T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MORUS NİGRA L. MEYVE VE YAPRAK EKSTRELERİNDEN GREEN SENTEZ YÖNTEMİYLE SENTEZLENEN ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN AFTÖZ STOMATİTLER ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

MİRAY EGE

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MAHFUZ ELMASTAŞ

FARMAKOGNOZİ ANA BİLİM DALI
FİTOTERAPİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
KASIM/2022

İTHAF

“Bu çalışmayı biricik çocuklarım Emir Aras ve Gülmina’ya ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında tecrübe ve bilgileriyle yol gösteren, desteğini her zaman hissettiğim çok değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a

Tez çalışmamızda kullanılacak jellerin hazırlanmasında ve analizlerinde bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR ve Dr. Öğr. Üyesi Emre Şefik ÇAĞLAR'a

Laboratuvar çalışmalarında yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Duygu MISIRLI'ya; histolojik analizlerin değerlendirilmesinde yardımcı olan Dr. Halime Tuğba CANBAZ'a ve nanopartiküllerin karakterizasyonunda yardımcı olan Dr. Cengiz TEMİZ'e

Bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan Adıyaman Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı sayın Prof. Dr. Murat KOCA ve Dekan Yardımcıları Doç. Dr. Ali Serol ERTÜRK ile Dr. Öğr. Üyesi Görkem Deniz SÖNMEZ'e, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'ndaki değerli hocam Prof. Dr. Ömer KILIÇ'a

Tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen, akıl veren, yol gösteren çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Erkan YILMAZ ve Doç. Dr. Mahmut KOPARAL'a

Bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Doç. Dr. Esra BOZGEYİK ve Dr. İbrahim BOZGEYİK'e

Canım kız kardeşim Medina Nilay BEZİRCİ başta olmak üzere sevgi ve destekleriyle yanımda olan aileme ve eşimin ailesine,

Hayata dair ihtiyaç duyduğum her anda, desteğini ve sevgisini yanımda hissettiğim, bilgi ve donanımıyla her zaman yol gösteren sevgili eşim Doç. Dr. Bilal EGE'ye sonsuz teşekkür ederim

Ayrıca 2020/091 Proje No ile bu araştırmanın gerçekleşmesine maddi katkı sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ xi
ŞEKİLLER LİSTESİ xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR xvi
ÖZET xx
ABSTRACT xxii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. REKÜRRENT AFTÖZ STOMATİT 5
2.1.1. Rekürrent Aftöz Stomatitlerin Özellikleri 5
2.1.1.1. Sınıflandırma 5
2.1.1.2. Rekürrent aftöz stomatitin evreleri 6
2.1.1.3. Rekürrent aftöz stomatitin etiyolojisi 7
2.1.1.4. Rekürrent aftöz ülserler ile ilişkili sistemik hastalıklar 14
2.1.1.5. Rekürrent aftöz stomatitin immunopatogenezi 15
2.1.2. Rekürrent Aftöz Stomatitin Tedavisi 16
2.1.2.1. Topikal tedavi 17
2.1.2.2. Sistemik tedavi 19
2.2. KARADUT-*MORUS NİGRA* L. 21
2.2.1. Türkiye'de Geleneksel Halk Tıbbında Kullanımı 22
2.2.2. Fitokimyasal Bileşimi 22
2.2.3. *Morus nigra* L. Farmakolojik ve Biyolojik Etkileri 24
2.2.3.1. Antioksidan aktivite 24
2.2.3.2. Antienflamatuar aktivite 25
2.2.3.3. Antinosiseptif etki 26
2.2.3.4. Antimikrobiyal aktivite 27
2.2.3.5. Antikanser aktivite 28
2.2.3.6. Antidiyabetik aktivite 29
2.2.3.7. Antihiperlipidemik aktivite 31
2.2.3.8. Organ koruyucu aktivite 32
2.2.3.9. Antimelanojenik aktivite 36
2.2.3.10. Yara iyileştirici aktivite 37

2.2.4. *Morus nigra* L. Toksikolojisi 38
2.3. GREEN SENTEZ (YEŞİL SENTEZ) ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLER. ... 38
2.3.1. Çinko Oksit Nanopartikül Sentez Yöntemleri 41
2.3.1.1. Konvansiyonel yöntemler 41
2.3.1.2. Mikroakışkan reaktör tabanlı nanopartikül sentezi (konvansiyonel olmayan yöntem) 45
2.3.2. Nanopartiküllerin Yeşil Sentezini Etkileyen Faktörler 46
2.3.3. Fizikokimyasal Karakterizasyon 47
2.3.3.1. Görünüm, kristallik, parçacık boyutu, morfoloji ve gözeneklilik 47
2.3.3.2. Karakterizasyon araçları 47
2.3.4. Çinko Oksit Nanopartiküllerin Farmakolojik ve Biyolojik Etkileri 50
2.3.4.1. Antimikrobiyal aktivite 51
2.3.4.2. Antikanser aktivitesi 52
2.3.4.3. Antienflamatuar aktivite 53
2.3.4.4. Yara iyileştirici etki 53
2.3.4.5. Antidiyabetik aktivite 54
2.3.4.6. Fotokatalitik aktivite 54
2.4. MUKOADEZİF SİSTEMLER 55
2.4.1. Mukoadezyon Mekanizmaları 56
2.4.2. Mukoadezyon Teorileri 56
2.4.2.1. Islanma teorisi 57
2.4.2.2. Difüzyon teorisi 57
2.4.2.3. Kırılma teorisi 57
2.4.2.4. Elektronik teori 58
2.4.2.5. Adsorpsiyon teorisi 58
2.4.2.6. Mekanik teori 58
2.4.3. Mukoadezyonu Etkileyen Faktörler 58
2.4.3.1. Moleküler ağırlık 58
2.4.3.2. Esneklik 58
2.4.3.3. Çapraz bağlama yoğunluğu 59
2.4.3.4. Hidrojen bağı kapasitesi 59
2.4.3.5. Hidrasyon 59
2.4.3.6. Elektriksel yük 59
2.4.3.7. Konsantrasyon 60
2.4.3.8. Çevresel ve fizyolojik faktörler 60
2.4.4. Mukoadezyonun Ölçüm Yöntemleri 60
2.4.5. Mukoadezif İlaç Uygulama Bölgeleri 61

