



## A Histopathological and Biochemical Investigation of the Wound Healing and Oxidative Stress Effect on the Wound Model of the *Achillea millefolium* in Rats

Ahmet UYAR<sup>1</sup> Turgut AKYOL<sup>2</sup> Turan YAMAN<sup>3</sup> Ömer Faruk KELEŞ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Hatay, Turkey

<sup>2</sup>Van Yuzuncu Yil University, Health Science Institute, Department of Veterinary Pathology, Van, Turkey

<sup>3</sup>Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Van, Turkey

Received: 13.11.2017

Accepted: 18.12.2017

### SUMMARY

The aim of current study is to evaluate of histopathological and biochemical effects of *Achillea millefolium* (Civanperçemi-CP) on the wound healing in the rats skin. In this study, 24 Wistar albino rats were divided to three groups, Control (K), Madecassol® (M) and *Achillea millefolium* (CP). A wound was created with a punch under the anesthesia in the back region of the rats in all groups. *Achillea millefolium* and madecassol pomad have been administered to study groups per day and serum physiologic solution has been administered to K group locally as placebo. In order to evaluate by histopathological and immunohistochemical and biochemical on 7th and 15th days were taken the blood and skin tissue. Compared with the K group, the topical application of *Achillea millefolium* has a positive effect on epithelialization, fibroblastic activity and collagenization in the CP group. As a result of immunohistochemical investigation, Glutathione peroxidase 1 (GPx1) immunoreactivity in the CP group was stronger than in the K group. Biochemical examination of skin and blood tissue revealed that fluctuated antioxidant defence system constituents levels were restored in CP and M groups. In conclusion, *Achillea millefolium* increased connective tissue formation and reduced the time needed to complete epithelization and was also found that wound healing was accelerated by this occasion.

**Key Words:** *Achillea millefolium*, Wound healing, Rat

### ÖZET

**Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Yara Modelinde Civanperçemi (*Achillea millefolium*) Bitkisinin Yara İyileşmesi ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Histopatolojik ve Biyokimyasal Olarak Araştırılması**

Bu çalışmada Civanperçemi'nin (*Achillea millefolium*) (CP) ratlarda yara iyileşmesi üzerine histopatolojik ve biyokimyasal etkisi araştırıldı. Çalışmada 24 adet Wistar albino ırkı rat kullanıldı. Ratlar; Kontrol (K), CP ve Madecassol (M) grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Tüm gruplardaki ratların sırt bölgesi derisinde anestezi altında punch cihazı ile yara oluşturuldu. CP grubu ratların yara bölgelerine CP ekstraktından elde edilen pomat uygulanırken, M grubu ratların yara bölgelerine ise ticari bir preparat olan madecassol kremi uygulandı. Denemenin 7. günü ile deneme sonu olan 15. günde anestezi altında kan ve deri doku örnekleri alındı. Histopatolojik incelemelerde, K grubu ile karşılaştırıldığında CP grubunda yangı ve ödemin azaldığı, epitelizasyon, fibroblastik aktivite ve kollajenizasyonda pozitif bir etki görüldü. İmmunohistokimyasal olarak CP grubunda Glutathione peroxidase 1 (GPx1) immunoreaktivitesi K grubundan daha güçlü idi. Deri ve kan dokusunun biyokimyasal incelemelerinde K grubuna göre M ve CP grubunda antioksidan savunma sistemi enzim düzeyleri daha yüksek idi. Sonuç olarak CP'nin bağ doku oluşumunu arttırdığı ve epitelizasyonun tamamlanması için gerekli zamanı azalttığı, bu vesile ile yara iyileşmesini hızlandırdığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Civanperçemi (*Achillea millefolium*), Yara İyileşmesi, Rat

### GİRİŞ

Fiziksel, kimyasal, ısı, radyasyon ve cerrahi müdahalelere bağlı veya kendiliğinden gelişen doku bütünlüğünün bozulması, yara olarak tanımlanır. Diğer bir deyişle yara, değişik nedenlerle vücudun herhangi bir dokusunun anatomik ve fizyolojik fonksiyonlarının azalması ya da doku

veya organların çeşitli etkenler tarafından tamamen veya kısmen fonksiyonlarının bozulmasına denir (Aydın ve ark. 2002).

Doku harabiyeti sonucu yaralanma gerçekleştiğinde, vücudumuzun sistemleri karmaşık ve birbirleri ile ilişkili bir seri yapılanma/iyileşme sürecine girer (Agarwal ve ark. 2005). Doğumdan sonraki en karmaşık biyolojik olaylardan

biri olan yara iyileşmesi, farklı yapılarıdaki dokuların çeşitli etkileşimleri sonucu birbirini takip eden inflamasyon, vaskülarizasyon, yara kapanması, epitelizasyon ve matriksin yeniden meydana gelmesini de kapsayan birçok hücresel olayı içerir (Jurjus ve ark. 2007; Duarte ve ark. 2009). Yara oluştuktan hemen sonra başlayan iyileşme sürecinde nötrofiller ve makrofajlar, inflamasyonun ilk evresinde salgılanan mediyatörlerin etkisi ile dolaşımdan yara bölgesine gelir. Bu bölgeye gelen yangı hücreleri ve diğer hücrelerin katkısı ile kollajen sentezi ve kontraksiyon sonucunda yara iyileşmesi gerçekleşir (Özler ve ark. 2010).

Yara iyileşme sürecini kısaltma ve ideal skar oluşumunu sağlamada temel yaklaşım; bu süreçte rol oynayan başta inflamatuvar hücreler, trombositler ve mediyatörler olmak üzere, kollajen sentezini, anjiyogenezi ve hücre dışı matriks gibi etmenleri etkilemektir (Kapan ve ark. 2008; Özler ve ark. 2010). Bu amaçla eski zamanlardan beri yara tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve anonimleşmiş bu tür bitkisel ilaçlar, kırsal bölgelerde sağlık hizmetine önemli katkılar sağlamıştır (Adetutu ve ark. 2011). *Asteraceae* familyasından olan Civanperçemi (CP) (*Achillea millefolium*) de, yaklaşık bin yıldır halk hekimliğinde yara iyileştirici amacıyla kullanılan bitkilerden biridir. *Achillea* türü Truva savaşı sırasında yaralı askerleri iyileştirmek için *Achillea spp* bitkisini kullanan Yunan mitolojisinin önemli kahramanlarından biri olan *Achilles*'dan adını almıştır (Lakshmi ve ark. 2011). Çok yıllık otsu bir bitki olan CP, dünyanın birçok yerinde yetişmekle birlikte genellikle Asya, Avrupa ve Amerika kıtalarında yaz aylarında özellikle de haziran-eylül ayları arasında yetişmektedir (Passalacqua ve ark. 2007). Son zamanlarda deneysel çalışmalarda bu bitki antibakteriyel (Candan ve ark. 2003), antifungal (Stojanović ve ark. 2005), antiparaziter (Murnigsih ve ark. 2005), antispazmotik ve hepatoprotektif (Yaesh ve ark. 2006), antipiretik (Pires ve ark. 2009) ve kan basıncını düşürücü (Souza ve ark. 2011) olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan yara modelinde civanperçemi (*Achillea millefolium*) bitkisinin yara iyileşmesi ve oksidatif stres üzerine etkisinin histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Deney hayvanları

