroksit (Reidel deHaen, Almanya); sodyum klorür (Merck, U.S.A); sodyum piruvat (Biochrom, Almanya); TEKA (*Centella asiatica* ekstresi) (Bayer Kimya Sanayi, İstanbul, Türkiye); tripan mavisi solüsyonu (Biological industries, Kanada); tripsin (Sigma-Aldrich,U.S.A); tween 80 (Merck, U.S.A).

### Kullanılan Araç ve Gereçler

Armudi balon (50 ml) (İldam); balon joje (10, 25, 100, 250 ml) (İldam); beher (250 ml) (İldam); borosilikat vial (Cole Parmer); buzdolabı (Arçelik, Türkiye);  $\text{CO}_2$ 'li etüv (Hera Cell 240 Thermo Scientific, Almanya); derin dondurucu (-20 °C) (Vestel No Frost, Türkiye); ELIZA cihazı (Bio.Tek. ELx808IU); etüv (Venticell, Almanya); filtre (0,22  $\mu\text{M}$  milipor) (TRP- Almanya); akım sitometri (BD FACSAria™, Kanada); hassas terazi (Ohaus, İsviçre); hücre kültür flaskı (25  $\text{cm}^2$ -75  $\text{cm}^2$  lik) (TRP. Almanya); inverted mikroskop (Leica); kriyotüp (2ml) (TRP, İsviçre); kültür plakası (6 ve 96 kuyucuklu) (TRP, İsviçre); laminar kabin (Steril Kabin) (Heal Force®, Çin); liyofilizatör (Leybold-Heraeus Lyovac GT-2); manyetik karıştırıcı (İsolab, Almanya); mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye); mezür (50 ml'lik, 100ml'lik, 500ml'lik, 1000ml'lik) (Isolab, Almanya); mikropipet ucu (silikonlu 10, 200, 1000  $\mu\text{l}$ ) (Eppendorf); neubauer lamı (Marienfeld, Almanya); otoklav (ALP); otoklavlanabilen kültür şişeleri (Isolab, Almanya); parafilm (Menasha, Amerika); pH metre (Merck, Almanya); rotavapor (Buchi-R114); rotavapor Balonu (İldam); santrifüj tüpleri (15, 50 ml) (TRP, Almanya); santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Almanya); şarjlı Pipet (Isolab, Almanya); sterilizatör (Nüve FN 500, Türkiye); soxhlet ekstraktörü (Merck, U.S.A); spektrofotometre küveti (S-10SM 1 ml Quartz); su banyosu (Nüve BM 302, Türkiye); tek kullanımlık dereceli pipet (5-10-25ml) (HBG, Almanya); ultrasonik banyo (J.P. Selecta); UV-visible Spektrofotometre (Shimadzu 160A); vorteks (Heidolph, Almanya); 12 kanallı otomatik pipet (Eppendorf, Kanada).

## YÖNTEMLER

Çalışmada kullanılan ekstreler, Trabzon Sürmene'den toplanmış olan *Camellia sinensis* yaprakları ile marketten satın alınan (ticari) yeşil çaydan hazırlanmıştır. Yara iyileştirici aktivite için Farmakoloji Laboratuvarımızın NIH 3T3 fare fibroblast hücreleri (ATCC numarası: 1658) kullanılmıştır. Antikanser etkinin araştırıldığı U2OS hücre dizisi (ATCC numarası: HTB-96<sup>TM</sup>), Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zerrin İncesu'dan, TEKA (*Centella asiatica* ekstresi) ise Bayer Kimya Sanayi (Türkiye) tarafından temin edilmiştir.

### Ekstraksiyon Metodu

#### *Metanol ekstraksiyonu*

Trabzon Sürmene'den toplatılan *Camellia sinensis* yaprakları yaş olarak temin edilmiştir.

Taze *C. sinensis* yapraklarının bir kısmına,

- 100-110 °C'de 3 dakika buhar verilmiştir. Bu işlemin amacı polifenoloksidaz enzimi başta olmak üzere tüm oksidasyon enzimlerini inaktive etmektir..
- Buhar verme işleminden sonra yapraklar 20°C'de hızlı bir şekilde soğutulmuştur. Bu işlem, şoklanmış yaprakların soğutulması ve yüzeylerindeki suyun kısmen buharlaştırılması amacıyla yapılmıştır.
- 60-70 °C sıcaklıkta 15-20 dakika süre ile kurutma işlemi uygulanmıştır.
- Kurutulan *C. sinensis* yaprakları küçük parçacıklar halinde ufalanmış ve ekstraksiyon için hazırlanmıştır.
- Kuru *C. sinensis*'in tam tartımı alınmış, filtre kağıdından yapılmış kartuşa konmuş ve metanol ile 1 gece maserasyona bırakılmıştır. Ertesi gün 100 °C'lik su banyosunda 8 saat süreyle Soxhlet cihazında ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ekstreye, **işlenmiş *Camellia sinensis* metanol (işlenmiş yeşil çay-metanol ekstresi = İYÇ-Me) ekstresi** adı verilmiştir<sup>(1)</sup>.

Taze *C. sinensis* yapraklarının diğer bir kısmı oda sıcaklığında, karanlıkta oda sıcaklığında kurutulmuş, ufalanmıştır. Tam olarak tartımı alınan kuru *C. sinensis* numunesi aynı şekilde 1 gece maserasyona bırakılmış, ertesi gün 100 °C'lik su banyosunda 8 saat süreyle ekstre edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ekstreye, **işlenmemiş *Camellia sinensis* metanol (işlenmemiş yeşil çay-metanol ekstresi = YÇ-Me) ekstresi** adı verilmiştir<sup>(1)</sup>.

*Camellia sinensis*'den hazırlanmış olup; özel bir firmanın piyasaya sunduğu, paket halde marketten satın alınan kuru haldeki yeşil çay örneğinin yine tam olarak tartımı yapılmış ve 1 gece maserasyondan sonra, ertesi gün 100 °C'lik su banyosunda 8 saat süreyle Soxhlet cihazında ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ekstreye, **satın alınmış yeşil çay-metanol = SYÇ-Me ekstresi** adı verilmiştir<sup>(1)</sup>.

---

<sup>(1)</sup> *Camellia sinensis* metanol ekstreleri: İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me'dir.

### ***İnfüzyonların hazırlanması***

Birçok farmakopeye göre infüzyonlar 2 gr kuru bitkisel materyalin 100 ml sıcak suda 5-10 dakika demlenmesi ile hazırlanır. Bu çalışmada da yukarıda bahsedilen, kuru haldeki 3 örneğin her birinden 2 gr tartılarak, üzerine 100 ml kaynamış su ilave edilmiş ve 30 dakika kaynar su banyosunda bekletildikten sonra sıcakken süzümüştür. Süzüntü derin dondurucuda dondurularak, liyofilize edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan infüzyonlar: **işlenmiş *Camellia sinensis* infüzyon (işlenmiş yeşil çay-infüzyon = İYÇ-inf)**, **işlenmemiş *Camellia sinensis* infüzyon (işlenmemiş yeşil çay-infüzyon = YÇ-inf)**, **satın alınmış yeşil çay-infüzyon = SYÇ-inf<sup>(2)</sup>** 'dir.

### **Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini**

Ekstreler içindeki toplam fenol miktarları Folin-Ciocaltaeu Metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asit % 50 lik metanolde çözülmüştür. 0.5 ml örnek, 2.5 ml Folin-Ciocaltaeu reaktifi (% 10'luk, h/h, suda) ve 7.5 ml sodyum karbonat çözeltisi (% 20'lik, a/h, suda) deney tüpünde karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözeltilerin absorbans değerleri 750 nm'de spektrofotometrede okunmuş, toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

### **Antioksidan Aktivite Tayini**

#### ***DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki***

*Camellia sinensis* ekstrelerinin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH\*) üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno ve arkadaşları (1998) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır.

Metanol içerisinde hazırlanmış 0.1, 0.2 ve 0.4 ml örnek çözeltileri (reaksiyon ortamındaki örnek konsantrasyonları  $9.6 \times 10^{-4}$ - $3.6 \times 10^{-3}$  mg/ml) üzerine metanolde hazırlanmış 3 ml DPPH ( $2 \times 10^{-2}$  g/L) çözeltisi ilave edilerek vorteksde 30 sn karıştırılmış ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen çözeltilerin 517 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiş, serbest radikal süpürücü etki (Antioksidan İndeks) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol absorbansı} - \text{Örneğin absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}} \times 100$$

Radikal süpürücü etki konsantrasyona karşı korele edilmiş ve her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmış, referans madde olarak BHT kullanılmıştır.

---

<sup>(2)</sup> *Camellia sinensis* infüzyon ekstreleri: İYÇ-inf, YÇ-inf, SYÇ-inf'dir.

### ***β-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini***

Bu yöntem, β-karoten ve linoleik asit sulu emülsiyon sisteminde ısı yardımıyla oksidasyonunun indüklenmesi esasına dayanmaktadır (Koleva ve ark., 2002).

Kuru bir kaba tartılan 40 mg linoleik asit ve 400 mg Tween 80 ile β-karoten çözeltisinin tamamı (3 mg/ml kloroformda) vorteksde iyice karıştırılmış, kloroform alçak basınç altında 40°C'de rotavaporda ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bakiye oksijenlenmiş su ile emülsifiye edilerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Portakal renkli bu stok çözelti deneyler sırasında karanlıkta saklanmıştır. 3 ml β-karoten çözeltisi içerisine 0.2 ml numune çözeltisi (0.6 mg/ml konsantrasyonda) ilave edilerek vorteksde iyice karıştırılmış, herbir numune çözeltisi (0.2 ml) mikropiplara yerleştirilerek işlem sırasında 40°C'de etüvde tutulmuş ve 15 dakika aralıklarla 490 nm de mikropipla okuyucuda absorbansları ölçülmüştür. Herbir deney 3 kez tekrarlanmış, antioksidan aktivite ekstre veya BHT ilave edilmeksizin kontrole karşı oksidasyonun inhibisyon yüzdesi olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar sentetik antioksidan BHT'nin sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak metanol kullanılmıştır.

$$\% \text{ Antioksidan aktivite} = 100 \times [1 - (As^0 - As^{180}) / (Ak^0 - Ak^{180})]$$

$As^0$  = örneğin başlangıçtaki absorbansı (490 nm)

$As^{180}$  = örneğin 180 dakika sonraki absorbansı (490 nm)

$Ak^0$  = kontrolün başlangıçtaki absorbansı (490 nm)

$Ak^{180}$  = kontrolün 180 dakika sonraki absorbansı (490 nm)

### **NIH 3T3 Fare Fibroblast ve U2OS İnsan Osteosarkom Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık**

Tez çalışması süresinde deneylerde kullanılmak üzere NIH 3T3 hücre dizisi, içinde % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin, % 1 L-glutamin içeren DMEM besiyerinde, % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de süspansiyon kültür ortamında çoğaltılmıştır. Aynı şekilde U2OS hücre dizisi de, içinde % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin, % 1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyerinde, % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37° C'de süspansiyon kültür ortamında çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı stoklanarak tez çalışmasının sonraki deneyleri için depolanmıştır.

**Hücreleri stoklama:** Hücreler, PBS ve PBS-EDTA ile yıkandıktan sonra, 1 x tripsin EDTA yardımıyla kaldırılarak, santrifüj tüpü (falkon) içerisine aktarılmış, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pelet üzerine her bir kriyotüp (vial) için 1800 µl hücre besiyeri konularak, elde edilen bu hücre-besiyeri karışımı 30 dakika kuru buz üzerinde bekletilmiştir. 30 dakika sonrasında, hazırlanacak vial miktarına göre, her bir vial için 200 µl DMSO çözeltisi ilave edilmiş ve homojen bir karışım elde edene dek pipetleme yapılmıştır. Hücre, besiyeri ve DMSO çözeltisi karışımından her bir vialde 2 ml aktarılmış ve vialler -20 °C'ye kaldırılmıştır. 3-4 saat sonrasında vialler sıvı azot tankına (-196° C) yerleştirilerek, stoklama işlemi tamamlanmıştır.

**Stoktan hücre çıkarma:** Azot tankından (-196 °C) çıkarılan NIH 3T3 ve U2OS hücrelerini içeren vialler, hızla eritildikten sonra, içinde 5 ml besiyeri bulunan santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri, 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, pelet üzerine 5-10 ml besiyeri eklenmiştir. Elde edilen besiyeri-hücre karışımı otomatik pipet yardımıyla, santrifüj tüpünden alınarak, hücre kültür kaplarına aktarılmış ve 37 °C'de, % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde, inkübasyona bırakılmıştır.

**NIH 3T3 ve U2OS hücre dizilerinin pasajlanması:** Hücre kültür kaplarındaki kirlenmiş vaziyetteki hücre besiyerleri pipet yardımıyla atılmış ve kültür kabına yapışmış olan hücreler öncelikle PBS (1lt distile su için: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) yardımıyla, sonra PBS-EDTA (1lt distile su için: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.372 g EDTA) ile yıkanmıştır. Kültür kabının büyüklüğüne ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak, 250-450 µl 1 x tripsin EDTA konmuş, bir iki dakika etüvde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan hücrelerin üzerine hemen besiyeri ilave edilerek, besiyeri-hücre karışımı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj sonrasında, pelet üzerine kullanılan hücre kültür kabının büyüklüğüne göre 25 cm<sup>2</sup>'lik ise 8-15 ml besiyeri, 75 cm<sup>2</sup>'lik ise 12-20 ml besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. Santrifüj tüpünde homojen olarak dağılan hücreler, pipet yardımıyla hücre kültür kaplarına paylaştırılmıştır.

#### **Yara iyileştirici etkinin araştırılması için konsantrasyonların hazırlanması**

İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf ekstraları DMSO'da çözülerek stok solüsyonları hazırlanmıştır. Bu stok solüsyonlar hücre besiyerinde seyreltme işlemlerinden geçerek, altı ekstrelerin de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2.5 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonları hazırlanmıştır. Maddeleri DMSO'da çözdüğümüz için, çalışmalarda normal kontrol grubu (besiyeri kullanılan) haricinde DMSO-kontrol (1 ml besiyeri içinde 0.001 ml DMSO) grubu da oluşturulmuştur. Konsantrasyonların seyreltilmesi işleminde, en yüksek konsantrasyonda, DMSO oranının % 0.1 olmasına dikkat edilmiştir.

*Camellia sinensis* ekstralarının yara iyileştirici etkilerini karşılaştırmak amacıyla hazırlanan TEKA (*Centella asiatica*) ekstre konsantrasyonları ise 0.5, 1, 5, 10, 20 ve 40 µg/ml olarak çalışılmıştır.

#### **NIH 3T3 hücrelerinde yara iyileştirici aktivite öncesi, ekstraların sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi**

##### **Mitokondriyal aktivite testi (MTT)**

Neubauer lamında sayımları yapılan ve  $3 \times 10^4$  hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan NIH 3T3 hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına, her kuyucukta 100 µl olacak şekilde aktarılmış ve ekstraların konsantrasyonları hücrelere verilmeden önce, kültür plakalarındaki hücreler % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37° C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf ekstraları ve TEKA için ayrı ayrı hücre kültür plakaları hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için, 8 plaka kuyucuğu kullanılacak şekilde konsantrasyonlar verilmiştir. Yine her madde için, hücre içeren 8 kuyucuğa besiyeri ve 8 kuyucuğa da % 0.1 oranında DMSO içeren

besiyeri verilmiştir. Kontrol, DMSO-kontrol ve madde konsantrasyonlarını içeren hücre kültür plakaları % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde, 37° C'de, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır.

Her bir inkübasyon süresi sonunda, plakalardaki besiyeri uzaklaştırılarak, kültür besiyeri ile taze olarak hazırlanmış MTT çalışma solüsyonundan, plakaların her bir kuyucuğuna 100 µl ilave edilmiş ve plakalar 3-4 saat 37°C lik etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda NIH 3T3 hücrelerini içeren kuyucuklardaki MTT solüsyonu dökülmüş ve her bir kuyucuğa 100 µl DMSO konularak, plakalardaki hücrelerin optik yoğunlukları (dansiteleri) mikropilaka okuyucu cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu testte her maddenin 3 tekrarı alınmıştır. MTT boyası ışıktan bozulduğu için deneyde MTT boya ilavesi ve sonraki aşamalarının karanlıkta yapılmasına dikkat edilmiştir (Alkan, 2009; Hatok ve ark., 2009).

### ***Yara iyileştirici aktivitenin değerlendirilmesi***

#### *NIH 3T3 hücrelerinin sayımı, ekimi ve konsantrasyonlarının uygulanması*

5x10<sup>5</sup> hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan NIH 3T3 hücre süspansiyonu, 6 kuyucuklu hücre kültür plakalarındaki streil lameller üzerine 1 ml olacak şekilde aktarılmış ve plakalardaki hücreler % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37° C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf ekstreleri ve TEKA için hazırlanan her bir konsantrasyon ve yine saf besiyeri ile % 0.1 oranında DMSO içeren besiyeri 6'lı plaka kuyucuklarına verilmiştir. Kontrol, DMSO-kontrol ve madde konsantrasyonlarını içeren hücre kültür plakaları % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde, 37 °C'de, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır.

İnkübasyon süreleri sonrasında, hücrelerin üzerlerindeki besiyeri boşaltılmıştır. Bu işlem ve sonraki aşamalarda steril kabin kullanılmamıştır.

#### *Masson's Trichrome tekniği ile yara iyileştirici aktivitenin değerlendirilmesi*

##### *I. Hücrelerin fiksasyonu ve Masson's Trichrome boyama yöntemi*

Üzerlerindeki besiyerleri alınmış olan lamellerdeki hücreler % 70'lik alkolde 15 dakika tutularak fikse edilmiştir. Sonrasında kaybettikleri suyu kazanmaları için 5-10 dakika distile suda tutulmuş ve daha sonra boyama işlemine geçilmiştir.

Fikse edilmiş preparatlar, hücre çekirdeklerinin boyanması için 5 dakika hematoksilende tutulmuştur. % 1 HCl - % 70 alkol karışımı ile hematoksilin boyası uzaklaştırıldıktan sonra lameller distile su ile yıkanmıştır. Sitoplazmanın boyanması için asit fuksin solüsyonu ile 5 dakika muamele edildikten sonra yine distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. % 1'lik fosfomolibdik asit solüsyonuyla 5 dakika muamele edilerek, süzdürülmüş ve böylece metilen mavisi ile boyamaya zemin hazırlanmıştır. Kollajen granüllerinin açığa çıkması için metilen mavisi boyası ile 2-5 dakika boyama gerçekleştirilmiştir. Distile su ile yıkama işleminden sonra glasiyel asetik asit solüsyonu ile 2 dakika muamele edilmiştir. % 70'lik alkolle kurutulmuştur. Temiz lamın üzerine bir damla entellan damlatılarak, lamellerin hücreli tarafları arada kalacak şekilde kapatılmıştır ve sabit preparat haline getirilmiştir. Bu boyama tekniği ile nükleus mavi, sitoplazma kırmızı, kollajen mavi-gri renklerde görülmektedir (Korkmaz, 1996; Öztürk ve ark., 2006; Öztürk ve ark., 2007).



## *II. Preparatların hücre morfolojisi ve sayımları yönünden değerlendirilmesi*

Hazırlanan sabit preparatlardaki hücrelerin morfolojik açıdan; fusiform, poligonal, vakuollü ve yuvarlak olarak 40X objektifte, en az 5 değişik alanda sayımı yapılırken; mitozaya giren hücreler 40X objektifte, 10 farklı alanda; kollajen granülü içeren hücreler ise 40X objektifte, 20 farklı alanda sayılmıştır. Alınan değerler sonrasında; toplam hücre, mitozaya giden hücre sayıları hariç diğer parametreler % olarak hesaplanmıştır.

### ***U2OS hücrelerinde sitotoksik etkilenin değerlendirilmesi***

#### *Mitokondriyal aktivite testi (MTT)*

NIH 3T3 hücrelerinde olduğu gibi U2OS hücreleri de  $3 \times 10^4$  hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına 100 µl ekilmiştir. Ertesi gün, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf ekstraları için 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml ve kateşin için 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 µM konsantrasyonların verildiği plakalar 24 ve 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonrasında, plakalardaki besiyerleri uzaklaştırılarak, her bir kuyucuğa 100 µl MTT çalışma solüsyonu ilave edilmiş ve karbondioksit inkübatöründe 3-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda alınan plakaların besiyerleri uzaklaştırılmış ve 100 µl DMSO ilave edilerek, plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELİZA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Yine bu test her ekstre için 3 kez tekrar edilmiştir.

### ***U2OS hücrelerinde apoptotik etkilenin değerlendirilmesi***

#### *Annexin V - FITC/PI ile hücre akım sitometrisinde apoptotik etkinin saptanması*

Apoptotik etkinin saptanmasında, hücre membran yüzeyinde ortaya çıkan değişikliklere göre, apoptotik hücrelerin ayrımını hücre akım sitometri cihazında belirleme özelliğine sahip olan ApopNexin™ FITC Apoptoz belirleme kiti kullanılmıştır. Bu kit, apoptoz olayında hücre membran yüzeyindeki biyokimyasal değişiklikleri algılamaktadır (Alkan, 2009).

U2OS hücre süspansiyonu 6 kuyucuklu hücre plakalarına  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir. Hücre süspansiyonu içeren plakalar % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37° C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonrasında, hücreler kuyulardan kaldırılarak, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatant atılıp, pelet üzerine 3 ml soğuk PBS konarak, tekrar santrifüj edilmiş ve bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrası, pelet üzerine 100 µl bağlanma solüsyonu konulmuştur. Bağlanma solüsyonu-hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak, 3 µl Anneksin ve 2µl PI bulunan flow tüpüne aktarılmış ve vortekslenmiştir. Bu karışım 15 dakika karanlıkta bekletilip, üzerine 400 µl bağlayıcı tampon ilave edilerek, hafifçe çalkalanmış ve akım sitometre cihazında belirlenen dalga boyunda 10 000 hücre olacak şekilde sayılmıştır (Alkan, 2009).

### **İstatistiksel Analizler**

Tüm sonuçlar, SPSS 13.0-Statistical data modeling tool (Statistic Program for Social and Science) yazılım programında ‘ortalama  $\pm$  S.E (Standart hata)’ olarak hesaplanmıştır. MTT absorbans ve yara iyileştirici morfometrik sayım değerleri, tek yönlü ANOVA ve post-hoc olarak Tukey’s b sonuçları ile analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri;  $p>0,05$  fark yok,  $p<0,05^*$  fark var,  $p<0,01^{**}$  önemli derecede fark var,  $p<0,001^{***}$  çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

Apoptotik etki hücre akım sitometri cihazından elde edilen analiz sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Toplam Fenolik Madde İçeriği

*Camellia sinensis* ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak gallik asit üzerinden değerlendirilmiştir. Sonuçlar ve ekstraktların kuru baz üzerinden % verimleri **Çizelge 7**'de verilmiştir.

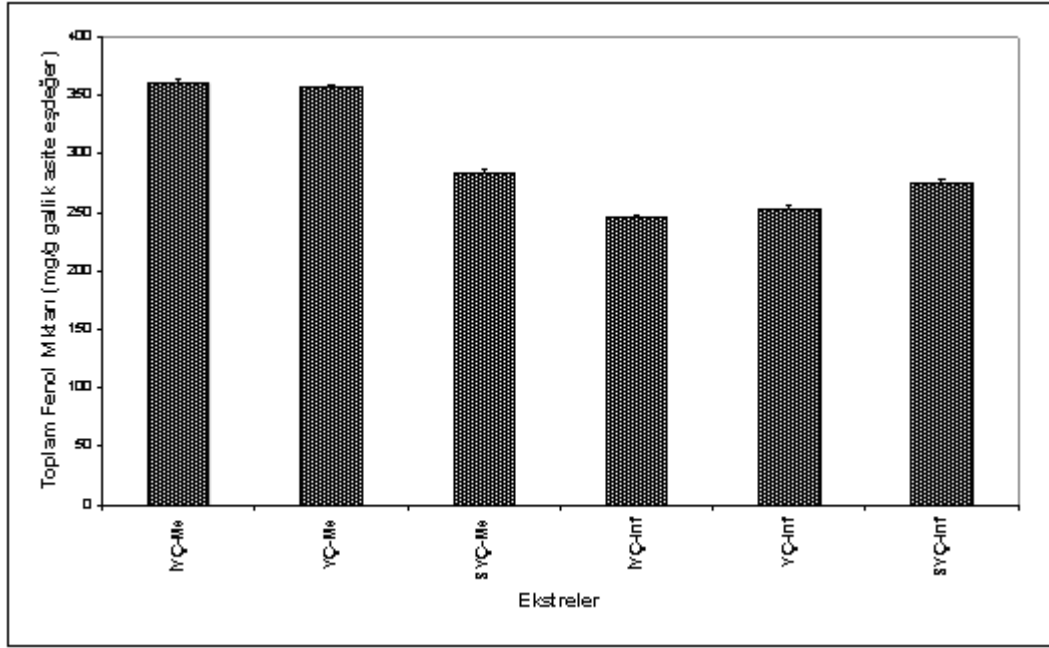
**Çizelge 7. *Camellia sinensis* Ekstrelerinin % Verimleri, Toplam Fenolik Madde Miktarları (mg/g)**

Ekstreler	Ekstraksiyon Verimi (%)	Toplam Fenolik Madde Miktarı <sup>1,*</sup>
İYÇ-Me	36.75	360.70±3.64
YÇ-Me	21.60	357.81±2.17
SYÇ-Me	29.49	283.63±2.76
İYÇ-inf	39.98	246.37±1.75
YÇ-inf	19.27	253.61±3.06
SYÇ-inf	31.50	275.27±2.76

<sup>1</sup> mg/gram ±SD, \* gallik asite eşdeğer

Tez kapsamında çalışılan *C. sinensis*'den hazırlanan ekstraktların çözünen madde miktarları kuru baz üzerinden % verim olarak hesaplanmıştır. Ekstraksiyon verimleri %19.27 (YÇ-inf) ile %39.98 (İYÇ-inf) arasında değişmektedir.

*C. sinensis* yapraklarından ve satın alınmış yeşil çaydan hazırladığımız infüzyon ve metanol ekstraktlarına ait toplam fenol içeriği gram ekstrede mg gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. **Çizelge 7**'de görüldüğü gibi *C. sinensis* yapraklarından ve satın alınmış yeşil çay'dan metanol ile hazırlanan ham ekstraktların toplam fenol miktarlarında infüzyonlara oranla oldukça belirgin bir artış gözlenmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla, İYÇ-inf < YÇ-inf < SYÇ-inf < SYÇ-Me < YÇ-Me < İYÇ-Me olarak artış göstermiştir (**Şekil 12**).



Şekil 12. *Camellia sinensis* Ekstrelerinin Toplam Fenolik Madde Miktarları (mg/g) (Ortalama Değer±Standart Sapma)

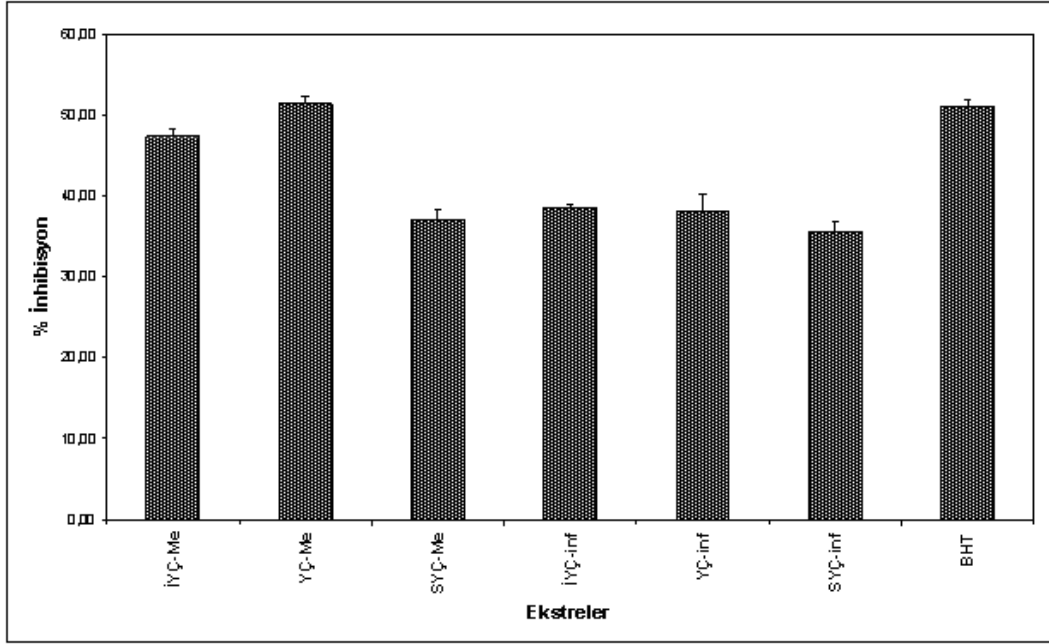
### DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

*Camellia sinensis* yaprakları ve satın alınmış yeşil çayın infüzyon ve metanollü ekstrelerinin serbest radikal süpürücü etkileri DPPH' (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikali üzerinden tayin edilmiştir (Sanchez-Moreno ve ark., 1998). Sonuçlar test edilen konsantrasyonlarda % inhibisyon olarak değerlendirilmiş ve standart antioksidan BHT'nin değerleriyle karşılaştırılmıştır. Örneklerin serbest radikal süpürücü etkileri Çizelge 8'de verilmiştir.

Çizelge 8. *Camellia sinensis* Ekstrelerinin % İnhibisyon Değerleri

Ekstreler	% İnhibisyon
İYÇ-Me	47.30±0.95
YÇ-Me	51.36±0.98
SYÇ-Me	37.06±1.30
İYÇ-inf	38.45±0.48
YÇ-inf	38.11±1.99
SYÇ-inf	35.55±1.30
BHT	51.08±0.67

Sonuçlar ortalama değer±standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.



Şekil 13. *Camellia sinensis* Ekstrelerinin Serbest Radikal Süpürücü Etkileri

Çizelge 8 ve Şekil 13’de de görüldüğü gibi *Camellia sinensis*’den hazırlanan metanollü ekstrelerin serbest radikal süpürücü etkileri, infüzyonlarına göre daha fazladır. Metanollü ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları da yüksek olduğu için (Çizelge 7), söz konusu ekstrelerde anti-radikal etkinlik yüksek bulunmuştur.

#### β-Karoten Linoleik Asit Sisteminde Antioksidan Aktivite Tayini

Bu yöntem, emülsiyondaki linoleik asit oksidasyonu sonucu oluşan radikallerin β-karotenle reaksiyonundan oluşan sarı rengin zaman içerisinde kaybolmasına dayanmaktadır. Antioksidan madde varlığı rengin açılmasını önlemektedir (Kulisic ve ark., 2004). β-karoten-linoleik asit sisteminde test süresi olan 3 saat boyunca β-karotenin solmasının önlenmesi yüksek potansiyel antioksidan aktivitenin varlığını göstermektedir.

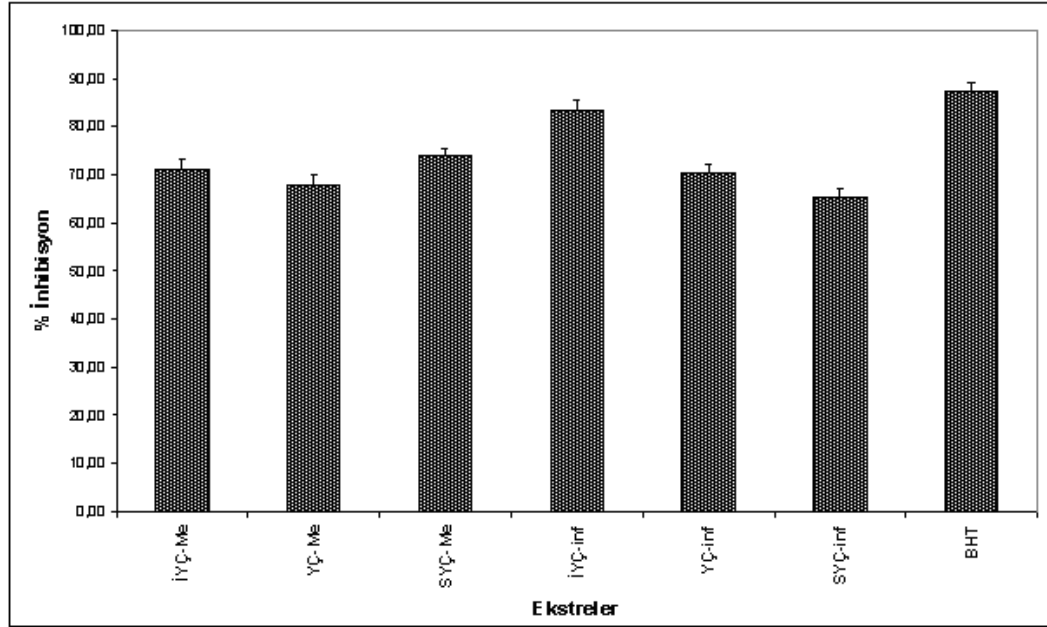
*C. sinensis* ekstreleri β-karoten-linoleik asit sisteminde test edilmiştir. Çalışılan ekstrelerde saptanmış % antioksidan aktivite değerleri SYÇ-inf < YÇ-Me < YÇ-inf < İYÇ-Me < SYÇ-Me < İYÇ-inf şeklinde artmaktadır (Çizelge 9, Şekil 14).

**Çizelge 9. *Camellia sinensis* Ekstrelerinin  $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Sisteminde % Antioksidan Aktivite Değerleri**

Ekstreler	AA (%) <sup>1</sup>
İYÇ-Me	71.07±2.06
YÇ-Me	67.77±2.35
SYÇ-Me	73.90±1.56
İYÇ-inf	83.33±2.22
YÇ-inf	70.44±1.78
SYÇ-inf	65.41±1.59
BHT	87.11 ± 2.06

$$^1\% \text{ İnhibisyon} = 100 \times [1 - (A_s^0 - A_s^{180}) / (A_k^0 - A_k^{180})]$$

Sonuçlar ortalama değer±standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.



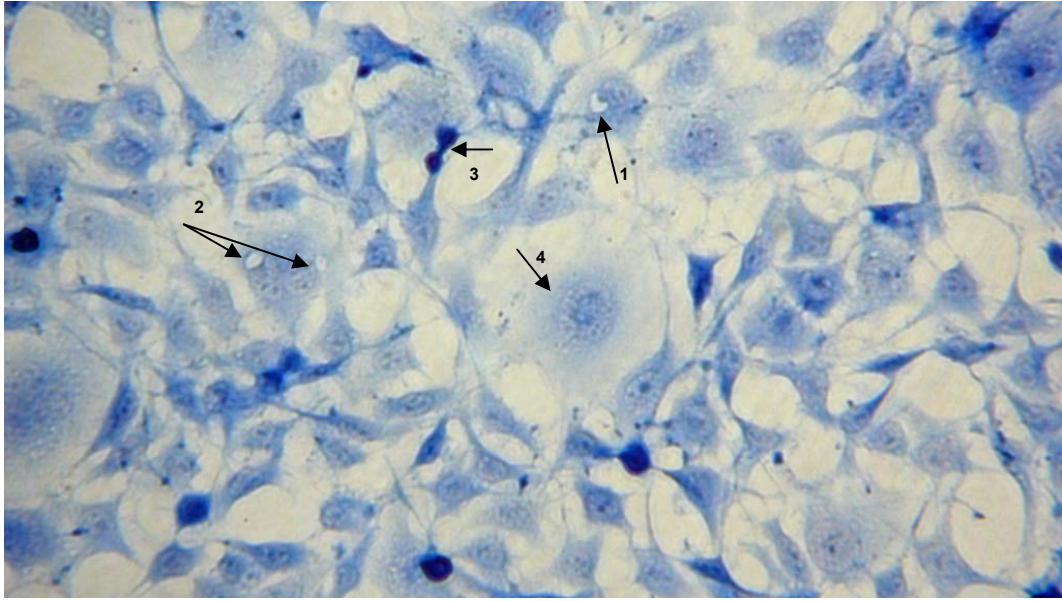
**Şekil 14.  $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Sisteminde *Camellia sinensis* Ekstrelerinin Antioksidan Aktiviteleri**

## NIH 3T3 Fibroblastlarında Yara İyileştirici Aktivitenin Değerlendirilmesi

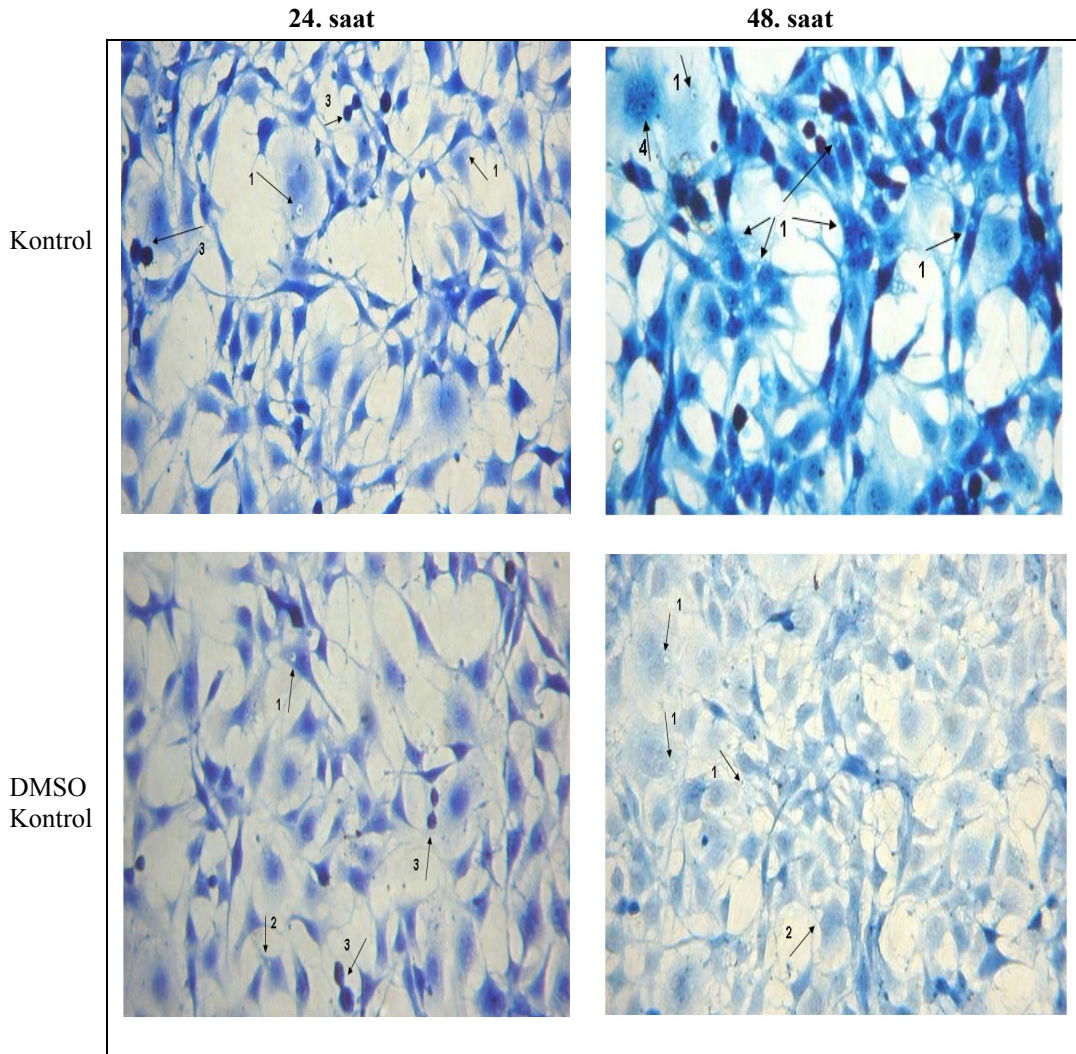
### NIH 3T3 hücrelerinde morfolometrik bulgular ve sabit preparatlardaki sayım sonuçları

Şekil 15-Şekil 23’de NIH 3T3 hücre dizisinde *Centella asiatica* ekstresi (TEKA)’nın 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 µg/ml, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf, SYÇ-inf ekstrelerinin 0.5, 1, 2.5, 5, 10 µg/ml konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonrasında Masson’s Trichrome tekniği ile boyama sonundaki morfolojik görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 10-Çizelge 15’de, TEKA ve her bir ekstrenin konsantrasyonları için hazırlanan sabit preparatlardaki NIH 3T3 hücrelerinin morfolojik açıdan; fusiform, poligonal, vakuollü ve yuvarlak olarak 5 değişik alanda, mitoz giren hücrelerin 10 farklı alanda; kollajen granülü içeren hücrelerin, 20 farklı alanda yapılmış sayımları sonucu elde edilen değerleri ve % hesapları yer almaktadır.