2.4.6. Mukoadezif Dozaj Formları 63
2.4.6.1. Tabletler 63
2.4.6.2. Filmler 63
2.4.6.3. Yamalar 63
2.4.6.4. Jeller ve merhemler 64
2.5. EMULJELLER 64
2.5.1. Emüljellerin Avantajları 65
2.5.2. Emüljellerin Dezavantajları 66
2.5.3. Emüljelin Hazırlanması İçin Gerekli Bileşenler 66
2.5.3.1. Yağ fazı 66
2.5.3.2. Su fazı 66
2.5.3.3. Emülgatör 66
2.5.3.4. Penetrasyon arttırıcı 67
2.5.4. Emüljellerin Karakterizasyonu ve Yapılan Analizler 67
3. GEREÇ VE YÖNTEM 68
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER 68
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR 69
3.3. *MORUS NİGRA* L.BİTKİ MATERYALİNİN TOPLANMASI 70
3.4. *MORUS NİGRA* L. MEYVE VE YAPRAK EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI 72
3.4.1. Çinko Oksit Nanopartikül Green Sentezi için Hazırlanan Ekstreler 72
3.4.2. Aftöz Stomatit Tedavisinde Uygulanacak Mukoadezif Jeller için Hazırlanan Ekstreler 72
3.4.3. *Morus nigra* L. Meyve ve Yaprak Ekstrelerinin HPLC Analizleri 73
3.4.4. *Morus nigra* L. Meyve Ekstrelerinin Toplam Monomerik Antosiyanin Miktar Tayini 77
3.5. *MORUS NİGRA* L. MEYVE VE YAPRAK EKSTRELERİNDEN GREEN SENTEZ YÖNTEMİ İLE ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU 78
3.5.1. Çinko Oksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 79
3.6. FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANIŞI 80
3.6.1. Boş Jel, Ekstre ve Nanopartikül Yüklü Emuljel Formülasyonlarının Karakterizasyonu 83
3.6.1.1. Formülasyonların pH ölçümü 83
3.6.1.2. Formülasyonların viskozite ölçümü 83
3.6.1.3. Formülasyonların tekstür profil analizleri 83
3.6.1.4. Formülasyonların yayılabilirlik analizleri 83
3.6.1.5. Formülasyonların *ex vivo* biyoadezyon analizleri 84
3.7. HAYVAN DENEY MODELİ VE GRUPLARIN OLUŞTURULMASI 84

3.7.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Etik Onay 84
3.7.2. Aftöz Stomatit Modelinin Oluşturulması 84
3.7.3. Deney Gruplarının Oluşturulması 85
3.7.4. Mukoadezif Emüljellerin Uygulanması 87
3.7.5. Sakrifikasyon Protokolü ve Örneklerin Elde Edilmesi 88
3.7.6. Sakrifikasyon Protokolü Sonrasında Yapılan İşlemler 89
3.7.6.1. Ağırlık değişimi 89
3.7.6.2. Yara alanının fotoğraflanması 89
3.8. BİYOKİMYASAL ANALİZLER 89
3.9. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME 90
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 91
3.11. ÇIKAR ÇATIŞMASI 91
4. BULGULAR 92
4.1. *MORUS NİGRA* L. EKSTRELERİNİN ANALİZ BULGULARI 92
4.1.1. *Morus nigra* L. Ekstrelerinin Verim Hesaplamaları 92
4.1.2. *Morus nigra* L. Meyve Ekstrelerinin Toplam Monomerik Antosiyanin Miktar Tayini 92
4.2. HPLC ANALİZİ SONUÇLARI 93
4.2.1. *Morus nigra* L. Meyve Ekstrelerinin HPLC Analizleri 93
4.2.1.1. *Morus nigra* L. meyvelerinden çinko oksit nanopartikül sentezi için hazırlanan su ekstresinin HPLC analizi 93
4.2.1.2. *Morus nigra* L. meyve etanol ekstresinin HPLC analizi 95
4.2.1.3. *Morus nigra* L. yaprak çinko oksit nanopartikül sentezi için kullanılan sulu ekstrenin HPLC analizi 97
4.2.1.4. *Morus nigra* L. yaprak etanol ekstresinin HPLC analizi 99
4.3. *MORUS NİGRA* L. MEYVE VE YAPRAK EKSTRELERİNDEN GREEN SENTEZ YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU 101
4.3.1. UV–Visible Spekroskopisi 101
4.3.2. Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi Analizi 102
4.3.3. X Işını Kırınımı 104
4.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu 106
4.3.5. Energy-Dispersive X-ray Spektroskopisi 107
4.4. JEL FORMÜLASYONLARININ ANALİZ SONUÇLARI 109
4.4.1. Formülasyonların pH ve Viskozite Ölçümü 109
4.4.2. Formülasyonların Tekstür Profil Analizleri 110
4.4.3. Formülasyonların Yayılabilirlik Analizleri 112
4.4.4. Formülasyonların *ex vivo* Mukoadezyon Analizleri 114

4.5. HAYVAN DENEYLERİ BULGULARI 116
4.5.1. Deney Hayvanlarının Kilo Takibi 116
4.5.2. Deney Hayvanlarına Ait Ağız İçi Fotoğraflar 117
4.5.2.1. Kontrol grubu 119
4.5.2.2. Boş jel grubu 120
4.5.2.3. Meyve ekstresi grubu 121
4.5.2.4. Yaprak ekstresi grubu 122
4.5.2.5. Meyve nanopartikül grubu 123
4.5.2.6. Yaprak nanopartikül grubu 124
4.5.3. Serum ve Doku Örneklerinin Biyokimyasal Analiz Bulguları 125
4.5.3.1. Tümör nekroz faktör-α 125
4.5.3.2. Interlökin-1β 129
4.5.3.3. Interlökin-2 133
4.5.3.4. Interlökin-6 137
4.5.3.5. Interlökin-8 141
4.5.3.6. Interlökin-10 145
4.5.3.7. Total antioksidan seviye 149
4.5.3.8. Total oksidan seviyesi 150
4.5.3.9. Glutatyon 150
4.5.3.10. Nitrik oksit 151
4.5.4. Histopatolojik Değerlendirmeler 155
5. TARTIŞMA 164
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 182
KAYNAKLAR 183
EK 207

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Rekürrent aftöz stomatitlerin etiyolojisinde yer alan faktörler 8

Tablo 2.2: *Morus nigra* L. meyvelerinin besin öğeleri. 23

Tablo 3.1: HPLC pompa program 73

Tablo 3.2: Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin HPLC bilgileri 76

Tablo 3.3: Emülsiyon formülasyonunun içeriği ve madde miktarları 80

Tablo 3.4: Emuljel formülasyonların içerikleri ve madde miktarları (%) 82

Tablo 3.5: Çalışmaya dahil edilen grupların dağılımı 86

Tablo 3.6: Histopatolojik değerlendirme skorları 91

Tablo 4.1: Meyve ve yaprak ekstrelerinin ekstraksiyon verimleri 92

Tablo 4.2: *Morus nigra* L. meyvelerinden çinko oksit nanopartikül sentezi için hazırlanan su ekstresinin HPLC- PDA analiz sonuçları 93

Tablo 4.3: *Morus nigra* L. meyvelerinin etanol ekstresinin HPLC- PDA analiz sonuçları 95

Tablo 4.4: *Morus nigra* L. yapraklarından çinko oksit nanopartikül sentezi için hazırlanan su ekstresinin HPLC-PDA sonuçları 97