Bu çalışmada deney hayvanı olarak ortalama 200-250 gr ağırlığında Wistar-albino türü 24 adet rat kullanıldı. Ratlar, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin (24.12.2015 tarih ve 14 sayı) alındıktan sonra Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi Başkanlığından temin edildi. Deney süresince 12;12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırılması, 22±2°C ısı, %45-50 nemli otomatik olarak ayarlanmış odalarda barındırılan ratlar, şehir şebeke suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

### Bitki numunelerinden pomad hazırlanması

Temmuz-Ağustos aylarında Van ili Erciş ilçesi Yukarıkaçgedik Köyünden toplanarak gölgede kurutulan Civanperçemi bitkisinin çiçek kısımları öğütülerek toz haline getirildi. Toz haline gelen örnekten her ekstraksiyon için 50 g örnek alınarak 500 ml metanol ile oda sıcaklığında 24 saat soxhlet cihazında ekstrasyona tabi tutuldu. Ekstraksiyon sonrası vakumlu ortamda çözücüler uzaklaştırıldı. Ekstre 30 ml distile su ile karıştırılarak üzerine 80 gr gliserin ilave edildikten sonra tekrar karıştırılarak çok hafif alevde amyant üzerine kondu ve yarı şeffaf bir hal alıp ağırlığı 100 grama ininceye kadar ısıtıldı. İşlem sonunda kutusuna konularak

uygun şekilde etiketlenip kullanıncaya kadar uygun ortamda saklandı.

### Grupların oluşturulması

Ratlar her grupta sekizer adet olmak üzere üç gruba ayrıldı.

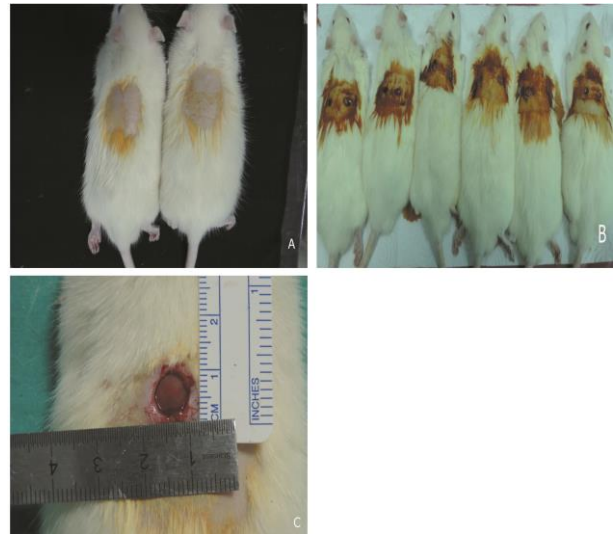
Kontrol (K) grubu: Bu gruptaki ratların yaraları sadece serum fizyolojik ile tedavi edildi.

Madecassol® (M) grubu: Pozitif kontrol amacıyla bu gruptaki ratların yaralarına Madecassol® (Bayer) pomad sürüldü.

Civanperçemi (CP) (*Achillea millefolium*) grubu: Bu gruptaki ratların yaralarına gliserinle hazırlanmış Civanperçemi pomadı uygulandı.

### Yara oluşturulması ve takibi

Ratların dorsal interscapular bölgelerinde oluşturulacak yaralar için öncelikle 60 mg/kg Ketamine+10 mg/kg dozunda Xylazine ile anestezileri sağlandı. Elektrikli traş makinesi ile yara oluşturulacak bölgenin kılları temizlendi. Bu bölge antiseptik solüsyon ile silinerek antiseptisi sağlandıktan sonra 0.8cm punch cihazı ile deride tam kat yara oluşturuldu. Yara bölgesi 15 gün boyunca, günde 1 defa lokal olarak pansuman edildi. 0, 4, 7, 12 ve 15. günlerde tüm grupların makroskopik resimleri çekildi ve yaraların izdüşümleri asetat kâğıdına çizilerek AutoCAD programı yardımıyla alan hesaplamaları yapılarak yara iyileşmeleri takip edildi. Yara oluşumunu takiben, 7. ve 15. günde her gruptan 4'er adet ratın anestezi altında nekropsisi yapılarak histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için kan ve yara bölgesi doku örnekleri alındı. Şekil 1 (A-C)'de yara oluşturulma öncesi ratın sırt derisinin tıraşlanmış ve dezenfekte edilmiş hali, postoperatif tedavi sonrası görünümü ve yara boyutunun ölçülmesi sunulmuştur.



**Şekil 1 (A-C):** Deneme sürecinde ratların görünümü, A. Yara oluşturulma öncesi, B. Postoperatif tedavi sonrası, C. Yara boyutunun ölçülmesi.

**Figure 1 (A-C):** The appearance of rats in the process of the experiment, A. Before wound creation, B. After postoperative treatment, C. Wound size measurement.

### Histopatolojik inceleme

Histopatolojik inceleme için yara bölgesinden alınan deri dokusu örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 72 saat fikse edildi. Rutin takip işlemi kapsamında; doku örnekleri alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyonları; ksilol serilerinden geçirilerek şeffaflandırılmaları sağlandı ve daha sonra parafinde bloklandı. Bu bloklardan mikrotomda (Leica RM 2135) 4µm kalınlığında alınan kesitler Hematoksilin-Eozin (H.E.) boyama

teknikğine göre boyanarak ışık mikroskopunda (Nikon 80i-DS-R12) incelendi.