Şekil 15. SYÇ-Me 5 µg/ml Konsantrasyonu Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. Saatte Masson’s Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400) (1. Kollajen granülü, 2. Vakullü hücre, 3. Mitoza giden hücre, 4. Yuvarlak hücre)



**Şekil 16. Kontrol ve DMSO Kontrol (2µg/ml) Grubu NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400) (1. Kollajen granülü, 2. Vaküllü hücre, 3. Mitoza giden hücre, 4. Yuvarlak hücre)**

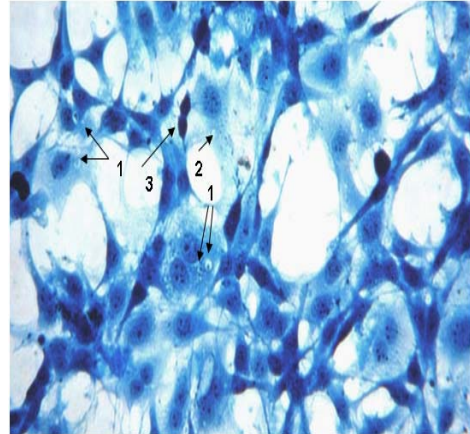
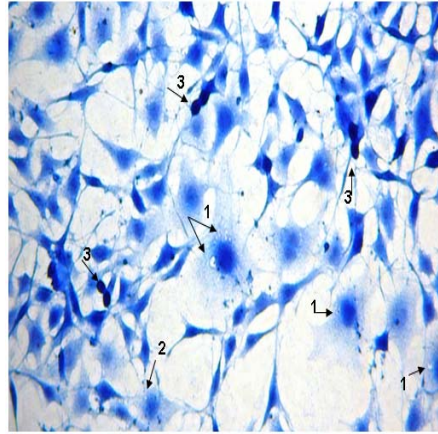


TEKA

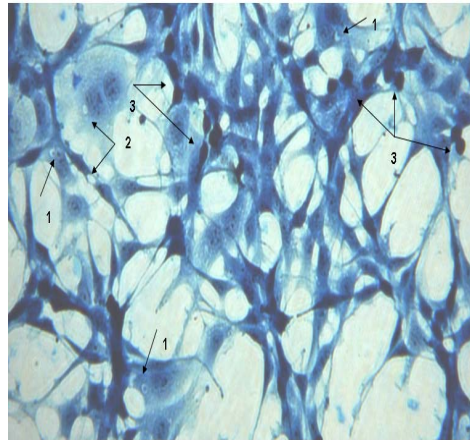
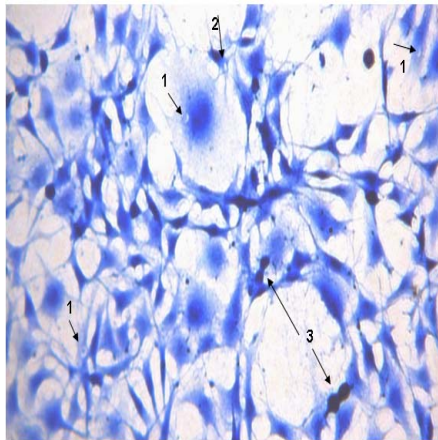
24. saat

48. saat

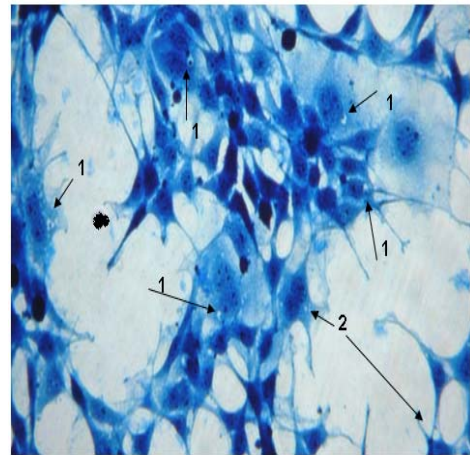
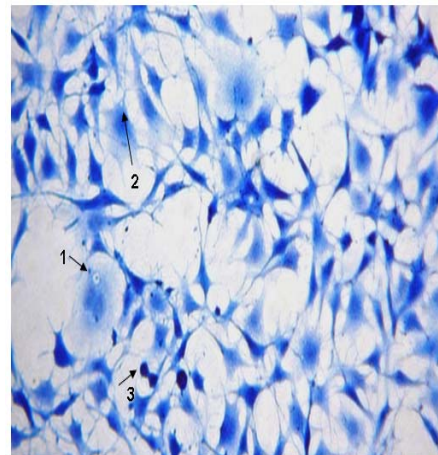
0,5  
µg/ml

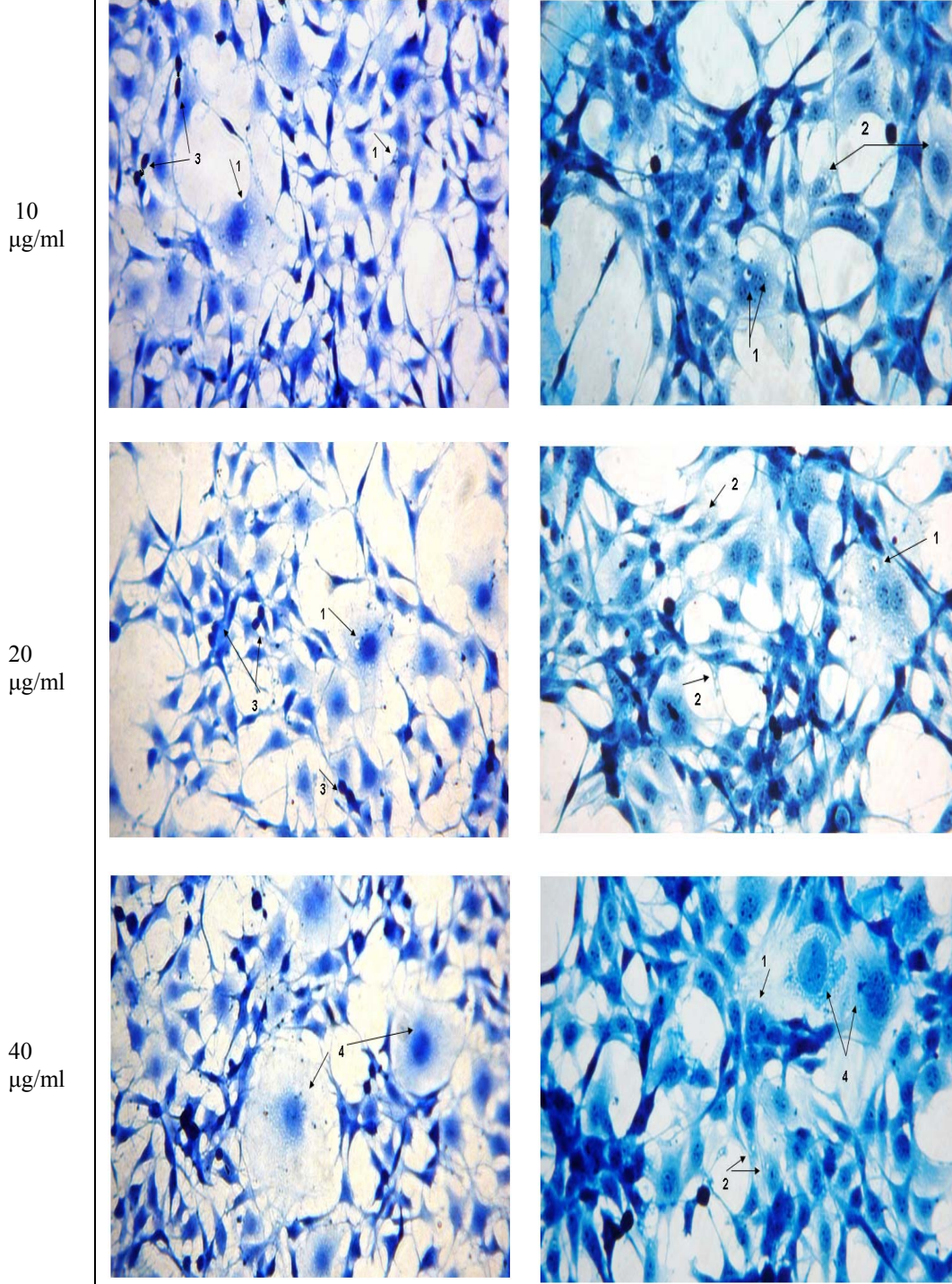


1  
µg/ml

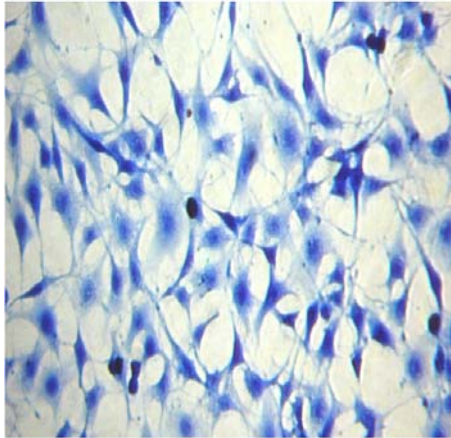
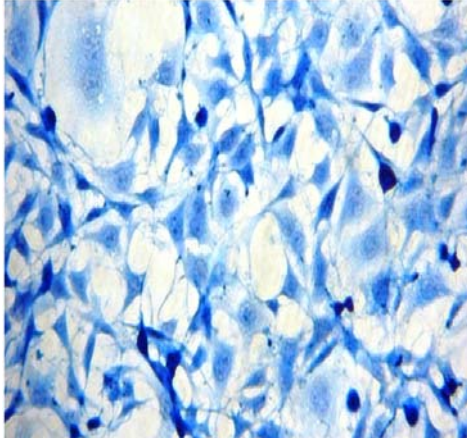
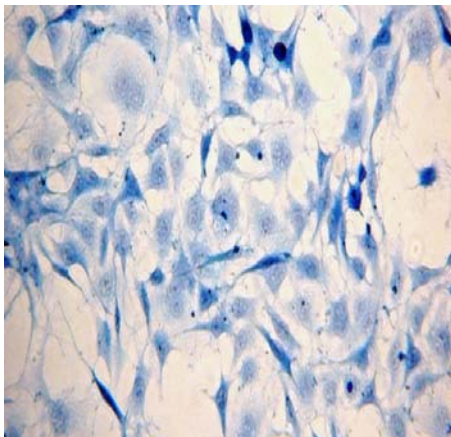
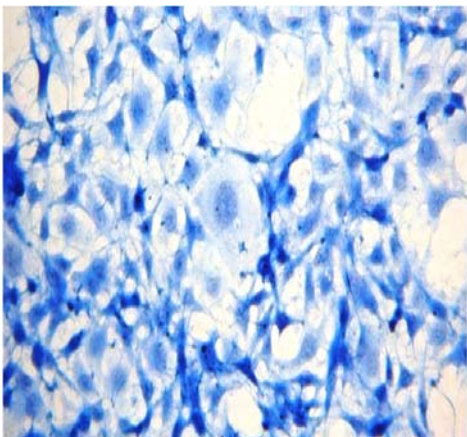
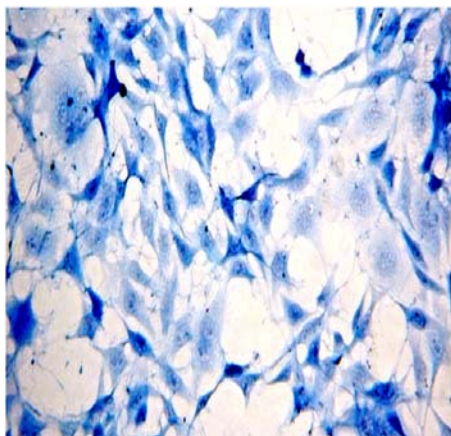
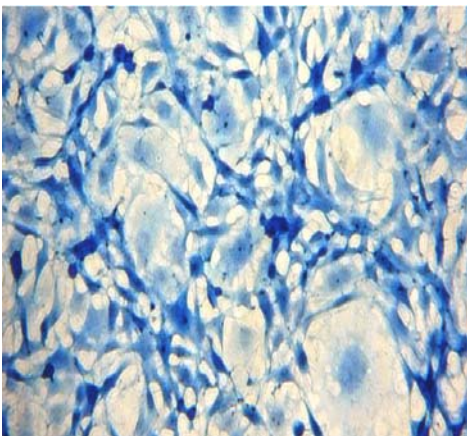


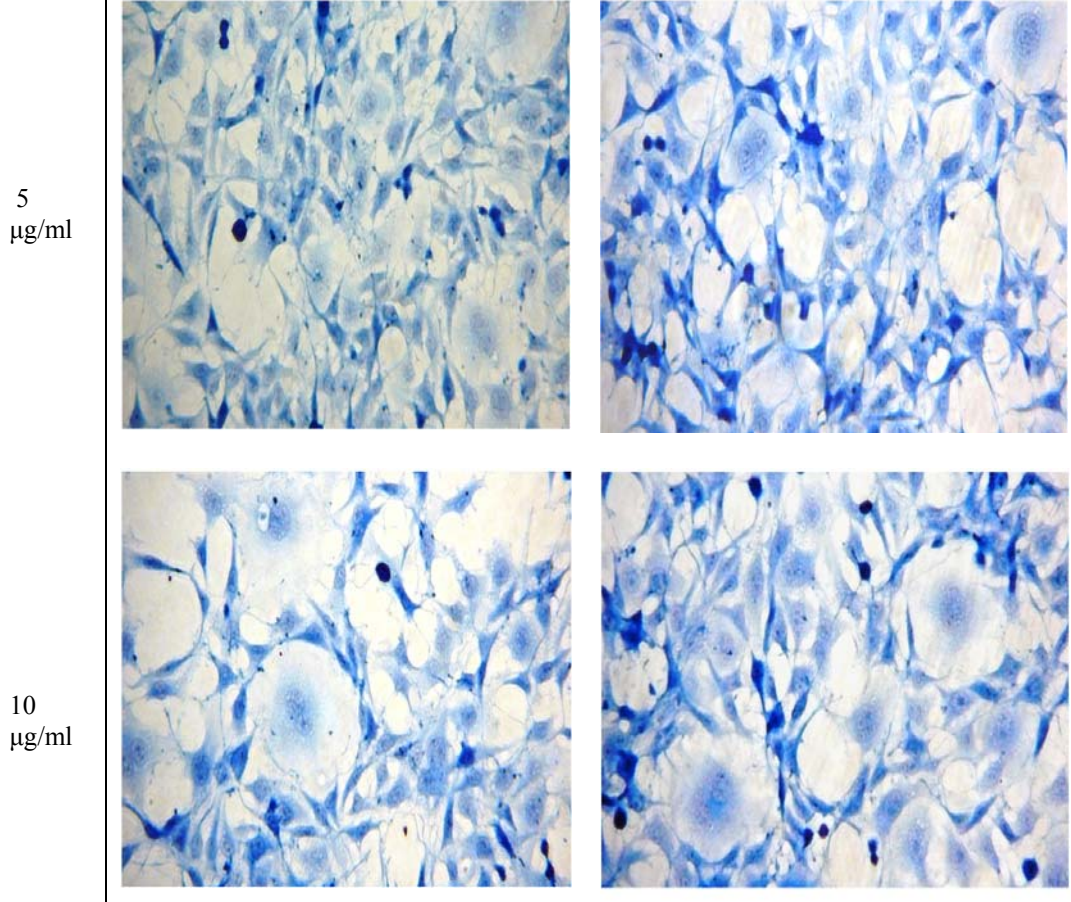
5  
µg/ml



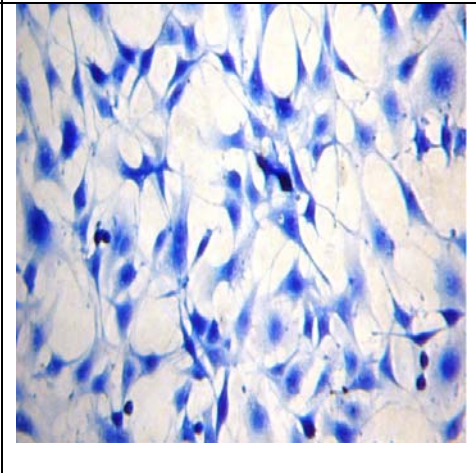
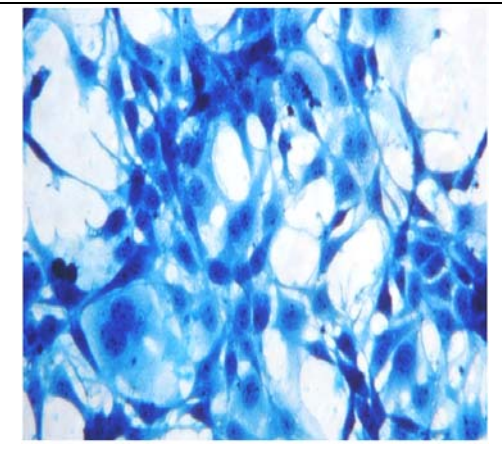
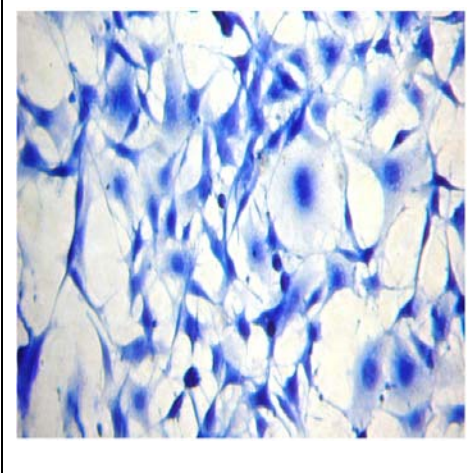
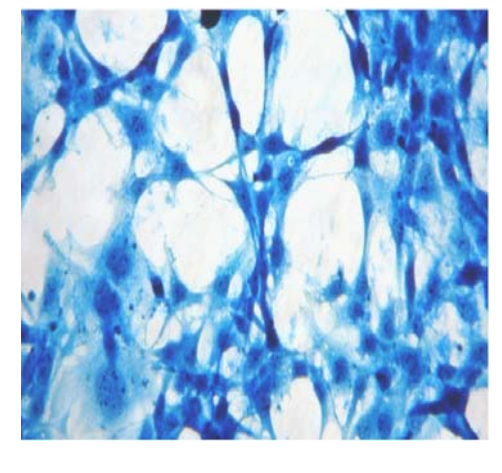
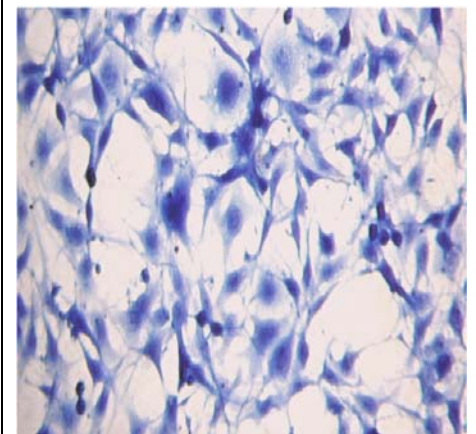
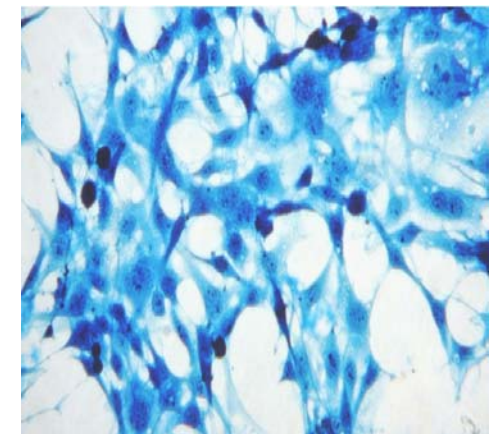


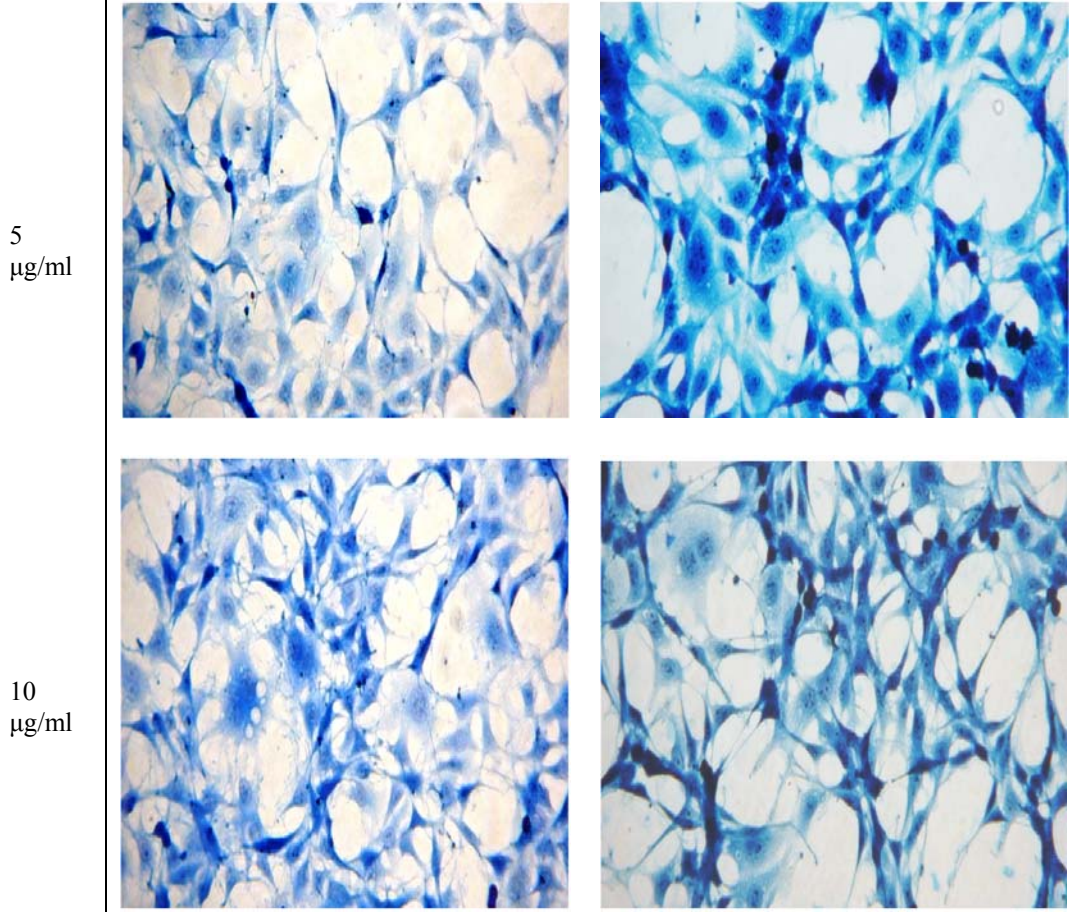
**Şekil 17. Farklı TEKA (*Centella asiatica* ekstresi) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400) (1. Kollajen granülü, 2. Vaküllü hücre, 3. Mitoza giden hücre, 4. Yuvarlak hücre)**

İYÇ-Me	24. saat	48. saat
0,5 µg/ml		
1 µg/ml		
2,5 µg/ml		



**Şekil 18. Farklı İYÇ-Me (İşlenmiş Yeşil Çay-Metanol) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400)**

YÇ-Me	24. saat	48. saat
0,5 µg/ml		
1 µg/ml		
2,5 µg/ml		



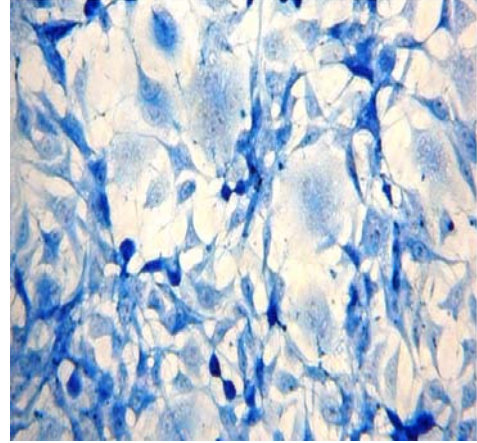
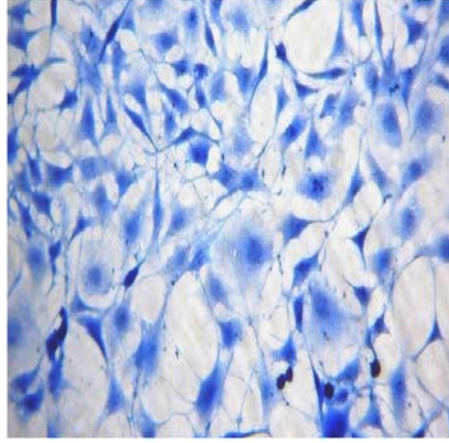
**Şekil 19. Farklı YÇ-Me (İşlenmemiş Yeşil Çay-Metanol) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400)**

SYÇ-  
Me

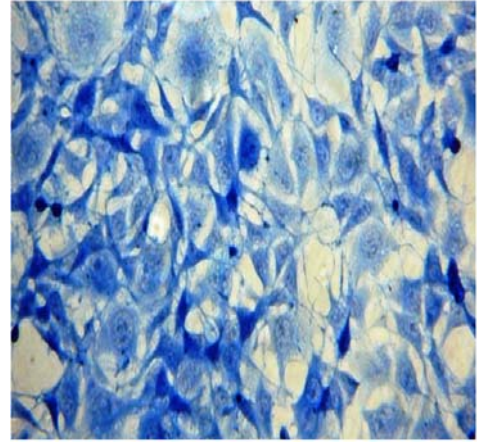
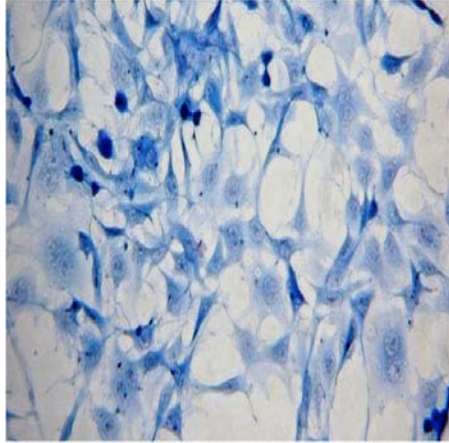
24. saat

48. saat

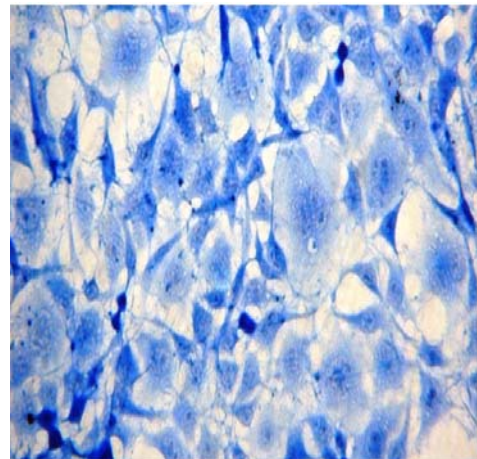
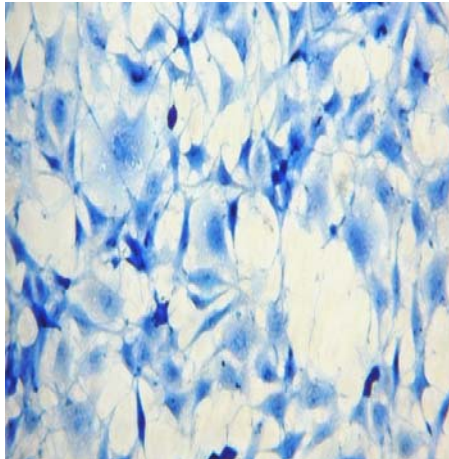
0,5  
µg/ml

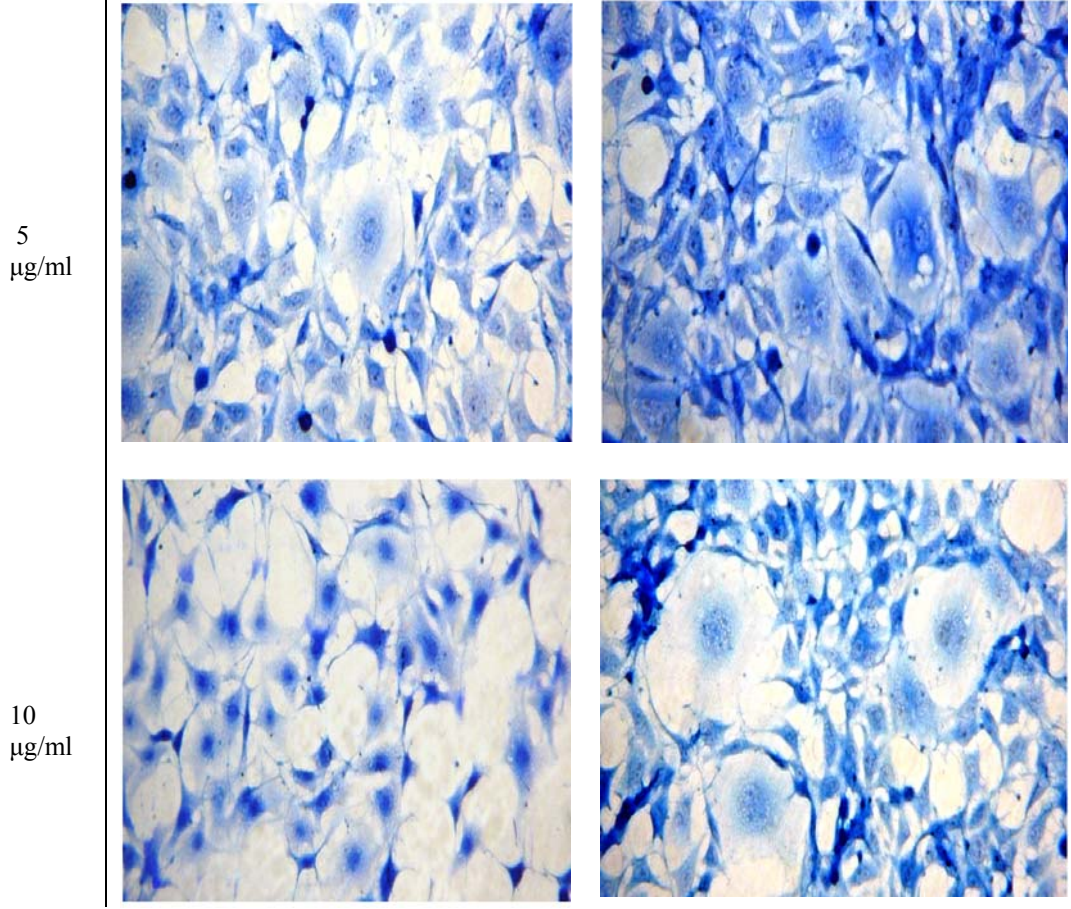


1  
µg/ml



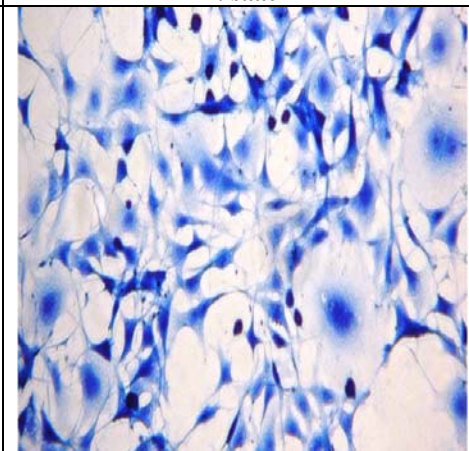
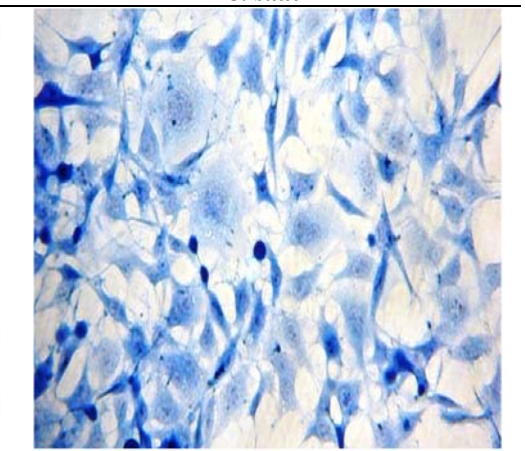
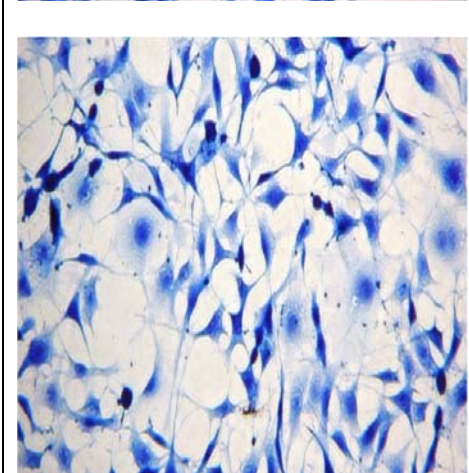
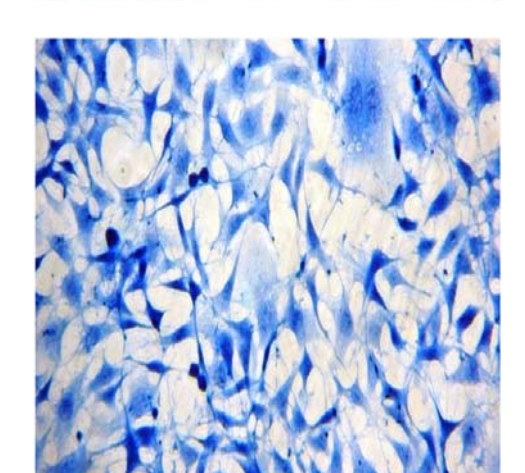
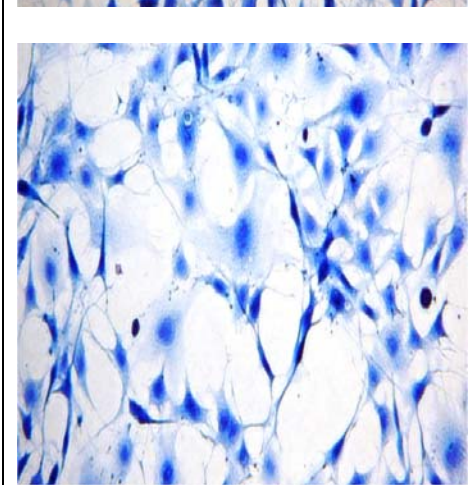
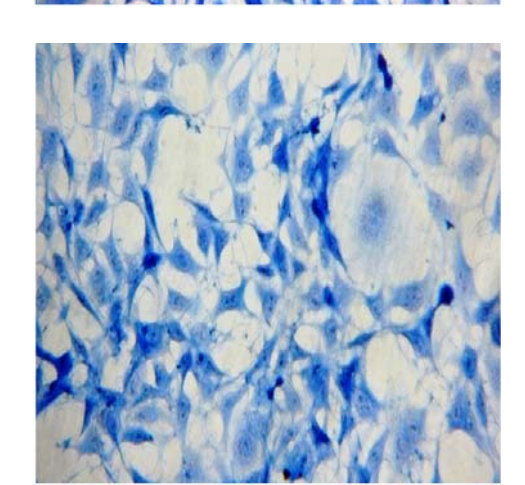
2,5  
µg/ml

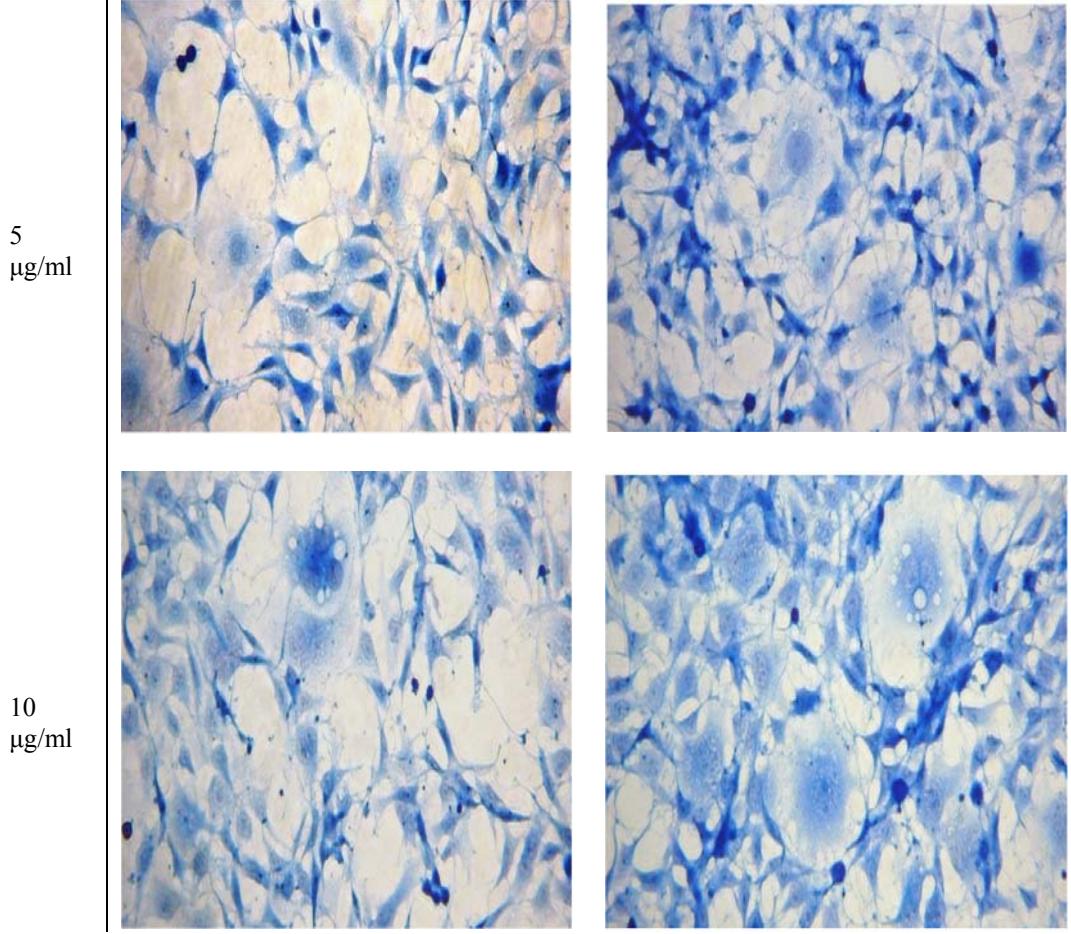




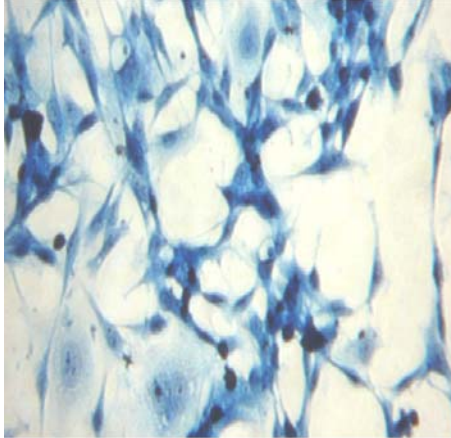
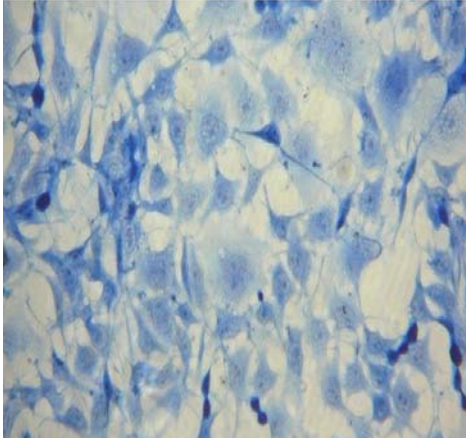
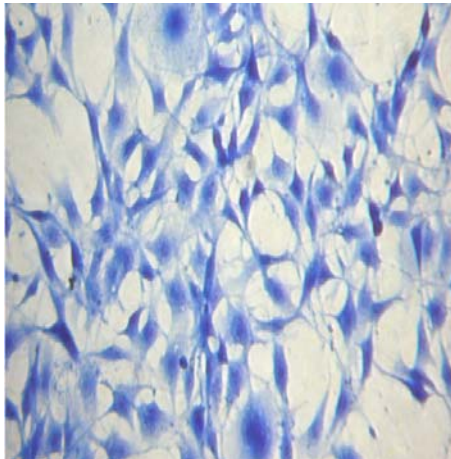
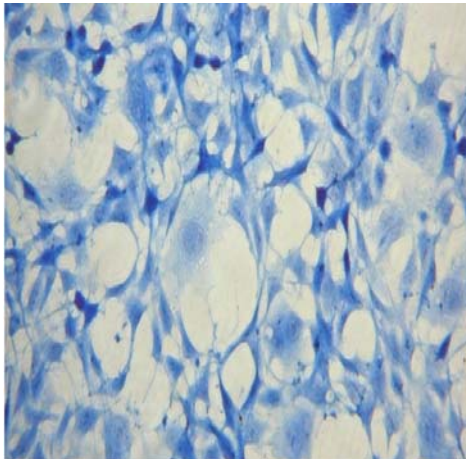
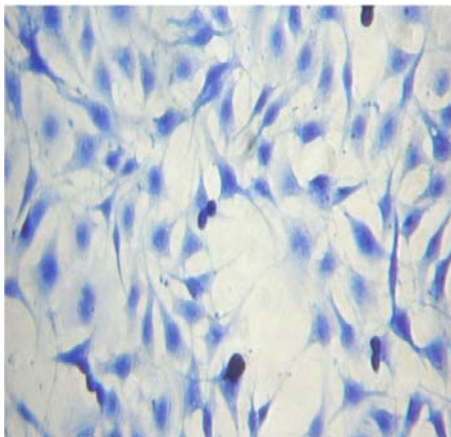
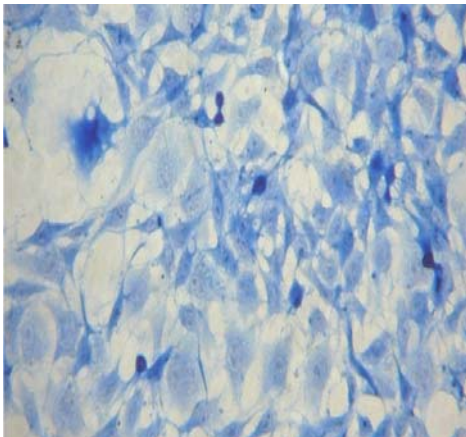
**Şekil 20. Farklı SYÇ-Me (Satın Alınmış Yeşil Çay-Metanol) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400)**