Tablo 4.5: *Morus nigra* L. yapraklarının etanol ekstresinin HPLC-PDA sonuçları 99

Tablo 4.6: Boş ve yüklü formğlasyonların pH ve viskozite sonuçları 110

Tablo 4.7: Boş ve yüklü formülasyonların tekstür profil analizi sonuçlar 111

Tablo 4.8: Boş ve yüklü formülasyonların yayılabilirlik çalışması sonuçları 113

Tablo 4.9: Boş ve yüklü formülasyonların *ex vivo* biyoadezyon çalışması sonuçları 114

Tablo 4.10: Deney hayvanlarının kilo takibi 116

Tablo 4.11: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen tümör nekroz faktör-α düzeyleri 127

Tablo 4.12: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-1β düzeyleri 131

Tablo 4.13: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-2 düzeyleri..... 135

Tablo 4.14: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-6 düzeyleri..... 139

Tablo 4.15: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-8 düzeyleri..... 143

Tablo 4.16: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-10 düzeyleri..... 147

Tablo 4.17: Tüm gruplara ait doku örneklerinde analiz edilen antioksidan/oksidan parametrelerin düzeyleri 152

Tablo 4.18: Tüm gruplara ait doku örneklerinin histopatolojik skorlanması 156

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Green sentez yönteminin avantajları 39

Şekil 2.2: Çinko oksit nanopartikül kullanım alanları 40

Şekil 3.1: *Morus nigra* L. yaprak ve meyveleri 70

Şekil 3.2: *Morus nigra* L. herbaryum kayıt örneği 71

Şekil 3.3: 15 Fenolik bileşiğin 254 nm'deki HPLC kromatogramı 75

Şekil 3.4: Meyve ekstreleri aracılığıyla çinko oksit nanopartikül sentezi 78

Şekil 3.5: Yaprak ekstreleri aracılığıyla çinko oksit nanopartikül sentezi 79

Şekil 3.6: Deney hayvanlarında aftöz ülser modelinin oluşturulması 85

Şekil 3.7: Topikal uygulanan jel uygulaması ve kullanılan jeller 88

Şekil 3.8: Sakrifikasyon sonucu elde edilen doku örneği 89

Şekil 4.1: *Morus nigra* L. meyvelerinin su ekstresine ait HPLC kromatogramı 94

Şekil 4.2: *Morus nigra* L. meyvelerinin etanol ekstresine ait HPLC kromatogramı 96

Şekil 4.3: *Morus nigra* L. yapraklarının su ekstresine ait HPLC kromatogramı 98

Şekil 4.4: *Morus nigra* L. yapraklarının etanol ekstresine ait HPLC kromatogramı 100

Şekil 4.5: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin UV-Visible spektrumu 102

Şekil 4.6: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin UV-Visible spektrumu 102

Şekil 4.7: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin Fourier Transform Kızılötesi spektrumu 103

Şekil 4.8: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin Fourier Transform Kızılötesi spektrumu 104

Şekil 4.9: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin X-Işını Difraktometresi paterni 105

Şekil 4.10: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin X-Işını Difraktometresi paterni 106

Şekil 4.11: *Morus nigra* L. meyve ekstresi (sol) ve yaprak ekstresi (sağ) ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskopu görüntüsü 107

Şekil 4.12: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskopu görüntüsü ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrumu 108

Şekil 4.13: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskopu görüntüsü ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrumu 109

Şekil 4.14: Formülasyonların tekstür profil analizlerinin grafik olarak görünümleri 112

Şekil 4.15: Formülasyonların yayılabilirlik çalışmalarının grafik olarak görünümü 114

Şekil 4.16: Formülasyonların *ex vivo* biyoadezyon çalışmalarının grafik olarak görünümü 115

Şekil 4.17: Tüm gruplarda yara modelinin 1. gündeki ağız içi görünümü 118

Şekil 4.18: Kontrol grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü 119

Şekil 4.19: Boş jel grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü 120

Şekil 4.20: Meyve ekstresi grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü 121

Şekil 4.21: Yaprak ekstresi grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü 122

Şekil 4.22: Meyve nanopartikül grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü 123

Şekil 4.23: Yaprak nanopartikül grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü 124

Şekil 4.24: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen tümör nekroz faktör-α seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı 128

Şekil 4.25: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-1β seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı 132

Şekil 4.26: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-2 seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı.....136

Şekil 4.27: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-6 seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı.....140

Şekil 4.28: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-8 seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı.....144

Şekil 4.29: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-10 seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı.....148

Şekil 4.30: Doku örneklerinden analiz edilen total antioksidan ve total oksidan seviyelerinin 3. (i), 6. (ii), ve 9. (iii) günlerde gruplara göre dağılımı. 153

Şekil 4.31: Doku örneklerinden analiz edilen glutatyon ve nitrik oksit seviyelerinin 3. (i), 6. (ii), ve 9. (iii) günlerde gruplara göre dağılımı. 154

Şekil 4.32: Gruplara ait histolojik iyileşme skorlarının karşılaştırılması.....157

Şekil 4.33: 3. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Hematoksilen eozin, X5) 158

Şekil 4.34: 3. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Hematoksilen eozin, X10).....159

Şekil 4.35: 6. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Hematoksilen eozin, X5).....160

Şekil 4.36: 6. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Hematoksilen eozin, X10).....161

Şekil 4.37: 9. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Hematoksilen eozin, X5).....162

Şekil 4.38: 9. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Hematoksilen eozin, X10).....163

SİMGELER VE KISALTMALAR

A549: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sülfonik asit

ADSC: Adiposit Türevli Kök Hücre

ALP: Alkalen Fosfotaz

ALT: Alanin Aminotransferaz

AS: Aftöz Stomatit

AST: Aspartat Aminotransferaz

ASTM: American Society for Testing and Materials

B16F10/A375: Melanoma

BET: Brunauer–Emmett-Teller Analizi

BUN: Kan Üre Nitrojeni

C3G: Siyanidin-3- glikozit

C3R: Siyanidin-3- rutinozit

CAT: Katalaz

CCl_4: Karbon tetra klorür

CD4+: Yardımcı T Hücresi

CD8+: Sitotoksik T Hücresi

CMC: Karboksimetil Selüloz

CMV: Sitomegalovirüs

COX-2: Siklooksijenaz-2

CUPRAC: Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite

DNJ: 1-deoksinojirimisin

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EDX: Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektrometresi

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FDA: Food and Drug Administration

FRAP: Demir İndirgeyici Antioksidan Güç

FTIR: Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi

GİS: Gastrointestinal Sistem

GİT: Gastrointestinal Tüp

GPx: Glutatyon Peroksidaz

GS: Green Sentez

GSH: Glutatyon

GSH-Px: Glutatyon Peroksidaz

HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

HeLa: Serviks Adenokarsinomu

HepG2: Hepatoselüler Karsinom

HIV: Human Immmunodeficiency Virus

HNSCC: Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom

HPC: Hidroksipropil Selüloz

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPMC: Hidroksipropilmetil Selüloz