### İmmunohistokimyasal inceleme

Glutasyon peroksidaz-1 (GPx1) aktivitesini belirlemek amacıyla 4µm kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı ve anti-GPx1 (abcam-ab22604) primer antikoru ile üretici firma tarafından tarif edilen standart Avidin-Biotin Peroksidaz metodu 3,3-Diamino-benzidine (DAB) kromojeni kullanılarak immunohistokimyasal olarak boyandı. İmmunohistokimyasal boyama yoğunluğu; boyanma yoksa (-), zayıf boyanma (+1), orta boyanma (+2) ve güçlü boyanma (+3) olacak şekilde ışık mikroskopunda (Nikon 80i-DS-R12) incelenerek semikantitatif olarak değerlendirildi.

### Biyokimyasal inceleme

Biyokimya testleri (ALT, AST, Total protein, Kreatinin, Fe, K, Ca, Mg) için gerekli olan kan enjektörler yardımıyla ratların kalbinden alınarak biyokimya tüplerine aktarıldı. Tüpler dk/10000 devirde serumu ayrıştırılarak laboratuvarında sonuçları analiz edildi. Ayrıca yara bölgesinden alınan deri doku örneğinde de oksidatif stres göstergesi olan Malondialdehid (MDA), Glutasyon (GSH) ve Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerine bakıldı.

### İstatistiksel analiz

Biyokimyasal analiz sonuçları, merkezi eğilim ve yayılım ölçülerinden olan ortalama ve standart sapma ( $X \pm SD$ ) ile değerlendirildi. Grup ortalamaları ve yara boyutları arasındaki farkın anlamlılığı ise tek taraflı Varyans Analizi ile (Oneway ANOVA) test edildi. Tüm istatistik analizlerde SPSS-15 paket programından yararlanıldı.

## BULGULAR

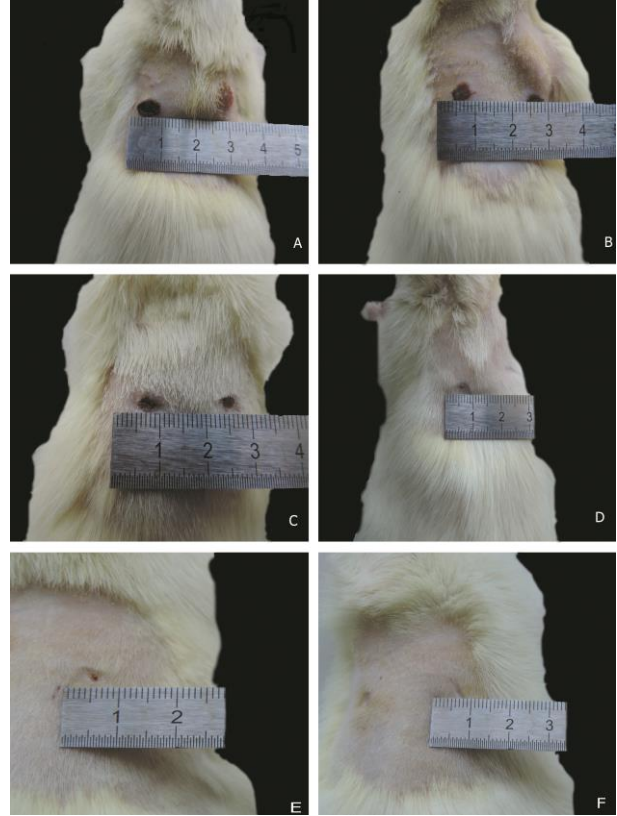
### Makroskobik bulgular

Çalışmanın 4. ve 7. gününde yapılan makroskobik incelemelerde K grubuna ait ratların yara bölgelerinde diğer tedavi gruplarına göre kısmen düzensiz bir kabuklanma ile yaranın değişik bölgelerinde eksudat gözlemlendi. CP ve M gruplarında kabuklanma daha düzenliydi. M grubuyla karşılaştırıldığında, CP grubunda kabuklanma daha düzenli bir görünüme sahip olup kabuklanma safhası hemen hemen tamamlanmıştı. 12. günde K grubundaki iyileşmenin CP ve M gruplarına göre yavaşlamaya başladığı gözlemlendi. K grubunda oluşan kabukta çatlaklar görüldü ve bu çatlaklar arasından seröz bir eksudatın dışarıya sızdığı tespit edildi. 15. günde CP grubunda yara iyileşmesinin büyük oranda tamamlandığı ve yara izlerinin kaybolduğu gözlenirken, K grubundaki ratların yara bölgelerinde iyileşmenin biraz geciktiği, yara izlerinin tamamen kapanmadığı görüldü. Her üç grupta da enfeksiyona rastlanmadı. Şekil 2 (A-F)'de gruplara göre yara boyutunun 7. ve 15. günlerdeki makroskobik görünümü sunulmuştur.

### Histopatolojik bulgular

7. günde K grubu ratların yara bölgesi epidermisinde epitel rejenerasyonu hiç gelişmemiş olup anjiogenezis yetersizdi. Ayrıca yara bölgesinde yangısal hücrelerden zengin bir eksudat ve ödemle birlikte gevşek bir bağ doku hücre proliferasyonu gözlemlendi. 7. günde M ve CP grubu ratların yara dokuları kesitlerinde K grubuna göre epidermiste, epitelizasyonun belirgin olarak ilerlemiş olması dikkat çekti. Dermiste ise belirgin bir anjiogenezis ve bazı kapıllar damarlarda hiperemiyle birlikte kısmen lenfoplazmasiter ve nötrofil lökositlerin oluşturduğu inflamatuvar hücre infiltrasyonunu içeren gevşek bağ doku proliferasyonu gözlemlendi. 15. günde K grubu ratların ensizyon bölgesindeki epidermiste rejenerasyon tamamlanmış olup yara bölgesinin içbükey görünüme sahip olduğu, dermiste ise kapıllar damar ve bağdoku proliferasyonu meydana geldiği gözlemlendi.