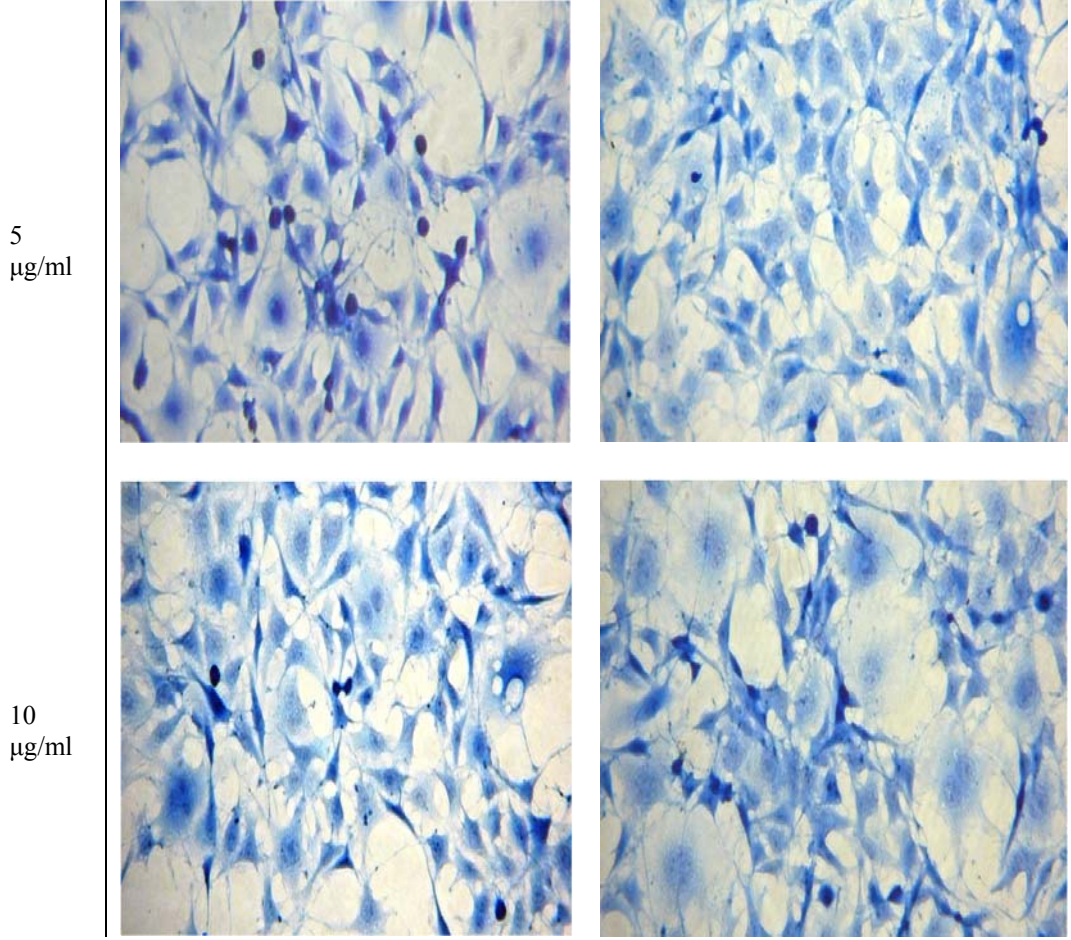


İYÇ-inf	24. saat	48. saat
0,5 µg/ml		
1 µg/ml		
2,5 µg/ml		

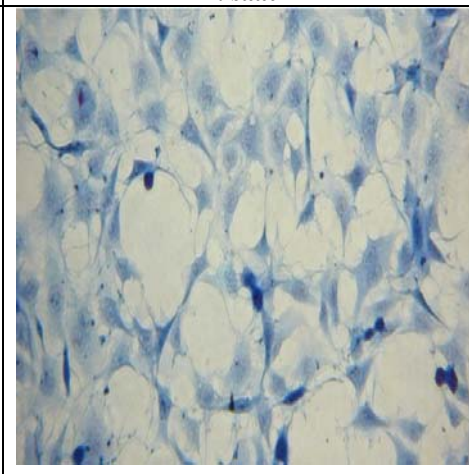
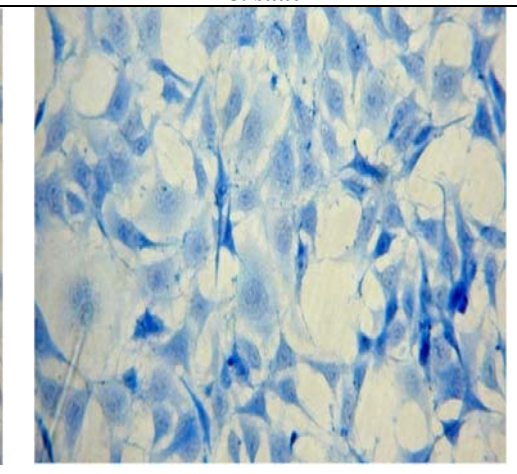
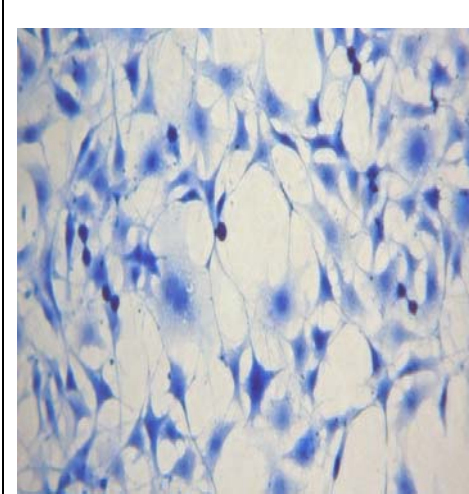
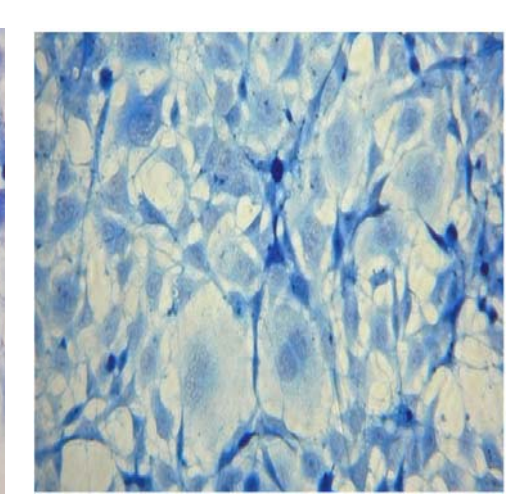
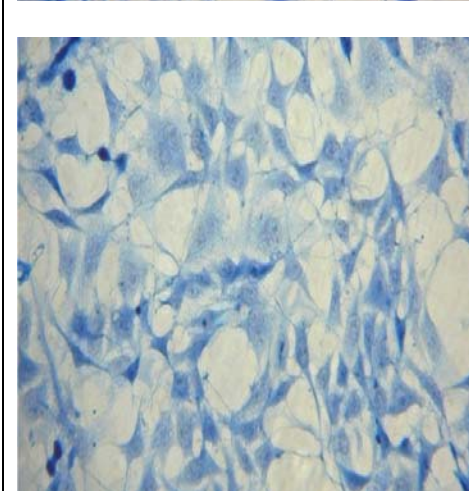
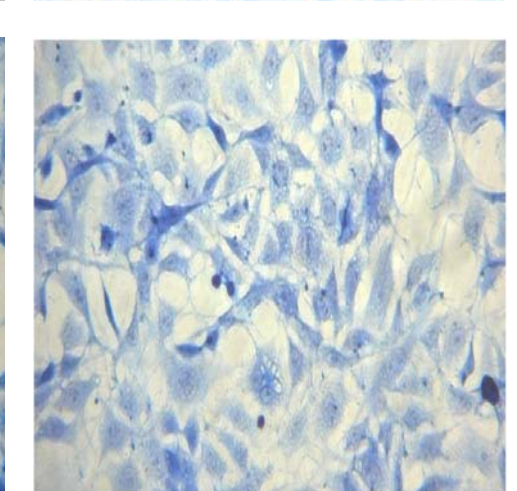


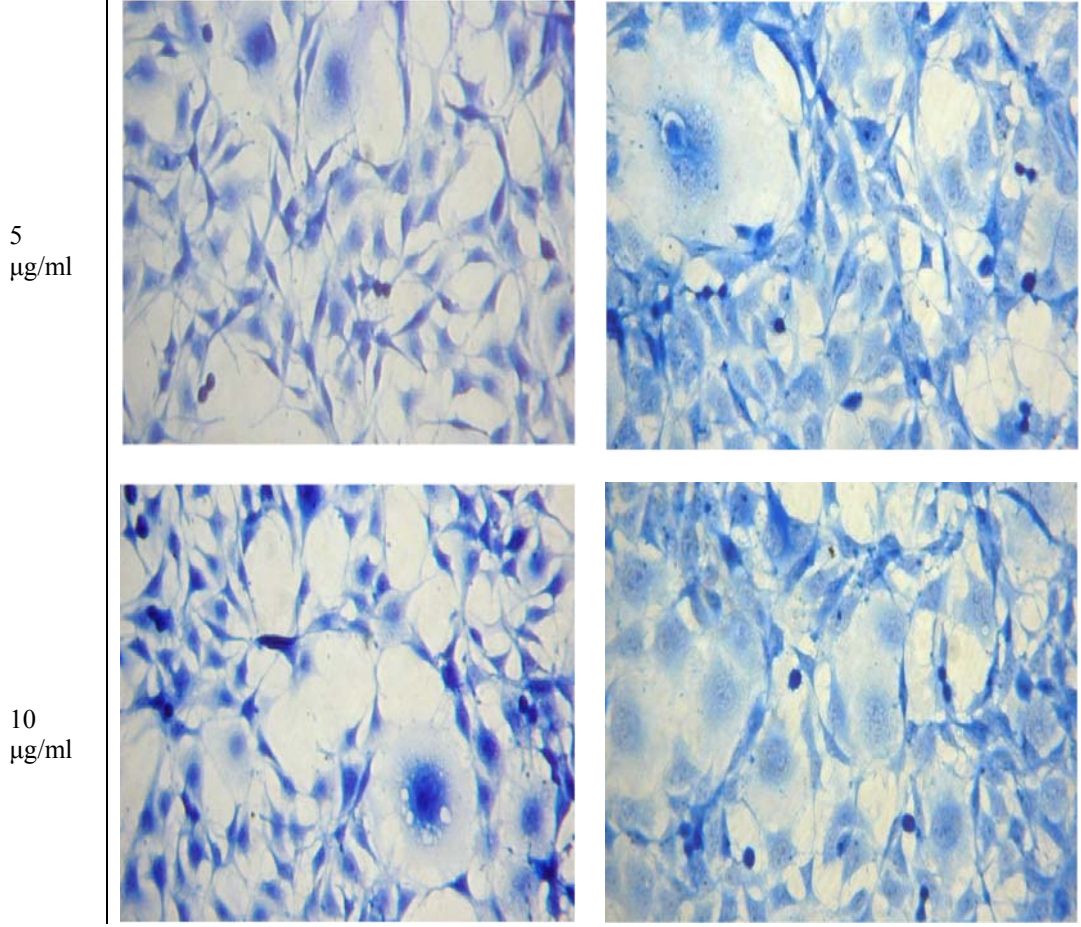
**Şekil 21. Farklı İYÇ-inf (İşlenmiş Yeşil Çay-İnfüzyon) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400)**

YÇ-inf	24. saat	48. saat
0,5 µg/ml		
1 µg/ml		
2,5 µg/ml		



**Şekil 22. Farklı YÇ-inf (İşlenmemiş Yeşil Çay-İnfüzyon) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400)**

SYÇ-inf	24. saat	48. saat
0,5 µg/ml		
1 µg/ml		
2,5 µg/ml		



**Şekil 23. Farklı SYÇ-inf (Satın Alınmış Yeşil Çay-İnfüzyon) Konsantrasyonları Uygulanmış NIH 3T3 Fibroblastlarının, 24. ve 48. Saatte Masson's Trichrome Tekniği ile Boyama Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400)**

TEKA ve *Camellia sinensis* ekstrelerinin NIH 3T3 fibroblast hücrelerinde 24 saatlik yara iyileştirici etkileri **Çizelge 10-Çizelge 12**'de; 48 saatlik etkileri de **Çizelge 13-Çizelge 15**'de morfometrik olarak değerlendirilmiştir. Yara iyileştirici aktivite için, NIH 3T3 fibroblast hücrelerinde sitotoksik etki meydana getirmeyen konsantrasyonlar arasından ekstre konsantrasyonları belirlenmiştir. Yara iyileştirici aktivitenin değerlendirildiği konsantrasyonlara ait MTT (mitokondriyal aktivasyon) sonuçları **Şekil 24-Şekil 30** ile MTT sonuçlarının istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 16-Çizelge 22**'de verilmiştir.

Bu çalışmada yara tedavisinde kullanılmakta olan *Centella asiatica* ekstresi (TEKA) pozitif kontrol olarak çalışılmış ve çay ekstre sonuçları kontrol ve TEKA gruplarına göre değerlendirilmiştir. Deney sonuçlarımız bakımından kontrol ve DMSO-kontrol grupları arasında istatistiksel değerlendirmelerde anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p>0.05$ ).

24. saatte kontrol grubuna göre TEKA ve tüm ekstrelerde total hücre sayısında artış bulunmuştur. Total hücre sayısında en fazla artış kontrol ve TEKA grubuna göre 0.5 µg/ml SYÇ-Me konsantrasyonunda belirlenmiştir ( $p<0.001^{***}$ ). Ekstreler arasında özellikle İYÇ-Me, YÇ-Me ve SYÇ-Me'nin tüm konsantrasyonlarında (0.5-10 µg/ml) total hücre sayılarının kontrole göre artmış olduğu ve TEKA konsantrasyon sonuçlarına oldukça yakın değerlerde olduğu görülmüştür (**Çizelge 10**). *C. sinensis*'in infüzyonlarında ise kontrole göre total ve mitozaya giden hücre sayılarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Mitoza giden hücre sayısı bakımından 0.5, 1 ve 5 µg/ml TEKA konsantrasyonlarında, kontrole göre artış görülse de, 0.5 µg/ml TEKA konsantrasyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.01^{**}$ ).

İYÇ-Me, YÇ-Me ve SYÇ-Me'nin özellikle düşük konsantrasyonlarında total hücre sayısındaki artışa paralel olarak mitozaya giden hücre sayılarında anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.05^{*}$ ) (**Çizelge 10**).

24 saatlik inkübasyon sonunda kontrol ve DMSO-kontrol grubunda fusiform hücre sayıları sırasıyla % 32.11±2.05 ve 30.86±1.12; poligonal hücre sayıları da % 55.39±2.19 ve 55.73±1.85 olarak belirlenmiştir (**Çizelge 11**). Fusiform hücre sayısı (%), TEKA ve çay ekstrelerinde kontrole göre azalmış, poligonal hücre sayısı da (%), buna paralel olarak artmıştır. Fusiform hücre sayısında kontrol ve TEKA gruplarına göre en fazla azalış, İYÇ-Me, YÇ-Me ve SYÇ-Me ekstrelerinin düşük konsantrasyonlarında meydana gelmiştir. Poligonal hücre sayısı da kontrol ve TEKA gruplarına göre en fazla İYÇ-Me 0.5 ve 1 µg/ml ile SYÇ-Me 0.5 µg/ml konsantrasyonlarında artmıştır (**Çizelge 11**).

Yuvarlak ve vakuollü hücre sayıları TEKA ve *Camellia sinensis* ekstre gruplarında, konsantrasyon artışına bağlı olarak artış göstermiştir. Özellikle TEKA'nın 40 µg/ml konsantrasyonunda yuvarlak hücre sayısı % 6.61±0.45, İYÇ-Me'nin 10 µg/ml konsantrasyonunda da % 7.46±0.55 olarak hesaplanmıştır (**Çizelge 12**). Granül sayısı bakımından kontrol ve deney gruplarında çok anlamlı farklılıklara rastlanmamıştır. Granül sayısında, kontrol (% 1.75±0.17) ve TEKA grubuna göre en fazla artış, YÇ-Me ekstresinin 0.5 µg/ml konsantrasyonunda % 2.25±0.20; 2.5 µg/ml'de % 1.94±0.20 ve SYÇ-Me ekstresinin de 0.5 µg/ml konsantrasyonunda % 1.90±0.17 olarak belirlenmiştir (**Çizelge 12**).

**Çizelge 10. TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Fibroblastlarında Toplam ve Mitoza Giden Hücre Sayıları Üzerine 24. Saatteki Etkileri**

Gruplar	Total Hücre Sayısı	Mitoza Giden Hücre Sayısı
Kontrol	79.40±2.20	5.50±0.40
DMSO Kontrol (2 µl/ml)	81.00±2.81	5.40±0.45
TEKA ( <i>C. asiatica</i> ekstresi)		
0.5 µg/ml	99.80±2.03 $p<0.001$	8.70±0.68 $p<0.01$
1 µg/ml	106.40±0.92 $p<0.001$	6.50±0.45
5 µg/ml	106.20±0.58 $p<0.001$	6.20±0.46
10 µg/ml	99.00±1.34 $p<0.001$	5.20±0.32
20 µg/ml	92.20±2.20	3.90±0.37
40 µg/ml	91.20±2.17	2.11±0.26
İYÇ-Me		
0.5 µg/ml	96.80±3.65 $p<0.01$	7.80±0.69
1 µg/ml	98.60±2.63 $p<0.01$	8.40±0.63 $p<0.05$
2.5 µg/ml	90.80±1.46	8.50±0.71 $p<0.01$
5 µg/ml	94.20±2.95 $p<0.05$	9.00±0.55 $p<0.001$
10 µg/ml	87.80±2.59	3.50±0.40
YÇ-Me		
0.5 µg/ml	103.40±2.83 $p<0.001$	8.80±0.84 $p<0.01$
1 µg/ml	96.00±2.04 $p<0.001$	7.60±0.60
2.5 µg/ml	92.00±3.49 $p<0.05$	4.80±0.38
5 µg/ml	100.00±2.77 $p<0.001$	6.70±0.53
10 µg/ml	103.20±3.62 $p<0.001$	4.80±0.46
SYÇ-Me		
0.5 µg/ml	118.60±3.55 $p<0.001$	7.90±0.37 $p<0.05$
1 µg/ml	89.40±3.44	4.90±0.56
2.5 µg/ml	97.80±1.68 $p<0.001$	6.80±0.38
5 µg/ml	83.80±1.39	2.80±0.32
10 µg/ml	86.40±2.29	5.50±0.40
İYÇ-inf		
0.5 µg/ml	77.20±1.85	4.00±0.61
1 µg/ml	72.60±3.17	3.70±0.42
2.5 µg/ml	83.80±1.62	6.00±0.51
5 µg/ml	77.60±1.63	4.40±0.40
10 µg/ml	83.00±2.50	4.00±0.51
YÇ-inf		
0.5 µg/ml	73.80±1.28	4.20±0.62
1 µg/ml	83.60±2.94	4.00±0.51
2.5 µg/ml	80.00±3.59	5.40±0.49
5 µg/ml	81.60±2.65	3.60±0.40
10 µg/ml	79.20±2.59	3.80±0.29
SYÇ-inf		
0.5 µg/ml	86.40±1.96	5.30±0.51
1 µg/ml	87.20±3.96	5.20±0.44
2.5 µg/ml	85.00±1.76	5.40±0.52
5 µg/ml	79.20±2.26	4.20±0.32
10 µg/ml	83.00±2.02	4.40±0.37

İstatistiksel karşılaştırma kontrole göre yapılmıştır.



**Çizelge 11. TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının Fusiform ve Poligonal Şekildeki NIH 3T3 Fibroblastları Üzerine 24. Saatteki Etkilerinin Yüzde Değerleri**

Gruplar	Fusiform Hücre Sayısı (%)	Poligonal Hücre Sayısı (%)
Kontrol	32.11±2.05	55.39±2.19
DMSO Kontrol (2 µl/ml)	30.86±1.12	55.73±1.85
TEKA ( <i>C. asiatica</i> ekstresi)		
0.5 µg/ml	17.88±0.85 $p<0.001$	69.12±0.52 $p<0.001$
1 µg/ml	17.10±0.94 $p<0.001$	65.79±1.31 $p<0.001$
5 µg/ml	19.20±0.83 $p<0.001$	62.72±1.64
10 µg/ml	13.75±1.11 $p<0.001$	65.26±0.97 $p<0.01$
20 µg/ml	12.73±1.07 $p<0.001$	63.59±0.77 $p<0.05$
40 µg/ml	11.15±0.81 $p<0.001$	62.44±0.75
İYÇ-Me		
0.5 µg/ml	12.85±1.95 $p<0.001$	73.24±2.05 $p<0.001$
1 µg/ml	13.91±1.32 $p<0.001$	75.21±1.70 $p<0.001$
2.5 µg/ml	17.34±1.59 $p<0.001$	69.44±2.15 $p<0.001$
5 µg/ml	19.73±0.87 $p<0.001$	63.54±0.63 $p<0.05$
10 µg/ml	19.12±0.84 $p<0.001$	61.33±1.42
YÇ-Me		
0.5 µg/ml	17.72±1.37 $p<0.001$	69.50±1.41 $p<0.001$
1 µg/ml	20.21±0.62 $p<0.001$	67.35±1.36 $p<0.001$
2.5 µg/ml	18.28±1.54 $p<0.001$	67.99±1.53 $p<0.001$
5 µg/ml	16.13±1.25 $p<0.001$	68.69±1.68 $p<0.001$
10 µg/ml	18.00±1.49 $p<0.001$	66.38±1.83 $p<0.001$
SYÇ-Me		
0.5 µg/ml	16.43±1.33 $p<0.001$	71.08±0.85 $p<0.001$
1 µg/ml	18.90±2.80 $p<0.001$	64.66±1.71 $p<0.01$
2.5 µg/ml	19.23±0.61 $p<0.001$	67.32±1.18 $p<0.001$
5 µg/ml	14.54±2.56 $p<0.001$	68.98±1.59 $p<0.001$
10 µg/ml	21.02±0.53 $p<0.001$	60.76±2.13
İYÇ-inf		
0.5 µg/ml	20.73±2.75 $p<0.001$	64.58±0.80 $p<0.001$
1 µg/ml	12.41±1.45 $p<0.001$	68.98±1.22 $p<0.001$
2.5 µg/ml	21.01±2.16 $p<0.001$	62.04±0.42
5 µg/ml	20.02±2.56 $p<0.001$	63.92±1.11 $p<0.01$
10 µg/ml	24.67±0.88 $p<0.001$	56.88±0.73
YÇ-inf		
0.5 µg/ml	15.68±1.11 $p<0.001$	69.12±1.04 $p<0.001$
1 µg/ml	21.98±1.08 $p<0.001$	64.57±0.58 $p<0.01$
2.5 µg/ml	20.96±1.82 $p<0.001$	65.73±2.28 $p<0.001$
5 µg/ml	20.18±1.76 $p<0.001$	64.28±0.91 $p<0.01$
10 µg/ml	23.74±1.21 $p<0.001$	61.10±0.10
SYÇ-inf		
0.5 µg/ml	23.44±1.11 $p<0.001$	65.69±1.25 $p<0.001$
1 µg/ml	22.74±1.21 $p<0.001$	65.48±0.85 $p<0.001$
2.5 µg/ml	22.39±1.40 $p<0.001$	64.47±1.22 $p<0.001$
5 µg/ml	20.09±1.45 $p<0.001$	65.51±1.21 $p<0.001$
10 µg/ml	23.83±0.71 $p<0.001$	60.46±0.62

İstatistiksel karşılaştırma kontrole göre yapılmıştır.

**Çizelge 12. TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının Yuvarlak Şekli, Vakuol ve Kollajen Granülü İçeren NIH 3T3 Fibroblastları Üzerine 24. Saatteki Etkilerinin Yüzde Değerleri**

Gruplar	Yuvarlak Hücre Sayısı (%)	Vakuollü Hücre Sayısı (%)	Granül Sayısı (%)
Kontrol	2.72±0.66	9.77±0.85	1.75±0.17
DMSO Kontrol (2µl/ml)	2.20±0.43	11.18±1.12	1.60±0.13
TEKA ( <i>C. asiatica</i> ekstresi)			
0.5 µg/ml	1.78±0.34	11.20±0.75	1.70±0.19
1 µg/ml	2.07±0.36	15.03±0.81	1.55±0.18
5 µg/ml	2.82±0.29	15.24±0.91	1.50±0.15
10 µg/ml	3.62±0.21	17.35±0.45 <sup>p&lt;0.01</sup>	1.30±0.10
20 µg/ml	4.09±0.33	15.44±2.00	1.29±0.11
40 µg/ml	6.61±0.45 <sup>p&lt;0.001</sup>	15.57±2.45 <sup>p&lt;0.05</sup>	1.08±0.08
İYÇ-Me			
0.5 µg/ml	4.40±0.50	9.59±0.79	1.65±0.1
1 µg/ml	2.05±0.34	8.81±1.09	1.70±0.19
2.5 µg/ml	1.97±0.40	11.23±0.62	1.57±0.15
5 µg/ml	4.91±0.35 <sup>p&lt;0.05</sup>	11.80±0.96	1.50±0.13
10 µg/ml	7.46±0.55 <sup>p&lt;0.001</sup>	12.07±0.57	1.47±0.15
YÇ-Me			
0.5 µg/ml	2.68±0.29	10.08±0.92	2.25±0.20
1 µg/ml	1.66±0.25	10.76±1.07	1.75±0.14
2.5 µg/ml	2.82±0.39	10.89±0.74	1.94±0.20
5 µg/ml	3.00±0.31	12.16±1.39	1.60±0.15
10 µg/ml	2.87±0.37	12.73±0.59	1.65±0.13
SYÇ-Me			
0.5 µg/ml	3.00±0.37	9.47±0.88	1.90±0.17
1 µg/ml	4.22±0.28	12.20±1.77	1.55±0.15
2.5 µg/ml	2.66±0.42	10.77±1.23	1.40±0.13
5 µg/ml	5.47±0.79 <sup>p&lt;0.01</sup>	11.00±1.38	1.25±0.09
10 µg/ml	3.25±0.45	14.95±1.52	1.31±0.15
İYÇ-inf			
0.5 µg/ml	3.64±0.51	11.03±1.84	1.35±0.13
1 µg/ml	4.06±0.60	14.53±1.54	1.29±0.14
2.5 µg/ml	4.55±0.30	12.38±2.00	1.26±0.12
5 µg/ml	3.55±1.13	12.50±1.89	1.20±0.09
10 µg/ml	5.04±0.38	13.38±1.01	1.23±0.10
YÇ-inf			
0.5 µg/ml	3.77±0.46	11.41±0.65	1.85±0.19
1 µg/ml	3.32±0.38	10.11±1.25	1.45±0.13
2.5 µg/ml	3.18±0.39	10.10±0.67	1.65±0.15
5 µg/ml	3.95±0.52	11.57±0.96	1.50±1.15
10 µg/ml	4.59±0.61 <sup>p&lt;0.05</sup>	10.55±0.79	1.29±0.14
SYÇ-inf			
0.5 µg/ml	2.34±0.54	8.51±0.56	1.47±0.15
1 µg/ml	2.61±0.52	9.16±0.41	1.60±0.16
2.5 µg/ml	3.29±0.23	9.84±1.12	1.70±0.16
5 µg/ml	2.01±0.29	12.37±0.87	1.29±0.11
10 µg/ml	3.34±0.55	12.35±0.95	1.27±0.10

İstatistiksel karşılaştırma kontrole göre yapılmıştır.

48. saatte kontrol grubunda  $129.80 \pm 2.43$  olan total hücre sayısı TEKA grubunun 0.5, 1 ve 5  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonunda sırasıyla  $144.60 \pm 2.20$ ,  $160.60 \pm 1.96$  ve  $133.00 \pm 1.64$  olarak hesaplanmıştır. Çay ekstraları arasında metanol ekstralarına ait total hücre sayıları, infüzyonlardan daha fazladır ve kontrole göre çay metanol ekstralarında, total hücre sayıları istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ( $p < 0.001^{***}$ ,  $p < 0.01^{**}$ ), (**Çizelge 13**).

Özellikle çay ekstraları arasında da kontrole göre en fazla total hücre sayısı 0.5  $\mu\text{g/ml}$  İYÇ-Me konsantrasyonunda  $175.40 \pm 2.29$  ( $p < 0.001^{***}$ ), 1  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda  $159.20 \pm 3.26$  ( $p < 0.001^{***}$ ) ve 2.5  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda  $158.80 \pm 1.46$  ( $p < 0.001^{***}$ ) olarak bulunmuştur. YÇ-Me'nin 0.5  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonunda da kontrole göre total hücre sayısı  $169.20 \pm 1.82$  ( $p < 0.001^{***}$ ) ve 1  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonunda da  $172.00 \pm 3.13$  ( $p < 0.001^{***}$ ) olarak artış göstermiştir. SYÇ-Me konsantrasyonlarında da kontrole göre total hücre sayısı artış göstermiş ve en fazla artış 1  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda görülmüştür. İnfüzyonlar arasında kontrole göre en fazla artış İYÇ-inf grubunda 10  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda  $150.60 \pm 2.13$  ( $p < 0.001^{***}$ ), 2.5  $\mu\text{g/ml}$  YÇ-inf konsantrasyonunda  $154.40 \pm 2.74$  ( $p < 0.001^{***}$ ) ve 2.5  $\mu\text{g/ml}$  SYÇ-inf konsantrasyonunda da  $154.40 \pm 2.35$  ( $p < 0.001^{***}$ ) olarak hesaplanmıştır (**Çizelge 13**).

48. saatte kontrole göre TEKA ve çay ekstralarında mitozaya giden hücre sayısı, hücre çoğalmasına bağlı olarak 24. saate göre artış göstermemiştir. 48. saatte hücre çoğalmasının artmasına bağlı olarak, hücre hücre etkileşimleri ile hücreler çoğalma alanında sıkışmış ve bu yüzden mitotik aktiviteleri azalmıştır. Yine 24. saatte gözlenen mitozaya giren hücre sayısı artışına paralel olarak, 48. saatte de kontrole göre en fazla artış *Camellia sinensis* metanol ekstralarında meydana gelmiştir. 48. saat sonunda mitozaya giden hücre sayısı kontrolde  $4.40 \pm 0.40$ , DMSO-kontrol'de  $4.50 \pm 0.42$  iken İYÇ-Me 0.5  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonunda  $7.20 \pm 0.61$  ( $p < 0.001^{***}$ ), YÇ-Me 0.5, 2.5 ve 5  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarında ise  $7.30 \pm 0.42$  ( $p < 0.001^{***}$ ),  $7.00 \pm 0.49$  ( $p < 0.001^{***}$ ) ve  $7.60 \pm 0.37$  ( $p < 0.001^{***}$ ) olarak arttığı belirlenmiştir (**Çizelge 13**).

48. saatte fusiform hücre sayıları, 24. saatteki fusiform hücre sayılarına göre azalmış, poligonal hücre sayısı artış göstermiştir. Yine kontrole kıyaslandığında da 48 saat inkübasyon sonunda, tüm *Camellia sinensis* ekstralarında fusiform hücre sayısı azalmış, poligonal hücre sayısı artış göstermiştir (**Çizelge 14**). TEKA ve ekstralarda yuvarlak hücre sayısı, vakuollü hücre sayısı ve granül sayısı % değerlerinde ise kontrole göre önemli farklılık bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ) (**Çizelge 15**).

**Çizelge 13. TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Fibroblastlarında Toplam ve Mitoza Giden Hücre Sayıları Üzerine 48. Saatteki Etkileri**

Gruplar	Total Hücre Sayısı	Mitoza Giden Hücre Sayısı
Kontrol	129.80±2.43	4.40±0.40
DMSO Kontrol (2 µl/ml)	127.20±1.82	4.50±0.42
TEKA ( <i>C. asiatica</i> ekstresi)		
0.5 µg/ml	144.60±2.20 $p<0.001$	4.50±0.37
1 µg/ml	160.60±1.96 $p<0.001$	4.50±0.50
5 µg/ml	133.00±1.64	3.70±0.30
10 µg/ml	126.00±1.87	3.40±0.30
20 µg/ml	125.00±1.87	2.70±0.39
40 µg/ml	123.40±2.08	2.55±0.37
İYÇ-Me		
0.5 µg/ml	175.40±2.29 $p<0.001$	7.20±0.61 $p<0.001$
1 µg/ml	159.20±3.26 $p<0.001$	5.40±0.42
2.5 µg/ml	158.80±1.46 $p<0.001$	6.20±0.35
5 µg/ml	143.60±1.80 $p<0.01$	6.30±0.66
10 µg/ml	129.20±2.43	6.00±0.53
YÇ-Me		
0.5 µg/ml	169.20±1.82 $p<0.001$	7.30±0.42 $p<0.001$
1 µg/ml	172.00±3.13 $p<0.001$	6.80±0.32 $p<0.01$
2.5 µg/ml	136.80±2.13	7.00±0.49 $p<0.001$
5 µg/ml	141.20±2.55 $p<0.05$	7.60±0.37 $p<0.001$
10 µg/ml	134.60±1.86	4.90±0.31
SYÇ-Me		
0.5 µg/ml	146.40±3.72 $p<0.01$	6.30±0.51
1 µg/ml	152.60±3.64 $p<0.001$	5.70±0.63
2.5 µg/ml	149.80±3.45 $p<0.001$	6.00±0.57
5 µg/ml	140.20±2.26	5.10±0.37
10 µg/ml	145.80±2.92 $p<0.01$	3.50±0.37
İYÇ-inf		
0.5 µg/ml	135.00±3.50	2.10±0.34
1 µg/ml	132.40±3.94	4.20±0.35
2.5 µg/ml	127.60±1.56	4.30±0.36
5 µg/ml	132.60±1.56	2.00±0.23
10 µg/ml	150.60±2.13 $p<0.001$	3.40±0.47
YÇ-inf		
0.5 µg/ml	131.40±2.65	4.70±0.42
1 µg/ml	129.40±3.23	5.10±0.48
2.5 µg/ml	154.40±2.74 $p<0.001$	7.10±0.56
5 µg/ml	134.60±1.69	3.80±0.44
10 µg/ml	121.00±0.70	2.60±0.40
SYÇ-inf		
0.5 µg/ml	139.60±1.60	5.10±0.62
1 µg/ml	124.60±2.92	4.60±0.42
2.5 µg/ml	154.40±2.35 $p<0.001$	4.20±0.66
5 µg/ml	125.60±2.69	2.70±0.44
10 µg/ml	127.20±0.73	3.60±0.37

İstatistiksel karşılaştırma kontrole göre yapılmıştır.

**Çizelge 14. TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının Fusiform ve Poligonal Şekildeki NIH 3T3 Fibroblastları Üzerine 48. Saatteki Etkilerinin Yüzde Değerleri**

Gruplar	Fusiform Hücre Sayısı (%)	Poligonal Hücre Sayısı (%)
Kontrol	16.35±0.30	67.57±1.53
DMSO Kontrol (2 µl/ml)	17.89±1.12	63.07±1.14
TEKA ( <i>C. asiatica</i> ekstresi)		
0.5 µg/ml	7.72±0.41 $p<0.001$	79.00±0.54 $p<0.001$
1 µg/ml	9.21±0.73 $p<0.001$	77.08±0.93 $p<0.001$
5 µg/ml	7.80±0.72 $p<0.001$	78.49±0.55 $p<0.001$
10 µg/ml	6.96±0.44 $p<0.001$	75.70±1.26 $p<0.001$
20 µg/ml	7.68±0.39 $p<0.001$	73.43±0.79 $p<0.05$
40 µg/ml	10.19±0.52 $p<0.001$	67.63±0.96
İYÇ-Me		
0.5 µg/ml	7.62±0.81 $p<0.001$	78.22±1.04 $p<0.001$
1 µg/ml	8.82±0.82 $p<0.001$	74.98±0.75 $p<0.001$
2.5 µg/ml	8.04±0.84 $p<0.001$	77.19±0.87 $p<0.001$
5 µg/ml	9.77±0.96 $p<0.001$	70.49±0.83
10 µg/ml	7.10±0.50 $p<0.001$	71.56±1.59
YÇ-Me		
0.5 µg/ml	9.10±0.87 $p<0.001$	77.80±1.58 $p<0.001$
1 µg/ml	8.62±0.42 $p<0.001$	76.76±0.72 $p<0.001$
2.5 µg/ml	8.45±0.57 $p<0.001$	74.14±0.58 $p<0.001$
5 µg/ml	9.75±0.39 $p<0.001$	71.01±0.82
10 µg/ml	12.46±0.41 $p<0.01$	66.58±0.76
SYÇ-Me		
0.5 µg/ml	11.79±0.86 $p<0.01$	70.16±1.09
1 µg/ml	9.94±0.44 $p<0.001$	74.09±0.76 $p<0.01$
2.5 µg/ml	12.27±0.53 $p<0.01$	70.24±0.28
5 µg/ml	9.28±0.76 $p<0.001$	72.44±0.94
10 µg/ml	9.19±1.15 $p<0.001$	69.93±0.52
İYÇ-inf		
0.5 µg/ml	5.89±0.67 $p<0.001$	75.31±1.17 $p<0.001$
1 µg/ml	8.21±0.78 $p<0.001$	80.60±0.93 $p<0.001$
2.5 µg/ml	9.85±0.60 $p<0.001$	78.54±0.84 $p<0.001$
5 µg/ml	11.42±1.14 $p<0.001$	75.44±1.16 $p<0.001$
10 µg/ml	8.14±0.78 $p<0.001$	78.86±0.55 $p<0.001$
YÇ-inf		
0.5 µg/ml	6.51±0.64 $p<0.001$	77.20±0.75 $p<0.001$
1 µg/ml	6.76±0.41 $p<0.001$	77.63±1.67 $p<0.001$
2.5 µg/ml	11.28±0.50 $p<0.001$	75.75±0.74 $p<0.001$
5 µg/ml	7.13±0.72 $p<0.001$	74.00±0.97 $p<0.01$
10 µg/ml	7.10±0.98 $p<0.001$	73.06±0.55 $p<0.05$
SYÇ-inf		
0.5 µg/ml	6.58±0.80 $p<0.001$	75.78±0.48 $p<0.001$
1 µg/ml	6.72±0.58 $p<0.001$	74.68±0.73 $p<0.001$
2.5 µg/ml	8.67±0.51 $p<0.001$	80.44±0.43 $p<0.001$
5 µg/ml	8.38±0.88 $p<0.001$	74.27±1.39 $p<0.001$
10 µg/ml	11.62±0.41 $p<0.001$	66.97±0.82

İstatistiksel karşılaştırma kontrole göre yapılmıştır.