HSV: *Herpes simplex* virus

IC50: Yarım Maksimal Etkili Konsantrasyon

IFN-c: İnterferon c

IFN-y: İnterferon gama

IgE: İmmunglobulin E

IL: İnterlökin

IPM: İsopropilmiristat

K562: Duyarlı Lösemi

K562/A02: Dirençli Lösemi

LoVo/CaCo-2: Kolon Kanseri

LDH: Laktat dehidrogenaz

LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

LPS: Lipoglisakkarit

MAGIC: Oral ve Genital Ülserler, Kıkırdak İltihabı

MCF-7: Meme Kanseri

MDA: Malondialdehit

MMP: Metalloproteinaz

MP: Metilparaben

NAFLD: Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

NF-kB: Nuclear Factor kappa B

NO: Nitrik oksit

NP: Nanopartikül

PC-3: Prostat Kanseri

PDA: Photo Diode Array Dedektör

PFAPA: Periyodik Ateş, Aftöz Stomatit, Farenjit, Adenit

PG: Propilen Glikol

PP: Propilparaben

PPARy: Peroksizom Proliferatörleri ile Aktive Olan Reseptör Gama

PTP: Protein Tirozinaz Fosfataz

RAS: Rekürrent Aftöz Stomatit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

Scr: Serum Kreatinin

SEM: Scanning (Taramalı) Elektron Mikroskopu

SLS: Sodyum Lauril Sülfat

SOD: Süperoksit Dismutaz

SP: Sıvı Parafin

STZ: Streptozotosin

T98G: Glioma

TAS: Total Antioksidan Seviyesi

TBARS: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler

TEA: Trietilamin

TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu

TGF-β: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

TMBC: 2,4,2',4'-tetrahidroksi-3-(3-metil-2-butenil) kalkon

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TOS: Total Oksidan Seviyesi

UV: Ultraviyole

UV-Vis: Ultraviyole ve Görünür Bölge Spekrofotometresi

VCAM-1: Vasküler Hücre Yapışma Molekülü-1

VLDL: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

VZV: *Varicella zoster*

XRD: X- Işını Difraktometresi

ZnONP: Çinkooksit Nanopartikül

MORUS NİGRA L. MEYVE VE YAPRAK EKSTRELERİNDEN GREEN SENTEZ YÖNTEMİYLE SENTEZLENEN ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN AFTÖZ STOMATİTLER ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN *İN VİVO* DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada *Morus nigra* L. yaprak ve meyve ekstreleri aracılığıyla green sentez yöntemi kullanılarak çinko oksit nanopartiküller (ZnONP) sentezlenmiş ve sentezlenen ZnONP'ler ve ekstreler ile mukoadezif jel formülasyonları geliştirilmiştir. Ratlarda deneysel olarak oluşturulan aftöz ülser modeli üzerinde geliştirilen formülasyonların terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sentezlenen ZnONP'lerin karakterizasyonu, boyutu ve morfolojisi tanımlandı. Uygun ekstreler ve sentezlenen ZnONP'ler ile mukoadezif emüljel formülasyonu hazırlandı. Aftöz ülser modeli oluşturulmak üzere toplam 108 adet Wistar-Albino rat kontrol (K), jel bazı (B), meyve ekstresi (M), yaprak ekstresi (Y), meyve ekstresi aracılığıyla sentezlenen ZnONP (MNP), yaprak ekstresi aracılığıyla sentezlenen ZnONP (YNP) içeren jeller ile tedavi edilen gruplar olmak üzere altı ana gruba ayrıldı. Bu altı ana grup 3., 6. ve 9. tedavi günleri olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Gruplarda oluşturulan yaraların iyileşme düzeyleri histopatolojik ve biyokimyasal olarak incelendi.

Bulgular: Histolojik olarak hasar sonrası en çabuk iyileşme gösteren gruplar YNP ve MNP olarak tespit edildi. Doku ve serum örneklerinde M, Y, MNP ve YNP gruplarında, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 seviyeleri K ve B grubuna göre düşük tespit edilirken IL-10 seviyeleri daha yüksek olarak tespit edildi. Dokuda GSH ve TAS seviyeleri M, Y, MNP ve YNP gruplarında K ve B grubuna göre daha yüksek, TOS seviyeleri ise daha düşük bulundu.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar geliştirilen formülasyonların antienflamatuar, antioksidan ve yara iyileştirici etkilerini doğrulamaktadır. Formülasyonların ileri çalışmalar ile desteklendiğinde klinik kullanıma uyarlanabilecek, çok yönlü etki gösteren ve mevcut tedavilere alternatif olabilecek düzeyde umut verici ajanlar olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Aftöz Stomatit, Çinko Oksit Nanopartikül, Emüljel, Green Sentez, *Morus nigra* L., Mukoadezif jel, Oral Ülser

EVALUATION OF *IN VIVO* EFFICIENCY OF GREEN SYNTHESIZED ZINC OXIDE NANOPARTICLES FROM *MORUS NIGRA* L. FRUIT AND LEAF EXTRACTS IN ORAL APHTHOUS STOMATITIS

ABSTRACT

Aim: Zinc oxide nanoparticles (ZnONP) were synthesized by using green synthesis method through *Morus nigra* L. leaf and fruit extracts and mucoadhesive emulgel formulations were formed with synthesized ZnONPs and *M. nigra* fruit and leaf extracts. In the present study, it was aimed to evaluate the therapeutic efficacy of emulgel formulations on an experimentally created aphthous ulcer model in rats.

Materials and Methods: The size and morphology of ZnONPs synthesized from *M. nigra* fruit and leaf extracts were defined and characterized. Mucoadhesive emulgel formulation was prepared with appropriate extracts and synthesized ZnONPs. 108 Wistar-Albino rats were divided into six main groups as the control group (C), gel base group (B), gel of *M. nigra* fruit extract group (F), gel of *M. nigra* leaf extract group (L), gel of ZnONP synthesized with *M. nigra* fruit extract group (FNP), gel of ZnONP synthesized with *M. nigra* leaf extract group (LNP) to create an experimental aphthous ulcer model. These six main groups were divided into three subgroups as the 3rd, 6th and 9th treatment days. The healing levels of the wounds were examined histopathologically and biochemically.

Results: Histologically, the groups that showed the fastest healing after injury were found to be FNP and LNP. In tissue and serum samples, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 levels were found to be lower in M, Y, MNP and YNP groups compared to K and B groups, while IL-10 levels were found to be higher. In the tissue, GSH and TAS levels were higher in M, Y, MNP and YNP groups compared to K and B groups, while TOS levels were lower.