Granülasyon dokusu içerisinde yaygın bir şekilde lenfoplazmasiter hücre infiltrasyonu vardı. 15. günde M ve CP grubu ratların ensizyon bölgesinde epidermiste rejenerasyon tamamlanmıştı. Stratum bazale belirgin olarak izlendi. Ayrıca rejenerasyon epidermis girintili-cıkıntılı bir yüzeye sahip ve yara kenarlarıyla hemen hemen aynı seviyeye gelmişti. Dermiste ise damarlardan fakir ancak olgun bağdoku hücrelerinden zengin granülasyon dokusu görüldü. Ödem kaybolmuş ve granülasyon dokusu içerisinde de tek tük lenfoplazmasiter hücre infiltrasyonu vardı. Şekil 3 (A-F)'de gruplara göre yara iyileşmesinin 7. ve 15. günlerdeki mikroskobik görünümü sunulmuştur.



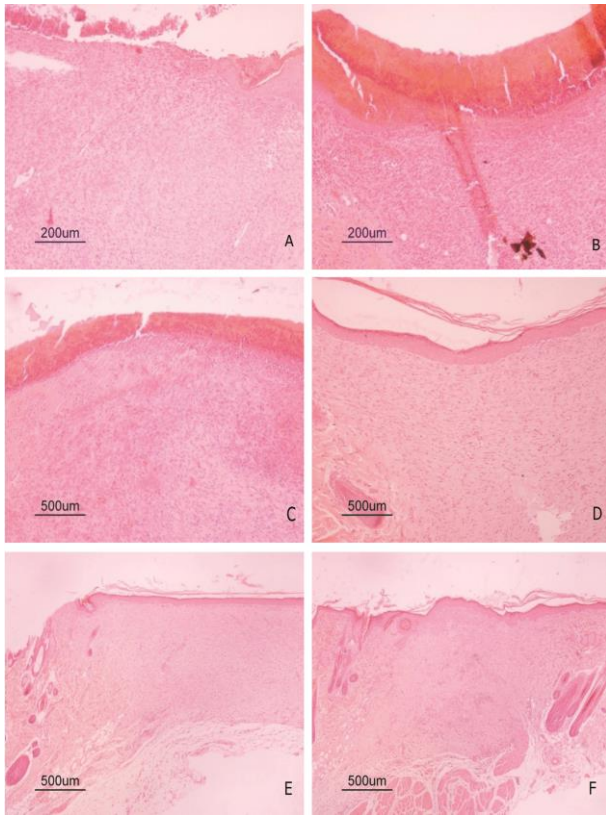
**Şekil 2 (A-F):** Yara boyutunun 7. ve 15. günlerdeki makroskobik görünümü. A. K grubu 7. gün, B. M grubu 7. gün, C. CP grubu 7. gün, D. K grubu 15. gün, E. M grubu 15. gün, F. CP grubu 15. gün.

**Figure 2 (A-F):** Macroscopic appearance of wound size 7th and 15th days, A. Group K 7th day, B. Group M 7th day, C. Group CP 7th day, D. Group K 15th day, E. Group M 15th day, Group CP 15th day.

### İmmunohistokimyasal bulgular

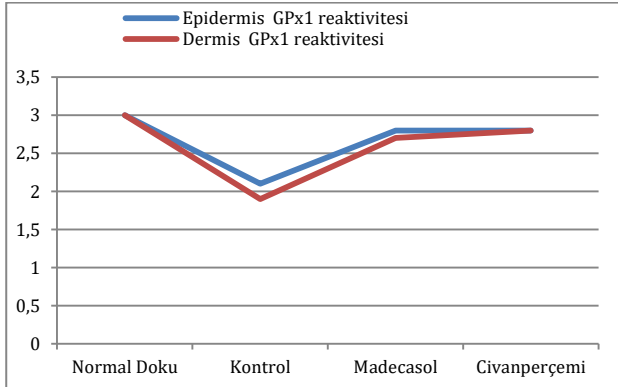
Deri dokusunun GPx1 primer antikoru ile immunohistokimyasal olarak yapılan incelemelerinde normal sağlam deriden alınan doku örneği ile CP ve M uygulanan grupta epidermis ve dermis tabakasında (+3) düzeyine yakın güçlü immunreaktivite görülürken, K grubunda (+2) düzeyde hafif-orta GPx1 reaktivitesi gözlemlendi. CP'nin oksidatif stres üzerine GPx1 immunreaktivitesinin mikroskobik görünümü, gruplara göre boyanma dereceleri ve skor ortalamaları sırasıyla Şekil 4 (A-D), Tablo 1 ve Şekil 5'te sunulmuştur.

**Biyokimyasal bulgular:** Lipid peroksidasyon (MDA) ve antioksidan savunma sistemi enzimlerinden GSH ve SOD düzeylerine ait bulgular ile bazı biyokimyasal parametrelere ait bulgular (ALT, AST, Total protein Kreatinin, Fe, K, Ca, Mg) sırası ile Tablo 2 ve Tablo 3'te sunulmuş olup, diğer grupların kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık dereceleri verilmiştir.



**Şekil 3 (A-F):** Yara iyileşmesinin 7. ve 15. günlerdeki mikroskopik görünümü (H.E.) A. K grubu 7. gün, B. M grubu 7. gün, C. CP grubu 7. gün, D. K grubu 15. gün, E. M grubu 15. gün, F. CP grubu 15. gün.

**Figure 3 (A-F):** Microscopic appearance of wound size 7th and 15th days, A. Group K 7th day, B. Group M 7th day, C. Group CP 7th day, D. Group K 15th day, E. Group M 15th day, Group CP 15th day.



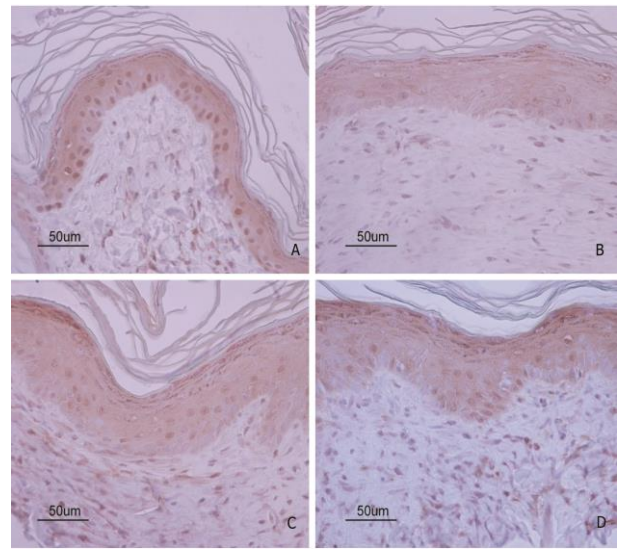
**Şekil 5.** GPx1 immunreaktivite skorları