**Çizelge 15. TEKA, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Konsantrasyonlarının Yuvarlak Şekli, Vakuol ve Kollajen Granülü İçeren NIH 3T3 Fibroblastları Üzerine 48. Saatteki Etkilerinin Yüzde Değerleri**

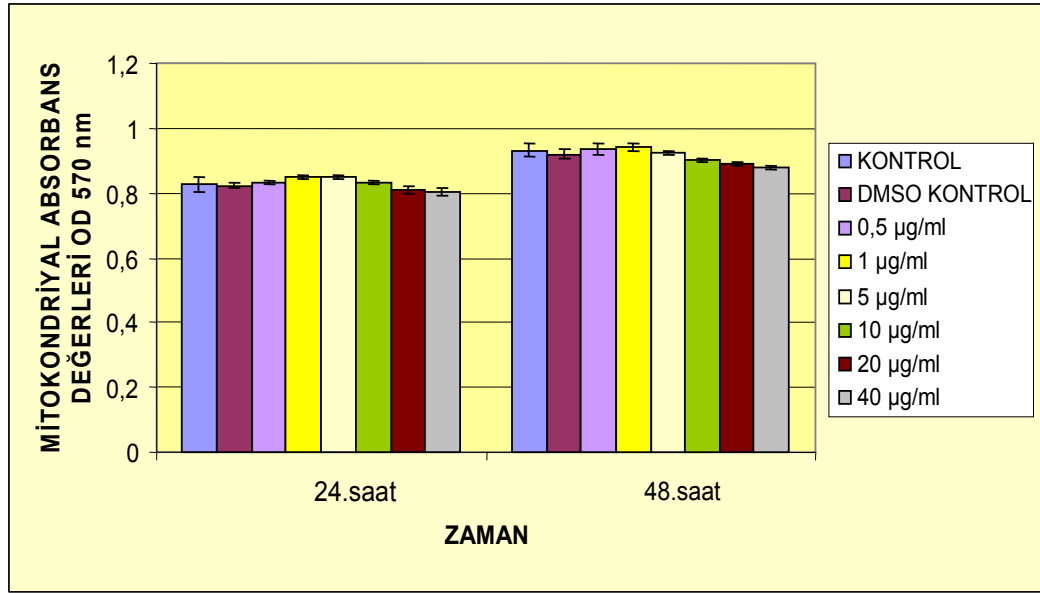
Gruplar	Yuvarlak Hücre Sayısı (%)	Vakuollü Hücre Sayısı (%)	Granül Sayısı (%)
Kontrol	4.78±0.52	11.28±0.80	1.45±0.15
DMSO Kontrol (2µl/ml)	4.26±0.44	14.76±0.55	1.40±0.13
TEKA ( <i>C. asiatica</i> ekstresi)			
0.5 µg/ml	3.46±0.22	9.80±0.34	1.45±0.13
1 µg/ml	3.62±0.37	10.08±0.29	1.40±0.13
5 µg/ml	4.68±0.55	9.01±0.34	1.35±0.10
10 µg/ml	5.55±0.25	11.77±1.13	1.33±0.11
20 µg/ml	5.27±0.39	13.60±0.66	1.22±0.10
40 µg/ml	5.63±0.66	16.53±0.32	1.17±0.09
İYÇ-Me			
0.5 µg/ml	3.53±0.51	10.61±0.86	1.45±0.18
1 µg/ml	4.63±0.36	11.55±0.50	1.30±0.12
2.5 µg/ml	3.78±0.72	10.96±0.86	1.20±0.09
5 µg/ml	5.71±0.28	14.01±1.26	1.15±0.08
10 µg/ml	6.96±0.75 <sup>p&lt;0.001</sup>	14.34±0.95	1.11±0.07
YÇ-Me			
0.5 µg/ml	3.18±0.42	9.90±1.00	1.55±0.16
1 µg/ml	3.82±0.24	10.78±0.55	1.30±0.10
2.5 µg/ml	4.39±0.43	13.00±0.54	1.55±0.16
5 µg/ml	5.07±0.64	14.15±0.37	1.33±0.11
10 µg/ml	5.79±0.58	15.14±0.33 <sup>p&lt;0.01</sup>	1.17±0.09
SYÇ-Me			
0.5 µg/ml	4.89±0.29	13.14±0.49	1.35±0.13
1 µg/ml	4.95±0.28	11.00±0.24	1.35±0.13
2.5 µg/ml	5.46±0.15	12.01±0.55	1.30±0.16
5 µg/ml	5.02±0.56	13.25±0.24	1.40±0.18
10 µg/ml	5.50±0.51	15.36±0.88 <sup>p&lt;0.001</sup>	1.23±0.10
İYÇ-inf			
0.5 µg/ml	5.01±0.34	13.77±0.57	1.23±0.10
1 µg/ml	3.65±0.34	7.53±0.95	1.26±0.10
2.5 µg/ml	3.75±0.43	7.85±0.54	1.20±0.09
5 µg/ml	5.73±0.38	7.39±0.65	1.20±0.14
10 µg/ml	5.16±0.34	7.82±0.46	1.45±0.15
YÇ-inf			
0.5 µg/ml	3.64±0.23	12.64±0.63	1.17±0.09
1 µg/ml	3.53±0.56	12.06±1.64	1.16±0.09
2.5 µg/ml	2.84±0.39	10.10±0.83	1.36±0.13
5 µg/ml	4.87±0.73	13.99±0.65	1.29±0.14
10 µg/ml	5.11±0.38	14.71±0.90	1.33±0.11
SYÇ-inf			
0.5 µg/ml	4.29±0.38	13.33±0.55	1.40±0.15
1 µg/ml	5.13±0.29	13.45±0.47	1.35±0.13
2.5 µg/ml	3.87±0.32	7.01±0.42 <sup>p&lt;0.001</sup>	1.50±0.18
5 µg/ml	4.16±0.50	13.17±0.56	1.40±0.13
10 µg/ml	6.61±0.43	14.78±0.83	1.21±0.12

İstatistiksel karşılaştırma kontrole göre yapılmıştır.

### ***NIH 3T3 fibroblastlarında mitokondriyal aktivitenin (MTT) değerlendirilmesi***

NIH 3T3 hücre dizisinde TEKA grubu için kontrol, DMSO-Kontrol, 0.5, 1, 5, 10, 20 ve 40 µg/ml TEKA konsantrasyonları olmak üzere toplam 8, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf, SYÇ-inf ekstrelerinin her biri için de; ayrı ayrı kontrol, DMSO-kontrol, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 µg/ml konsantrasyon olmak üzere toplam 7 grup kullanılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonuçları ELİZA (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi) cihazında okutulmuş ve her bir gruba ait mitokondriyal absorbans (MTT) sonuçları **Şekil 24-Şekil 30'** da verilmiştir. **Çizelge 16- Çizelge 22'** de de istatistiksel değerlendirme sonuçları verilmiştir.

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, 24 saatlik MTT değerleri arasında anlamlı farklılık görülmemiştir. Yalnızca SYÇ-Me grubunun 24 saatlik 0.5 ve 2.5 µg/ml konsantrasyonlarında, kontrole göre anlamlı bir artış vardır ( $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.05^{*}$ ), (**Çizelge 19**). 48. saat MTT (mitokondriyal aktivasyon) sonuçlarına göre de, hücre proliferasyonunun zamana göre artış gösterdiği gözlenmiştir. NIH 3T3 hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda, yalnızca İYÇ-inf grubunun 10 µg/ml konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir artış varken ( $p<0.05^{*}$ ), (**Çizelge 20**), İYÇ-Me ekstresinin 10 µg/ml konsantrasyonunda MTT absorbans değerinde anlamlı bir azalma görülmüştür ( $p<0.05^{*}$ ), (**Çizelge 17**).

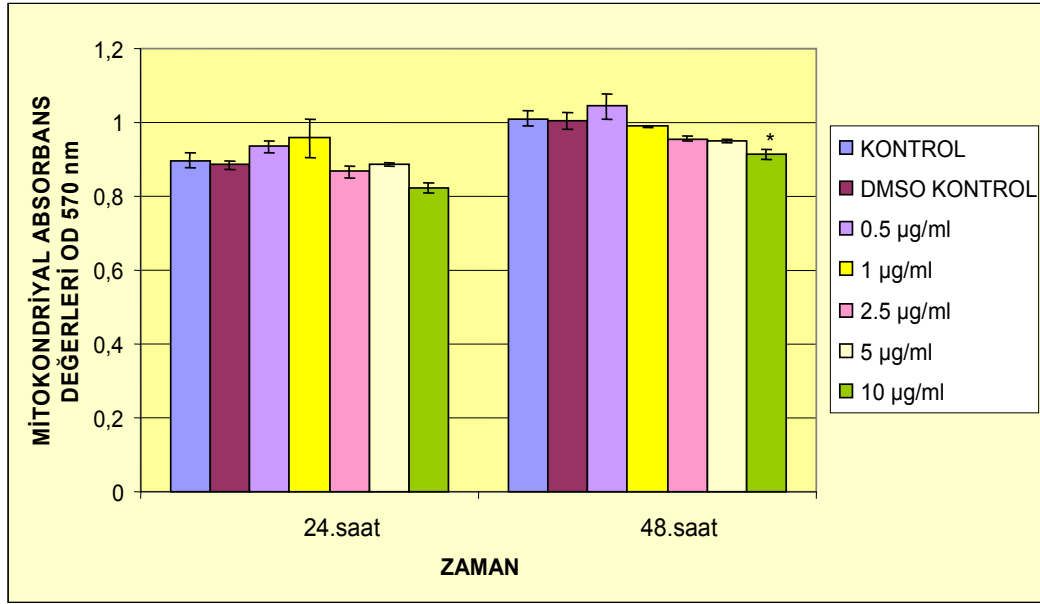


Şekil 24. TEKA Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

Çizelge 16. Farklı TEKA Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
Kontrol	0.825	0,023	$p > 0.05$	0.930	0.019	$p > 0.05$
DMSO-Kontrol	0.824	0,010	$p > 0.05$	0.930	0.015	$p > 0.05$
0.5 µg/ml	0.827	0,006	$p > 0.05$	0.935	0.015	$p > 0.05$
1 µg/ml	0.830	0,004	$p > 0.05$	0.930	0.009	$p > 0.05$
5 µg/ml	0.827	0,005	$p > 0.05$	0.926	0.004	$p > 0.05$
10 µg/ml	0.812	0,006	$p > 0.05$	0.900	0.007	$p > 0.05$
20 µg/ml	0.809	0,009	$p > 0.05$	0.885	0.006	$p > 0.05$
40 µg/ml	0.807	0,012	$p > 0.05$	0.884	0.004	$p > 0.05$

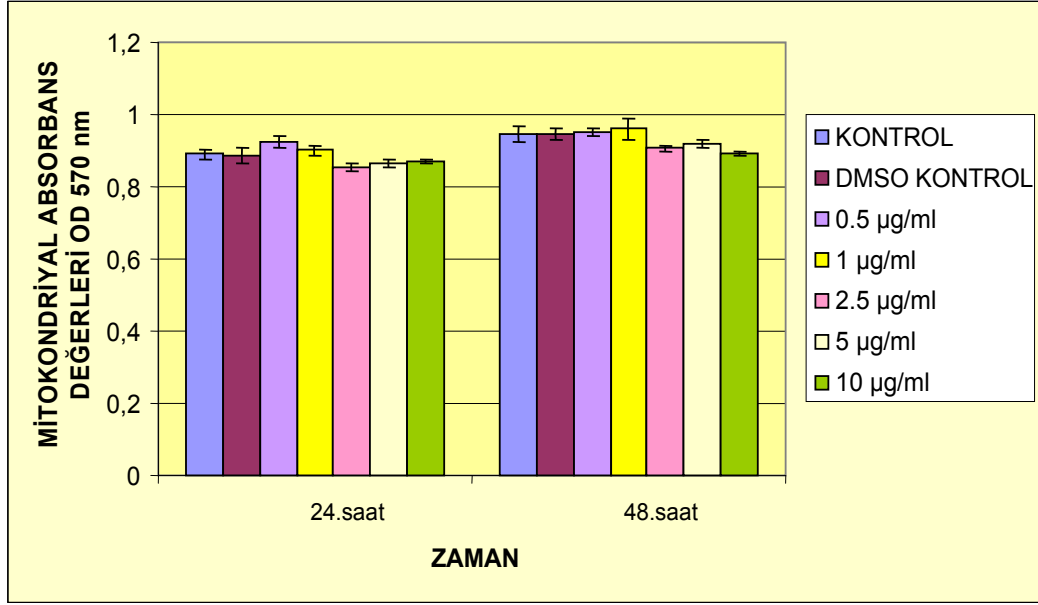




Şekil 25. İYÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

Çizelge 17. Farklı İYÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

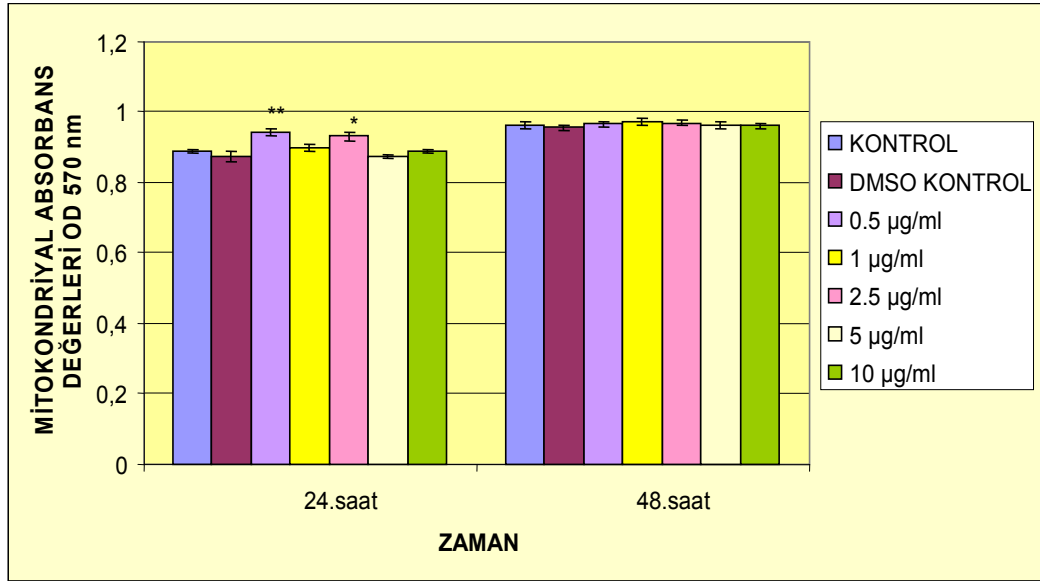
GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
<b>Kontrol</b>	0.897	0.021	$p > 0.05$	1.010	0.019	$p > 0.05$
<b>DMSO-Kontrol</b>	0.884	0.010	$p > 0.05$	1.003	0.023	$p > 0.05$
<b>0.5 µg/ml</b>	0.934	0.017	$p > 0.05$	1.045	0.033	$p > 0.05$
<b>1 µg/ml</b>	0.956	0.051	$p > 0.05$	0.989	0.002	$p > 0.05$
<b>2.5 µg/ml</b>	0.866	0.016	$p > 0.05$	0.956	0.008	$p > 0.05$
<b>5 µg/ml</b>	0.885	0.005	$p > 0.05$	0.948	0.004	$p > 0.05$
<b>10 µg/ml</b>	0.821	0.013	$p > 0.05$	0.912	0.013	$p < 0.05$



Şekil 26. YÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

Çizelge 18. Farklı YÇ-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

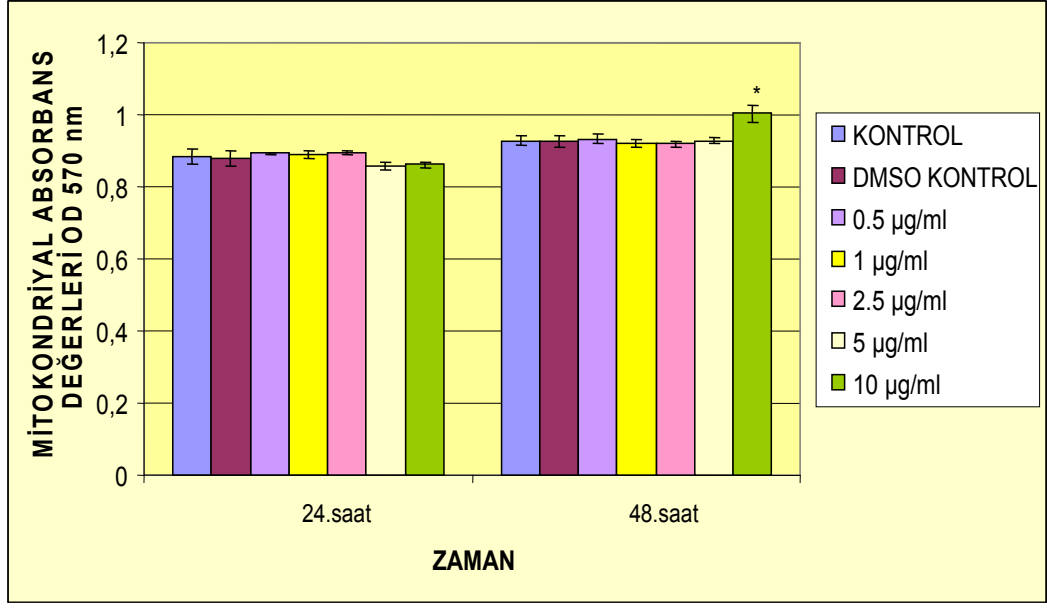
GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
Kontrol	0.889	0.013	$p > 0.05$	0.946	0.023	$p > 0.05$
DMSO-Kontrol	0.885	0.020	$p > 0.05$	0.945	0.016	$p > 0.05$
0.5 µg/ml	0.924	0.015	$p > 0.05$	0.951	0.010	$p > 0.05$
1 µg/ml	0.901	0.012	$p > 0.05$	0.961	0.030	$p > 0.05$
2.5 µg/ml	0.854	0.011	$p > 0.05$	0.906	0.008	$p > 0.05$
5 µg/ml	0.865	0.009	$p > 0.05$	0.918	0.009	$p > 0.05$
10 µg/ml	0.869	0.005	$p > 0.05$	0.891	0.005	$p > 0.05$



Şekil 27. SYC-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

Çizelge 19. Farklı SYC-Me Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

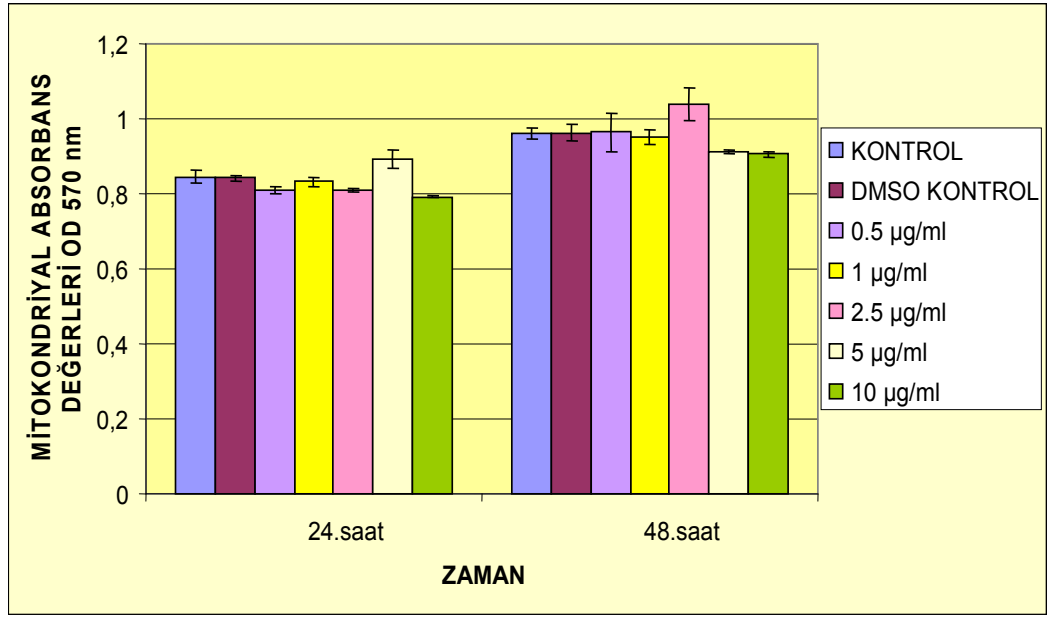
GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
<b>Kontrol</b>	0.889	0.005	$p > 0.05$	0.962	0.011	$p > 0.05$
<b>DMSO-Kontrol</b>	0.873	0.013	$p > 0.05$	0.956	0.005	$p > 0.05$
<b>0.5 µg/ml</b>	0.943	0.010	$p < 0.01$	0.966	0.006	$p > 0.05$
<b>1 µg/ml</b>	0.898	0.011	$p > 0.05$	0.973	0.009	$p > 0.05$
<b>2.5 µg/ml</b>	0.931	0.011	$p < 0.05$	0.968	0.007	$p > 0.05$
<b>5 µg/ml</b>	0.875	0.003	$p > 0.05$	0.963	0.008	$p > 0.05$
<b>10 µg/ml</b>	0.887	0.004	$p > 0.05$	0.961	0.006	$p > 0.05$



Şekil 28. İYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

Çizelge 20. Farklı İYÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

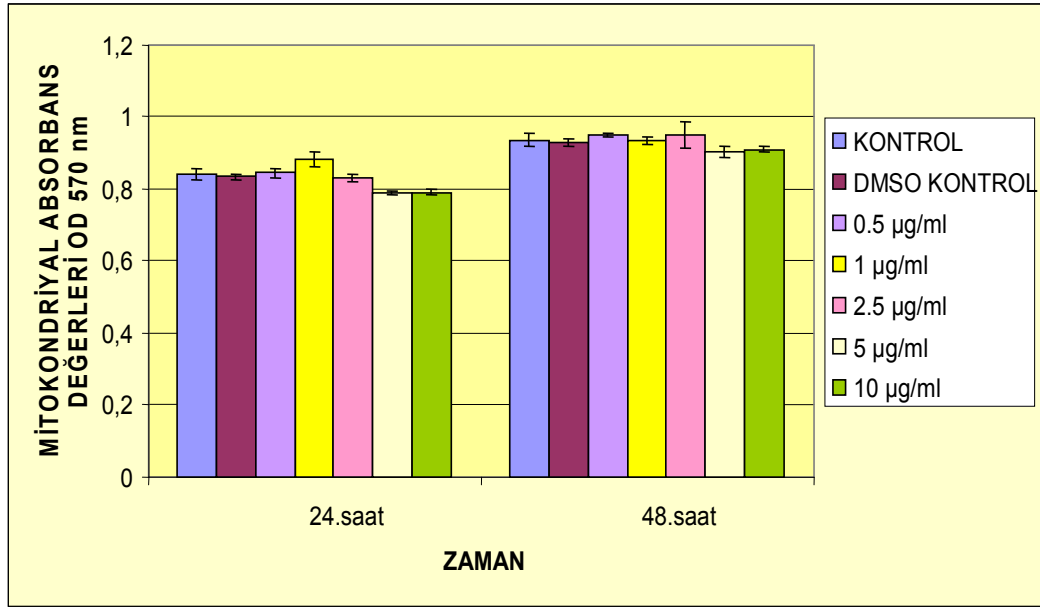
GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
<b>Kontrol</b>	0.885	0.020	$p > 0.05$	0.928	0.014	$p > 0.05$
<b>DMSO-Kontrol</b>	0.879	0.019	$p > 0.05$	0.925	0.015	$p > 0.05$
<b>0.5 µg/ml</b>	0.892	0.004	$p > 0.05$	0.932	0.013	$p > 0.05$
<b>1 µg/ml</b>	0.887	0.010	$p > 0.05$	0.921	0.011	$p > 0.05$
<b>2.5 µg/ml</b>	0.896	0.005	$p > 0.05$	0.918	0.006	$p > 0.05$
<b>5 µg/ml</b>	0.856	0.009	$p > 0.05$	0.928	0.008	$p > 0.05$
<b>10 µg/ml</b>	0.861	0.007	$p > 0.05$	1.002	0.023	$p < 0.05$



Şekil 29. YÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

Çizelge 21. Farklı YÇ-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
<b>Kontrol</b>	0.846	0.015	$p > 0.05$	0.962	0.014	$p > 0.05$
<b>DMSO-Kontrol</b>	0.842	0.007	$p > 0.05$	0.962	0.021	$p > 0.05$
<b>0.5 µg/ml</b>	0.807	0.009	$p > 0.05$	0.965	0.051	$p > 0.05$
<b>1 µg/ml</b>	0.833	0.012	$p > 0.05$	0.952	0.019	$p > 0.05$
<b>2.5 µg/ml</b>	0.810	0.005	$p > 0.05$	1.039	0.042	$p > 0.05$
<b>5 µg/ml</b>	0.892	0.023	$p > 0.05$	0.913	0.005	$p > 0.05$
<b>10 µg/ml</b>	0.791	0.003	$p > 0.05$	0.905	0.005	$p > 0.05$



Şekil 30. SYC-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

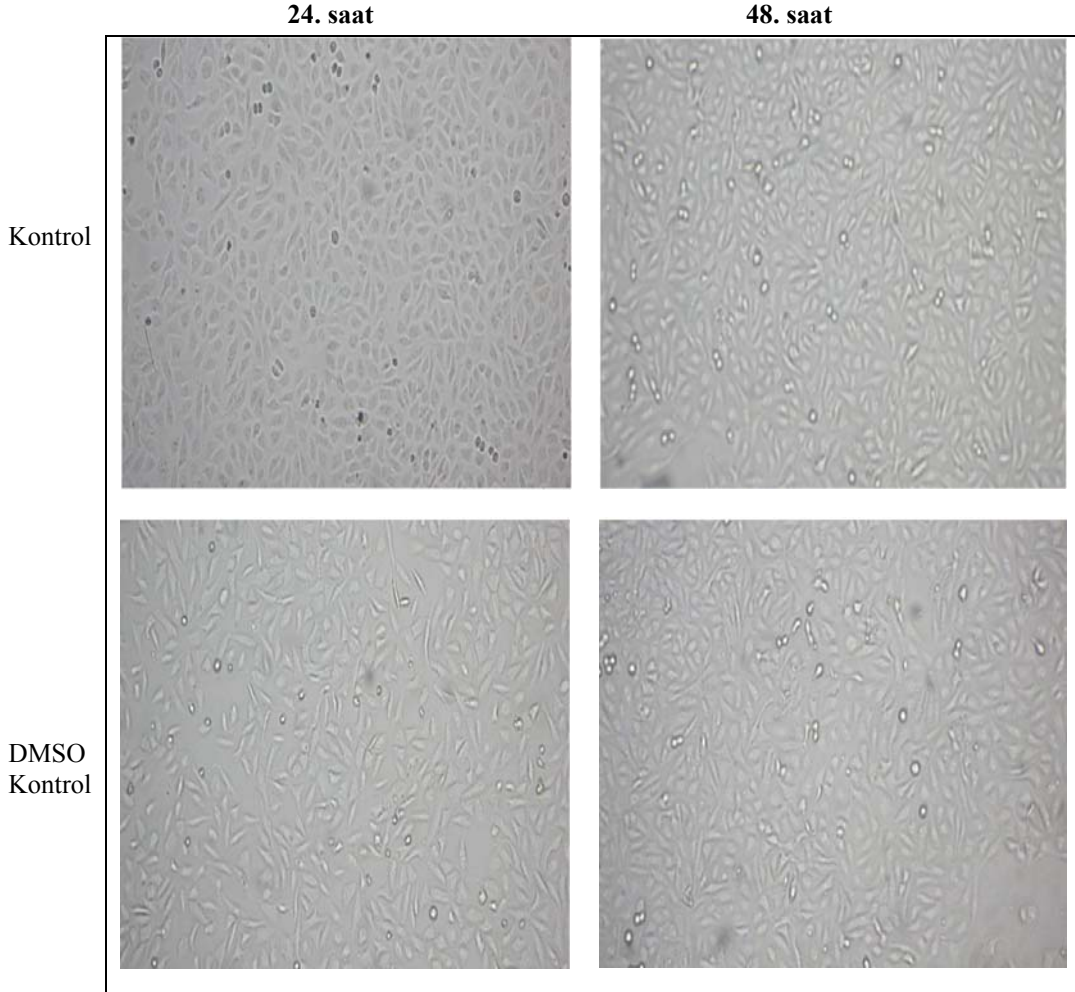
Çizelge 22. Farklı SYC-inf Konsantrasyonlarının NIH 3T3 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrolle Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
Kontrol	0.840	0.015	$p > 0.05$	0.936	0.018	$p > 0.05$
DMSO-Kontrol	0.834	0.009	$p > 0.05$	0.930	0.011	$p > 0.05$
0.5 µg/ml	0.844	0.011	$p > 0.05$	0.950	0.006	$p > 0.05$
1 µg/ml	0.884	0.021	$p > 0.05$	0.936	0.009	$p > 0.05$
2.5 µg/ml	0.831	0.010	$p > 0.05$	0.950	0.034	$p > 0.05$
5 µg/ml	0.789	0.006	$p > 0.05$	0.904	0.016	$p > 0.05$
10 µg/ml	0.791	0.007	$p > 0.05$	0.911	0.007	$p > 0.05$

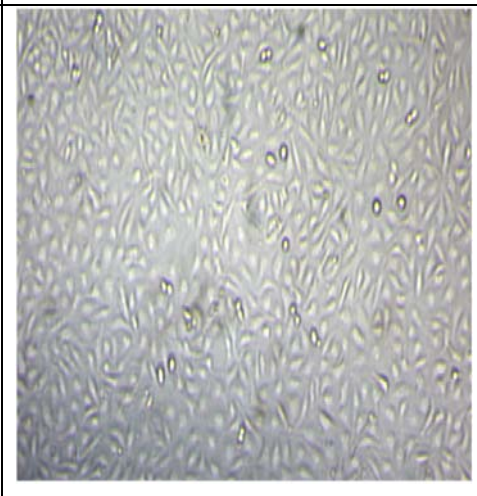
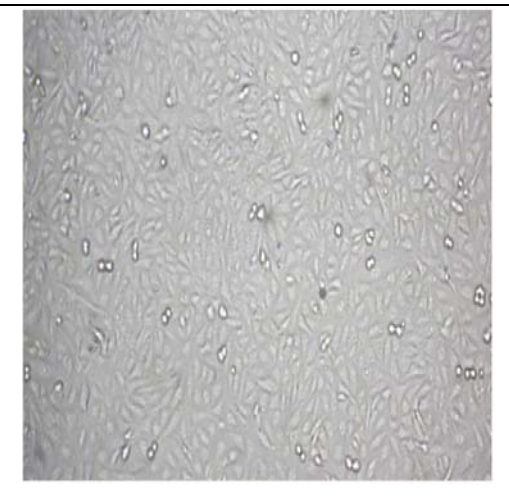
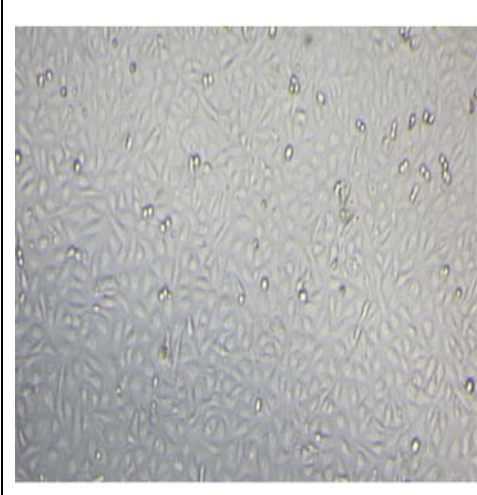

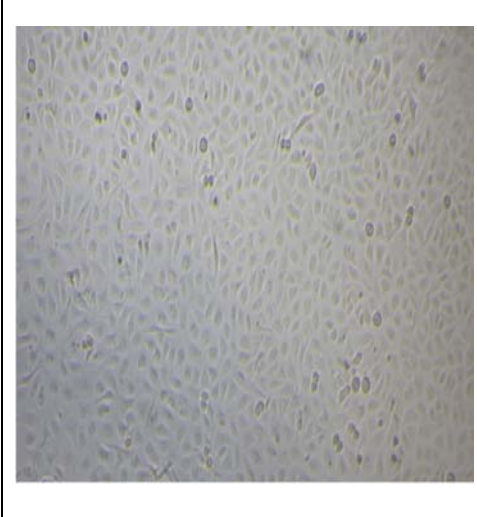

## U2OS Hücrelerinde Antikanser Aktivitenin Değerlendirilmesi

### *Farklı deney gruplarına ait U2OS hücrelerinin invert-mikroskop görüntüleri*

Şekil 31-Şekil 38’de kontrol, DMSO-kontrol, kateşin ve *Camellia sinensis* ekstraktları uygulanan U2OS hücrelerinin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri verilmiştir. Özellikle *C. sinensis* ekstraktlarında konsantrasyon ve inkübasyon zamanı arttıkça hücre canlılığının ve proliferasyonunun azaldığı görülmektedir.

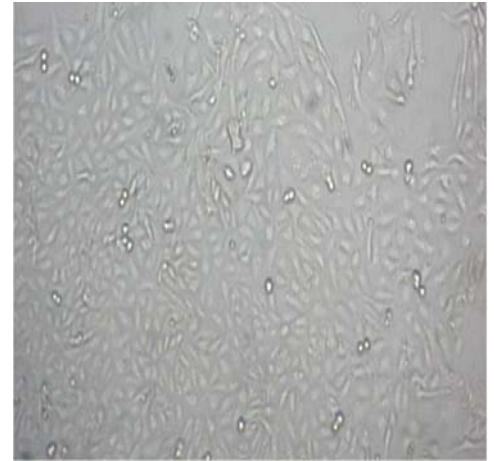


Şekil 31. Kontrol ve DMSO-Kontrol Grubu U2OS Hücrelerinin 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X100)

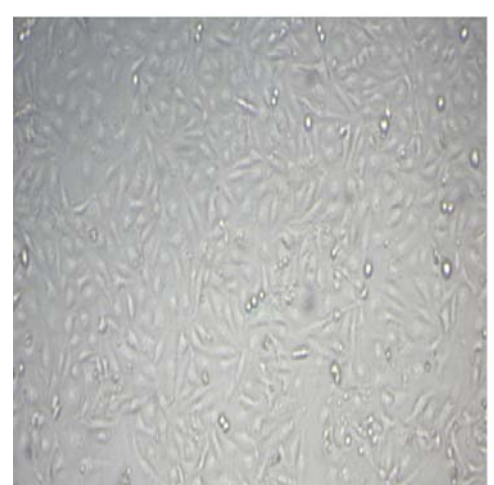
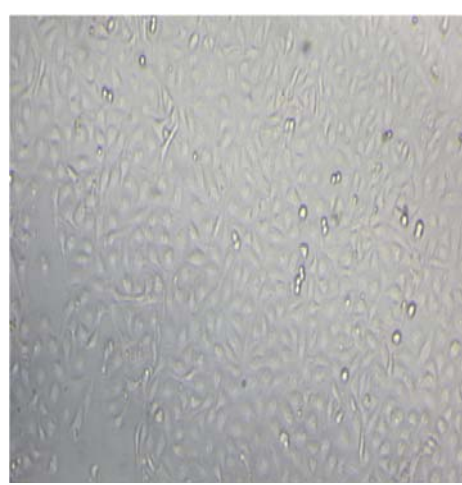
Kateşin	24. saat	48. saat
50 $\mu$ M		
100 $\mu$ M		
200 $\mu$ M		



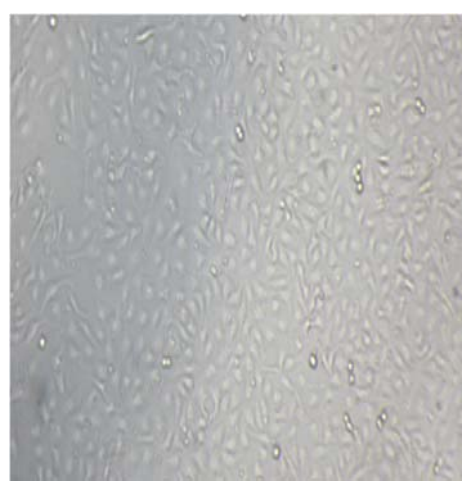
**300  
μM**



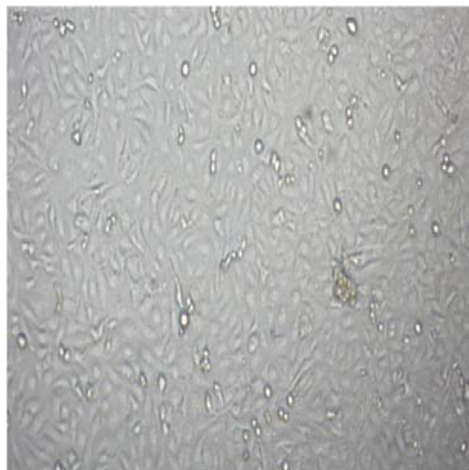
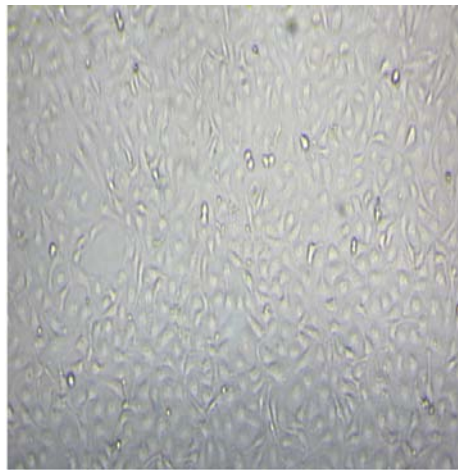
**400  
μM**



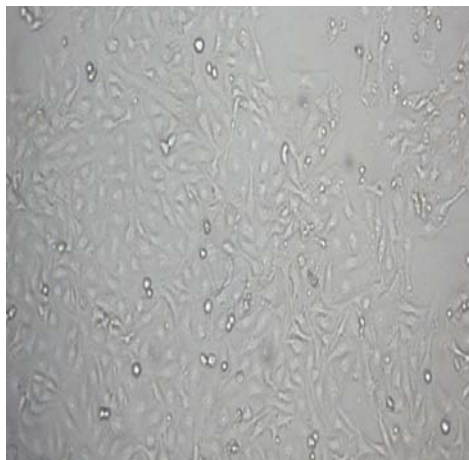
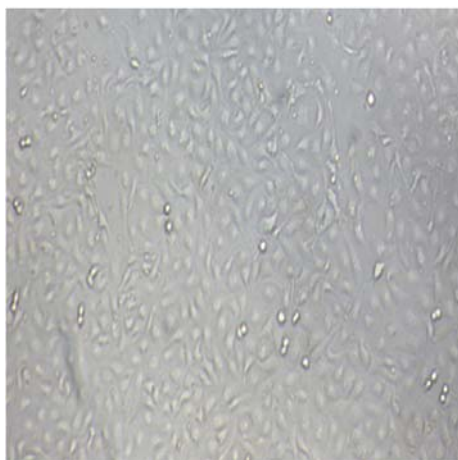
**500  
μM**



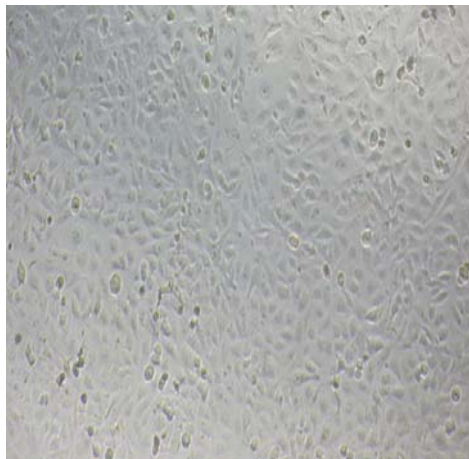
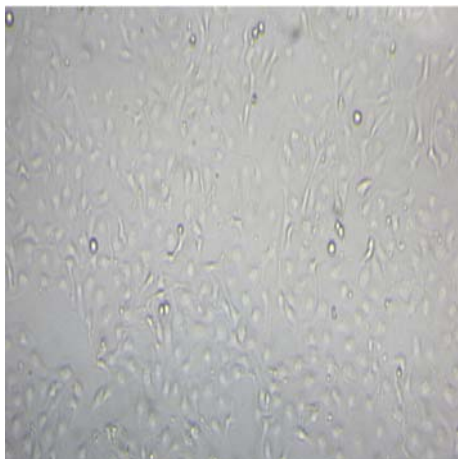
**600  
μM**