Conclusion: The results confirm the anti-inflammatory, antioxidant and wound-healing effects of the formulations. It is thought that the formulations, when supported by further studies, can be adapted to clinical use, have multifaceted effects and are promising agents that can be an alternative to current treatments.

Key Words: Aphthous Stomatitis, Emulgel, Green Synthesis, *Morus nigra* L., Mucoadhesive Gel, Oral Ulcer, Zinc Oxide Nanoparticle

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aftöz stomatit (AS), oral mukozada sık görülen, ağrılı, tekrarlayan, tek veya çok sayıda ülserlerle karakterize enflamatuar bir hastalıktır. AS'ler genel olarak sık tekrarlamaları nedeniyle rekürrent aftöz stomatit (RAS) ismiyle adlandırılırlar. Özellikle ağız içi yerleşimli ülserler; hastaların yutkunma, yeme, içme hatta konuşma gibi günlük fonksiyonlarını etkilemekte ve dolayısıyla yaşam kalitelerinde düşüşe neden olmaktadır. Bu nedenle RAS toplumda görülen önemli sağlık sorunlarından birisidir (1).

RAS'ın etiyolojisi ve patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber lokal, sistemik, alerjik, genetik, nutrisyonel ve mikrobiyal faktörlere bağlı olarak gelişebildiği düşünülmektedir. Ayrıca yaş, cinsiyet ve sosyoekonomik durumla hastalığın insidansı arasında doğrudan bir ilişki de bulunmaktadır (2-4).

RAS'ın tedavisi genellikle semptomatiktir. Tedavi protokolünde genel olarak analjezikler, antiseptikler, antibiyotikler ve kortikosteroidler gibi semptomatik rahatlama sağlayan ilaç grupları yer almaktadır (5). Sentetik ilaçların çoğu oral mikrobiyotayı değiştirebildiği gibi süper enfeksiyon, kusma, ishal, dişlerde renklenme, ağızda hissizlik gibi istenmeyen yan etkilere de yol açabilmektedir (6,7). Bu sebeplerden dolayı son zamanlarda sentetik ilaç gruplarının sağladığı semptomatik rahatlamayı sağlayabilecek daha doğal seçenekler ilgi çekmeye başlamıştır.

Birçok bitkinin antibakteriyel, antiviral, antifungal etkileri yanında antienflamatuar ve yara iyileştirici etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle bitkisel ekstrelerin bu çoklu etkileri, oral ülserlerin tedavisinde klinisyenlere oldukça iyi bir seçenek sunmaktadır. Literatürde de yapılan birçok çalışmada RAS, radyoterapi ve kemoterapinin neden olduğu mukozit, eroziv lökoplaki ve oral liken planus dahil olmak üzere oral mukozal lezyonların tedavisinde bitki kaynaklı biyoaktiflerin tedavide etkin potansiyele sahip oldukları gösterilmiştir (8).

Türkiye'de halk arasında ağız yaralarının tedavisinde geleneksel olarak en sık kullanılan bitkilerden birisi karadut'dur (*Morus nigra* L.). Karadut meyvesinde fenoller, flavonoidler, antosiyaninler, karotenoidler, esansiyel yağ asitleri, askorbik asit ve çeşitli organik asitler gibi biyolojik olarak aktif birçok bileşik bulunmaktadır

(9). Bu da özellikle tamamen olgunlaşmış meyvelerinde yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (10). Ayrıca çok sayıda kanıt *M. nigra*'nın kanserlerin, kardiyovasküler hastalıkların, nörotoksisitenin, nörodejenerasyonun ve oksidatif stresin önlenmesinde potansiyel rollerini ortaya koymaktadır (11). Literatürde *M. nigra*'nın ağacının neredeyse tüm bölümlerinin farmakolojik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Yaprakların diüretik, hipoglisemik ve hipotansif aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (12). Buna karşılık kök kabuğu uzun süredir antienflamatuar, antitussif ve antipiretik amaçlar için kullanılmaktadır (11). Farklı çalışmalar, tip II diyabetli hastalarda glukoz seviyelerini iyileştirdiğini göstermiştir (13). Ayrıca geleneksel olarak dizanteriye karşı bir preparat olarak ve tonik, yatıştırıcı, müshil, antihelmintik, balgam söktürücü ve emetik olarak kullanılmaktadır (14). Son zamanlarda ise enflamasyon ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu inhibe eden karadut meyvelerinin yüksek antinosiseptif özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (15). Bu biyolojik aktivitelerden, yüksek antioksidan ve antienflamatuar etkilerden polifenol bileşenleri ve özellikle meyvelerdeki antosiyaninler sorumludur (16). Siyanidin-3-*O*-glikozit, siyanidin-3-*O*-rutinosit, pelargonidin-3-*O*-glikozit, pelargonidin-3-*O*-rutinosit, karadutlarda tanımlanan ana antosiyaninlerdir ve antioksidan kapasiteleri oldukça yüksektir (17).

Anadolu'da özellikle karadut pekmezi ve meyve suları ağız yaralarının tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (18). Halk arasında *M. nigra* meyvelerinden hazırlanan şurup ve gargaralar; ağız ve boğaz hastalıklarında, bademcik enfeksiyonlarında, ağız ve diş eti yaralarında, çocuklarda ağız içerisinde görülen pamukçuk enfeksiyonlarında kullanılır. Ayrıca yaprak infüzyonları da ateş düşürücü, ağrı kesici olarak; yaprak dekoksiyonları ise diş ve diş eti enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (18,19).

Literatürde *M. nigra*'nın halk arasında kullanımını destekleyen, ağız yaralarının tedavisinde etkinliğinin iyi tasarlanmış deneysel modeller üzerinde değerlendirildiği bilimsel çalışmalar oldukça kısıtlıdır. *M. nigra*'nın halk arasında özellikle gargara şeklinde kullanımı göz önünde bulundurulduğunda geleneksel kullanımı destekleyecek şekilde topikal olarak kullanımını da araştıran bilimsel çalışmalar yapılmalıdır. Tez çalışmamızda *M. nigra* yaprak ve meyve ekstrelerinin topikal jel formunda aftöz ülser modelinde terapötik etkinliğini değerlendirerek

literatüre bu anlamda katkıda bulunmayı amaçlamaktayız. Ayrıca bu ekstrelerden green sentez (yeşil sentez) yoluyla elde edilecek çinko oksit nanopartiküllerin (ZnONP) de aftöz ülser modeli üzerindeki topikal kullanımının etkinliği değerlendirilecektir.