**Figure 5.** GPx1 immunoreactivity scores

**Tablo 1.** GPx1 immunreaktivitesinin gruplara göre dağılımı.

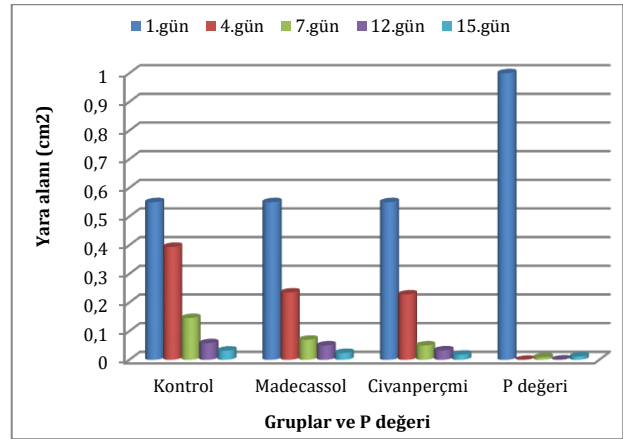
**Table 1.** Distribution of GPx1 immunoreactivity according to groups.

Parametreler	Normal Doku	Kontrol	Madecassol	Civanperçemi
Epidermis İmmunohistokimyasal GPx1 reaktivitesi	+3.0±0.1	+2.1±0.15	+2.8±0.16	+2.8±0.16
Dermis İmmunohistokimyasal GPx1 reaktivitesi	+3.0±0.16	+1.9±0.18	+2.7±0.13	+2.8±0.14



**Şekil 4 (A-D):** Glutasyon peroksidaz-1 (GPx1) immunreaktivitesi (Avidin-Biotin Peroksidase metod). A. Sağlam deri dokusunda güçlü boyanma, B. K grubu hafif-orta boyanma, C. M grubu güçlü boyanma, D. CP grubu güçlü boyanma.

**Figure 4 (A-D):** Glutathione peroxidase-1 (GPx1) immunoreactivity (Avidin-Biotin Peroxidase method), A. Strong staining in normal skin tissue, B. Light-medium staining in Group K, C. Strong staining in Group M, D. Strong staining in Group CP.



**Şekil 6.** Yara boyutlarının 1, 4, 7, 12 ve 15. günlerde gruplara göre karşılaştırılması.

**Figure 6.** Comparison of wound sizes according to groups in 1, 4, 7, 12 and 15 days.

**Tablo 2.** Gruplara göre lipid peroksidasyon ve antioksidan savunma sistemi düzeyleri.**Table 2.** Lipid peroxidation and antioxidant defense system levels according to the groups.

Parametre	Gruplar		
	Kontrol (X± SD)	Madecassol (X± SD)	Civanperçemi (X± SD)
MDA	117.74±26.74	98.38±5.50 <sup>a</sup>	102.42±26,62 <sup>a</sup>
GSH	2.64±0.26	3.75±0.90 <sup>a</sup>	3.63±0,80 <sup>a</sup>
SOD	2208.68±12.61	2266.22±20.33 <sup>a</sup>	2245.62±22,81 <sup>a</sup>

a: Kontrol grubuna göre fark istatistiksel açıdan anlamlıdır (P≤0.05).

**Tablo 3.** Gruplar arasındaki bazı biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması.**Table 3.** Comparison of some biochemical parameters between groups.

Testler	Gruplar			P değeri
	Kontrol (n=8)	Madecassol (n=8)	Civanperçemi (n=8)	
ALT	35.50±1.65	43.17±0.95	30.50±3.34	(P≤0.05)
AST	235.84±41.65	132.50±13.92	108.13±5.79	(P≤0.05)
Mg	2.74±0.17	2.91±0.22	2.22±0.07	(P>0.05)
Fe	207.50±9.84	194.50±21.68	127.75±5.42	(P≤0.05)
K	5.67±0.25	5.72±0.22	5.29±0.17	(P>0.05)
TP	4.32±0.20	6.50±0.23	5.83±0.12	(P≤0.05)
Ca	9.20±0.19	9.40±0.18	8.99±0.24	(P>0.05)
Kre	0.45±0.16	0.48±0.10	0.29±0.02	(P≤0.05)

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Hipokrates'in döneminden beri sağlık bakımından önemli bir yere sahip olan kesik, yara, yanık gibi dermatolojik rahatsızlıkların tedavisi amacıyla halk arasında geleneksel bitkisel yöntemlere sıkça başvurulmaktadır (Jain ve ark. 2006; Rodrigues ve ark. 2012). Yapılan bu çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan yara modelinde halk arasında kullanılan Civanperçemi (*Achillea millefolium*) bitkisinin yara iyileşmesi ve oksidatif stres üzerine etkisi histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle araştırıldı.

Düzenli ve hızlı bir şekilde granülasyon dokusunun gelişimi yara iyileşmesi sürecinde önemli bir göstergedir (Kirsner ve Eaglsterin 1993). Açık yara iyileşmesinde granülasyon dokusu gelişimi belirgin olup yaralanmadan sonraki 72-96 saatlerde başladığı tespit edilmiştir (Heinze ve Clem 1998). Granülasyon dokusu; kollajen, fibronektin ve hyaluronik asidin hücre dışı matriksi içine gömülmesi, angiogenesis ile fibroblast ve yangı hücrelerinin birleşiminden oluşur (Kirsner ve Eaglsterin 1993; Calvin 1998). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda da ensizyon yaralarının oluşumundan 3-4 gün sonra yara içindeki pıhtının fibrin ipliklerinin yara yüzeyine vertikal olarak yöneldiği, yaklaşık 6 gün sonra ise, ensizyonel yara arasındaki kapillarlar, fibroblastlar ve kollajen lifleri yara yüzeyine horizontal bir yapı olarak yara dudaklarını birbirine yaklaştırdığı gözlenmiştir (Swaim ve Henderson 1990). Yapılan bu çalışmada ilk 4 günde tüm gruplarda yara kabuğunun yara kenarlarından ortaya doğru gelişmeye başladığı fakat hala geniş bir ülser bölgesinin olduğu, K grubuna göre M ve CP grubunda 7. günde bu açıklığın daha belirgin bir şekilde yara kabuğu ile kapatılmış ve yara alanının azalmış olduğu tespit edilmiştir. 15. günde ise M ve CP grubunda yara bölgesinde epitelizasyonun tamamen gelişip yara izlerinin neredeyse kaybolduğu ancak K grubunda epitelizasyonun büyük oranda gerçekleştiği görülmüşüne rağmen yara bölgesindeki yara izlerinin mevcut olduğu görüldü. CP grubunda K grubundan daha belirgin bir farkın

gözlemlenmesi bu bitkinin M pomadı gibi yara iyileşmesinde etkin olduğunu düşündürmüştür.