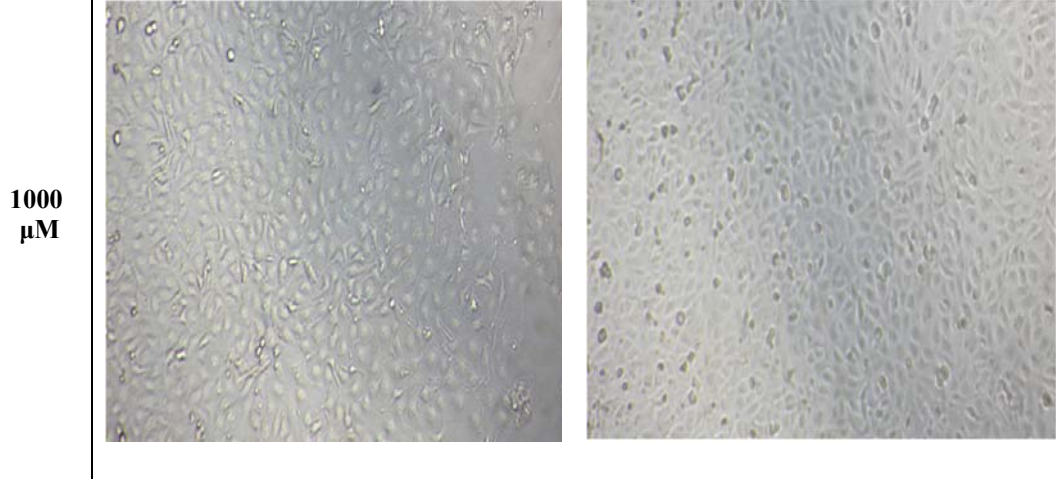


**700  
μM**

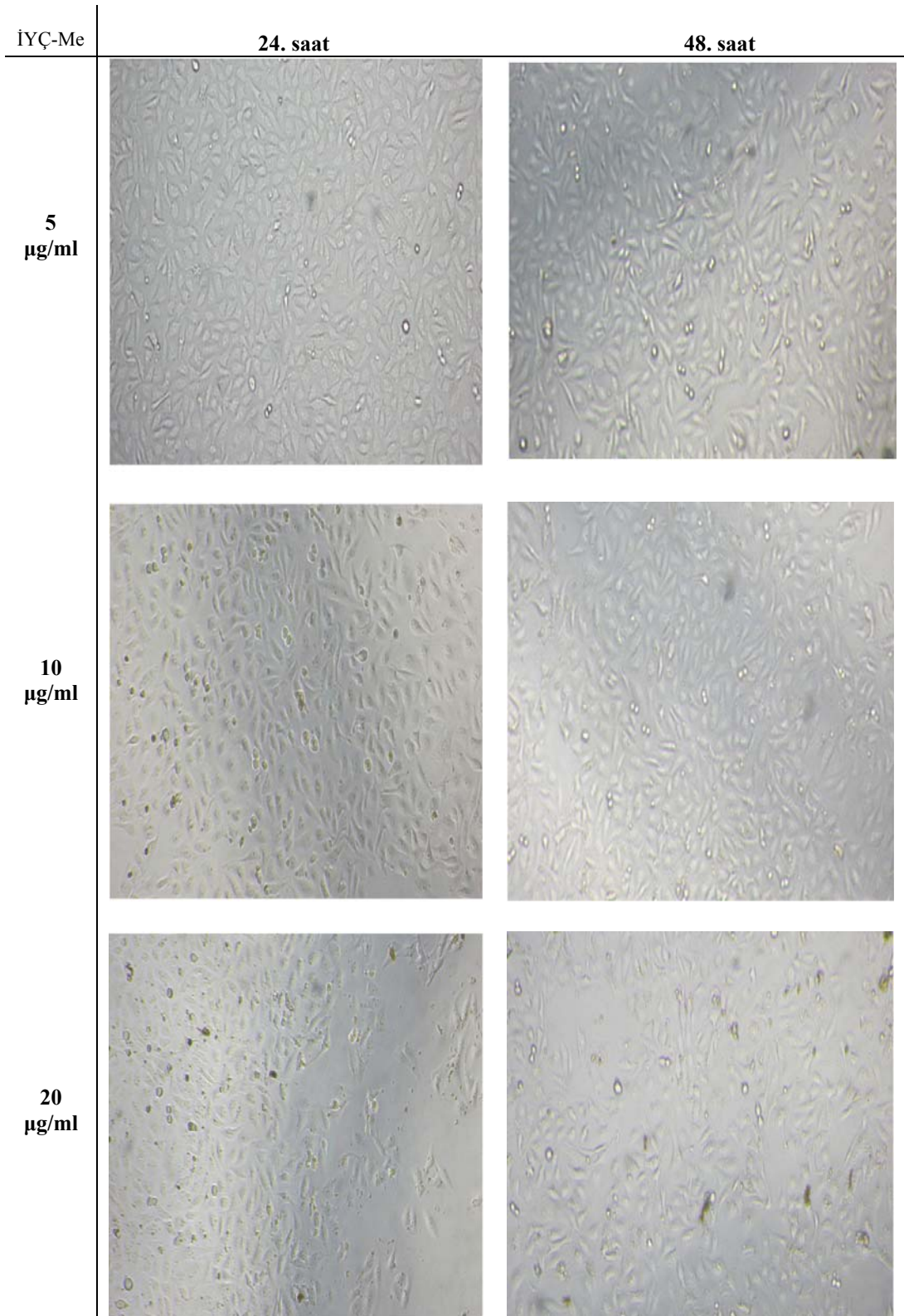


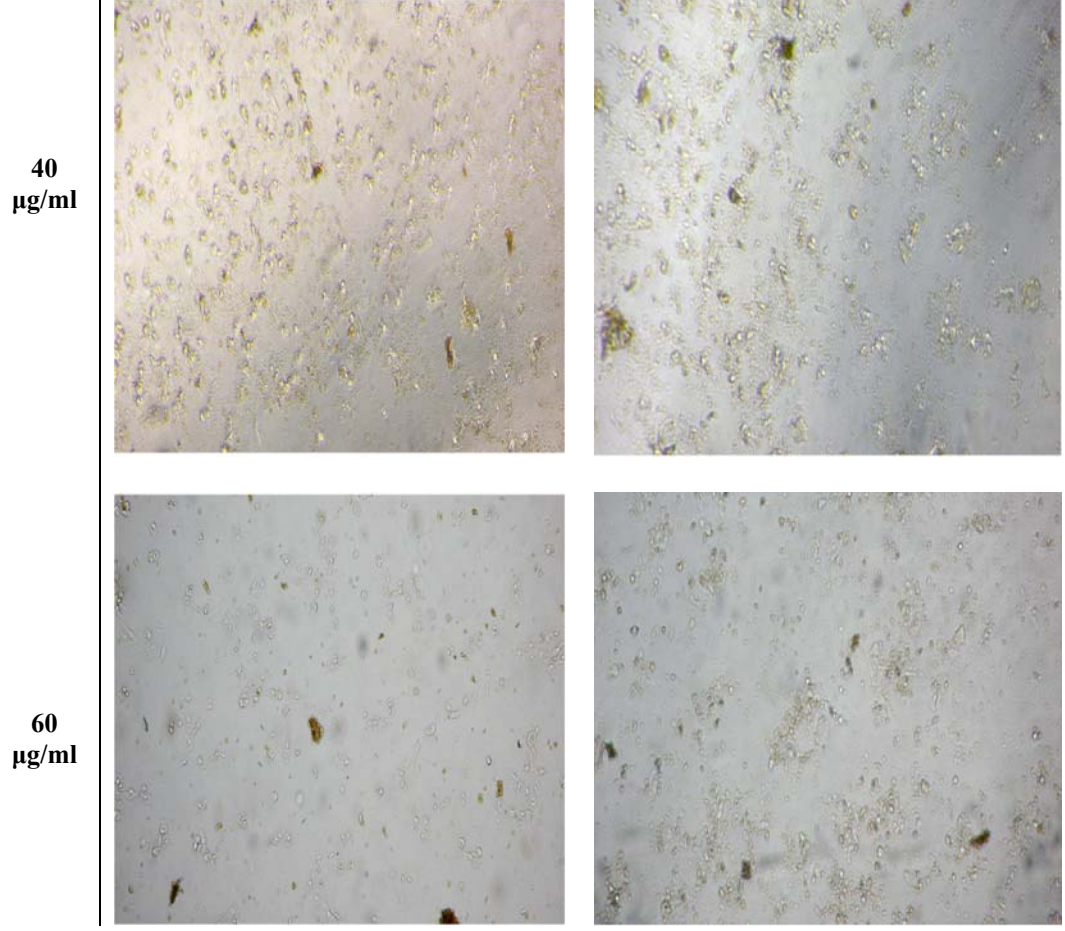
**800  
μM**



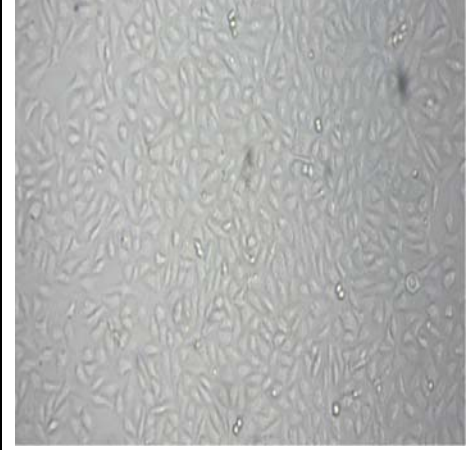
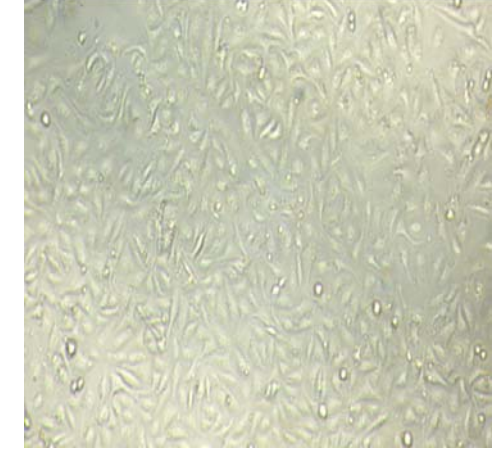
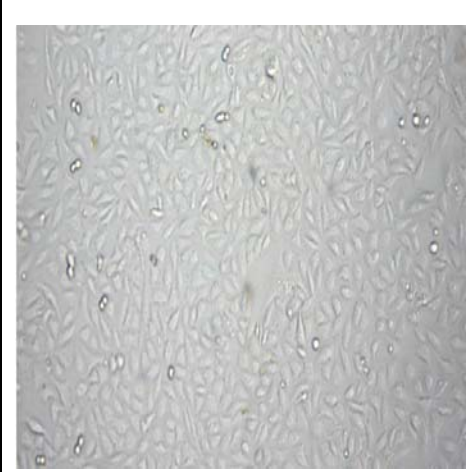
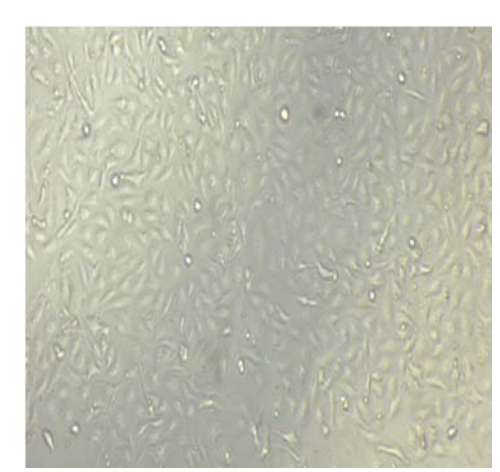
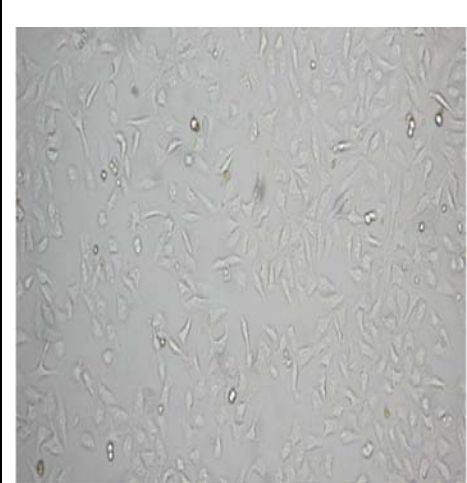
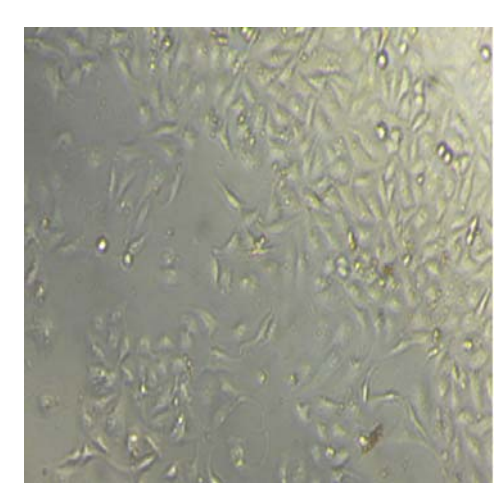


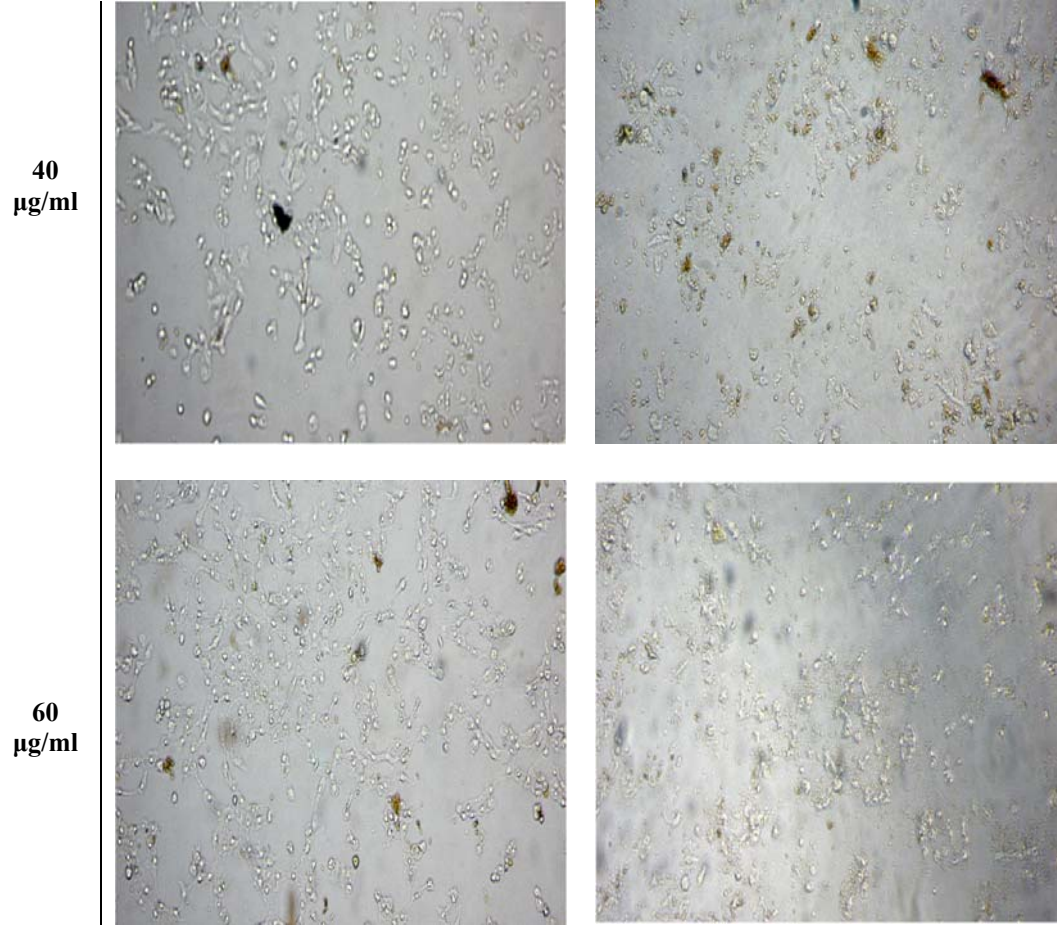
**Şekil 32. Kateşin Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X100)**








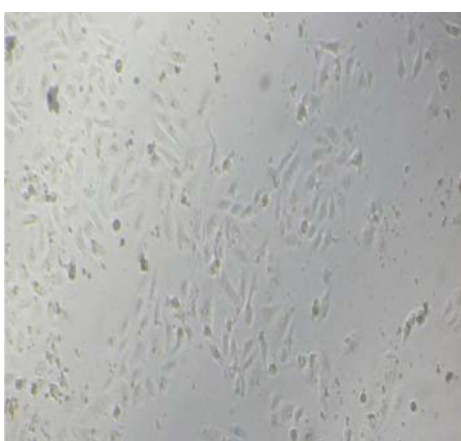


Şekil 33. İYÇ-Me (İşlenmiş Yeşil Çay-Metanol) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X100)

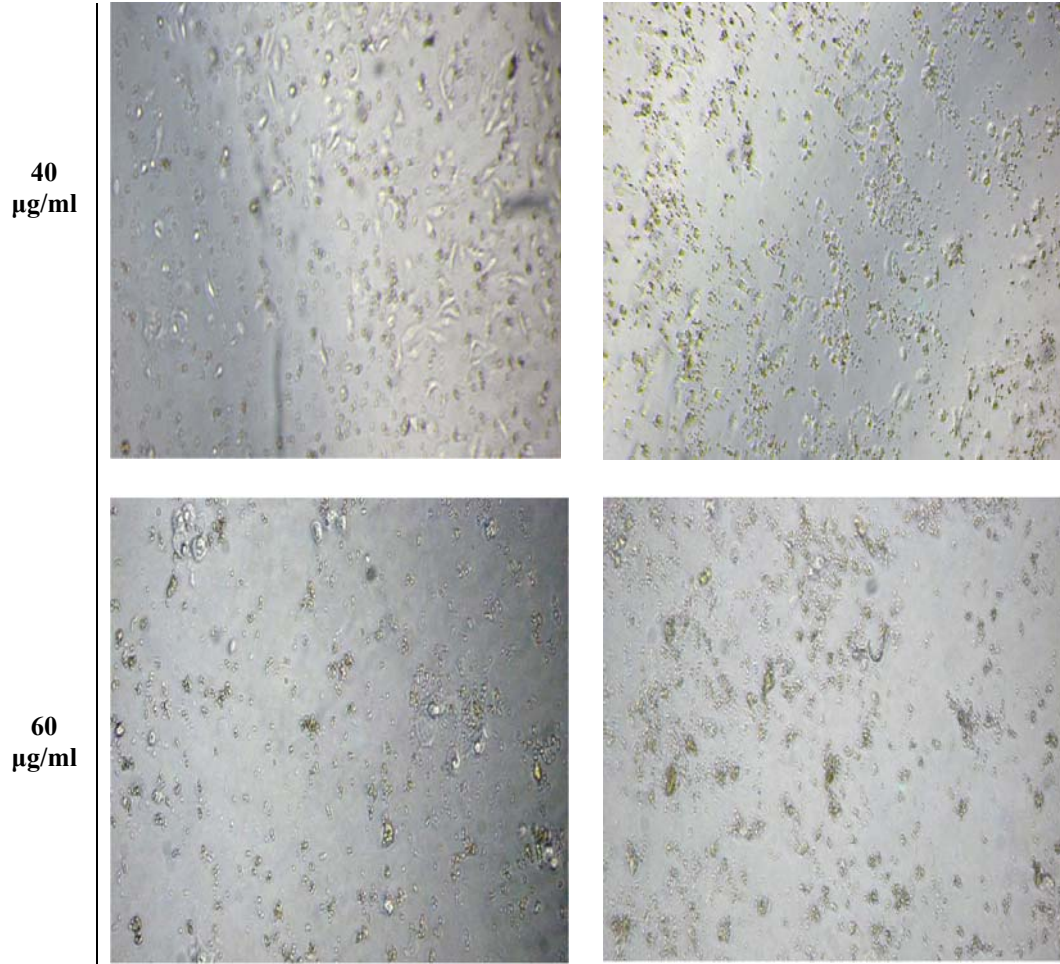
YÇ-Me	24. saat	48. saat
5 µg/ml		
10 µg/ml		
20 µg/ml		



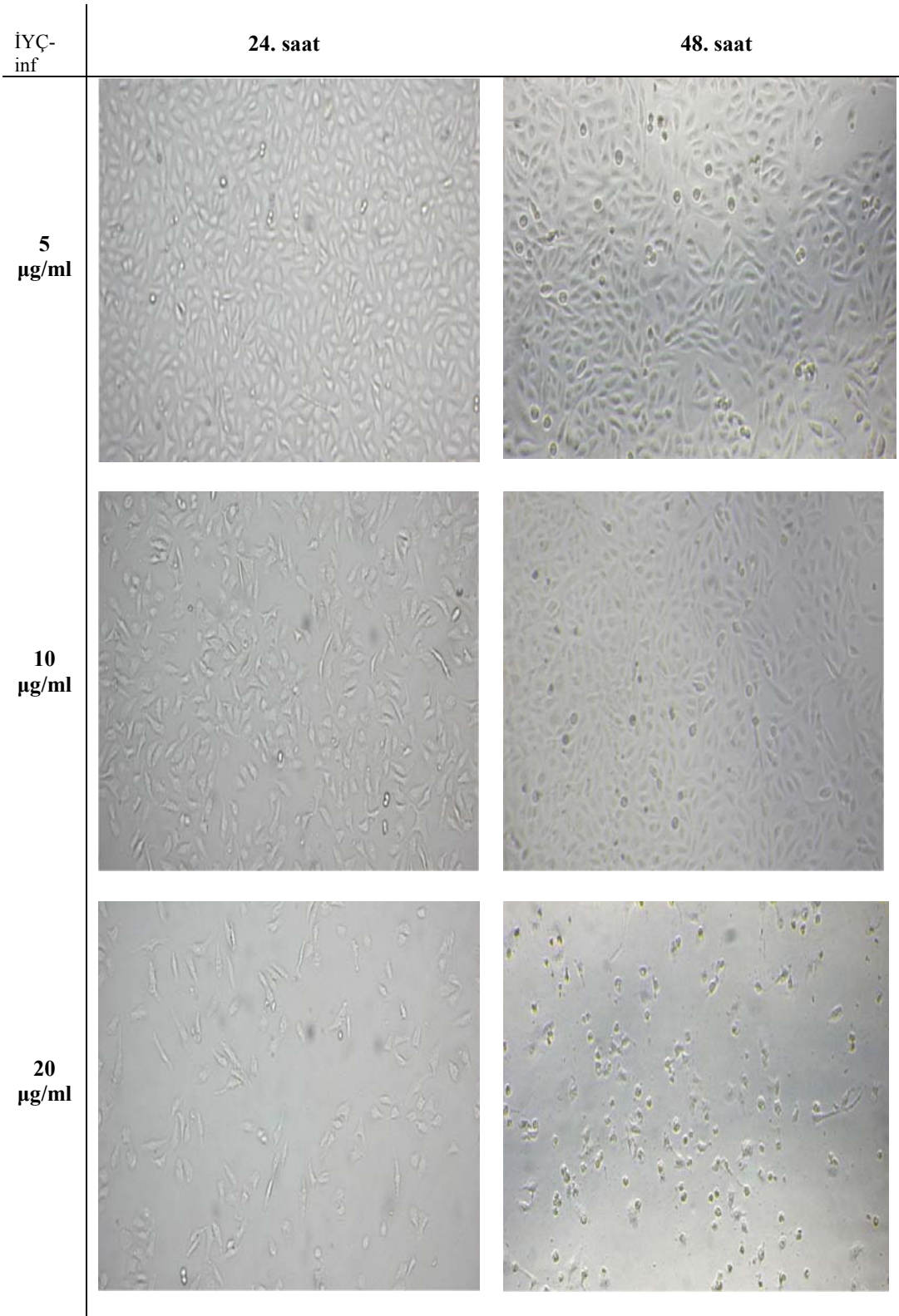
Şekil 34. YÇ-Me (İşlenmemiş Yeşil Çay-Metanol) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X100)

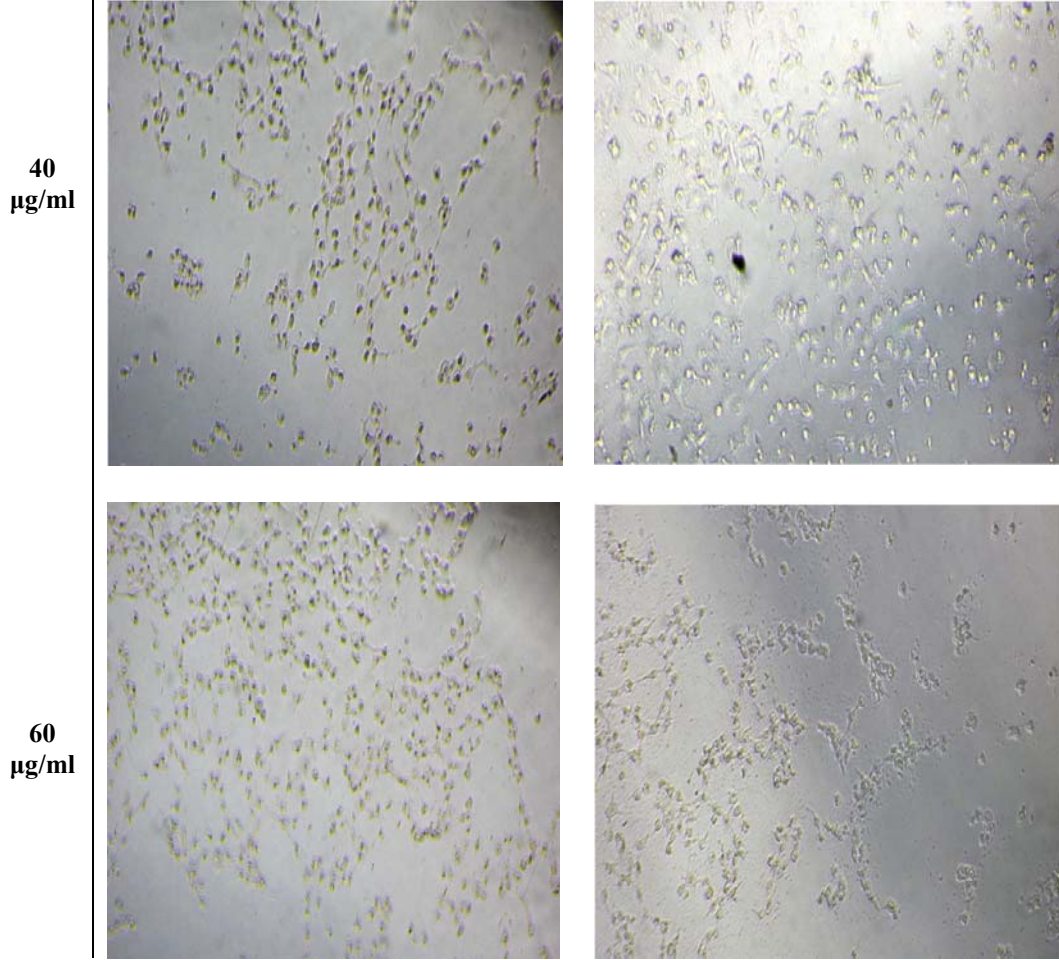
SYÇ- Me	24. saat	48. saat
5 µg/ml		
10 µg/ml		
20 µg/ml		



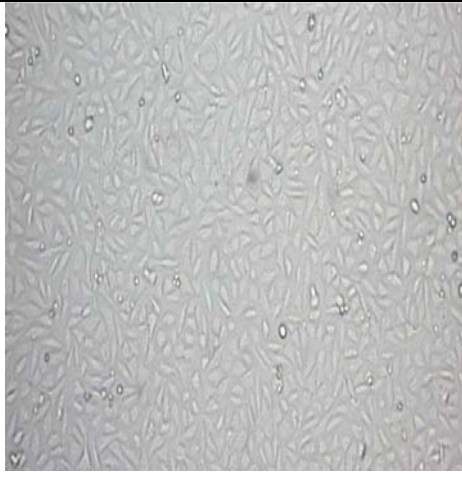
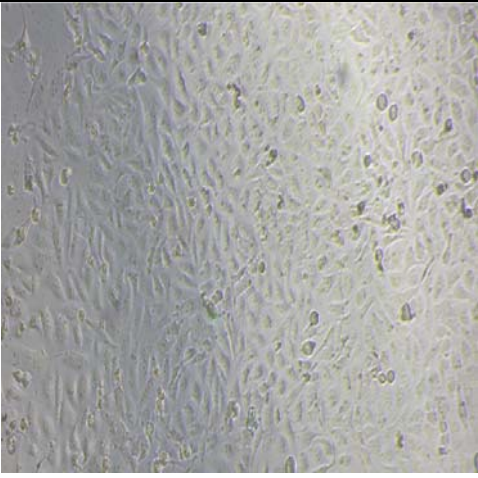
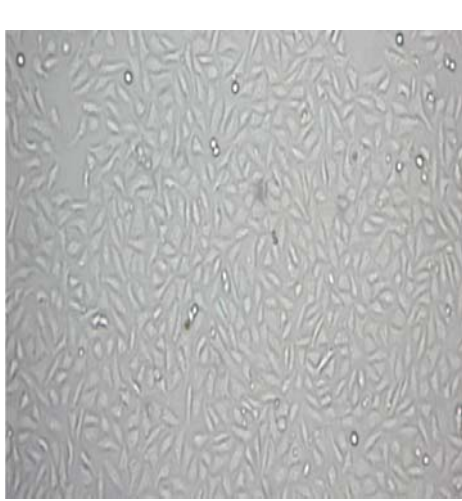
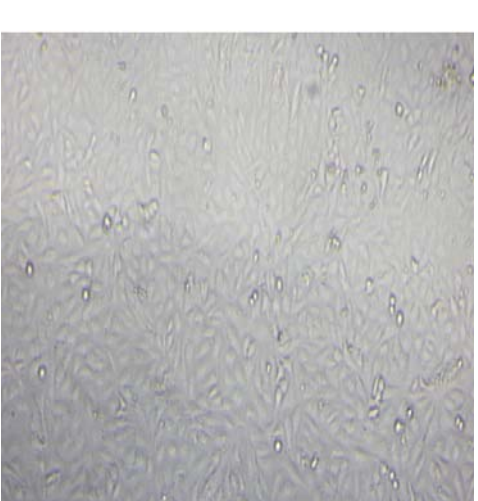
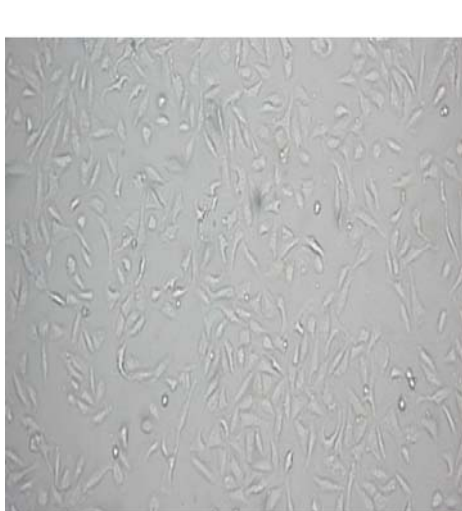



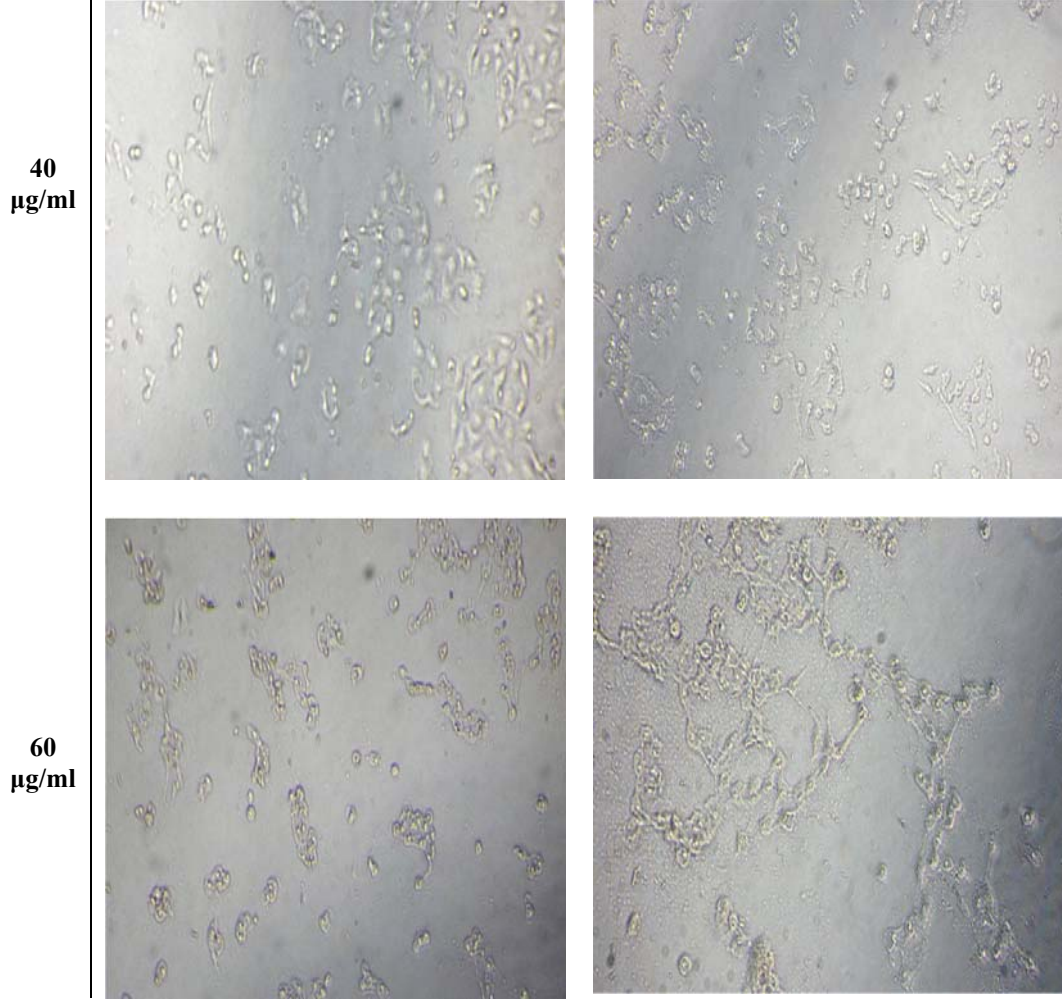
**Şekil 35. SYÇ-Me (Satın Alınmış Yeşil Çay-Metanol) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X100)**





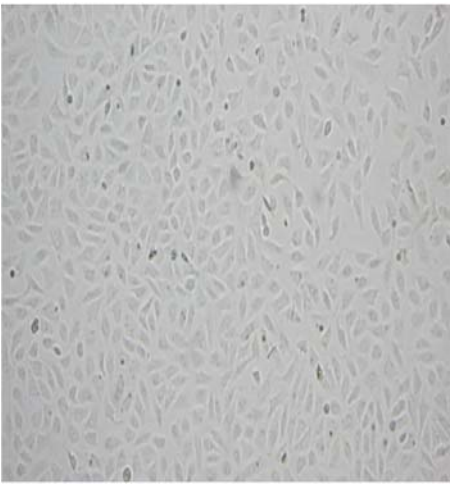
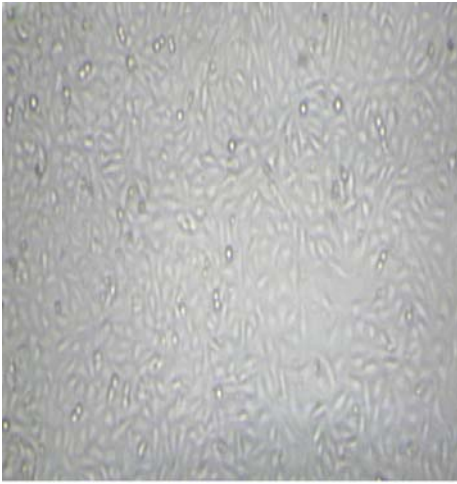

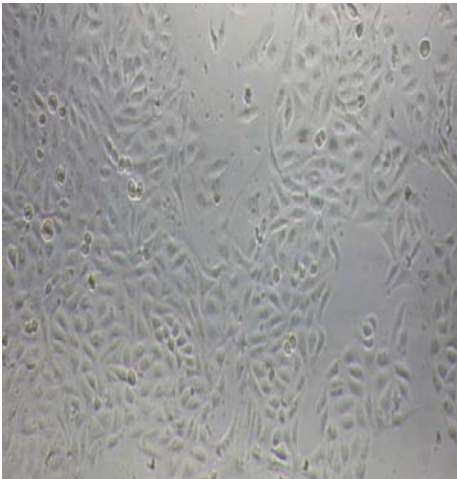


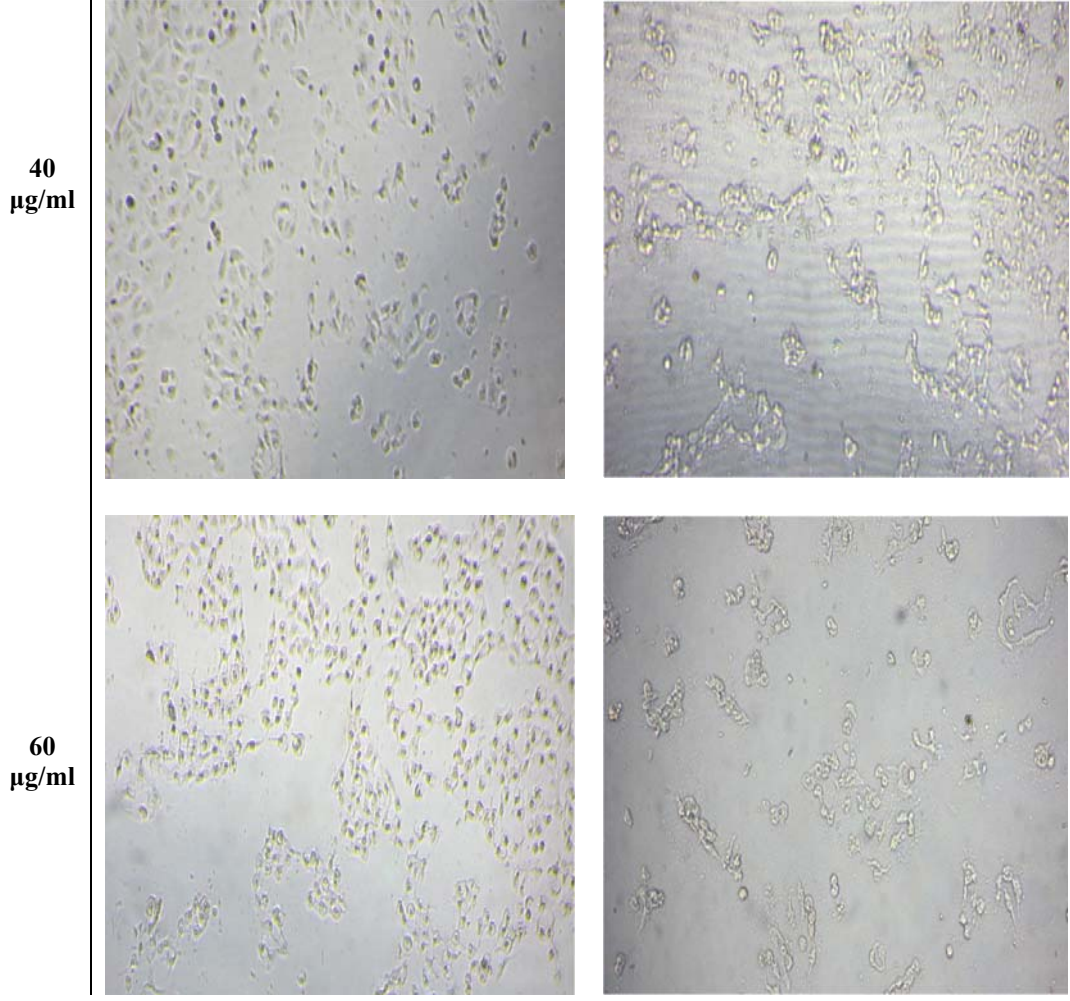
**Şekil 36. İYÇ-inf (İşlenmiş Yeşil Çay-İnfüzyon) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X100)**

YÇ- inf	24. saat	48. saat
5 µg/ml		
10 µg/ml		
20 µg/ml		



**Şekil 37. YÇ-inf (İşlenmemiş Yeşil Çay-İnfüzyon) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X100)**

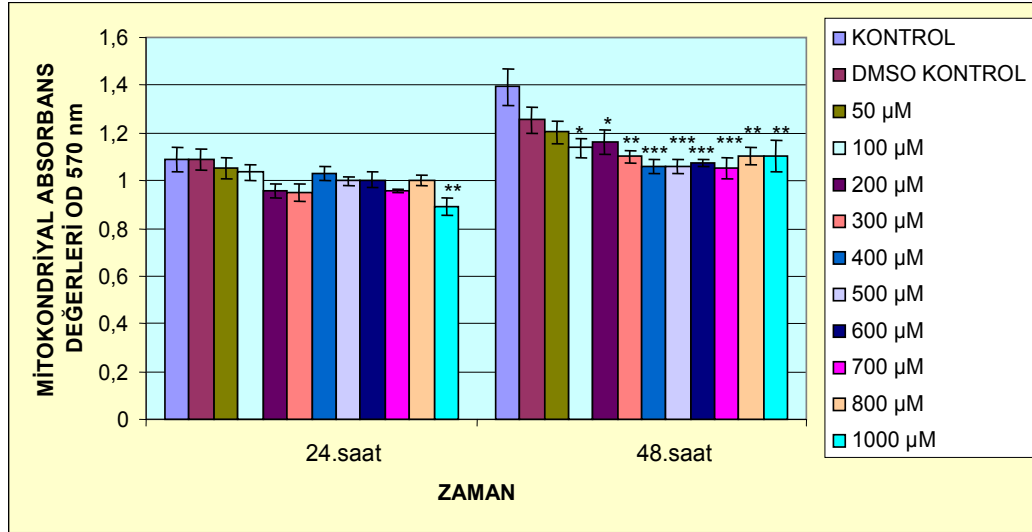
SYÇ- inf	24. saat	48. saat
5 µg/ml		
10 µg/ml		
20 µg/ml		



**Şekil 38. SYÇ-inf (Satın Alınmış Yeşil Çay-İnfüzyon) Grubu Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X100)**

### U2OS hücrelerinde mitokondriyal aktivitenin (MTT) değerlendirilmesi

U2OS hücre dizisinde kateşin grubu için; kontrol, DMSO-kontrol, 50, 100, 200,300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 µM olmak üzere toplam 12, İYÇ-Me, YÇ-Me, SYÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf, SYÇ-inf için de; kontrol, DMSO-kontrol, 5, 10, 20, 40 ve 60 µg/ml olmak üzere toplam 7 konsantrasyon kullanılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonuçları ELİZA (Enzim Bağlantılı İmmünoresorbent Yöntemi) cihazında okutulmuş ve her bir ekstreye ait mitokondriyal absorbans (MTT) sonuçları Şekil 39-Şekil 45 ve Çizelge 23-Çizelge 29’da da istatistiksel değerlendirme sonuçları verilmiştir.