Bakteriler, funguslar ve bitkiler aracılığıyla nanopartiküllerin sentezlenmesi green sentez (GS) olarak adlandırılmaktadır. GS yaklaşımı; uygun maliyetli, çevre dostu, biyouyumlu, güvenli bir nanopartikül (NP)sentez yöntemi olarak ilgi çekmektedir (20). GS yaklaşımı, ZnONP'lerin büyük ölçekli üretimlerine olanak sağlayan bir yöntemdir (21). Ayrıca, GS yaklaşımı sentez sürecinde pahalı ve toksik kimyasalların kullanımını ortadan kaldırmaktadır (22). NP sentezinde kullanılan doğal kaynaklı bitki ekstreleri hem indirgeyici ajan hem de capping veya stabilize edici ajan gibi davranan bazı fitokimyasallar içermektedir (23). Ayrıca; sentez süresinin kısa olması, maliyetli ekipman ve ilave kimyasal madde kullanımı gerektirmemesi bu yöntemin önemli avantajlarındandır (24).

ZnONP'ler elektronik, optik, kozmetik, ilaç ve biyomedikal alanlarda geniş uygulama seçenekleri nedeniyle son yıllarda ilgi odağı olmuştur (25). Metal oksit nanopartiküller içerisinde ZnONP'ler üretimleri kullanım alanları, güvenli olmaları, ucuz ve kolay üretilebilmeleri nedeniyle ayrı bir öneme sahiptir (26). ZnONP'ler yüksek katalitik aktivite, ultraviole (UV) filtreleme, antimikrobiyal, antienflamatuar ve yara iyileştirici gibi önemli aktivitelere sahiptir (27,28).

Temel bir mikro besin olarak çinko, yara onarımında önemli rollere sahiptir (29,30). ZnONP'ler yaralara uzun bir çinko kaynağı sağlayarak, hücreye etkili bir şekilde nüfuz eder, bağışıklık sistemini modüle eder ve antimikrobiyal aktiviteleri ile oldukça ilgi çekici terapötik ajanlardır. Çeşitli yara çalışmalarında iyileşme üzerine etkinlikleri bildirilmiştir (31).

GS ile sentezlenmiş ZnONP'lerin *in vivo* etkinliğini gösteren bilimsel çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Özellikle literatürde *M. nigra* eksrelerinden sentezlenmiş ZnONP'lerin etkinliğini *in vivo* olarak gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, özellikle iyi bir yara iyileştirici etkisi olduğu bilinen ZnONP'leri, *M. nigra* yaprak ve meyve ekstrelerinden sentezleyerek ratların bukkal mukozasında oluşturulmuş aftöz stomatit modelinde mukoadezif emuljel formunda terapötik etkinliğinin histolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması

amaçlanmıştır. Bu çalışma *M. nigra* ekstrelerinin geleneksel kullanımı destekleyecek hem de modern uygulama yöntemleri ile yeni formülasyonların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. REKÜRRENT AFTÖZ STOMATİT

Yunanca yanma**,** ateşlenme, iltihaplanma anlamlarına gelen aft kelimesi, Hipokrat tarafından oral ülserleri tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (3). AS, oral mukozada sık görülen, ağrılı, tek veya çok sayıda ülserasyonlarla karakterize bir hastalıktır. AS, etiyolojisi tam olarak bilinmeyen ve genellikle sıklıkla tekrar etmesi sebebiyle RAS olarak tanımlanan enflamatuar bir hastalıktır (32). RAS, sık görülen, nonenfeksiyoz ve nontravmatik oral mukozal ülseratif hastalıklardan biridir ve genel popülasyonun yaklaşık % 5-25'ini etkilemekle beraber bazı toplumlarda prevalansının % 50'ye kadar ulaşabildiği rapor edilmiştir (3,32-34).

Klinik olarak RAS lezyonları iyi sınırlı, yuvarlak ya da oval şekilli, çevresi kırmızı bir sınır ile çevrili, gri veya sarı zemini olan ülserlerdir. Bu ülserler, tek başına ortaya çıkabildiği gibi, bazı sistemik hastalıklarla beraber de görülebilmektedir. Ülserler dudağın iç kısmında, labial ve bukkal mukozada, dil, ağız tabanı, yumuşak damak ve orofarinkste görülebilir (33). RAS hastalarında ülseratif yapılar ağız içerisinde bulunduğundan yutkunma, yemek yeme, içme ve konuşma gibi normal fonksiyonlarını etkileyerek hastaların yaşam kalitesini oldukça olumsuz etkiler (32). RAS etiyolojisi ve patogenezisi tam olarak bilinmemekle birlikte, lokal, sistemik, alerjik, genetik, nutrisyonel ve mikrobiyal faktörlere bağlı olarak gelişebildiği düşünülmektedir. Ayrıca yaş, cinsiyet ve sosyoekonomik durumla da hastalığın insidansı arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır (2,3,35,36).

2.1.1. Rekürrent Aftöz Stomatitlerin Özellikleri

2.1.1.1. Sınıflandırma: Literatürde RAS, klinik olarak minör, majör ve herpetiform olmak üzere üç tipi tanımlanmıştır (37,38). Ayrıca hastalık klinik seyrine göre basit veya kompleks olarak da incelenebilir (39). Basit form; yıl içinde uzun bir ülsersiz periyot ile birlikte minör, majör veya herpetiform tiplerin görülebildiği formdur (3,39). Kompleks form ise eski lezyonlar iyileşirken yenilerinin oluştuğu ve sürekli bir hastalık aktivitesinin olduğu formdur (3).

2.1.1.1.a. Minör aftlar: Genel olarak en sık rastlanılan aftlardır ve klinik olarak RAS hastalarının %80-90'ında görülmektedir. Bu ülserlerin çapı yaklaşık 3 mm olup daha yüzeyel olan küçük ülserlerdir. Sıklıkla nonkeratinize mukozal yüzeylerde (labial mukoza, bukkal mukoza, dilin lateral ve ventral yüzeyleri) görülürler. Lezyonlar genellikle ağzın ön kısmında yoğunlaşır ve 1-5 tane olacak şekilde çok sayıdadır. Bu lezyonlar 7-14 gün içinde skar dokusu bırakmadan iyileşirler (34,37).

2.1.1.1.b. Major aftlar: Periadenitis mukoza nekrotika rekürrens ve Sutton hastalığı adlarıyla da bilinen major aftlar daha nadir görülmektedir. Lezyonlar 10 mm'den büyük, daha derin ve ağrılı ülserlerdir. Bu ülserler genellikle yumuşak damak da dahil olmak üzere keratinize ve nonkeratinize mukozada ortaya çıkar ve ciddi ağrı ve disfajiye neden olurlar. Sayıları 1-5 arasında olup genellikle 2 hafta-3 ay içinde genel olarak skar bırakarak iyileşirler. Ayrıca majör aftlara Human Immmunodeficiency Virus (HIV) ile enfekte hastalarda daha sık rastlanmaktadır (34,37).

2.1.1.1.c. Herpetiform aftlar: En az sıklıkta görülen form olan herpetiform ülserler 1-2 mm boyutlu çok sayıda (5-20) olup, birleşerek daha büyük ve düzensiz ülserler oluşturma eğilimindedir. Kadınlarda daha çok görülen bu ülserler nonkeratinize mukozada özellikle ağız tabanı ve dilin ventral yüzeyinde ortaya çıkar ve genellikle 7-14 gün içerisinde sıklıkla skar bırakmadan iyileşirler (34,37).