Epitelizasyon; yaralanma sonrası derinin yeniden bariyer özelliğini kazanması amacıyla epitel hücrelerinin göç ederek çoğalmasını, organize ve keratinize olmasını kapsayan bir süreçtir (Calvin 1998). Bazal membranın hasar gördüğü tam kalınlıktaki açık yaralarda epitelizasyon için hücreler yalnızca yara kenarlarındaki sağlam epitel hücrelerinden köken alır (Calvin 1998). Yaranın oluşmasından sonraki ilk birkaç dakikada meydana gelen pıhtı, epitelizasyona geçici bir engel teşkil eder (Engin 2004). Epitelizasyon, serbest yara kenarları tarafından başlayarak ilerler ve başka bir yönden gelen hücrelerle karşılaşmaya kadar bu ilerleme devam eder (Theoret 2004). Yara kenarlarının dikiş ile karşı karşıya getirildiği durumlarda epitelizasyon çok kısa sürede başlar (Hedlund 2002) ve 24-48 saat süre zarfında yaranın iki kenarı arasında periferden merkeze doğru tek katlı epitel hücrelerden oluşan bir köprü şekillenir. Bu köprü, dış tehlikelere karşı yaranın oluşturduğu ilk koruma engeli vazifesi görür (Regan ve Barbul 1994). Yara kabuğu oluşmuşsa, epitelizasyon bu kabuğun altında şekillenmeye devam eder (Stashak 1991). Epitelizasyon tamamlanması yara iyileşmiş olarak kabul edilir. Yara iyileşmesi sürecinde son faz maturasyon evresidir. Bu faz, granülasyon dokusunun skar dokusuna dönüşümü (Theoret 2004) ile ekstrasellüler matriksin olgunlaşmasını kapsayan yara iyileşme sürecinin en uzun dönemidir (Kirsner ve Eaglsterin 1993; Rigler 1997). Maturasyon evresinde, yara bölgesinde fibroblast sayısında azalma, kollajen üretiminde dengeye ulaşma, epitelizasyonda tamamlanma (Stashak 1991; Heinze ve Clem 1998), yara renginde soluklaşma, yara gerilim direncinde artma, skar dokusunun hacminde azalma ve az hücreli ve damarlı yapıya sahip bir skar dokusu oluşumu görülür (Rigler 1997; Heinze ve Clem 1998). Yapılan bu çalışmada denemenin 7. gününde kesilen ratların histopatolojik incelenmesinde tüm grupların yara alanında yangısal hücre ve fibroblast artışı gözlenirken, kollajenin henüz demetler halinde gelişmediği görülmüştür. Ayrıca M ve CP grubunda kontrol grubuna göre yara

bölgesinde neovaskularizasyon ve daha belirgin ve düzenli bir kabuk oluşumu gözlemlendi. 15 günlük deneme sonunda K grubunda epitelizasyonun şekillendiği görülmekle birlikte tedavi gruplarına göre vasküler yapının henüz kaybolmadığı, yara bölgesinde yangı hücreleriyle birlikte fibroblasttan zengin fibrosit ve kollajen ipliklerinden fakir gevşek bir bağ dokunun oluştuğu belirlendi. Tedavi gruplarında ise epitelizasyon tamamen şekillenmiş ve yara bölgesinde fibrosit ve kollajen ipliklerinden zengin, K grubuna göre daha olgun bir bağ doku oluştuğu görüldü. Bu sonuçlara göre Civanperçeminin yara bölgesinde Madecassol gibi fibroblastik aktiviteyi ve kollajen oluşumunu arttırdığı kanaatine varılmıştır.

Yara bölgesinde serbest radikallerin şekillenmesi ya da oksidanlar gibi etmenler, doku hasarına neden olarak iyileşme olayını bozabilmektedir. Bu etmenlerden hidroksil radikali ve O<sup>-</sup> anyonu, kollajen yapısında bulunan hidroksiprolin ve prolini parçalayarak fibroblastların adezyon, proliferasyon ve canlılığını değiştirebilmektedir. Aynı zamanda hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de hem keratinositlerin göçünü inhibe eder hem de epidermal büyüme faktörü (EGF) sinyal iletimini engelleyerek fibroblastlarda önemli hasarlara neden olur (Yager ve ark. 2007). Yüksek düzeylerde oluşan ROT, sitotoksik etkiye sebep olacağı için yara iyileşmesini geciktirmektedir. Bu nedenle yaraların iyileşmesinde ROT'un elimine edilmesi gereklidir (Aksoy ve Özakınar 2014). Serbest radikallere karşı doğal antioksidan savunma sistemlerinden biri olan glutasyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9), indirgenmiş glutasyonu kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya hidroperoksitlerin organik su veya alkollere indirgenmesini katalize eder (Herbette ve ark. 2007). Bu şekilde, lipid peroksidasyonunu önler ve böylece hücre zarlarını oksidatif hasardan korur (Czuczejko ve ark. 2003). Memelilerde antioksidan savunma sistemi için önemli bir komponent olan GPx, yara iyileşmesinin yangısal döneminde yoğun bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Bu sayede yoğun oksidatif stres durumlarda ROT ürünlerine karşı direnç oluşturarak keratinositlerin proliferasyonunu uyarılmaktadır (Munz ve ark. 1997). Yapılan bir çalışmada (Steiling ve ark. 1999), yara dokusunda oksidatif stresle birlikte GPx düzeyinde de artış görüldüğü bildirilmiştir. CP bitkisinin içerdiği bileşiklerden biri olan flavonoidler, glikolitik enzimleri veya protein sentezi gibi çeşitli metabolik ara yolları etkileyerek güçlü sitotoksik ve radikal süpürücü etkiler gösterdiği ve bu antioksidatif etkiyle serbest radikal hasarlarına karşı hücreleri korudukları gösterilmiştir (Gálvez ve ark. 2013). Yapılan bu çalışmada normal sağlam dokuya benzer şekilde yara bölgesinde CP ve M uygulaması yapılmış dokuların GPx ile immunohistokimyasal olarak boyanmasında K grubuna göre immunreaktivitenin güçlü çıkması, iyileşme sürecinde antioksidan enzim ekspresyonunun artan oksidatif strese uyumu olarak yorumlanmıştır.