Şekil 39. Kateşin Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

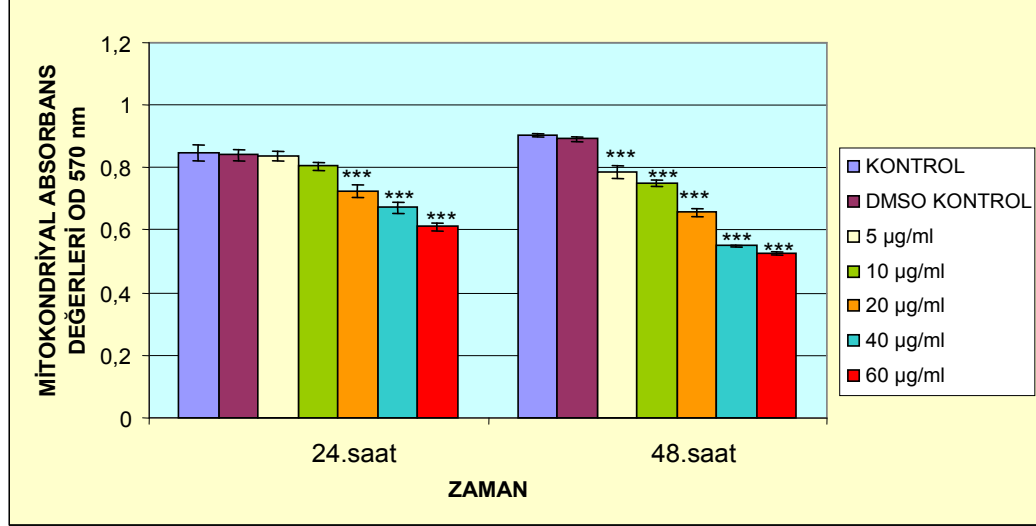
Çizelge 23. Farklı Kateşin Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
<b>Kontrol</b>	1.088	0.048	$p > 0.05$	1.391	0.079	$p > 0.05$
<b>DMSO-Kontrol</b>	1.087	0.042	$p > 0.05$	1.254	0.055	$p > 0.05$
<b>50 µM</b>	1.049	0.044	$p > 0.05$	1.203	0.047	$p > 0.05$
<b>100 µM</b>	1.034	0.030	$p > 0.05$	1.136	0.043	$p < 0.05$
<b>200 µM</b>	0.958	0.030	$p > 0.05$	1.158	0.051	$p < 0.05$
<b>300 µM</b>	0.950	0.036	$p > 0.05$	1.101	0.025	$p < 0.01$
<b>400 µM</b>	1.027	0.029	$p > 0.05$	1.060	0.031	$p < 0.001$
<b>500 µM</b>	0.999	0.019	$p > 0.05$	1.060	0.031	$p < 0.001$
<b>600 µM</b>	1.004	0.033	$p > 0.05$	1.074	0.013	$p < 0.001$
<b>700 µM</b>	0.958	0.009	$p > 0.05$	1.052	0.041	$p < 0.001$
<b>800 µM</b>	1.002	0.023	$p > 0.05$	1.104	0.036	$p < 0.01$
<b>1000 µM</b>	0.889	0.036	$p < 0.01$	1.102	0.064	$p < 0.01$

Şekil 39’da pozitif kontrol olarak kullandığımız kateşinin farklı konsantrasyonlarının U2OS hücrelerinde 24 ve 48 saatlik mitokondriyal absorbans değerleri ve Çizelge 23’de de MTT sonuçlarının istatistiksel değerlendirmeleri görülmektedir. 24 saatlik inkübasyon sonunda kateşin konsantrasyonlarının tümünün absorbans değerlerinde azalma görülsede sadece



en yüksek konsantrasyon olan 1000  $\mu\text{M}$ 'da kontrole göre önemli azalma belirlenmiştir ( $p < 0.01^{**}$ ). 48 saat inkübasyon sonunda kontrole göre kateşinin tüm konsantrasyonlarının mitokondriyal absorbands değerlerinde önemli düzeyde azalma meydana gelmiştir. İstatistiksel anlamlılık değerleri kontrole göre kateşinin 100 ve 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ( $p < 0.05^*$ ); 300, 800 ve 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ( $p < 0.01^{**}$ ) ve 400, 500, 600, 700  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında da ( $p < 0.001^{***}$ ) olarak belirlenmiştir (**Çizelge 23**).



**Şekil 40. İYÇ-Me Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama $\pm$ Standart Hata)**

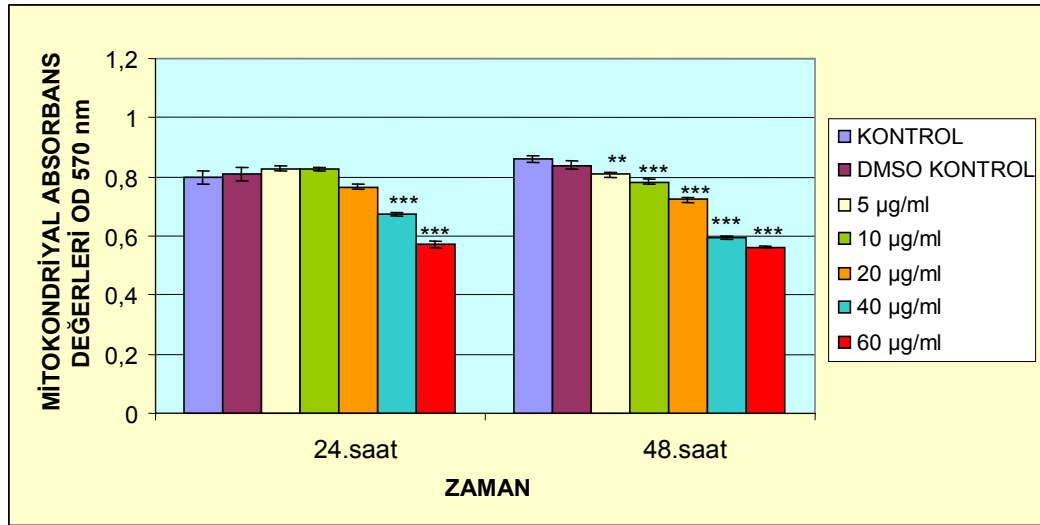
**Çizelge 24. Farklı İYÇ-Me Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri**

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
<b>Kontrol</b>	0.848	0.025	$p > 0.05$	0.902	0.005	$p > 0.05$
<b>DMSO-Kontrol</b>	0.850	0.017	$p > 0.05$	0.900	0.008	$p < 0.001$
<b>5 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	0.837	0.013	$p > 0.05$	0.787	0.019	$p < 0.001$
<b>10 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	0.804	0.013	$p > 0.05$	0.750	0.010	$p < 0.001$
<b>20 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	0.726	0.019	$p < 0.001$	0.658	0.012	$p < 0.001$
<b>40 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	0.672	0.018	$p < 0.001$	0.549	0.004	$p < 0.001$
<b>60 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	0.611	0.012	$p < 0.001$	0.527	0.004	$p < 0.001$

**Şekil 40**'da İYÇ-Me'nin U2OS hücrelerinde 24 ve 48 saatlik mitokondriyal absorbands değerleri ve **Çizelge 24**'de de MTT sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmeleri görülmektedir.

24 saatlik inkübasyon sonunda, İYÇ-Me'nin 20, 40 ve 60  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarında kontrole göre önemli sitotoksik etki meydana gelmiş ve mitokondriyal aktivitenin önemli düzeyde azaldığı görülmüştür ( $p < 0.001^{***}$ ).

48 saat sonra U2OS hücrelerinde İYÇ-Me'nin sitotoksik etkisi inkübasyon süresine bağlı olarak artmış ve tüm İYÇ-Me konsantrasyonlarında kontrole göre mitokondriyal aktivite önemli ölçüde azalmıştır ( $p < 0.001^{***}$ ).



Şekil 41. YÇ-Me Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

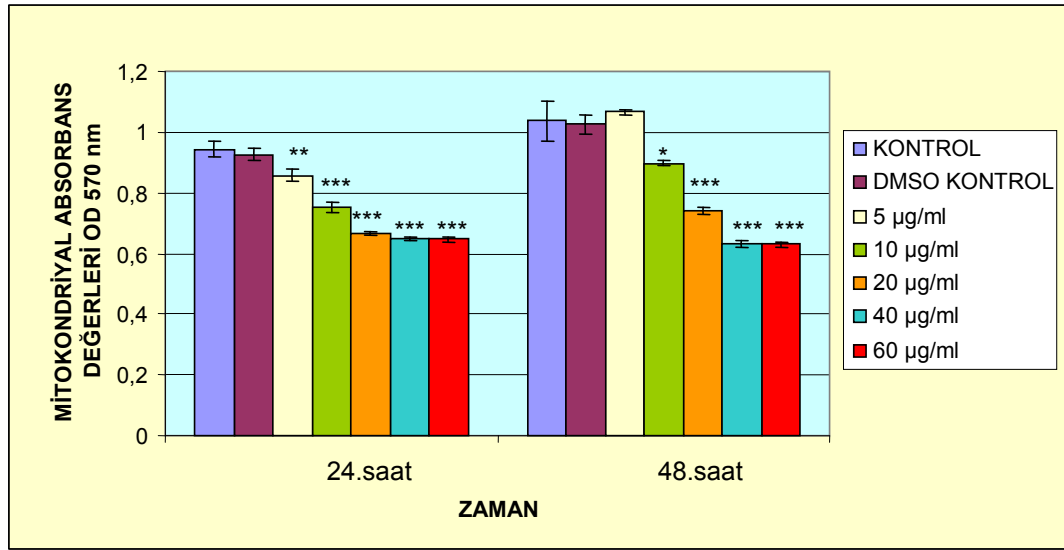
Çizelge 25. Farklı YÇ-Me Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
<b>Kontrol</b>	0.800	0.022	$p > 0.05$	0.859	0.012	$p > 0.05$
<b>DMSO-Kontrol</b>	0.810	0.022	$p > 0.05$	0.840	0.012	$p > 0.05$
<b>5 µg/ml</b>	0.826	0.008	$p > 0.05$	0.807	0.007	$p < 0.01$
<b>10 µg/ml</b>	0.825	0.004	$p > 0.05$	0.783	0.009	$p < 0.001$
<b>20 µg/ml</b>	0.766	0.008	$p > 0.05$	0.721	0.009	$p < 0.001$
<b>40µg/ml</b>	0.673	0.006	$p < 0.001$	0.593	0.005	$p < 0.001$
<b>60 µg/ml</b>	0.571	0.011	$p < 0.001$	0.561	0.002	$p < 0.001$

Şekil 41’de YÇ-Me’nin U2OS hücrelerinde 24 ve 48 saatlik mitokondriyal absorbans değerleri ve Çizelge 25’de de MTT sonuçlarının istatistiksel değerlendirmeleri görülmektedir.

24 saatlik inkübasyon sonunda, YÇ-Me’nin 40 ve 60 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre önemli sitotoksik etki meydana gelmiş ve mitokondriyal aktivitenin önemli düzeyde azaldığı görülmüştür ( $p < 0.001$ \*\*\*).

48 saat sonra U2OS hücrelerinde YÇ-Me’nin sitotoksik etkisi inkübasyon süresine bağlı olarak artmıştır. İstatistiksel anlamlılık değerleri kontrole göre YÇ-Me’nin 5 µg/ml konsantrasyonunda ( $p < 0.01$ \*\* ) iken, diğer tüm konsantrasyonlarda ( $p < 0.001$ \*\*\* ) olarak belirlenmiştir (Çizelge 25).



Şekil 42. SYÇ-Me Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

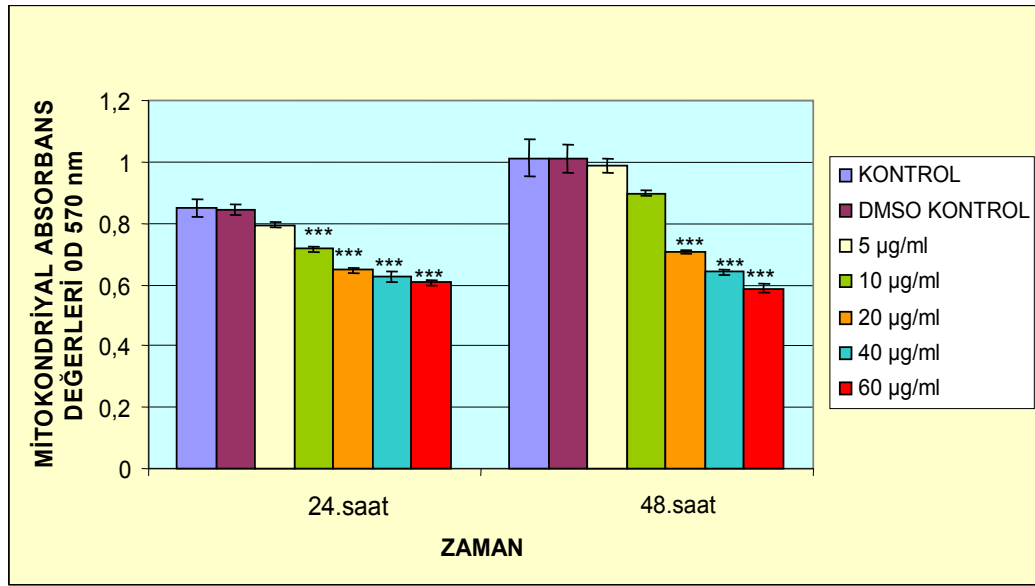
Çizelge 26. Farklı SYÇ-Me Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
Kontrol	0.943	0.025	$p > 0.05$	1.036	0.066	$p > 0.05$
DMSO-Kontrol	0.926	0.019	$p > 0.05$	1.065	0.030	$p > 0.05$
5 µg/ml	0.856	0.020	$p < 0.01$	1.067	0.008	$p > 0.05$
10 µg/ml	0.751	0.018	$p < 0.001$	0.897	0.008	$p < 0.05$
20 µg/ml	0.665	0.006	$p < 0.001$	0.738	0.011	$p < 0.001$
40µg/ml	0.648	0.003	$p < 0.001$	0.631	0.011	$p < 0.001$
60 µg/ml	0.646	0.009	$p < 0.001$	0.629	0.007	$p < 0.001$

Şekil 42’de SYÇ-Me’nin U2OS hücrelerinde 24 ve 48 saatlik mitokondriyal absorbans değerleri ve Çizelge 26’da da MTT sonuçlarının istatistiksel değerlendirmeleri görülmektedir.

24 saatlik inkübasyon sonunda, SYÇ-Me’nin tüm konsantrasyonlarında kontrole göre önemli sitotoksik etki meydana gelmiş ve mitokondriyal absorbans değerleri kontrole göre SYÇ-Me’nin 5 µg/ml konsantrasyonunda ( $p < 0.01$ \*\*) iken, diğer tüm konsantrasyonlarda ( $p < 0.001$ \*\*) olarak belirlenmiştir.

48 saat sonra kontrole göre SYÇ-Me’nin yalnızca 5 µg/ml konsantrasyonunun mitokondriyal absorbans değerinde az bir artış görülse de, diğer konsantrasyonlarda kontrole göre önemli sitotoksik etki meydana gelmiştir. SYÇ-Me’nin 10 µg/ml konsantrasyonundaki istatistiksel anlamlılık değeri kontrole göre ( $p < 0.05$ ); 20, 40 ve 60 µg/ml konsantrasyonlarında da ( $p < 0.001$ \*\*) olarak belirlenmiştir (Çizelge 26).



Şekil 43. İYÇ-inf Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

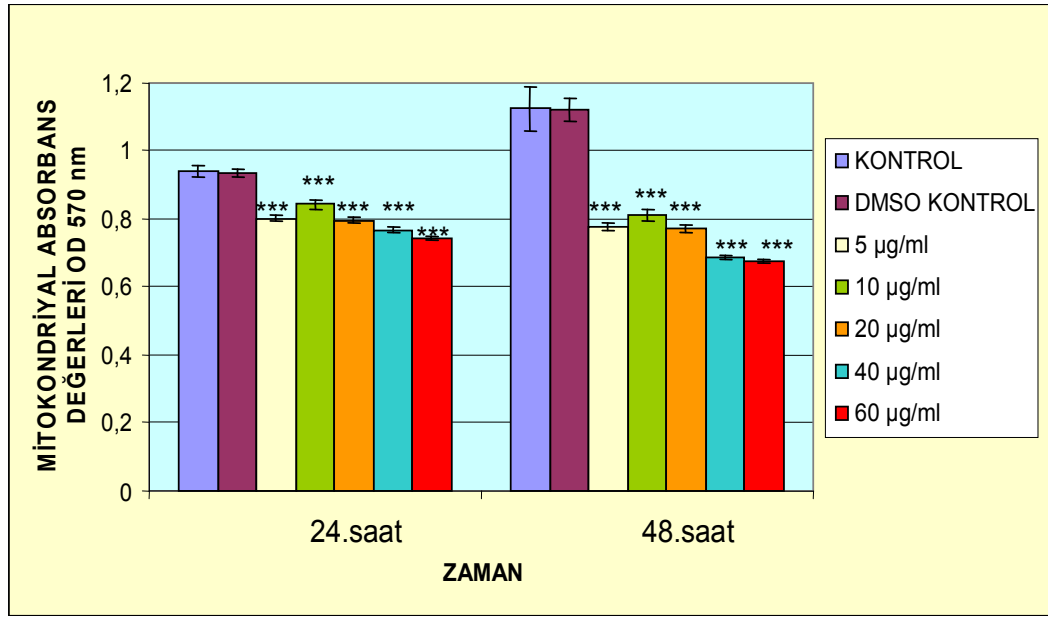
Çizelge 27. Farklı İYÇ-inf Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrole Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
Kontrol	0.850	0.028	$p > 0.05$	1.012	0.061	$p > 0.05$
DMSO-Kontrol	0.844	0.018	$p > 0.05$	1.065	0.045	$p > 0.05$
5 µg/ml	0.794	0.009	$p > 0.05$	0.987	0.021	$p > 0.05$
10 µg/ml	0.715	0.006	$p < 0.001$	0.898	0.008	$p > 0.05$
20 µg/ml	0.648	0.008	$p < 0.001$	0.704	0.006	$p < 0.001$
40µg/ml	0.625	0.014	$p < 0.001$	0.641	0.008	$p < 0.001$
60 µg/ml	0.606	0.006	$p < 0.001$	0.588	0.013	$p < 0.001$

Şekil 43'de İYÇ-inf'nin U2OS hücrelerinde 24 ve 48 saatlik mitokondriyal absorbans değerleri ve Çizelge 27'de de MTT sonuçlarının istatistiksel değerlendirmeleri görülmektedir.

24 saatlik inkübasyon sonunda, İYÇ-inf'nin 10, 20, 40 ve 60 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre önemli sitotoksik etki meydana gelmiş ve mitokondriyal aktivitenin önemli düzeyde azaldığı görülmüştür ( $p < 0.001^{***}$ ).

48 saat sonra ise U2OS hücrelerinde İYÇ-inf'nin 20, 40 ve 60 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre önemli sitotoksik etki meydana gelmiş ve mitokondriyal aktivitenin önemli düzeyde azaldığı görülmüştür ( $p < 0.001^{***}$ ).



Şekil 44. YÇ-inf Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

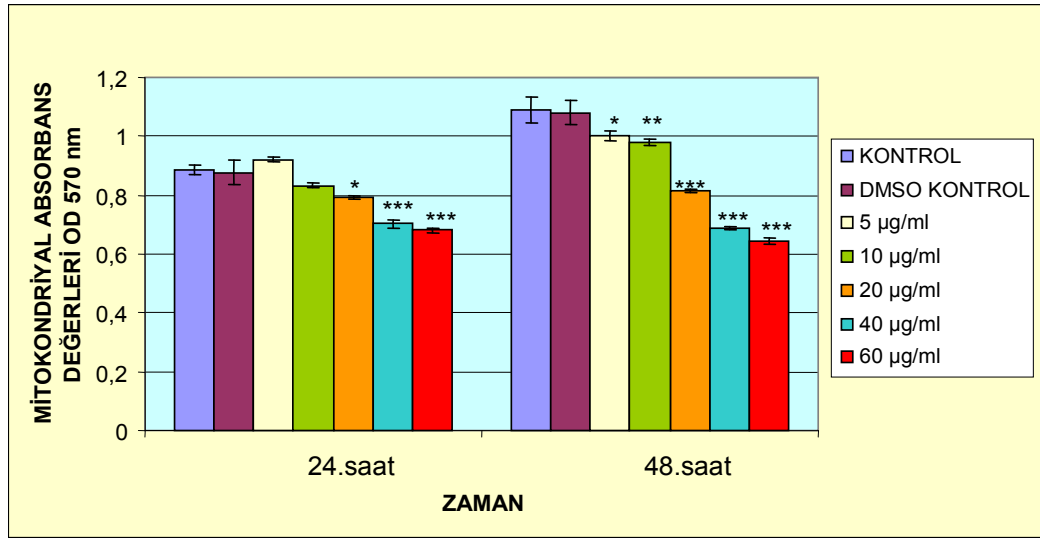
Çizelge 28. Farklı YÇ-inf Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrolle Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
Kontrol	0.942	0.016	$p > 0.05$	1.241	0.067	$p > 0.05$
DMSO-Kontrol	0.937	0.011	$p > 0.05$	1.124	0.033	$p > 0.05$
5 µg/ml	0.802	0.007	$p < 0.001$	0.778	0.009	$p < 0.001$
10 µg/ml	0.843	0.012	$p < 0.001$	0.809	0.017	$p < 0.001$
20 µg/ml	0.796	0.007	$p < 0.001$	0.771	0.008	$p < 0.001$
40µg/ml	0.768	0.006	$p < 0.001$	0.686	0.005	$p < 0.001$
60 µg/ml	0.742	0.006	$p < 0.001$	0.674	0.006	$p < 0.001$

Şekil 44'de YÇ-inf'nin U2OS hücrelerinde 24 ve 48 saatlik mitokondriyal absorbans değerleri ve Çizelge 28'de de MTT sonuçlarının istatistiksel değerlendirmeleri görülmektedir.

24 saatlik inkübasyon sonunda, YÇ-inf'nin tüm konsantrasyonlarında kontrole göre önemli sitotoksik etki meydana gelmiş ve mitokondriyal aktivitenin önemli düzeyde azaldığı görülmüştür ( $p < 0.001^{***}$ ).

48 saat sonra U2OS hücrelerinde YÇ-inf'nin sitotoksik etkisi inkübasyon süresine bağlı olarak artmış ve tüm YÇ-inf konsantrasyonlarında kontrole göre mitokondriyal aktivite önemli ölçüde azalmıştır ( $p < 0.001^{***}$ ).



Şekil 45. SYÇ-inf Konsantrasyonlarının, U2OS Hücre Dizisinde 24 ve 48. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri (Ortalama±Standart Hata)

Çizelge 29. Farklı SYÇ-inf Konsantrasyonlarının U2OS Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans ve Kontrolle Göre İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT		
	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık	Ortalama	St.Hata	Anlamlılık
Kontrol	0.884	0.017	$p > 0.05$	1.120	0.042	$p > 0.05$
DMSO-Kontrol	0.876	0.039	$p > 0.05$	1.080	0.040	$p > 0.05$
5 µg/ml	0.921	0.009	$p > 0.05$	1.001	0.015	$p < 0.05$
10 µg/ml	0.833	0.009	$p > 0.05$	0.979	0.012	$p < 0.01$
20 µg/ml	0.790	0.006	$p < 0.05$	0.812	0.004	$p < 0.001$
40µg/ml	0.702	0.012	$p < 0.001$	0.687	0.005	$p < 0.001$
60 µg/ml	0.680	0.010	$p < 0.001$	0.643	0.008	$p < 0.001$

Şekil 45’de SYÇ-inf’in U2OS hücrelerinde 24 ve 48 saatlik mitokondriyal absorbans değerleri ve Çizelge 29’da da MTT sonuçlarının istatistiksel değerlendirmeleri görülmektedir.

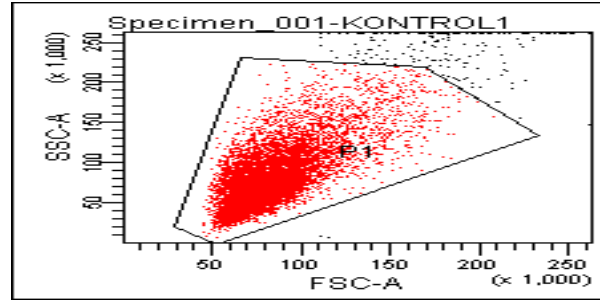
24 saatlik inkübasyon sonunda, SYÇ-inf’in 20, 40 ve 60 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole göre önemli sitotoksik etki meydana gelmiş ve mitokondriyal absorbans değerleri kontrole göre SYÇ-inf’in 20 µg/ml konsantrasyonunda ( $p < 0.05^*$ ) iken, 40 ve 60 µg/ml konsantrasyonlarında ( $p < 0.001^{***}$ ) olarak belirlenmiştir.

48 saat sonra U2OS hücrelerinde SYÇ-inf’in sitotoksik etkisi inkübasyon süresine bağlı olarak artmış ve mitokondriyal absorbans değerleri kontrole göre SYÇ-inf 5 µg/ml konsantrasyonunda ( $p < 0.05^*$ ); 10 µg/ml konsantrasyonunda ( $p < 0.01^*$ ); 20, 40 ve 60 µg/ml konsantrasyonlarında ( $p < 0.001^{***}$ ) olarak belirlenmiştir.

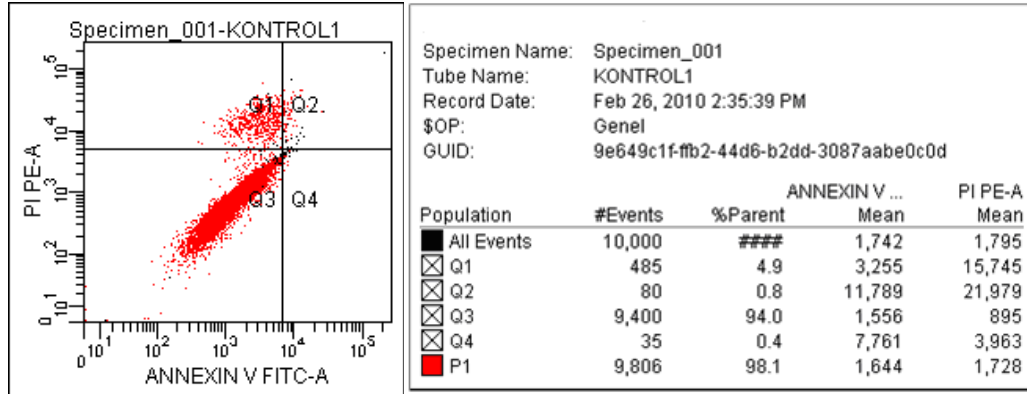
### Hücre akım sitometrisi yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

Kontrol, DMSO-kontrol, İYÇ-Me, SYÇ-Me ekstrelerinin 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml konsantrasyonlarının U2OS hücreleri üzerindeki, 24 saatlik apoptotik etkilerinin hücre akım sitometrisindeki analiz sonuçları Şekil 46-Şekil 48 ve Çizelge 30'da görülmektedir.

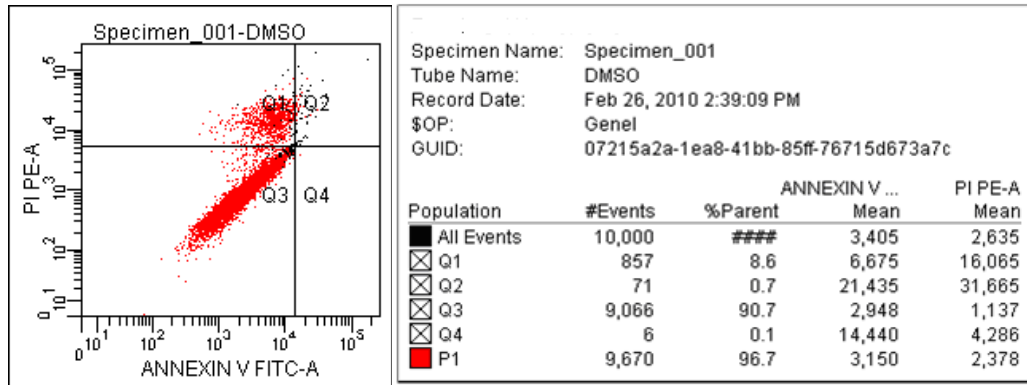
İYÇ-Me ve SYÇ-Me ekstre konsantrasyonlarının değerlendirilmesi amacıyla U2OS hücreleri üzerinde, Annexin V-PI boyaları ile, akım sitometri'deki değerlendirmesi yapıldığında, kontrolde canlı hücre yüzdesi %94.0, apoptotik hücre yüzdesi %1.2 ve nekrotik hücre yüzdesi %4.9; DMSO-kontrol grubunda da canlı hücre yüzdesi %90.7, apoptotik hücre yüzdesi %0.8, nekrotik hücre yüzdesi %8.6 olarak bulunmuştur (Şekil 46).



[a]



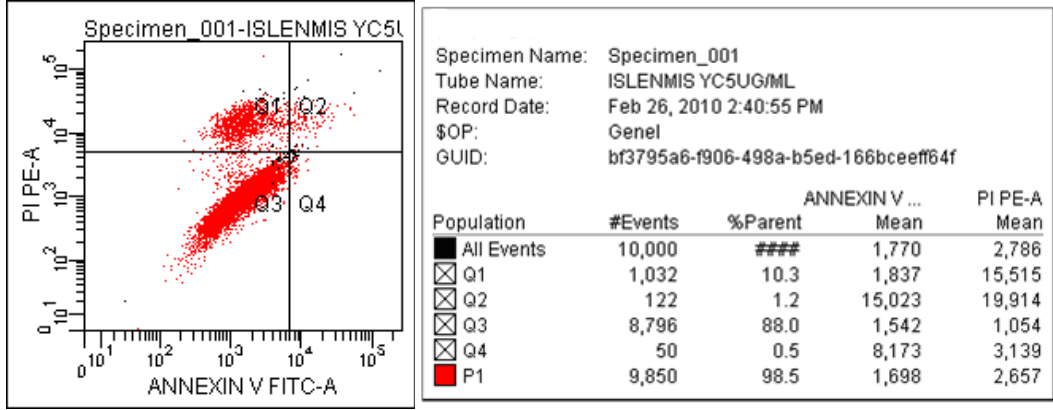
[b]



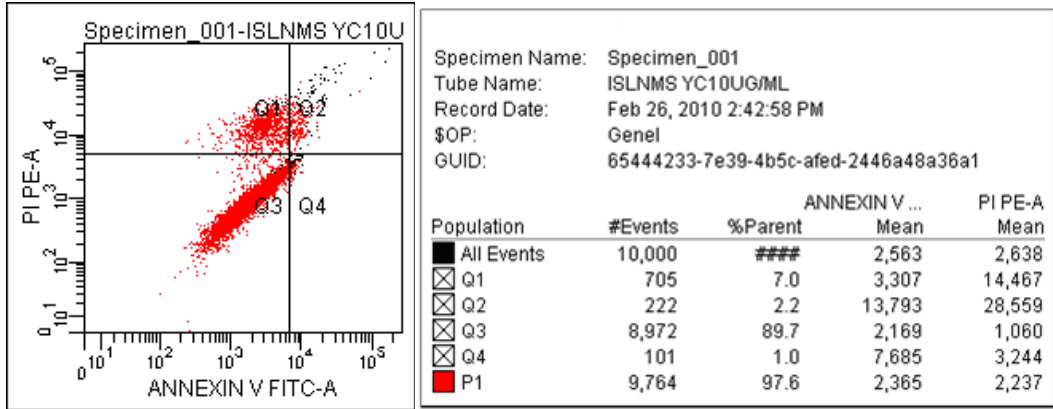
[c]

Şekil 46. Kontrol ve DMSO-Kontrol Gruplarına Ait U2OS Hücrelerinin Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları (a: Kontrol (FSC-A), b: Kontrol (Annexin V FITC- A), c: DMSO-kontrol (Annexin V FITC-A) (İYÇ-Me ve SYÇ-Me gruplarının analizi için kullanılan kontrol ve DMSO-kontrol)

U2OS hücre dizisi İYÇ-Me'nin 5 µg/ml konsantrasyon grubunda, canlı hücre yüzdesi %88.0, apoptotik hücre yüzdesi %1.7, nekrotik hücre yüzdesi %10.3; 10 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %89.7, apoptotik hücre yüzdesi %3.2, nekrotik hücre yüzdesi 7.0; 20 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %90.5, apoptotik hücre yüzdesi %2.1, nekrotik hücre yüzdesi %7.3; 40 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %86.2, apoptotik hücre yüzdesi %7.7, nekrotik hücre yüzdesi %6.1; 60 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %65.1, apoptotik hücre yüzdesi % 26.3, nekrotik hücre yüzdesi %8.6 olarak bulunmuştur (Şekil 47).

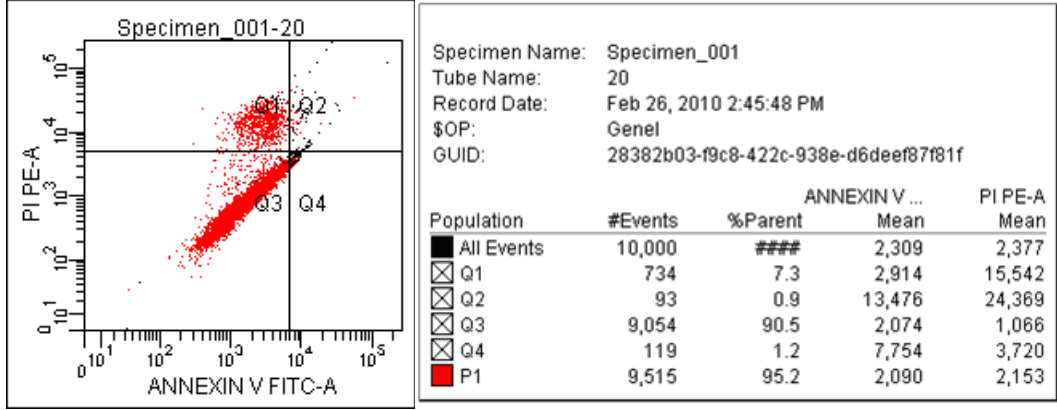


[a]

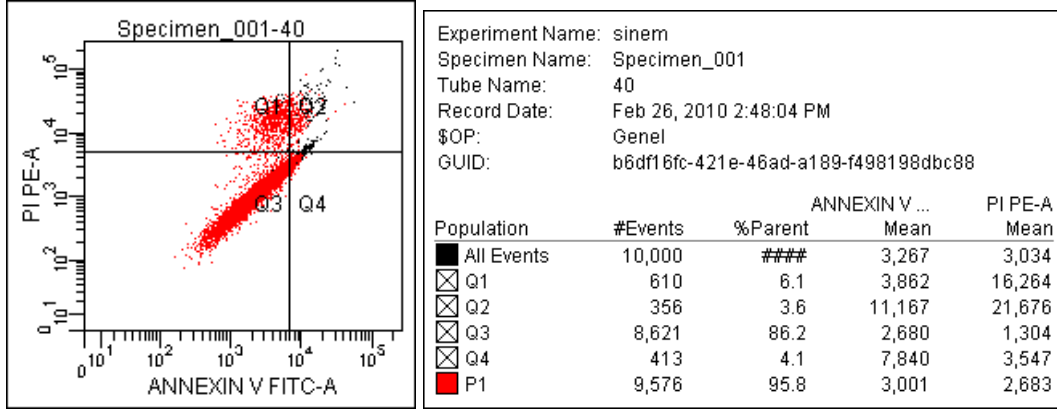


[b]

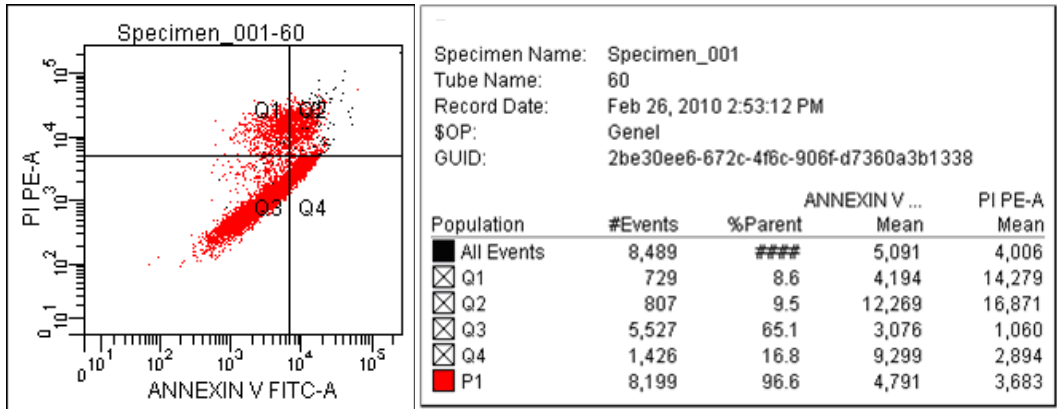




[c]



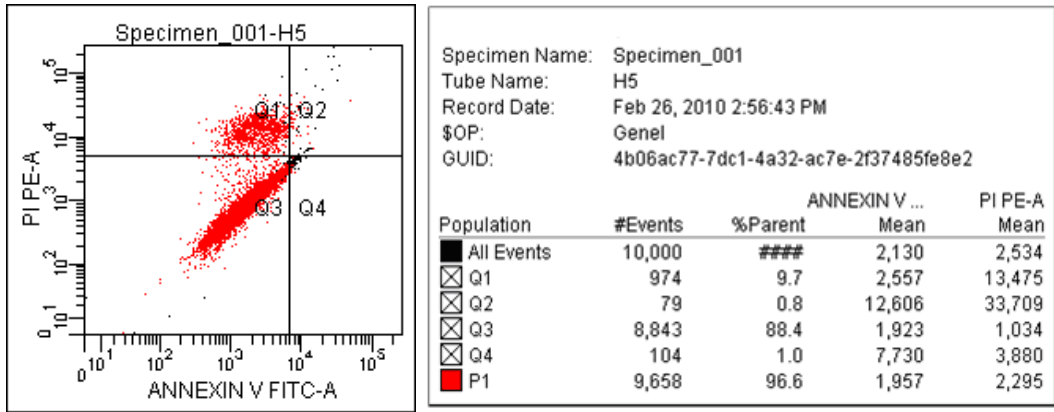
[d]



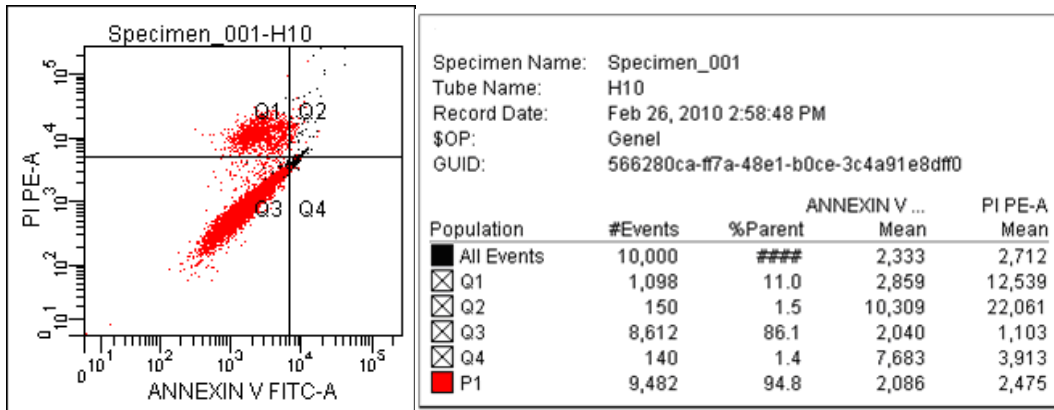
[e]

Şekil 47. İYÇ-Me Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları (a: 5 µg/ml, b: 10 µg/ml, c: 20 µg/ml, d: 40 µg/ml, e: 60 µg/ml)

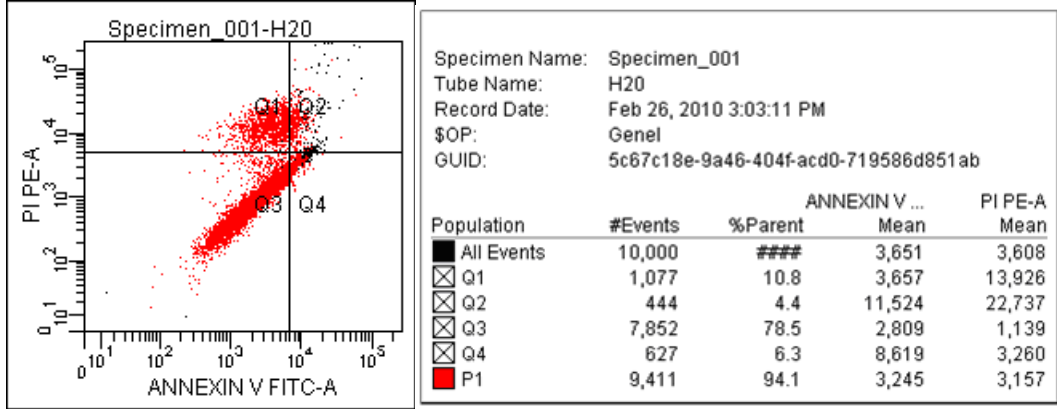
U2OS hücre dizisi SYÇ-Me'nin 5 µg/ml konsantrasyon grubunda, canlı hücre yüzdesi %88.4, apoptotik hücre yüzdesi %1.8, nekrotik hücre yüzdesi %9.7; 10 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %86.1, apoptotik hücre yüzdesi %2.9, nekrotik hücre yüzdesi 11.0; 20 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %78.5, apoptotik hücre yüzdesi %10.7, nekrotik hücre yüzdesi %10.8; 40 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %80.7, apoptotik hücre yüzdesi %9.7, nekrotik hücre yüzdesi %9.7; 60 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %76.9, apoptotik hücre yüzdesi % 14.7, nekrotik hücre yüzdesi %8.4 olarak bulunmuştur (Şekil 48).