2.1.1.2. Rekürrent aftöz stomatitin evreleri

2.1.1.2.a. Prodromal evre (başlangıç dönemi): Prodromal evre mukozada karıncalanma ve yanma hissi ile başlayan kısa süreli evredir. Bu aşama periferal kandan lenfositlerin girişinin habercisidir. Bu evre, lezyona tedavi edici ajan uygulanarak, lezyonun ilerlemesinin durdurulabileceği veya en azından ülseratif aşamaya ilerleyen lezyonun şiddetinin ve süresinin en aza indirebileceği dönemdir. Aftlar bu aşamadan yaklaşık 24-48 saat sonra gelişir (40).

2.1.1.2.b. Preülseratif evre (ülserasyon öncesi dönem): Preülseratif aşama kısa süreli bir evredir ve prodromal evre gibi tedavi edici ajan uygulamak için idealdir. Klinik olarak genellikle eritem ve ödem mevcuttur. Histolojik olarak, lenfositler artık bazal epitel tabakalarına girmiştir ve epitel hücrelerinin ölümüne ve ülseratif aşamaya ilerlemeye yol açacak sitotoksik süreci başlatmıştır (40).

2.1.1.2.c. Ülseratif evre: Bu evrede erken epitelyal destrüksiyon küçük bir ülsere neden olur ve ülser hızla maksimum boyuta ulaşmaya devam eder. Fibröz bir membranla örtülü ülser yatağı başlıca nötrofiller, lenfositler ve plazma hücreleriyle infiltredir. Ülseratif evredeki şiddetli lokal ağrı oldukça rahatsız edicidir. Bu süreçte lezyonlar umblike ya da kenarları kabarık ortası çukur krater şeklindedir. Lezyonun çevresinde eritem ve ödem mevcuttur. Lezyon genellikle yuvarlak-ovaldir ve lezyonun merkezi sarımsı veya grimsi-beyaz psödomembran ile kaplıdır. Daha sonra psödomembran kalınlaşır ve alttaki ülsere yapışır. Bu durum ağrı ve rahatsızlık hissinin kademeli olarak azalmasını sağlar. Ülseratif dönem, 1-16 gün aralığında olacak şekilde hastalar arasında önemli ölçüde farklılıklar gösterir (40,41).

2.1.1.2.d. İyileşme evresi: Bu dönemde ağrıda belirgin bir azalma başlar. Fibromembranöz kabuk altında çok sayıda immatür kapiller içeren granülasyon dokusu mevcuttur. Daha sonra granülasyon dokusu kollajenize olarak vaskülaritenin azalmasını ve epitelin iyileşmesini sağlar. Yoğun lenfosit infiltrasyonu nedeniyle aftöz lezyonlar diğer mukozal yaralara göre daha yavaş iyileşir (41).

2.1.1.3. Rekürrent aftöz stomatitin etiyolojisi: Literatürde yer alan pek çok araştırmaya rağmen RAS'ın etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Pek çok predispozan faktör ve immünolojik temelle birlikte etiyolojisinin multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir. RAS'ın etiyolojisinde rol alan predispozan faktörler ve RAS ile ilişkili sistemik bozukluklar Tablo 2.1.'de verilmiştir. Etiyolojik faktörler arasında; genetik faktörler, hematolojik bozukluklar, malnütrisyon, bazı vitamin ve minerallerin eksikliği (vitamin B12, demir, folat, çinko), gıda alerjileri ve gıda intoleransı, hormonal değişimler (menstrüel siklus), stres ve anksiyete, lokal travma, sigara, bazı kimyasal ve mikrobiyal ajanlar sayılabilir ancak bu faktörlerin etkinliği kesinlik kazanmış değildir (42,43).

Tablo 2.1: Rekürrent aftöz stomatitlerin etiyolojisinde yer alan faktörler

Predispozan Faktörler	Sistemik Bozukluklar
• Travma	• Behçet hastalığı
• Stres	• Reiter's sendromu
• Ailesel faktörler	• GİS hastalıkları
• Mikrobiyal etkenler	• MAGIC sendromu
• Alerjiler	• Hematolojik eksiklikler
• Yiyecekler	• Siklik nötropeni
• Bazı ilaç reaksiyonları	• PFAPA sendromu
• İmmun bozukluklar	• Sweet's sendromu
• Hormonal etkenler	
• Sigara	

2.1.1.3.a. Mikroelement eksiklikleri: RAS hastalarında ince bağırsaktaki malabsorbsiyonlar veya beslenme yetersizlikleri sonucu demir, folik asit, çinko, B1, B2, B5, B12 bazı vitamin ve minerallerde eksiklikler olduğu bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalar vücuttaki vitamin ve mineral eksikliklerıyle RAS arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir (44-47). Compilato ve ark. tarafından yapılan çalışmada RAS bulunan hasta grubunun kan değerlerinde %56 oranında patolojik değerler tespit edilmiştir. Demir eksikliği anemisi, vitamin B12, folat eksikliğinde ve megaloblastik anemide aft lezyonlarının görülme sıklığının arttığı gösterilmiştir (45).

B12 vitamininin RAS'ın etyopatogenezinde rolü olabileceğini düşünülmektedir. RAS hastalarında B12 vitamini eksikliği tespit edilmiştir (48). Demir ve B12 vitaminlerinin yanı sıra çinkonun da RAS için yararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Çinkonun yara iyileşmesi ve epitelyal bütünlüğün korunması üzerine yararlı etkileri bilinmektedir ve yapılan bazı çalışmalarda RAS hastalığında çinko eksikliği olduğu görülmüştür. Bao ve ark. tarafından yapılan çalışmada RAS hastalarının ortalama serum çinko seviyelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir (49). Başka bir çalışmada da benzer şekilde serum çinko ve selenyum seviyeleri RAS hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha düşük, bakır seviyesi ise daha yüksek olarak bulunmuştur (50). RAS hastalarında serum ferritin seviyelerinin düşük

olduğunu belirten araştırmacılar da vardır (48). Bu sebeple, tüm RAS hastalarında hematolojik değerlerin kontrol edilmesi önem arz etmektedir. Değerlerde eksiklik söz konusu olduğunda mutlaka konsültasyon yapılmalı ve gerektiğinde replasman tedavisi uygulanmalıdır.