Yaralanmalarda, serbest radikallerin artması nedeniyle oluşan lipid peroksidasyona bağlı olarak hem yara bölgesinde hem de uzak doku ve organlarda hasar ve fonksiyonel bozukluklar meydana gelebilir (Çavdar ve ark. 1997). Bu durum oksidatif stres olarak bilinmektedir. Oksidatif stresin, yara iyileşmesi sırasında görülen tromboz oluşumunun kontrolünde oldukça büyük bir öneme sahip olduğu bildirilmektedir. Yaralanmalarda oluşan damar hasarı endotelde granüllerin redoksa duyarlı mekanizmaları vasıtasıyla yangı ve pıhtılaşmayı başlatan mediyatör maddelerin kana verilmesini sağlar. Yaralı dokunun, oksidatif metabolizma aracılığıyla iyileşme sürecini hızlandırdığı düşünülmektedir (Sen ve Roy 2008; Özkorkmaz ve Özyay 2009). Kan dolaşımı veya herhangi bir metabolik sorunu olmayan bir dokuda meydana gelebilecek yara, kendi aktif sürecinde kısa sürede iyileşir. Ancak kan akımındaki

yetersizlik görülmesi, iskeminin derecesine bağlı olarak kronik yaraların oluşmasına sebep olabilir. Herhangi bir nedene bağlı iskemi oluşumu, dokuda hasara neden olan ROT'ları meydana getirir (Adamson ve ark. 1996; Mustoe 2004). İskemi nedeniyle oluşan ROT'lar dokuda protein sentezinin azalmasına, lökosit hücre infiltrasyonu ve metalloproteinaz seviyesinde artmaya sebep olmaktadır. İskemi nedeniyle oluşan bu patolojik değişiklikler, bozulmuş ekstrasellüler matris yapısını ve uzamış yangısal yanıt nedeni ile yara iyileşmesini normal seyrinden çıkarır (Saarialho Kere 1992). Yaralı dokunun oksijen ihtiyacı artmasına karşın, damarların hasar görmesi sonucu yarada hipoksi meydana gelir. Yaradaki hipoksi iyileşmeyi geciktirir. Yapılan bu çalışmada oksidatif stresin biyokimyasal olarak değerlendirilmesinde, yara oluşturulduktan sonraki 15. günde K grubuna göre M ve CP verilen gruplarda lipid peroksidasyon (MDA) ve antioksidanların (GSH ve SOD) istatistiki açıdan daha yüksek bulunması yara iyileşme sürecine olumlu katkıda bulunarak iyileşme sürecinin tamamlandığı şeklinde düşünülmüştür.

Yara iyileşmesinin değerlendirmesinde yara alanının uzunluğu ve genişliğinin ölçülmesi de önemli bir değerlendirme etmenidir. (Flanagan 1994; Grey ve ark. 2006). İyileşmiş yara durumunun saptanmasında, yaranın yüzey alanı ultrason, manyetik rezonans ya da stereofotometri gibi yöntemler kullanılarak ölçülebilmektedir. Klinik olarak ise, yara cetveli ile yapılan ölçümler ve yara boyutlarının asetat üzerine aktarılması tekniği sıklıkla kullanılmaktadır. Yara alanı ölçüm cetveli kullanılarak yapılan ölçümler düzensiz ve çok geniş olan yaralarda çok da güvenilir bir yöntem olmadığı bazı araştırmacılar (van Rijswijk ve Braden 1999) tarafından bildirilmesine rağmen, bu yöntem bazı araştırmacılarca (Thomas ve Wysocki 1990) en doğru yara ölçme yöntemi olarak görülmektedir. Bu yöntemde yaranın kenar hatları milimetre ya da santimetre karelik şeffaf bir asetat üzerine çizilir ve çizilen alan içerisinde kalan kareler ya manuel olarak sayılır ya da dijital planimetriler kullanılarak yara alanı hesaplanır (Güneş 2007). Yapılan bu çalışmada yara iyileşmesinde önemli bir gösterge olan yara yüzey alanı değerlerinin M ve CP gruplarında K grubundan anlamlı olarak daha az olduğu tespit edilmiştir. Tedavi amacıyla topikal olarak kullanılan civanperçeminin belirgin olarak yara iyileşmesini hızlandırdığı görülmüştür.

Sonuç olarak; binlerce yıldır tüm dünyada insanlar tarafından tıbbi bitkiler arasında yaygın bir şekilde kullanılmakta olan Civanperçemi bitkisinin; kollajen sentezine katkıda bulunarak iyileşmeyi hızlandırdığı histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal bulgularla gösterilmiştir. Bu bitkinin klinik kullanımını için yeni ilaç geliştirme çalışmaları kapsamında ilaç ve kozmetik imalatında değerlendirilmesinin gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2016-5217 nolu proje ile desteklenmiştir. Biyokimyasal analizler için Prof. Dr. İsmail ÇELİK'e teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Adamson B, Schwarz D, Klugston P, GilmonR, Perry L, Fisher J, Rees R (1996). Oxidant stress: the role of the glutathione redox cycle in skin preconditioning. *J Surg Res*, 62, 159-164.
- Adetutu, A, Morgan, W, Corcoran O (2011). Ethnopharmacological survey and in vitro evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. *J Ethnopharmacol*, 137, 50-56.