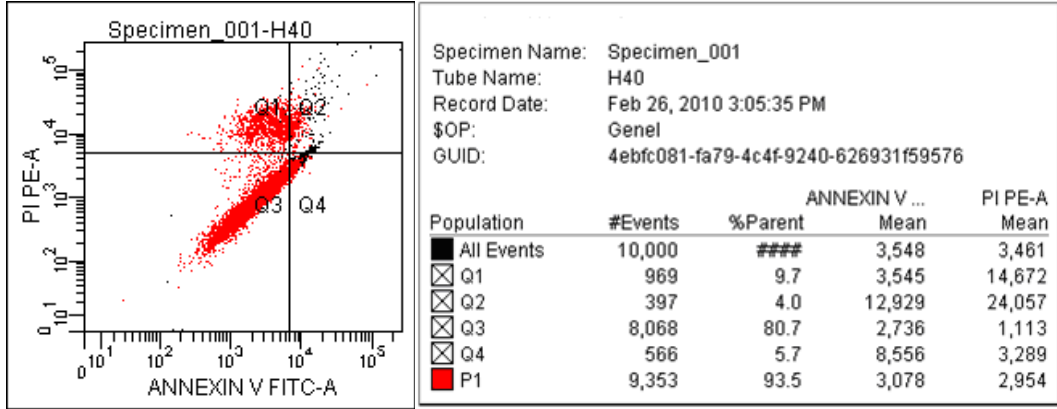
[a]



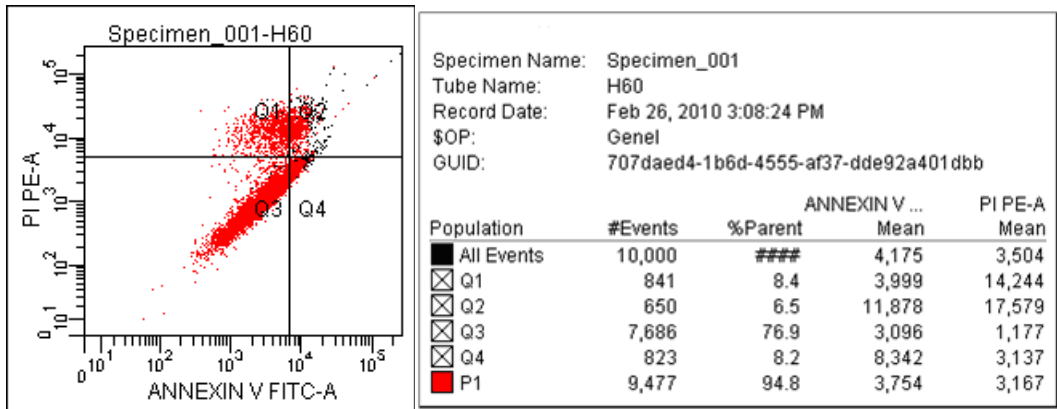
[b]



[c]



[d]

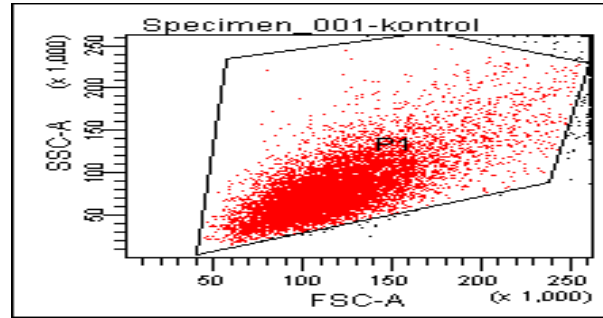


[e]

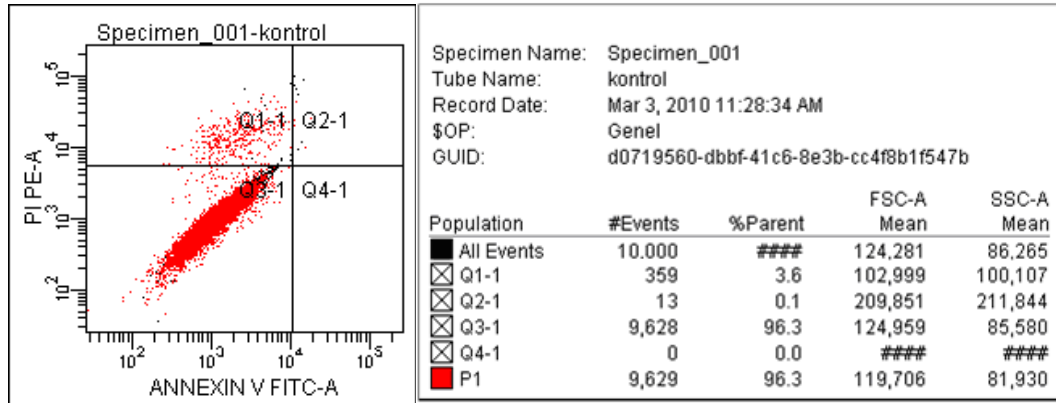
Şekil 48. SYÇ-Me Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları (a: 5 µg/ml, b: 10 µg/ml, c: 20 µg/ml, d: 40 µg/ml, e: 60 µg/ml)

YÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf, SYÇ-inf ekstralarının 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml konsantrasyonlarının U2OS hücreleri üzerindeki, 24 saatlik apoptotik etkilerinin hücre akım sitometrisindeki analiz sonuçları **Şekil 49-Şekil 53** ve **Çizelge 31**'de görülmektedir.

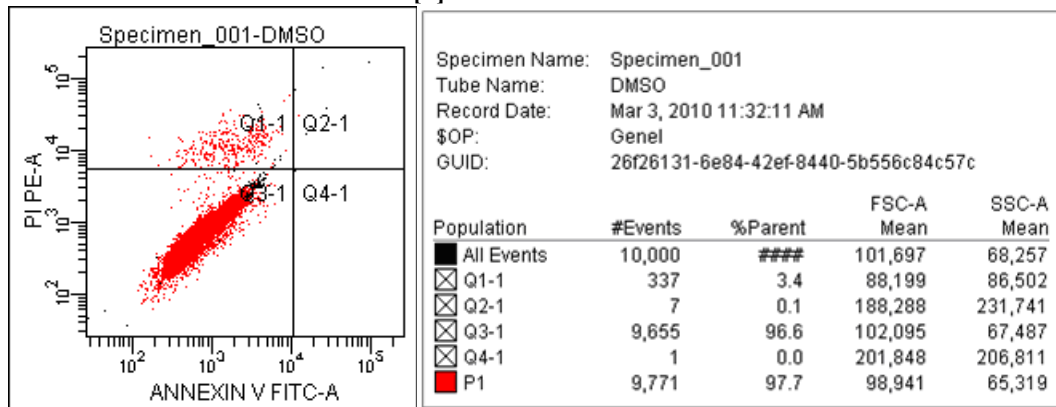
YÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf, SYÇ-inf ekstralarına ait konsantrasyonların değerlendirilmesi amacıyla U2OS hücreleri üzerinde, Annexin V-PI boyaları ile, akım sitometri'deki değerlendirmesi yapıldığında, kontrolde canlı hücre yüzdesi %96.3, apoptotik hücre yüzdesi %0.1 ve nekrotik hücre yüzdesi %3.6; DMSO-kontrol grubunda canlı hücre yüzdesi %96.6, apoptotik hücre yüzdesi %0.1, nekrotik hücre yüzdesi %3.4 olarak bulunmuştur (**Şekil 49**).



[a]



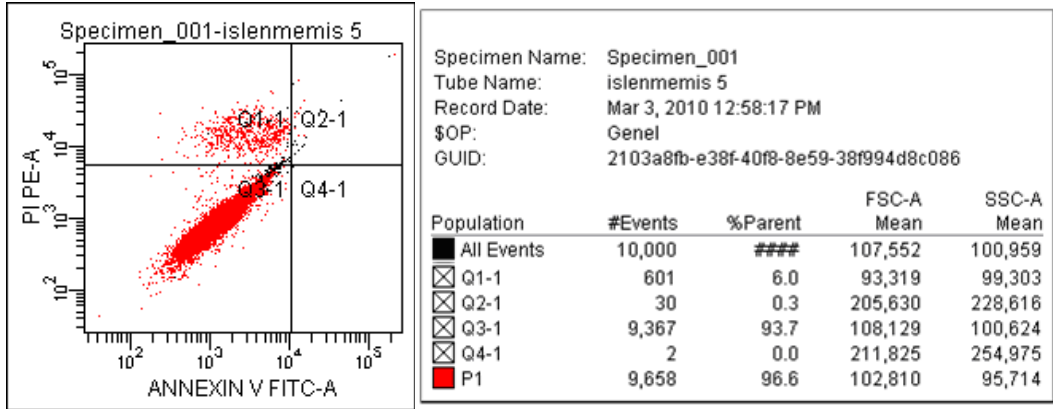
[b]



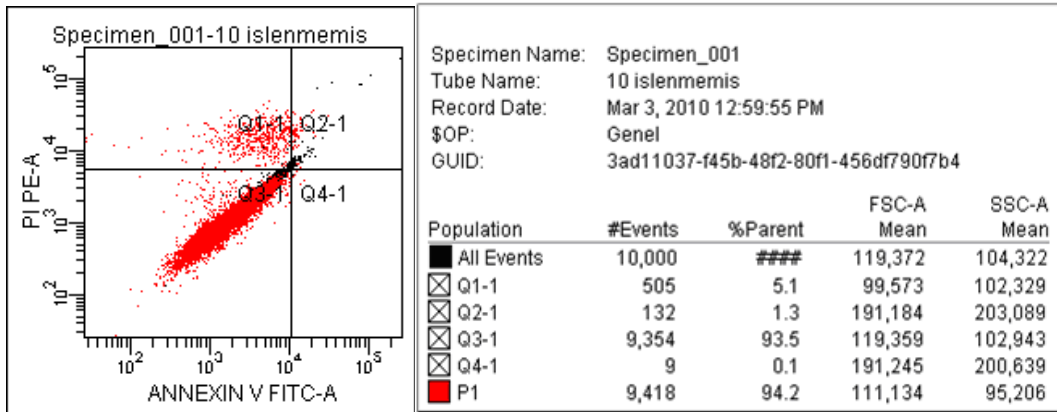
[c]

**Şekil 49. Kontrol ve DMSO-Kontrol Gruplarına Ait U2OS Hücrelerinin Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları (a: Kontrol (FSC-A) , b: Kontrol (Annexin V FITC-A) , c: DMSO-kontrol (Annexin V FITC- A) (YÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf, SYÇ-inf gruplarının analizi için kullanılan kontrol ve DMSO-kontrol)**

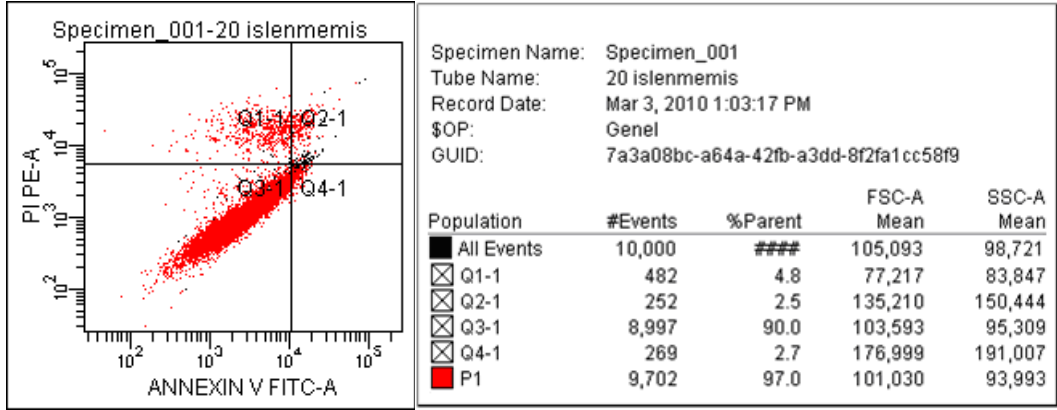
U2OS hücre dizisi YÇ-Me'nin 5 µg/ml konsantrasyon grubunda, canlı hücre yüzdesi %93.7, apoptotik hücre yüzdesi %0.3, nekrotik hücre yüzdesi %6.0; 10 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %93.5, apoptotik hücre yüzdesi %1.4, nekrotik hücre yüzdesi %5.1; 20 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %90.0, apoptotik hücre yüzdesi %5.2, nekrotik hücre yüzdesi %4.8; 40 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %86.5, apoptotik hücre yüzdesi %4.2, nekrotik hücre yüzdesi %9.3; 60 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %80.7, apoptotik hücre yüzdesi % 18.9, nekrotik hücre yüzdesi %0.4 olarak bulunmuştur (Şekil 50).



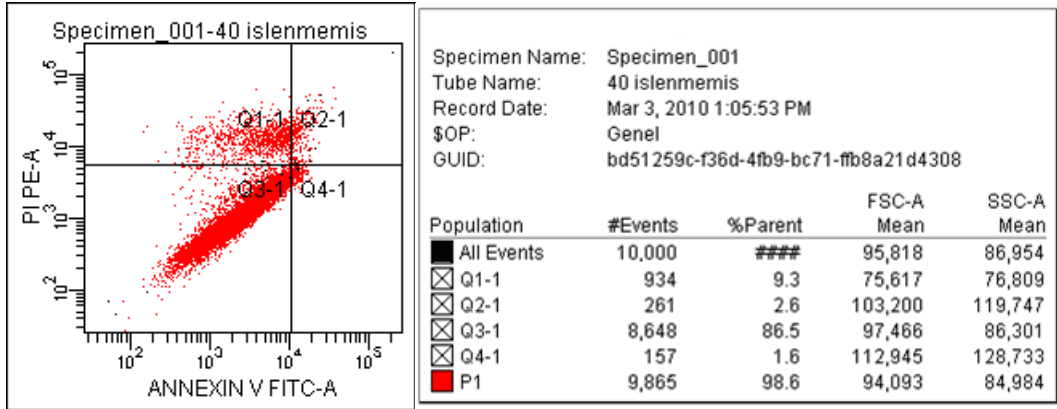
[a]



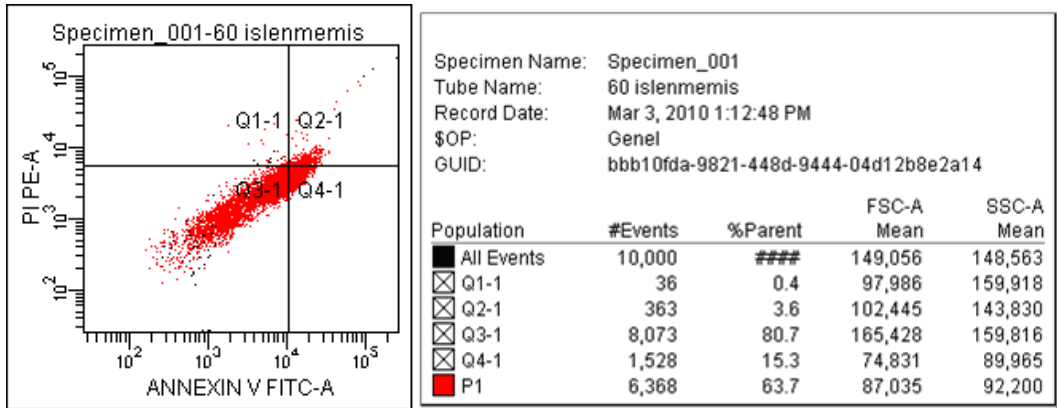
[b]



[c]



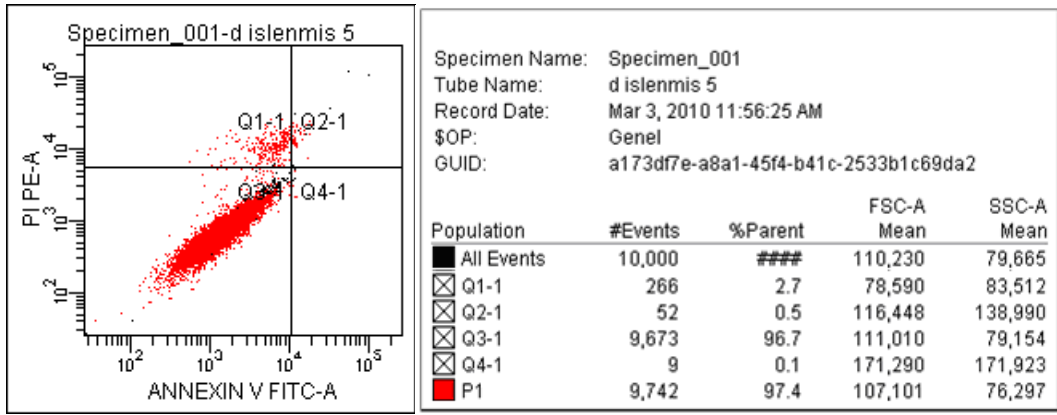
[d]



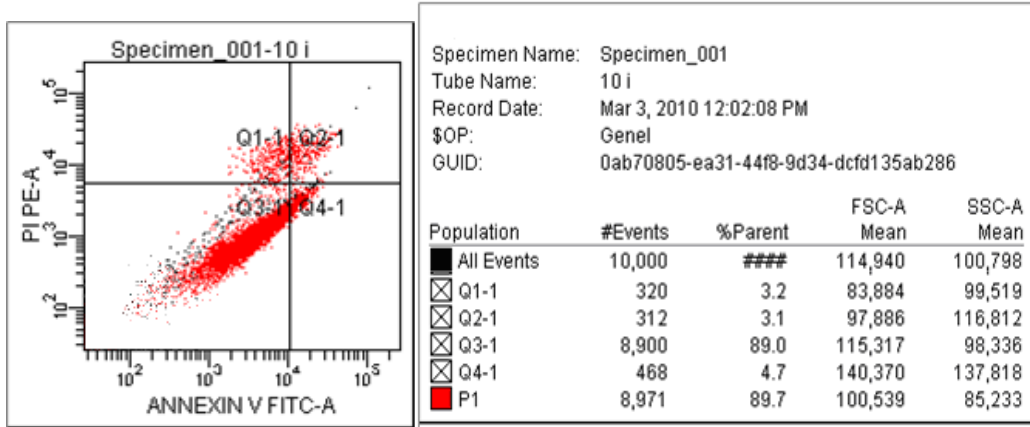
[e]

Şekil 50. YÇ-Me Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları (a: 5 µg/ml, b: 10 µg/ml, c: 20 µg/ml, d: 40 µg/ml, e: 60 µg/ml)

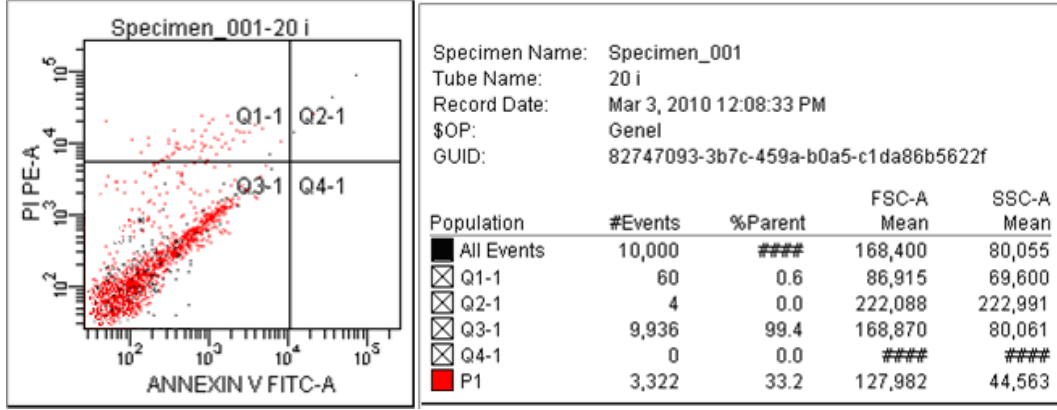
U2OS hücre dizisi İYÇ-inf'nin 5 µg/ml konsantrasyon grubunda, canlı hücre yüzdesi %96.7, apoptotik hücre yüzdesi %0.6, nekrotik hücre yüzdesi %2.7; 10 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %89.0, apoptotik hücre yüzdesi %7.8, nekrotik hücre yüzdesi %3.2; 20 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %99.4, apoptotik hücre yüzdesi %0, nekrotik hücre yüzdesi %0.6; 40 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %93.0, apoptotik hücre yüzdesi %2.0, nekrotik hücre yüzdesi %5.1, 60 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %94.0, apoptotik hücre yüzdesi % 5.2, nekrotik hücre yüzdesi %0.9 olarak bulunmuştur (Şekil 51).



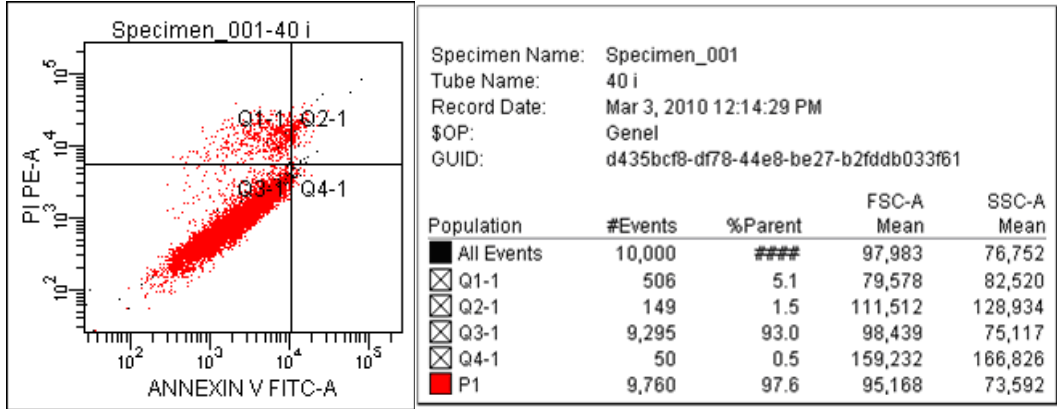
[a]



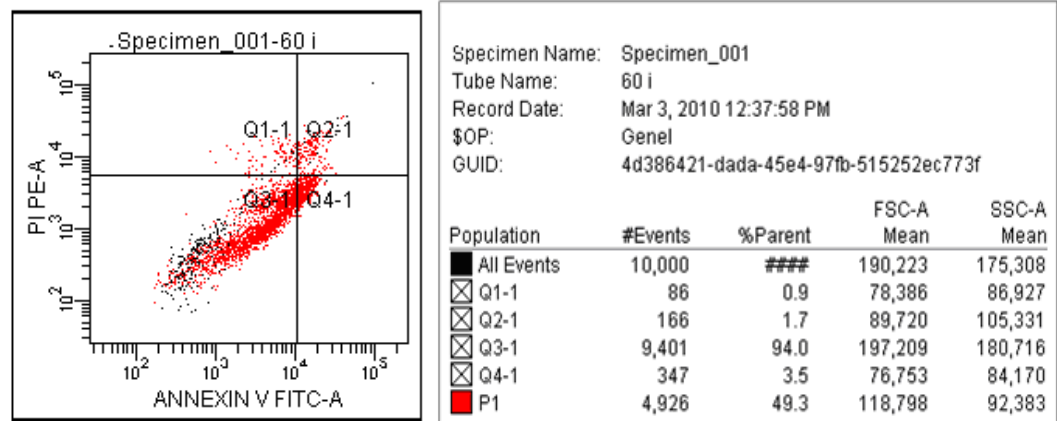
[b]



[c]



[d]

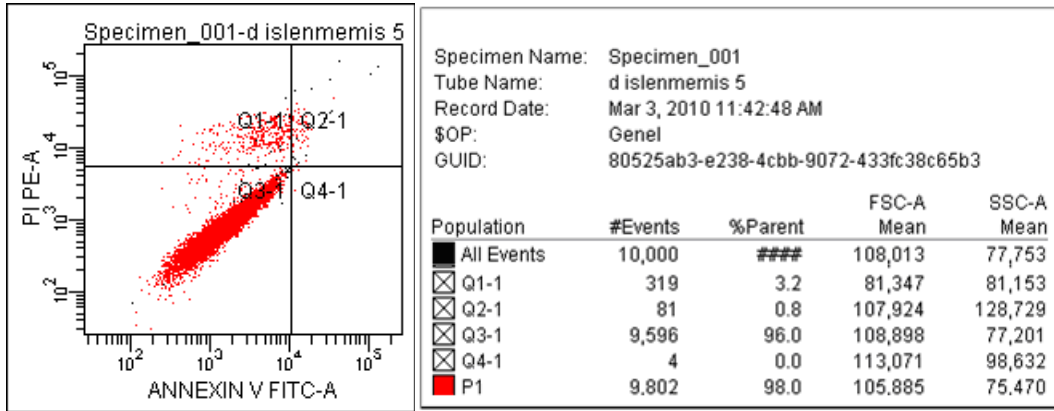


[e]

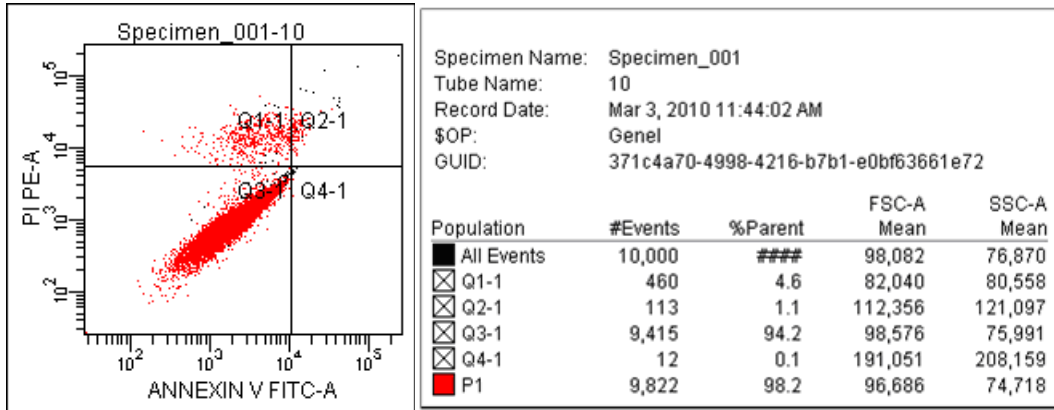
Şekil 51. İYÇ-inf Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları (a: 5 µg/ml, b: 10 µg/ml, c: 20 µg/ml, d: 40 µg/ml, e: 60 µg/ml)



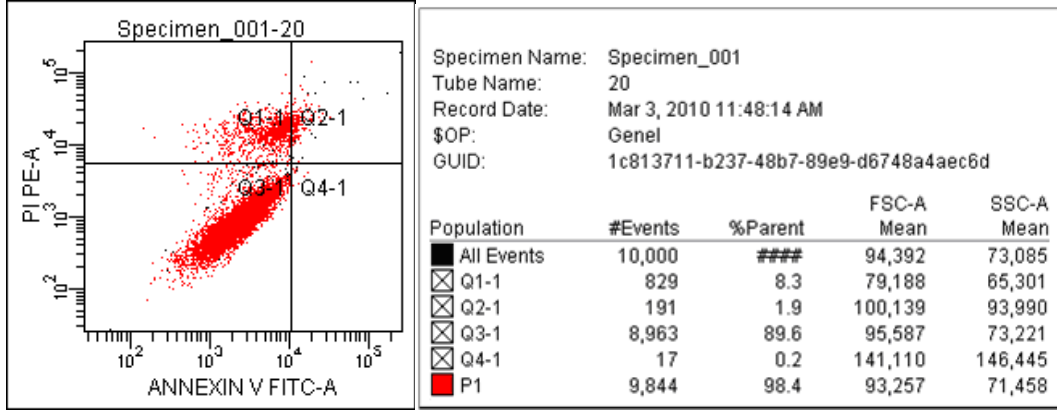
U2OS hücre dizisi YÇ-inf'nin 5 µg/ml konsantrasyon grubunda, canlı hücre yüzdesi %96.0, apoptotik hücre yüzdesi %0.8, nekrotik hücre yüzdesi %3.2; 10 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %94.2, apoptotik hücre yüzdesi %1.2, nekrotik hücre yüzdesi %4.6; 20 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %89.6, apoptotik hücre yüzdesi %2.1, nekrotik hücre yüzdesi %8.3; 40 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %91.2, apoptotik hücre yüzdesi %3.6, nekrotik hücre yüzdesi %5.1; 60 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %87.4, apoptotik hücre yüzdesi % 8.9, nekrotik hücre yüzdesi %3.8 olarak bulunmuştur (Şekil 52).



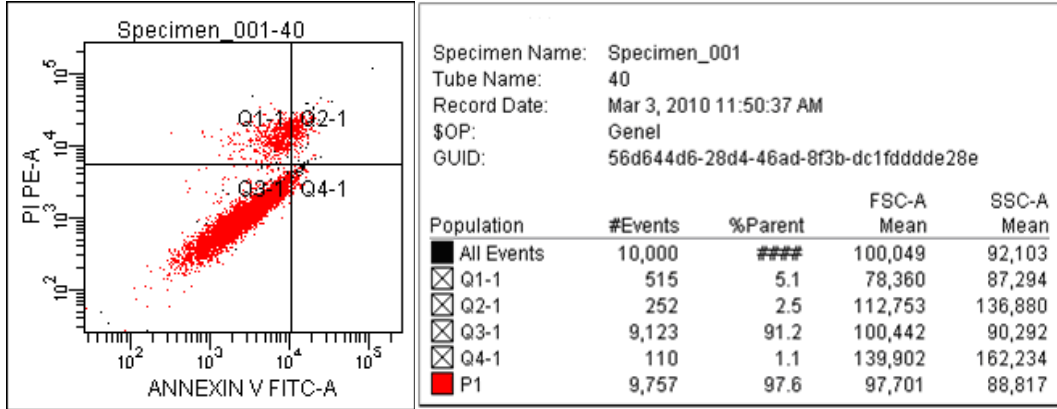
[a]



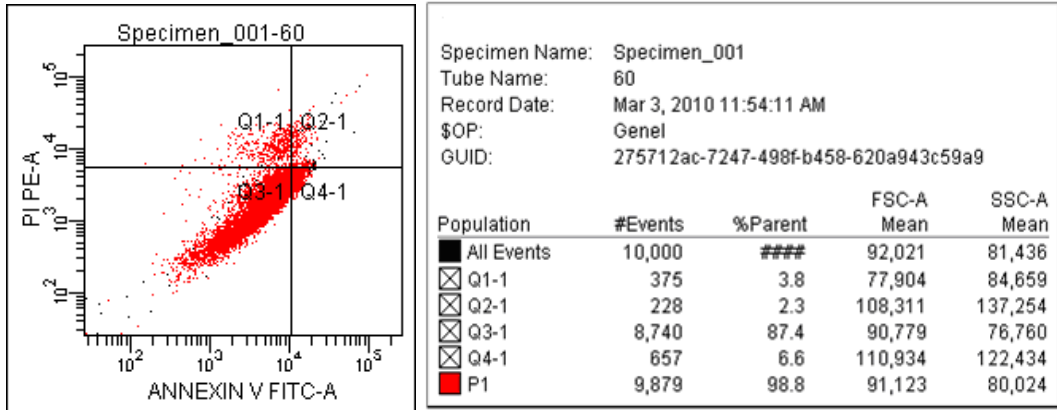
[b]



[c]



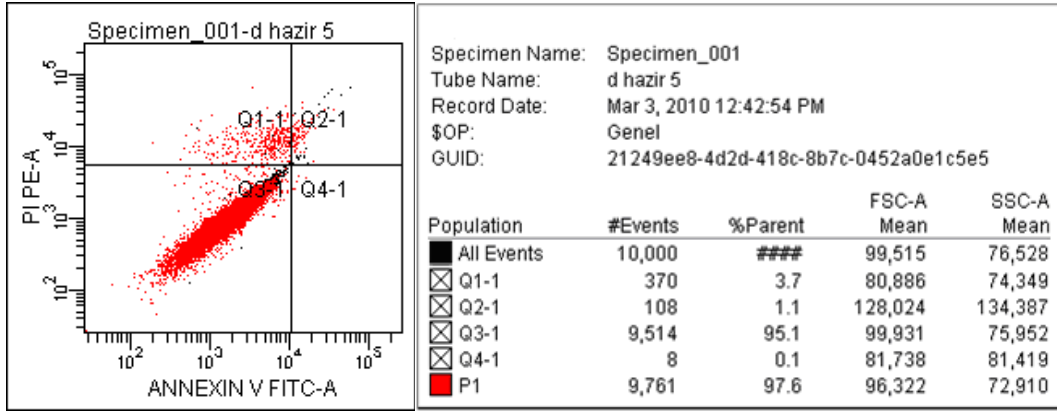
[d]



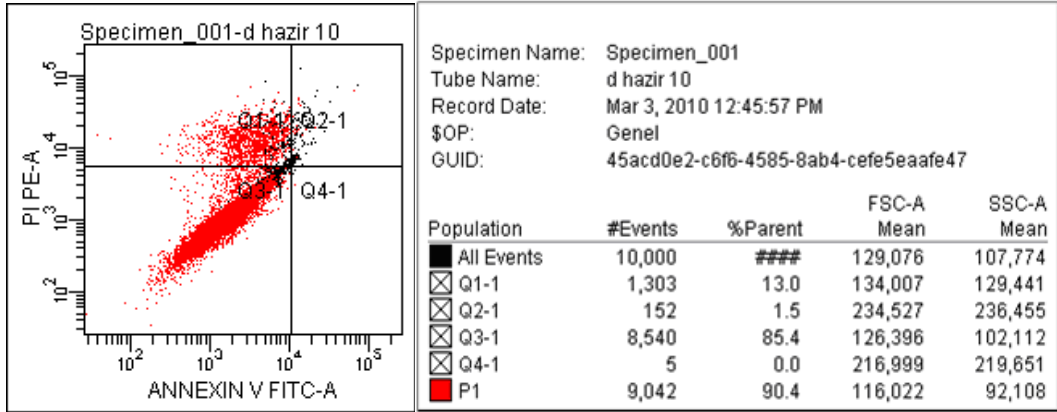
[e]

Şekil 52. YÇ-inf Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları (a: 5 µg/ml, b: 10 µg/ml, c: 20 µg/ml, d: 40 µg/ml, e: 60 µg/ml)

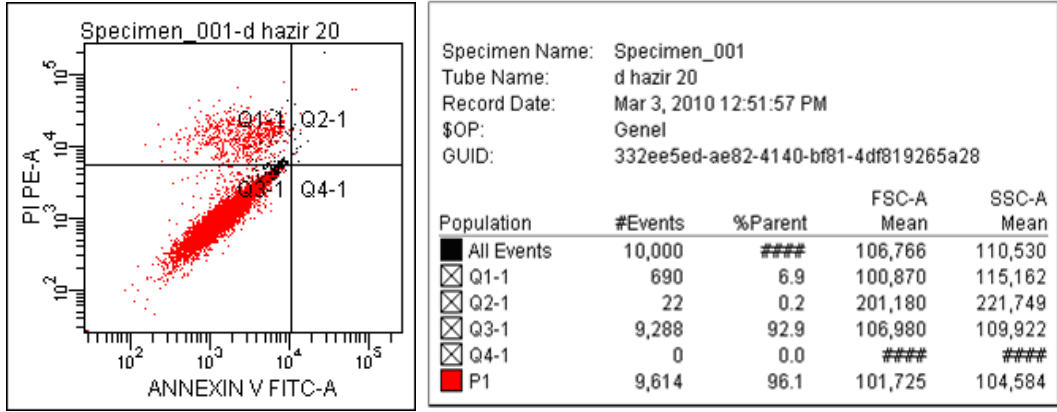
U2OS hücre dizisi SYÇ-inf'nin 5 µg/ml konsantrasyon grubunda, canlı hücre yüzdesi %95.1, apoptotik hücre yüzdesi %1.2, nekrotik hücre yüzdesi %3.7; 10 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %85.4, apoptotik hücre yüzdesi %1.5, nekrotik hücre yüzdesi %13.0; 20 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %92.9, apoptotik hücre yüzdesi %0.3, nekrotik hücre yüzdesi %6.9; 40 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %88.8, apoptotik hücre yüzdesi %5.0, nekrotik hücre yüzdesi %6.2; 60 µg/ml konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %87.6, apoptotik hücre yüzdesi % 1.1, nekrotik hücre yüzdesi %11.3 olarak bulunmuştur (Şekil 53).



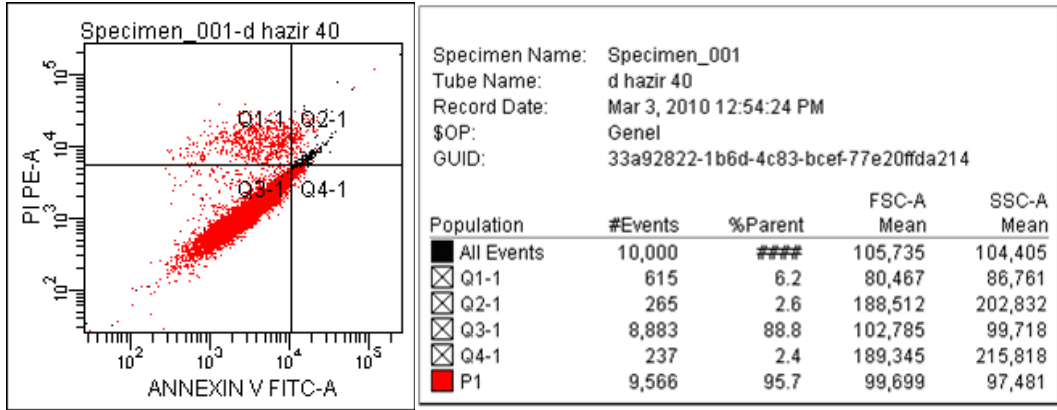
[a]



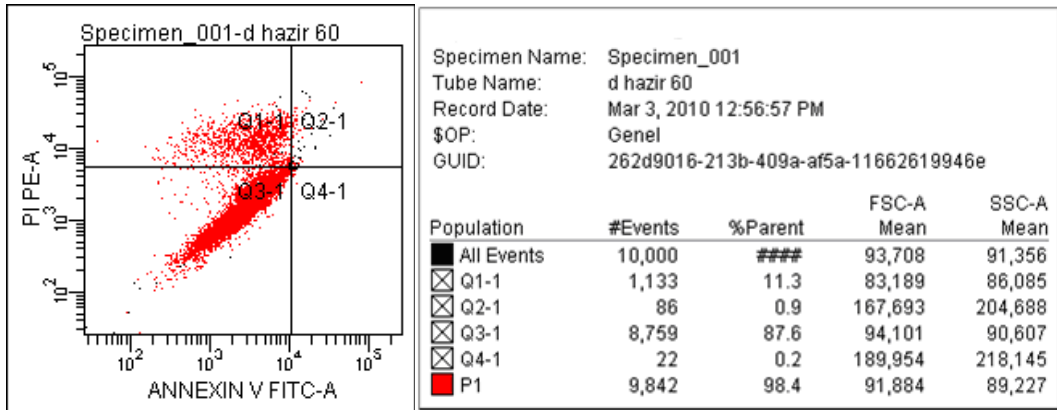
[b]



[c]



[d]



[e]

Şekil 53. SYÇ-inf Grubu 5, 10, 20, 40, 60 µg/ml Konsantrasyonlarının Hücre Akım Sitometride Apoptotik Analiz Sonuçları (a: 5 µg/ml, b: 10 µg/ml, c: 20 µg/ml, d: 40 µg/ml, e: 60 µg/ml)

**Çizelge 30. İYÇ-Me ve SYÇ-Me Ekstre Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilen U2OS Hücrelerinin Akım Sitometri Sonuçları**

<b>GRUPLAR</b>	<b>% Canlı hücre (Q3)</b>	<b>% Apoptotik hücre (Q2+Q4)</b>	<b>% Nekrotik hücre (Q1)</b>
<b>Kontrol</b>	94.0	1.2	4.9
<b>DMSO-Kontrol</b>	90.7	0.8	8.6
<b>5 µg/ml İYÇ-Me</b>	88.0	1.7	10.3
<b>10 µg/ml İYÇ-Me</b>	89.7	3.2	7.0
<b>20 µg/ml İYÇ-Me</b>	90.5	2.1	7.3
<b>40 µg/ml İYÇ-Me</b>	86.2	7.7	6.1
<b>60 µg/ml İYÇ-Me</b>	65.1	26.3	8.6
<b>5 µg/ml SYÇ-Me</b>	88.4	1.8	9.7
<b>10 µg/ml SYÇ-Me</b>	86.1	2.9	11.0
<b>20 µg/ml SYÇ-Me</b>	78.5	10.7	10.8
<b>40 µg/ml SYÇ-Me</b>	80.7	9.7	9.7
<b>60 µg/ml SYÇ-Me</b>	76.9	14.7	8.4

**Çizelge 31. YÇ-Me, İYÇ-inf, YÇ-inf ve SYÇ-inf Ekstre Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilen U2OS Hücrelerinin Akım Sitometri Sonuçları**

<b>GRUPLAR</b>	<b>% Canlı hücre (Q3)</b>	<b>% Apoptotik hücre (Q2+Q4)</b>	<b>% Nekrotik hücre (Q1)</b>
<b>Kontrol</b>	96.3	0.1	3.6
<b>DMSO-Kontrol</b>	96.6	0.1	3.4
<b>5 µg/ml YÇ-Me</b>	93.7	0.3	6.0
<b>10 µg/ml YÇ-Me</b>	93.5	1.4	5.1
<b>20 µg/ml YÇ-Me</b>	90.0	5.2	4.8
<b>40 µg/ml YÇ-Me</b>	86.5	4.2	9.3
<b>60 µg/ml YÇ-Me</b>	80.7	18.9	0.4
<b>5 µg/ml İYÇ-inf</b>	96.7	0.6	2.7
<b>10 µg/ml İYÇ-inf</b>	89.0	7.8	3.2
<b>20 µg/ml İYÇ-inf</b>	99.4	0	0.6
<b>40 µg/ml İYÇ-inf</b>	93.0	2.0	5.1
<b>60 µg/ml İYÇ-inf</b>	94.0	5.2	0.9
<b>5 µg/ml YÇ-inf</b>	96.0	0.8	3.2
<b>10 µg/ml YÇ-inf</b>	94.2	1.2	4.6
<b>20 µg/ml YÇ-inf</b>	89.6	2.1	8.3
<b>40 µg/ml YÇ-inf</b>	91.2	3.6	5.1
<b>60 µg/ml YÇ-inf</b>	87.4	8.9	3.8
<b>5 µg/ml SYÇ-inf</b>	95.1	1.2	3.7
<b>10 µg/ml SYÇ-inf</b>	85.4	1.5	13.0
<b>20 µg/ml SYÇ-inf</b>	92.9	0.3	6.9
<b>40 µg/ml SYÇ-inf</b>	88.8	5.0	6.2
<b>60 µg/ml SYÇ-inf</b>	87.6	1.1	11.3

Polifenolik bileşiklerce zengin bitkiler yara iyileştirici, yaşlanmayı geciktirici ve bazı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Polifenoller, özellikle serbest oksijen türleriyle etkileşerek, serbest radikalleri nötralize eder veya biyolojik etkileri başlatırlar. *Camelia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae)'de de kateşin grubu polifenolik bileşikler yoğun olarak bulunmakta olup, fermentasyonla elde edilen yeşil ve siyah çayın yararlı etkileri bu özelliğinden kaynaklanmaktadır (Hsu, 2005; Sahin ve Özdemir, 2006).

Deriyi bitkisel kaynaklı bileşiklerle, daha etkili olarak korumayı amaçlayan bilim adamları ilk olarak yeşil çayın polifenolik içeriğini tanımlamışlardır. Polifenolik içeriğinden dolayı çayın, deri hastalıkları ve yaralarda alternatif bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir (Hsu, 2005).

Bu çalışmada, *Camelia sinensis*'den hazırlanan ekstrelerin yara iyileştirici etkisi, yara tedavisinde kullanılmakta olan *Centella asiatica* ekstresi (TEKA) ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmiştir. Kontrol ve DMSO-kontrol grupları arasında yara iyileştirici aktivite bakımından anlamlı bir farklılık görülmediği için, istatistiksel olarak özellikle kontrol ile ekstreler arasındaki farklılıklar değerlendirmeye alınmıştır.

Yara iyileştirici aktivite için kullandığımız *C. sinensis* ekstre konsantrasyonlarına, NIH 3T3 hücrelerinde sitotoksik etkinin bir göstergesi olan MTT absorbans sonuçlarına bakılarak karar verilmiş, uygulanan konsantrasyonlarda önemli bir sitotoksik etkinin olmadığı gösterilmiştir. Yalnızca SYÇ-Me grubunun 24 saatlik 0.5 ve 2.5 µg/ml konsantrasyonlarında, kontrole göre mitokondriyal aktivitede anlamlı bir artış belirlenmiştir (**Çizelge 19**). 48. saat MTT (mitokondriyal aktivasyon) sonuçları değerlendirildiğinde, hücre proliferasyonunun zamana göre arttığı görülmüştür. NIH 3T3 hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda, MTT değeri kontrole göre yalnızca 10 µg/ml İYÇ-inf konsantrasyonunda artarken, 10 µg/ml İYÇ-Me konsantrasyonunda MTT absorbans değerinde anlamlı bir azalma görülmüştür (**Çizelge 17, Çizelge 20**).

Yara iyileştirici etkide, metanol ekstreleri, infüzyonlara göre daha anlamlı aktivite göstermiştir. TEKA grubu da dahil olmak üzere özellikle düşük ekstre konsantrasyonlarında belirgin bir yara iyileştirici aktivite belirlenmiştir. 24 ve 48. saat inkübasyon sonunda, kontrole göre TEKA ve ekstrelerde total hücre sayılarında anlamlı artışlar görülmüştür. 24. saatte total hücre sayısında en fazla artış 0.5 µg/ml SYÇ-Me konsantrasyonunda belirlenmiştir. Ekstreler arasında özellikle İYÇ-Me, YÇ-Me ve SYÇ-Me'nin tüm konsantrasyonlarında (0.5-10 µg/ml) total hücre sayılarının artmış olduğu ve TEKA konsantrasyon sonuçlarına oldukça yakın değerlerde olduğu görülmüştür (**Çizelge 10**). Yine total hücre sayılarındaki artışa paralel olarak, tüm metanol ekstrelerinin, özellikle düşük konsantrasyonlarında mitoza giden hücre sayılarında da anlamlı artışlar meydana gelmiştir. *C. sinensis*' in infüzyonlarında ise kontrole göre total ve mitoza giden hücre sayılarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

24 saatlik inkübasyonda fusiform hücre sayısı kontrole göre, TEKA ve tüm ekstrelerde azalırken, poligonal hücre sayısı da artış göstermiştir. İYÇ-Me, YÇ-Me ve SYÇ-Me ekstrelerinin düşük konsantrasyonlarında fusiform hücre sayısı kontrol ve TEKA gruplarına göre artarken, poligonal hücre sayısı da en fazla 0.5 ve 1 µg/ml İYÇ-Me ile 0.5 µg/ml SYÇ-Me konsantrasyonlarında artmıştır

**(Çizelge 11).** Yuvarlak ve vakuollü hücre sayıları TEKA ve ekstrelerde, konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. Granül sayısı bakımından kontrol, TEKA ve ekstrelerde çok anlamlı farklılıklara rastlanmamıştır. Granül sayısında en fazla artış, 0.5 µg/ml YÇ-Me konsantrasyonunda %2.25±0.20, 2.5 µg/ml'de %1.94±0.20 ve SYÇ-Me ekstresinin 0.5 µg/ml konsantrasyonunda da %1.90±0.17 olarak belirlenmiştir **(Çizelge 12).**

Hücrelerin ekstrelerle 48 saatlik inkübasyonu sonucu, kontrole göre en fazla total hücre sayısı 0.5 µg/ml İYÇ-Me, 0.5 ve 1 µg/ml YÇ-Me, 1 µg/ml SYÇ-Me konsantrasyonlarında görülmüştür. İnfüzyonlar arasında ise en fazla artış, 10 µg/ml İYÇ, 2.5 µg/ml YÇ-inf ve SYÇ-inf konsantrasyonunda hesaplanmıştır **(Çizelge 13).**

48. saatte mitozaya giden hücre sayısında önemli artışlar görülmemiştir. Bu durumun da, 48 saatte *in vitro* ortamda hücrelerin çoğalması için yeterli alanın kalmaması ve hücre-hücre kontak inhibisyonundan kaynaklandığını söyleyebiliriz. 48. saat sonunda mitozaya giden hücre sayısı kontrole göre 0.5 µg/ml İYÇ-Me ve 0.5, 2.5 ve 5 µg/ml YÇ-Me konsantrasyonlarında artmıştır **(Çizelge 13).** 48. saatte grupların fusiform hücre sayıları, 24. saatteki fusiform hücre sayılarına göre azalmış, poligonal hücre sayısı artış göstermiştir. TEKA ve ekstrelerde yuvarlak hücre sayısı, vakuollü hücre sayısı ve granül sayısı % değerlerinde ise kontrole göre önemli farklılık bulunmamıştır **(Çizelge 14, Çizelge 15).**

Metanol ekstrelerinden özellikle İYÇ-Me grubunun yara iyileştirici aktivitede anlamlı olan hücre sayısındaki artışlardan özellikle, 24. saatte total ve mitozaya giden hücre, 48. saatte ise total ve poligonal hücre sayısındaki artışlar, kontrole kıyaslandığında diğer metanol ekstrelerinden daha anlamlı bulunmuştur. Dolayısıyla yara iyileştirici etkide, metanol ekstrelerinin, infüzyonlara göre daha etkili olduğunu, metanol ekstrelerinden de İYÇ-Me grubunun, yara iyileştirici etkide daha anlamlı aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Yaptığımız literatür araştırmaları sırasında, Masson's Trichrome Tekniği ile *C. sinensis* ekstrelerinin *in vitro* yara iyileştirici etkisinin araştırıldığı çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın *C. sinensis* ekstrelerinin hücre kültüründe yara iyileştirici aktivite sonuçlarını karşılaştıracak çalışma mevcut değildir. Genel olarak yeşil çay ve polifenollerinin yara iyileştirici etki ve mekanizmaları ile ilgili *in vivo* hayvan deneyleri mevcuttur. Bizim sonuçlarımıza paralel olarak aşağıda bahsedildiği gibi, deney hayvanları üzerinde yürütülen çalışmalarda da yeşil çayın yara iyileştirici etkisinin olduğu açıklanmıştır.

Hsu (2005), yaptığı çalışmada yeşil çayın yapısal olarak en önemli bileşeni olan EGCG'nin insan epidermal keratinositlerinde farklılaşmaya yardımcı olan p57 ve kaspaz 14'ün ekspresyonunu aktive ettiğini göstermiştir. Yine yeşil çayın yaşlı keratinositleri uyarak ve apoptozu inhibe ederek, deri iyileşme sürecine yardımcı olduğu da rapor edilmiştir. Hsu ve ark. (2003), yeşil çay polifenollerini, yeni DNA sentezi ve biyolojik enerji üretiminin yaşlanmış keratinositleri düzenleyerek, yaşlanan derideki keratinositlerin rejenerasyonunu uyardığını bildirmişlerdir. Ayrıca p57 ve keratin 1 indüksiyonu, flaggrin ekspresyonu, transglutaminaz aktivasyonu ve yeşil çay polifenollerinin, epidermis bazal tabakasındaki keratinositlerin farklılaşmasını stimüle edeceğini belirterek; yeşil



çay bileşenlerinin yara iyileşmesi, deride rejenerasyon ve bazı cilt hastalıkları için yararlı olabileceğinin altını çizmişlerdir. Fu ve ark. (2000), yeşil çay polifenollerinin sıçan keratinositlerindeki koruyucu etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, hücre sayımı, akım sitometri ve proliferatif indeks gibi metodlar kullanarak apoptotik etkide düşüş (laktat dehidrogenaz salınımı); keratinosit proliferasyonunda ise artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Yeşil çay polifenollerinin lipid peroksidasyon ürünlerini azaltıcı, glutatyon peroksidaz seviyelerini yükseltici ve antioksidan özellikleri ile koruyucu etkileri arasında bağlantı olduğunu bildirmişlerdir. Kapoor ve ark. (2004), kesikle oluşturulan sıçanlardaki yaralar üzerinde yeşil çay kateşinlerinden ECG'nin iyileştirici etkisini araştırmışlardır. ECG uygulamasıyla anjiyojenik cevap ve yara iyileşme hızının arttığını açıklamışlardır. Ayrıca ECG'nin, NOS aktivitesi, VEGF protein ekspresyonu ve kollajen birikimini arttırarak skar oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Kim ve ark. (2008), diyabetik fare yaralarında yeşil çay kateşinlerinden EGCG'nin etkisini araştırdıkları çalışmada, yara büzüşmesi, reepitelizasyon, anjiyogenez ve granülasyon doku organizasyonunun indüklenmesinin, EGCG'nin miyofibroblast aktivitesini tetiklemesiyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Yeşil çay ekstresi ile EGCG'nin keloid fibroblastlarda kollajen homeostazı üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada da, yeşil çay ekstresi ile EGCG'nin tip 1 kollajen üretimini, P13K/Akt/mTOR sinyal yolağı aracılığıyla önemli ölçüde inhibe ettiği ve yeşil çayın keloid ve diğer fibrotik hastalıkların önlenmesinde terapötik bir etkisinin olabileceği rapor edilmiştir (Zhang ve ark. 2006).

Yeşil çayın, özellikle de kateşin gruplarının yara iyileştirici etkisi ile ilgili yapılmış olan *in vivo* hayvan modeli deneylerden yola çıkarak, yeşil çayın farklı mekanizmalar aracılığıyla deri iyileşme sürecinde yer aldığını söylemek mümkündür. Yeşil çayla ilgili yara iyileştirici etki anlamında olumlu veriler mevcut olsa da, ECG'nin keloid ya da hipertrofik skar gibi, fazlaca kollajen birikimi sonucu yara iyileşmesi problemlerine de neden olabileceği bildirilmektedir (Kapoor ve ark., 2004). Başka bir çalışmada ise , EGCG'nin tip 1 kollajen üretimini inhibe ederek, keloid ve diğer fibrotik hastalıkları önleyebileceği açıklanmıştır (Zhang ve ark., 2006). Burada birbirinin tam tersi iki sonuç var gibi gözükse de; aslında farklı sinyal yollarının aktivasyonu veya inhibisyonu söz konusudur.

Genetik yapı, iklim, ısı, ışık, beslenme gibi çevresel faktörlere ve yaprağın yaşına bağlı olarak polifenol miktarının değişiklik gösterebileceği ve kateşin gruplarının çaydaki miktarları ile etkilerinin farklı olabileceği göz önünde bulundurulursa, yeşil çayın yara iyileştirici aktivitesi ile ilgili farklı sonuçlarla karşılaşmak mümkündür. Bu nedenle öncelikli olarak çalışılan ekstrelerin toplam fenolik madde ve fenolik asit miktarları tayin edilmiş ve çalışılan metanollü ekstrelerin polifenolik madde miktarları ve antioksidan aktivitelerinin, suda çözünen polar bileşiklerce zengin infüzyonlara oranla daha yüksek bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda yara iyileştirici etkide de, metanol ekstrelerinin, infüzyonlara göre daha anlamlı yara iyileştirici aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu da bize yeşil çayın sağlığımız üzerindeki olumlu etkilerini daha etkili göstermesinde, fenolik madde içeriğinin önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Ayrıca yüksek antioksidan özellikte olması bazı *in vivo* çalışmalarda da belirtildiği gibi yara iyileşmesinde etkili bir özellik olabilmektedir.

Deney sonuçlarımız mitotik hücre sayıları ve granüllü hücre açısından değerlendirildiğinde yara iyileştirici etki anlamında çok olumlu olmasa da, toplam hücre sayısında özellikle de poligonal hücre sayısındaki artışlar hücrelerin migrasyon yeteneklerinin arttığını göstermektedir. Migrasyon ise yara iyileşmesinde oldukça önemli olup; migrasyon ve hücre hareketleri için hücrelerin fusiform değil, poligonal olmasının gerektiği daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Korkmaz, 1996). Sonuçlarımız doğrultusunda ve yapılmış olan *in vivo* çalışmalara dayanarak *Camellia sinensis* metanol ekstraktlarının yara iyileşmesinde olumlu etkilerinin olduğunu söyleyebiliriz.

Yeşil çay tüketimi ve insanlardaki kanser insidansı arasındaki yakın ilişki ilgi uyandırmaktadır ve son yıllarda üzerinde durulan bir konudur (Brown 1999). *In vitro* hücreler ve *in vivo* hayvan modelleri kullanılarak yapılan deneysel çalışma sonuçlarına göre yeşil çay kolon, mide, özefagus, akciğer başta olmak üzere prostat, meme ve cilt kanseri gibi birçok kanser çeşidine karşı koruyucu görev yapmaktadır (Fisunoğlu ve Besler 2008, Sharangi 2009).

Biz de bu çalışmada *C. sinensis* ekstraktlarının U2OS hücrelerinde antikanser etkili olduğunu belirledik. Özellikle *Camellia sinensis* ekstraktlarının konsantrasyon ve inkübasyon zamanı arttıkça U2OS hücre proliferasyonunu azalttığı görülmüştür. Antikanser aktivitenin değerlendirilmesinde kateşin grubu (pozitif kontrol), çay ekstre MTT değerlerini karşılaştırmak için kullanılmıştır. Bu çalışmada geniş bir kateşin konsantrasyon aralığı kullanmamıza rağmen, özellikle düşük kateşin konsantrasyonlarında etkili bir antiproliferatif etkiye rastlanmamıştır. 24 saatlik inkübasyon sonunda kateşin konsantrasyonlarının tümünde MTT absorbans değerlerinde azalma görülse de sadece en yüksek konsantrasyon olan 1000 µM'da kontrole göre istatistiksel olarak önemli azalma belirlenmiştir. 48 saat inkübasyon sonunda da kontrole göre kateşin'in tüm konsantrasyonlarının mitokondriyal absorbans değerlerinde önemli düzeyde azalmalar meydana gelmiştir (**Çizelge 23**).

24 saatlik inkübasyon sonunda, 20, 40 ve 60 µg/ml İYÇ-Me ve SYÇ-inf, 40 ve 60 µg/ml YÇ-Me, SYÇ-Me ve YÇ-inf'nin tüm konsantrasyonlarında ve 10, 20, 40 ve 60 µg/ml İYÇ-inf konsantrasyonlarında kontrole göre U2OS hücrelerinde mitokondriyal aktivite önemli düzeyde azalmıştır. 48 saat sonra U2OS hücrelerinde tüm ekstre konsantrasyonlarında sitotoksik etki inkübasyon süresine bağlı olarak artmış ve kontrole göre mitokondriyal aktivitelerde önemli azalmalar gözlenmiştir (**Çizelge 24-Çizelge 29**). *C. sinensis*'in antikanser aktivitesini araştırdığımız tüm ekstraktlarda, konsantrasyon ve inkübasyon zamanı arttıkça sitotoksik etkinin arttığını ve hücre proliferasyonunun azaldığını; apoptotik etkinin de metanol ekstraktlarında infüzyonlara göre, özellikle yüksek konsantrasyonlarda daha fazla olduğunu belirlenmiştir. En fazla apoptotik etki ise sırasıyla 60 µg/ml İYÇ-Me, YÇ-Me ve SYÇ-Me ekstre konsantrasyonlarında görülmüştür (**Çizelge 30, Çizelge 31**).

Yapılan literatür taraması sonucu, U2OS hücre hattında *C. sinensis* ekstresinin antikanser etkisine dair bir çalışmaya rastlanmasa da, son yıllarda yapılmış olan pek çok çalışmada yeşil çayın antikarsinojenik ve antioksidan etkilerinin olduğu

bildirilmiştir. Çay polifenollerinin antikanserojenik etkilerinin çalışıldığı bir çalışmada ise, melanoma kanser hücre dizilerinde (GE-0208, MB-1133, CH-0566, LF-0023) diğer kateşin gruplarına göre, en fazla hücre ölümüne EGCG'nin neden olduğu ve potansiyel bir hücre inhibitörü özelliği gösterdiği belirlenmiştir (Ravindranath ve ark., 2007). Kateşinlerin tüm tümör hücrelerinin ölümünde etkili olmadığına dair yapılan bir çalışmada ECG (50 mM)'nin, prostat kanser hücreleri (DU145, HH870) ve metastatik ovaryum kanser (HH450) hücrelerinde hücre ölümü tetikleyici etkisi olduğu açıklanmıştır (Ravindranath ve ark., 2006). Yine Ahmad ve ark. (1997), EGCG'nin sadece malign tümör hücrelerinde apoptotik etkili olduğunu, normal hücreleri etkilemediğini açıklamışlardır.

Nihal ve ark. (2005), hücre akım sitometrisi ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 10 µg/ml EGCG konsantrasyonunun A-375 ve Hs-294T melanoma kanser hücrelerinde sırasıyla %13.55 ve %47.56 apoptotik etki gösterdiğini ve EGCG'nin melanoma hücrelerinde hücre siklusunu ve apoptozisi cki-siklin-cdk ağı ve Bcl2 proteinleri aracılığı ile önemli derecede durdurduğunu rapor etmişlerdir. Ahmad ve ark. (1997), epigallokateşin-3-gallat ile tedavi sonunda HaCaT, L5178Y ve DU145 kanser hücrelerinde apoptotik etkiyi hücre akım sitometrisi ile belirlemişler ve epigallokateşin-3-gallat tedavisinin hücre siklusunu G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> fazında durdurduğu ve doza bağımlı apoptozis meydana geldiğini açıklamışlardır. Yang ve ark., (1998), çay ekstraktlarının hücre büyümesi üzerindeki inhibitör etkilerine, farklı çay polifenollerinin neden olduğunu belirtmişlerdir. H661 hücreleri 30 µM EGCG ve EGC ile 24 saat inkübe edildiğinde apoptotik etki sırasıyla %23 ve %26, 100 µM ile de %82 ve %76 olarak belirlenmiştir. Ancak 30µM EGCG ve EGC ve daha düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığının etkilenmediği, sitotoksik etkinin 100 µM EGCG ve EGC konsantrasyonlarında daha anlamlı olduğu da rapor edilmiştir. EGCG'nin düşük konsantrasyonlarında (12.5, 25, 50 µg/ml) U-373 MG (glioblastoma), U-87 MG (glioblastoma) ve C6 glioma hücrelerinde apoptotik etki görülürken, MtT/E (pituitary adenoma) hücrelerinde yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) apoptotik etki görülmüştür. Yine 50 µg/ml of EGCG konsantrasyonunda 24, 48 ve 72 saat sonra hücre canlılığında önemli azalmalar meydana gelmiştir (Yokoyama ve ark., 2000).

Lin ve ark. (1999), A431 epidermoid karsinoma hücrelerinde yeşil çay polifenollerinden EGCG'nin EGF, PDGF veya FGF reseptör aracılı ekstraselüler sinyalleri baskıladığını ve tümör gelişimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. 30 µM EGCG'nin ise MCF-7 hücrelerinde G<sub>1</sub> fazındaki hücre siklusunu bloke ettiğini, siklin bağımlı kinaz 2 ve 4 aktivitesini inhibe ettiğini; cdk inhibitörleri olan p21 ve p27 seviyelerini ise arttırdığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak da, EGCG'nin büyümeyi inhibe edici etkisini cdk2 ve cdk4 gibi G<sub>1</sub> düzenleyici proteinleri değiştirerek meydana getirdiği belirtilmiştir. Ayrıca; EGCG'nin makrofajlardaki NFκB transkripsiyon faktör aktivitesini baskılayarak, nitrik oksit sentazın (iNOS) indüksiyonunu bloke edebildiğini, iNOS aktivasyonunun inhibisyonu ile de pek çok bileşik ve radikal yapılarının baskılanabileceğini ve böylece tümör başlangıcı veya gelişiminin inhibe edilmiş olacağını bildirmişlerdir. Fujiki ve ark (1998); EGCG ve diğer çay polifenollerinin, insan akciğer kanser hücresindeki (PC-9) büyümeyi G<sub>1</sub>/M fazında durdurduğunu ve TNF-α yolağının, EGCG aracılı biyolojik cevapta rol olabileceğini söylerken; Liang ve ark (1997), EGCG'nin, DNA sentezini, EGFR'nin protein tirozin kinaz

ve EGFR'nin aktivitesini inhibe ettiğini ve tümör gelişimini EGFR yolağını bloke ederek inhibe edebileceğini belirtmişlerdir. Hsu (2005); yeşil çay polifenollerinin güçlü antioksidanlar olarak ROS'u imha ettiğini; aktif nutrasötikler olarak ERK, JNK ve AP-1 gibi ROS-MAPK'de yer alan elemanları düzenlediğini; COX-2, faz-1, faz-2 enzimlerini inhibe ettiğini; IL-1, IL-10 ve IL-12 salınımı gibi inflamasyona bağlı yanıtları inhibe ettiğini; p57 ve kaspaz 14 salınımıyla ilişkili yeni bir farklılaşma yolağını aktive ettiğini ve deri formasyonunu hızlandırdığını; kaspaz 3 aracılı apoptoz yolağını baskıladığını ve sağlıklı hücrelerde kaspaz 14 aracılıklı planlı hücre ölüm yolağını aktive ettiğini; p53 ve p21 gibi proapoptotik genleri uyardığını ve tümör hücrelerinde transkripsiyon faktörü NF-KB'nin aktivitesini baskıladığını bildirmiştir.

Yukarıda adı geçen ve yeşil çayın antiproliferatif etkisini ve yara iyileşmesi için tedavide kullanılabilirliğini gösteren çalışmaların sonuçları, bizim çalışma sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada, *C. sinensis*'in özellikle metanol ekstralarının, infüzyonlara göre önemli yara iyileştirici, apoptotik ve sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Yara iyileştirici etkide metanolla hazırlanan ekstraların düşük konsantrasyonları daha etkili bulunmuştur. Sitotoksik ve apoptotik etkiler de metanolla hazırlanan ekstre konsantrasyon artışına göre önemli derecede artmıştır. Özellikle *C. sinensis* metanol ekstralarının osteosarkom hücrelerindeki antikanser etkisinin, antioksidan aktivite sonuçları ile paralel olması, gruplar arasındaki farklılıkların ekstraların içerdiği fenolik madde içeriği, miktarı ve etkileşimlerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, tez kapsamında ulaşılan sonuçlarla *Camellia sinensis* ve yeşil çayın halk arasında antioksidan, antikanserojenik, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral kullanımlarına da bilimsel açıklama getirilmiştir.

Bundan sonraki çalışmalarda ise, polifenolik içeriği belirlenmiş *Camellia sinensis* ekstralarının antioksidan, yara iyileştirici ve antikanser aktivite özelliklerini açıklayacak moleküler mekanizmalar üzerinde yoğunlaşılabilir.

## KAYNAKLAR

Ahmad, N., Feyes, D. K., Nieminen, A-L., Agarwal, R., Mukhtar, H., Green Tea Constituent Epigallocatechin-3-Gallate and Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Carcinoma Cells, *Journal of the National Cancer Institute*, 89, 24, (1997).

Akşit, H., Bildik, A., Apoptozis, *Yyü Vet. Fak. Derg.*, 19 (1), 55-63 (2008).

Alkan, M., İnsan Lösemi (HL-60 ) Hücre Dizisinde Piridin 2-Karbaldoksim Ligandı Ve Pt(II) Kompleksinin Apoptotik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, (2009).

Bayraktar, B., Yücesir, İ., Yumuşak Doku Yaralanmaları, İyileşme Süreci ve Tedavi Yaklaşımları, *Klinik Gelişim Derg.*, 22 (1), 60-67, (2009).

Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi: Geçmişte ve Bugün, *Nobel Tıp Kitapevi*, 180-181, 1999.

Bertram, J.S., The molecular biology of cancer, *Molecular Aspects of Medicine*, 21, 167-223, (2001).

Beyhan, Ş. G., Kollajen Sentezi İnhibitörlerinden 5-Florourasil ve Halofuginon’ un Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği, İstanbul, (2008).

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., Use Of Free Radical Method To Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30, (1995).

Brown, M. D., Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract and Its Possible Role in the Prevention of Cancer, *Alternative Medicine Review*, 4, 5, (1999).

Cabadak, H., Hücre Siklusu ve Kanser, *Adü Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3), 51-61 (2008).

Chen, D., Dou, Q. P., Tea Polyphenols and Their Roles in Cancer Prevention and Chemotherapy, *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 1196-1206, (2008).

Chen, Z. P., Schell, J. B., Ho, C. T., Chen, K. Y., Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts, *Cancer Lett.*, 129, 173–179, (1998).

Chen, Z. P., Schell, J. B., Ho, C. T., Chen, K. Y., Gren Tea Epigallocatechin gallate Shows a Pronounced Growth Inhibitory Effect on Cancerous Cells But not on Their Normal Counterparts, *Cancer Lett.*, 129, 173-179, (1998).

Ciğer, S., Yara İyileşmesi ve Büyüme Faktörleri, In: Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi, C. Erdem, C. R. Çelebi, Ayrıntı Matbaacılık, Ankara, 20-27 (1996).

Demiray, E., Tülek, Y., Domates Kurutma Teknolojisi ve Kurutma İşleminin Domatesteki Bazı Antioksidan Bilesiklere Etkisi, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 9-20, (2008).

Diegelmann, R. F., Evans, M., Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing, *Frontiers in Bioscience*, 9, 283-289, (2004).

Dong, Z., Ma, W., Huang, C., Yang, C. S., Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate and theaflavins. *Cancer Res.*, 57, 4414-4419, (1997).

Durusoy, Ç., Ulusall, B. G., *Dermatolojide Bitkisel Tedavi-Fitoterapi, Türkiye Türk Dermatoloji Dergisi*, 1, 47-50, (2007).

Engin, K., Özyardımcı, N., *Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, Bölüm 3, Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul*, 2001.

Erdoğan, B. B., Uzaslan, E. K., *Apoptozis Mekanizmaları: Fas-FasL Bağımlı Apoptozis, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı*, (2003).

Fisunoğlu, M., Besler, H. T., *Çay ve Sağlık İlişkisi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara* (2008).

Freshney, R. I., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 5th Edition, 359-372, 2005.*

Fu, Y. C., Jin, X. P., Wei, S. M., The effects on cell growth of tea polyphenols acting as a strong anti-peroxidant and an inhibitor of apoptosis in primary cultured rat skin cells. *Biomed Environ Sci.*, 13, 170–179, (2000).

Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor- $\alpha$  and cancer preventive agents (-)- Epigallocatechin gallate and green tea- A Review, *Cancer Detection and Prevention*, 24, 1, 91-99, (2000).

Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Komori, A., Sueoka, E., Kozu, T., Tada, Y., Suga, K., Imai, K., Nakachi, K., *Cancer Inhibition by Green Tea*, 402, 307-310, (1998).

Griffiths, J. B., Doyle, A., *Cell and tissue culture Laboratory procedures in Biotechnology*, 62-64, 1998.

Guyton, A. C., *Textbook of Medical Physiology, 7. Edition, Nobel Tıp Kitapevi*, 53-55, 1986.

Hatok, J., Babusikova, E., Matakova, T., Mistuna, D., Dobrota, D., Racay, P., *In Vitro Assays For The Evaluation Of Drug Resistance in Tumor Cells, Clin. Exp. Med.*, 9, 1-7, (2009).

Hsu, S., Bollag, W. B., Lewis, J., Huang, Q., Singh, B., Sharawy, M., Yamamoto, T., Schuster, G., *Green Tea Polyphenols Induce Differentiation and Proliferation in Epidermal Keratinocytes, JPET*, 306, 29–34, (2003).

Hsu, S., *Green tea and the skin, J Am Acad Dermatol.*, 52, 1049-59, (2005).

Hsu S, Yamamoto T, Borke J, Walsh DS, Singh B, Rao S, *Green tea polyphenol-induced epithelial cell terminal differentiation is associated with coordinated expression of p57/KIP2 and caspase 14. J Pharmacol Exp Ther*, 312: 884-90, (2005).

http-1 <http://www.estetiks.com/yara+iyilesmesi.html>

http-2 [http://anestezi.med.ege.edu.tr/sem/2009/14\\_yara.ppt#392.3,Yara\\_iyilesmesi](http://anestezi.med.ege.edu.tr/sem/2009/14_yara.ppt#392.3,Yara_iyilesmesi)

http-3 [http://www.genrise.com.tr/pages/pdf/genrise\\_el\\_kitabi.pdf](http://www.genrise.com.tr/pages/pdf/genrise_el_kitabi.pdf)

http-4 <http://atcc.org>

http-5 <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells>

http-6 <http://en.aump.org/medical/>

http-7 <http://www.shayanaz.com/Pathology/Masson/masson-SURGICAL.pdf>

http-8 <http://www.canlibilimi.com/images/hucre-dongusu-nedir.gif>

http-9 <http://www.niaaa.nih.gov/NR/rdonlyres/5FDF1680-EC98-4FAB-B93A-4921229666E6/0/changes.gif>

http-10 [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/pm/doc/tds/cell\\_bio/live/web\\_enabled/6710KK\\_556570.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/6710KK_556570.pdf)

http-11 [http://www.biomol.de/dateien/infos\\_nr647.gif](http://www.biomol.de/dateien/infos_nr647.gif)

Jainchill, J. L., Aaranson, S. A., Todaro, G. J., Murine Sarcoma and Leukemia Viruses: Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells, American Society for Microbiology, Journal of Virology, 4, 5, 549-553, (1969).

Johnson, R., Understanding Biology, Second Edition, Mosby Year Book, 328, 1991.

Kantar, M., Osteosarkom, Klinik Gelişim Dergisi, 20 (2), 120-124, (2007).

Kapoor, M., Howard, R., Hall, I., Appleton, I., Effects of Epicatechin Gallate on Wound Healing and Scar Formation in a Full Thickness Incisional Wound Healing Model in Rats, American Journal of Pathology, 165, 1, (2004).

Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S., Flow Sitometri ve Kullanım Alanları, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 6, 2, 01-18, (2008).

Karp, G., Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 4 Edition, Wiley international edition, 669-6677, 2005.

Kayaalp O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., 315, Ankara, 2009.

Kelly, G. S., Centella asiatica, Alternative Medicine Review, 12 (1), 69-72, (2007).

Khokhar, S., Magnusdottir, S. G., Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom, J. Agric. Food Chem., 50, 565-570, (2002).

Kılıçoğlu, B., Kılıçoğlu, S. S., Eren, V. Ç., Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi, S.D.Ü. Tıp Fak. Derg., 12 (1), 67-76, (2005).

Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., Taniguchi, H., Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2161–2168, (2002).

Kim, H., Kawazoe, T., Han, D-W., Matsumara, K., Suzuki, S., Tsutsumi, S., Hyon, S-H., Enhanced wound healing by an epigallocatechin gallate-incorporated collagen sponge in diabetic mice, Wound Rep Reg, 16, 714–720, (2008).



- Klug, W. S., Cummings, M. R., Concepts of Genetics, Bell&Howell Company, 282-284, 1983.
- Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A., Evstatieva, L. N., Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods, *Phytochem. Anal.*, 13, 8-17, (2002).
- Koo, M.W.L., Cho, C.H., Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system, *European Journal of Pharmacology*, 500, 177–185, (2004).
- Korkmaz, S., Fibroblast Hücre Kültürlerinde Yara İyileştirici Etkinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye (1996).
- Köşlü, A., Yara İyileşmesinde Tarihsel Gelişmeler, In: Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi, C. Erdem, C. R. Çelebi, Ayrıntı Matbaacılık, Ankara, 1-7, (1996).
- Kulisić, T., Radonić, A., Katalinić, V., Milos, M., Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, *Food Chemistry* 85 , 633–640, (2004).
- Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S. L., Robbins Basic Pathology, 7th Edition, Saunders, 166-167, 2003.
- Kuroda, Y., Hara, Y., Antimutagenic And Anticarcinogenic Activity Of Tea Polyphenols, *Mutation Research*, 436, 69-97, (1999).
- Landau, J. M., Lambert, J. D., Yang, C. S., Green Tea, *Nutritional Oncology*, 597-606, (2006).
- Liang, Y. C., Lin-shiau, S. Y., Chen, C. F., Lin, J. K., Supression Of Extracellular Signals And Cell Proliferation Through EGF Receptor Binding By (-)-Epigallocatechin Gallate İn Human A431 Epidermoid Carcinoma Cells., *J. Cell. Biochem.*, 67, 55-65, (1997).
- Lin, J-K., Liang, Y-C., Lin-Shiau, S-Y., Cancer Chemoprevention by Tea Polyphenols through Mitotic Signal Transduction Blockade, *Biochemical Pharmacology*, 58, 911–915, (1999).
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Darnell, J., *Molecular Cell Biology*, 5th Edition, 217, 2003.
- Lu, L. H., Lee, S. S., Huang, H. C., Epigallocatechin Suppression Of Proliferation Of Vascular Smooth Muscle Cells: Correlation With c-jun and JNK, *Br. J. Pharmacol.*, 124, 1227-1237, (1998).
- Nihal, M., Ahmad, N., Mukhtar, H., Wood, G. S., Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: Possible implications for the chemoprevention of melanoma, *Int. J. Cancer*, 114, 513–521, (2005).
- Mukhtar, H., Ahmad, N., Gren Tea in Chemoprevention of Cancer, *Toxicological sciences*, 52, 111-117, (1999a).
- Mukhtar, H., Ahmad, N., Gren Tea Polyphenols and Cancer: Biologic Mechanisms and Practical Implications, *Nutrition Reviews*, 57(3), 78-83, (1999b).

- Nayir, S. M., Sütün Yoğurda Dönüşümü Sırasında İçerdiği Fenolik Antioksidan Maddelere Probiyotik Bakteri Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, (2008).
- Niforou, K. M., Anagnostopoulos, A. K., Vougas, K., Kittas, C., Gorgoulis, V. G., Tsangaris, G.T., The Proteome Profile of the Human Osteosarcoma U2OS Cell Line, *Cancer Genomics Proteomics*, 5, 63-77, (2008).
- Nursal, T. Z., Baykal, A., Hamaloğlu, E., Yaşlılarda Yara İyileşmesi: Fark Var mı?, *Turkish Journal of Geriatrics*, 2 (1), 29-32, (1999).
- Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D., Apoptozisin Önemi, *Toraks Dergisi*, 2 (1), 91-95 (2001).
- Öztürk, F., Apoptoz, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9, 2, 143-148, (2002).
- Öztürk, N., Korkmaz, S., Öztürk, Y., Başer, K. H. C., Effects of Gentiopicroside, Sweroside and Swertiamarine, Secoiridoids from Gentian (*Gentiana lutea* ssp. *Symphyantra*), on Cultured Chicken Embryonic Fibroblasts, *Planta Med.*, 72, 289-294, (2006).
- Öztürk, N., Korkmaz, S., Öztürk, Y., Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts, *Journal of Ethnopharmacology* 111, 33–39, ((2007).
- Pratt, D.E., Natural Antioxidants From Plant Material. In: HO, C.I., Lee, C.Y., Huang, M.I. (Eds.), *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health*, Vol. 507. ACS Symposium Series American Chemical Society, Washington, 54–71, (1992).
- Rah, D.K., Han, D.W., Baek, H.S., Hyon, S.H., Park, J.C., Prevention of Reactive Oxygen Species-induced Oxidative Stres in Human Microvascular Endathelial Cells by Gren Tea Polyphenol, *Toxicol. Lett.*, 155, 269-275, (2005).
- Ravindranath, M. P., Ramasamy, V., Moon, S., Ruiz, C., Muthugounder, S., Differential Growth Suppression of Human Melanoma Cells by Tea (*Camellia sinensis*) Epicatechins (ECG, EGC and EGCG), *Ecam*,1-8, (2007).
- Ravindranath, M. P., Saravanan, T. S., Monteclaro, C. C., Presser, N., Ye, X., Selvan, S. R., Bromsan, S., Epicatechins Purified from Green Tea (*Camellia sinensis*) Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines, *Ecam*, 3(2), 237–247, (2006).
- Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K.D., Natural products for cancer prevention: a global perspective, *Pharmacology&Therapeutics*, 99, 1-13, (2003).
- Şahin, F., Avcı, Ç.B., Avcu, F., Ural, A.U., Sarper, M., Hıslı, Y., Omay, S.B., Saydam, D., Red Grape Seed Extract And its Compound Resveratrol Exert Cytotoxic Effect To Various Human Cancer Lines, *Turk J Hematol*, 24, 102-109 (2007).
- Sahin, H., Özdemir, F., Yeşil Çayın Sağlık Üzerine Etkisi, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, (2006).

- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270–276, (1998).
- Schultz, G. S., Wysocki, A., Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing, *Wound Rep. Reg.*, 17, 153-162, (2009).
- Shahidi, F., Antioxidants in Food and Food Antioxidants, *Nahrung*, 44, 158-163, (2000).
- Sharangi, A. B., Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis L.*) – A review, *Food Research International*, 42, 529-535, (2009).
- Shukla, Y., Tea and Cancer Chemoprevention: A Comprehensive Review, *Asian Pacific J Cancer Prev.*, 8, 155-166, (2007).
- Smith, C., Marks, A., Lieberman, M., *Temel Tıbbi Biyokimyası, Klinik Yaklaşım, Güneş Tıp Kitabevleri*, 329, Ankara, 2007.
- Taneli, F., "Flow" Sitometri Tekniği Ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı, *Türk Klinik Biyokimya Derg.*, 5 (2), 75-82 (2007).
- Tekeli, Y., Sezgin, M., Şanda, M. A., Konya’da Yetişen *Centaurea Pterocaula* Truatv.’in Fenolik Yapısı ve Antioksidan Etkisi, *SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 3(1), 35-41, (2008).
- Tosun, İ., Karadeniz, B., Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi, *OMÜ Zir Fak. Dergisi*, 20(1), 78-83, (2005).
- Ulukaya, E., Apoptozis Ders Notları, *Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı*, Bursa, (2003).
- Vergote, D., Cren-Olive, C., Chopin, V., Toillon, R. A., Rolando, C., Hondermarck, H., Bourhis, X. L., (-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts, *Breast Cancer Research and Treatment*, 76, 195–201, (2002).
- Weisburger, J. H., Tea and health: a historical perspective, *Cancer Letters*, 114, 315-317, (1997).
- Yaka, E., Eğrilmez, P., Çavdar, Z., Genç, Ş., Genç, K., İyilikçi, L., Yener, G. G., Alzheimer Hastalığında Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) Biyolojik Belirteçler ve BOS’un PC12 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine *in vitro* Etkisinin Değerlendirilmesi, *Turkish Journal of Geriatrics*, 9 (1), 1-7, (2006).
- Yang, G. Y., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E. J., Yang, C. S., Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols, *Carcinogenesis*, 19, 611-616, (1998).
- Yang, G. Y., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E. J., Yang, C. S., Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols, *Carcinogenesis*, 19, 4, 611–616, (1998).
- Yokoyama, S., Hirano, H., Wakimaru, N., Sarker, K. P., Kuratsu, J., Inhibitory effect of epigallocatechin-gallate on brain tumor cell lines in vitro, *Neuro-Oncology*, (2001).

Yüksel, B., Kılıç Handemir, S., Taşdemir, N., Batioğlu, S., Apoptosis and Caspase System, Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi , Ankara, (2009).

Zeren, İ., Yara iyileşmesi ve Kollajen, In: Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi, C. Erdem, C. R. Çelebi, Ayrıntı Matbaacılık, Ankara, 37-41, (1996).

Zheng, C-j., Qin, L-p., Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities, *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 5 (3), 348-351, (2007).

Zhang, Q., Kelly, A. P., Wang, L., French, S. W., Tang, X., Duong, H. S., Messadi, D. V., Le, A. D., Green Tea Extract and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibit Mast Cell-Stimulated Type I Collagen Expression in Keloid Fibroblasts via Blocking PI-3K/Akt Signaling Pathways, *Journal of Investigative Dermatology* ,126, (2006).