- Agarwal JP, Ogilvie M (2005).** Vacuum-assisted closure for sternal wounds: a first-line therapeutic management approach. *Plast Reconstr Surg*, 116, 4, 1035-1040.
- Aksay H, Özakpınar ÖB. (2014).** Yara iyileşmesi ve oksidatif stres. *Marmara Pharm J*, 18, 153-158.
- Aydın S, Çağlıküleki M, Çolak T, Dirlik M, Öcal K, Akça T (2002).** Washington Cerrahi El Kitabı, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Calvin M (1998).** Cutaneous wound healing. *Wounds*, 10, 1, 12-32.
- Candan İ (2003).** Medikal Tedavi. Cilt 1. Antıp Yayınları. Ankara. 361-365.
- Czuczajko J, Zachara BA, Staubach-Topczewska E, Halota W, Kedziora J (2003).** Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. *Acta Biochim Pol*, 50, 1147-1154.
- Çavdar C, Sifil, A, Çamsarı, T (1997).** Reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma. *Turk Neph Dial Transpl*, 3, 92-95.
- Duarte T, Cooke M, Jones G (2009).** Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells. *Adv Free Radical Bio*, 46, 78-87.
- Engin A (2004).** Yara iyileşmesi. In: *Temel Cerrahi*. Edited by Sayek, İ., 3. Baskı, pp: 266-277, Güneş Kitabevi, Ankara.
- Flanagan M (1994).** Wound care. Assessment criteria. *Nurs Times*, 90, (45):77-9-15
- Gálvez M, Cordero CM, Lázaro, ML, Cortés F, Ayuso, MJ (2003).** Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*, 88, 125-130.
- Grey JE, Enoch S, Harding KG (2006).** Wound assessment. *BMJ*, 4, 332 (7536), 285-8.
- Güneş ÜY (2007).** Kronik yaraların değerlendirilmesi. *CÜ Hemşirelik Yüksekokulu Derg*, 11 (3), 38-44.
- Hedlund CS (2002).** Surgery of the integumentary system. In: *Small Animal Surgery*, 2th Edition, Edited by Fossum, T.W. Mosby, Printed in China, pp: 134-137
- Heinze CD, Clem MF (1988).** Wound healing and tissue repair. In: *Textbook of Large Animal Surgery*. 2nd Ed., Edited by Oehme, F.W., pp:141-153 Williams & Wilkins USA.
- Herbette S, Roedel-Drevet P, Drevet JR (2007).** Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J*, 274, 2163-2180.
- Jain V, Prasad V, Pandey RS (2006).** Wound healing activity of *Desmodium gangeticum* in Different Wound Model. *J Plant Sci*, 1(3), 247-253.
- Jurjus, A, Atiyeh BS, Abdallah IM, Jurjus RA, Hayek SN, Jaoude MA, Gerges A, Tohme RA (2007).** Pharmacological modulation of wound healing in experimental burns. *Burns*, 33, 892-907.
- Kapan M, Aslanmirza MY, Karip AB, Bozkurt Y, Evsen MS, Sak E, Öngören AU (2008).** Lokal fenitoin ve üre uygulamasının yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması. *Yeni Tıp Derg*, 25, 209-212.
- Kirsner, RS, Eaglsterin WH (1993).** The wound healing process. *Dermatol Clin*, 11, 4, 629-640
- Lakshmi T, Geetha R, Roy A, Aravind Kumar S (2011).** Yarrow (*Achillea Millefolium* Linn) A Herbal Medicinal Plant with Broad Therapeutic Use-A Review. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 9, 136-144.
- Munz B, Frank S, Hübner G, Olsen E, Werner S (1997).** A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair. *Biochem J*, 326, 579-85.
- Murnigsih T, Subeki H, Matsuura K, Takahashi M, Yamasaki O, Yamato Y, Maede K, Katakura M, Suzuki S, Kobayashi C, Yoshihara T (2005).** Evaluation of the inhibitory activities of the extracts of Indonesian traditional medicinal plants against *Plasmodium falciparum* and *Babesia gibsoni*. *J Vet Med Sci*, 67, 829-831.
- Mustoe T (2004).** Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg*, 187, 65-70.
- Özkorkmaz E, Özay Y (2009).** Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinde kullanılan bazı bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2, 63-67.
- Özler M, Şimşek K, Topal T, Öter Ş, Korkmaz A (2010).** Pinealektomili ratlarda yara iyileşmesi. *Gulhane Med J*, 52, 181-184.
- Passalacqua N, Guarrera P, De Fine G (2007).** Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia*, 78: 52-68.
- Pires JM, Mendes FR, Negri G, Duarte-Almeida JM, Carlini EA (2009).** Anti nociceptive peripheral effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L, both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. *Phytother Res*, 23, 212-219.
- Regan MC, Barbul A (1994).** The cellular biology of wound healing. In: *Wound Healing*. Edited by Schlag, G., Redl, H. Vol:1 pp: 3-17 Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Printed in Germany.
- Rigler DJ (1997).** Inflammation and repair. In *Veterinary Pathology*, 6nd Ed., Edited by Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W., pp: 150-157, Williams & Wilkins, Pennsylvania.
- Rodrigues HG, Vinolo MA, Magdalon J, Vitzel K, Nachbar RT, Pessoa AF, dos Santos MF, Hatanaka E, Calder PC, Curi R (2012).** Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. *J Invest Dermatol*, 132, 1, 208-215.
- Saarialho-Kere UK (1992).** Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res*, 290, 47-54.
- Sen CK, Roy S (2008).** Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta*, 1780, 1348-1361.
- Souza de P, Gasparotto Jr. A, Crestania S, Stefanello MEA, Marques MCA, Silva-Santos JE, Kassuya CAL (2011).** Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. *Phytomedicine*, 18, 819-825.
- Stashak TS (1991).** Principles of wound healing. In: *Equine Wound Management*, pp: 1-15, Lea & Febiger, Malvern, Pennsylvania.
- Steiling H, Munz B, Werner S, Brauchle M (1999).** Different types of ROS scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*, 247, 484-94.
- Stojanović G, Radulović N, Hashimoto T, Palić R (2005).** In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species, The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. *J Ethnopharmacol*, 101, 185-190.
- Swaim SF, Henderson RA (1990).** Wound healing. In: *Small Animal Wound Management*. pp: 1-8, Lea & Febiger, Malvern, Pennsylvania.
- Theoret CL (2004).** Update on wound repair. *Clin Tech Equine Pract*, 3, 110-122.
- Thomas AC, Wysocki AB (1990)** The healing wound: a comparison of three clinically useful methods of measurement. *Decubitus*, 3, 1, 18-20, 24-5.
- Van Rijswijk L, Braden BJ (1999)** Pressure ulcer patient and wound assessment: an AHCPR clinical practice guideline update. *Ostomy Wound Manage*, 45:56S-67S; quiz 68S-69S.
- Yaeesh S, Jamal Q, Khan AU, Gilani AH (2006).** Studies on hepatoprotective, anti-spasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium*. *Phytother Res*, 20, 546-551.
- Yager DR, Kulina RA, Gilman LA (2007).** Wound fluids: a window into the wound environment? *Int J Low Extrem Wounds*, 6, 4, 262-272.