2.1.1.3.b. Lokal travmalar: Lokal travmalar sebebiyle mukoza yapısının hasar görmesi gibi bazı çevresel faktörler de aftöz ülser oluşumuna neden olabilmektedir. Özellikle sert yiyeceklerin tüketimi, sert diş fırçalama ve uygun olmayan fırça kullanımı, kırık ve sivri dişler, ağız ve diş yapısına tam uyumlu olmayan protezler, lokal anestezi enjeksiyonu ve yapılan diş tedavileri gibi nedenlerle ağız içerisinde meydana gelebilen travmalar ülser gelişimini tetikleyebilmektedir (3,51). 30 RAS'lı hasta ile yapılan bir çalışmada hem RAS hastalarının hem de sağlıklı kontrol grubunun oral mukozasında sütur, tenakulum ve hipodermik iğne ile 6 adet yara oluşturulmuş ve lezyon gelişimi izlenmiştir. RAS'lı hastalardan on üçünde 26 adet lezyon oluşurken, sağlıklı kontrollerde hiç lezyon gelişmediği görülmüştür. Travma ile indüklenen ülserler, klinik olarak hastalarda gelişen oral ülserlerden ayırt edilememiştir. Bu bulgular, oral mukozada mekanik bir hasar oluştuğunda, aftöz lezyon oluşturmaya meyilli kişilerde travma kaynaklı ülserlerin gelişebileceğini doğrulamaktadır (52).

Mukozal bariyer ülser oluşumundan korunmada oldukça önemlidir ve genel olarak aftöz ülserler keratinize olmayan ve yapı bütünlüğü hasar görmüş mukozada daha çok oluşum göstermektedir.

2.1.1.3.c. Stres ve uyku bozuklukları: Uyku düzensizliklerinin ve stresin de RAS görülme sıklığında artışa neden olduğuna dair görüşler bulunmaktadır (53). Bazı çalışmalar RAS görülme sıklığının anksiyete, öfke ve stres düzeyi ile artış gösterdiğini bildirse de bazı çalışmalar bunun aksine ülserlerin görülme sıklığı ile stres değerleri arasında herhangi bir bağlantı olmadığını bildirmektedir (54-57).

RAS hastalarında hipnoz ve rahatlama üzerine uygulanan bir tedavi programının RAS hastalarında ülserlerin rekürrens sıklığında belirgin bir azalma sağladığı bildirilmiştir (58). Bunun yanı sıra stresin primer olarak etken oluşturmadığını fakat kişilerde strese bağlı diş sıkma (bruksizm), dudak, yanak veya dil ısırma gibi ağız içerisindeki yumuşak dokularda travmaya sebep olabilecek bazı alışkanlıkların gelişebildiği ve bu travmanın da ülser oluşumunu tetikleyebileceği de düşünülmektedir (55). Her ne kadar bazı çalışmalar stresin etiyolojik bir faktör olmadığını, tetikleyici bir

etken olduğunu belirtse de bazı hastaların antidepresan tedaviden yarar gördüğü de belirtilmektedir (59). Ayrıca RAS hastalarında anksiyete ve tükürük kortizol seviyelerinin normalin üzerinde olduğu da bilinmektedir (60,61). Stres altındaki hastalarda, strese eşlik eden immünolojik değişiklikler ile aftöz ülserlerin ilişkisi ise hala net bir şekilde ortaya koyulamamıştır.

2.1.1.3.d. Genetik faktörler: RAS etyopatogenezinde genetik faktörlerin rolü, akraba ve ikizler arasında yapılan çalışmalar ile doğrulanmıştır. RAS etiyolojisi genetik açıdan değerlendirildiğinde hastaların yaklaşık %46'sının 1. derece akrabalarında da RAS öyküsü bulunduğu görülmüştür (35,62-64). Aile bireylerinde RAS öyküsü olan kişilerde daha erken yaşta ve daha şiddetli olguların görüldüğü bildirilmiştir (64). Ancak hastalığın bazı toplumlarda prevalansının yüksek olması genetik faktörler kadar hastaların kişisel özellikleri, toplumun sosyokültürel seviyesi, beslenme alışkanlıkları, stres ve diğer faktörlerle de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

2.1.1.3.e. Besin ve kimyasal alerjileri: Alerjik bünyelerde ve alerji yatkınlığı bulunan kişilerde RAS görülme sıklığının arttığı bilinmektedir. Normal popülasyona oranla RAS hastalarında yiyeceklerle ilişkili antikorların oranları belirgin biçimde daha yüksek olduğu görülmüştür (65,66). Bazı gıdaların (özellikle alerjik reaksiyonları da tetikleyen asidik, tuzlu, baharatlı gıdalar, fıstık, çikolata, sitrik asitli meyveler veya alkollü içecekler, buğday, süt, peynir vb.) ve gıda katkı maddelerinin (benzoik asit, sinnamik asit) aftöz ülserleri tetiklediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (65). Tedaviye dirençli 17 RAS hastası ile yapılan bir çalışmada hastalara eliminasyon diyeti ile tedavi uygulanmış, tedaviyi tamamlayan 12 hastanın 5'inin oral ülserlerin tekrarlaması açısından remisyona girdiği belirtilmiştir. Çalışmada besin komponentlerinin, RAS etiyolojisinde rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (67). RAS'lı hastalara patch test ile alerjenlerin belirlendiği başka bir çalışmada da hastaların alerjenlerden kaçınması sonucunda birtakım iyileşmelerin olduğu gözlemlenmiştir (68). Bu durumda özellikle RAS oluşumunu tetiklediği düşünülen ya da lezyonların iyileşme sürecini uzatan gıdalar ve alerjenlerin testlerle belirlenerek uzak durulması halinde iyileşme olacağı düşünülmektedir. Ancak bu durumun aksini savunan çalışmalar da bulunmaktadır. RAS'lı hastalarda yiyecek antijenlerine karşı antikorların araştırıldığı bir çalışmada, hasta gruplarda antikor insidansı benzer bulunurken, kontrol grubunda antikor oranının daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun RAS etiyolojisinde gıda alerjilerinin

etkinliğini direkt açıklamadığını ancak RAS hastalarında gıda alerjenlerinin oral emilimindeki artışa bağlı olarak gelişen immün cevapta bir artış olduğu şeklinde yorumlanmıştır (69). Çölyak hastalığının etiyolojisinde yer alan glutenin aftöz ülserlerin etiyolojisinde de yer alabileceği düşünülse de henüz bu durumun RAS hastalığındaki rolü belirsizdir (62). Çölyak hastalığı bulunmayan RAS'lı hastalara glütensiz diyet uygulandığında, hastaların %25'inde olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (70). Ayrıca gluten alerjisinin dışında alerji riski yüksek kabul edilen ceviz, çilek ve domates gibi gıdalar ile RAS arasında da bir ilişki saptanamamıştır (71). Üniversite öğrencileri ile yapılan bir çalışmada ise çay ve baharat tüketimi fazla olanlarda aft görülme sıklığının daha çok olduğu belirtilmiştir (72). Başka bir araştırmada da RAS'lı hastalar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında, her iki grupta da inek sütü, peynir, yoğurt, elma, portakal, limon, domates, kahve, çay ve baharatlı gıda tüketiminin benzer olduğu ancak RAS'lı hastalarda limon ve portakal tüketiminin daha sık olduğu tespit edilmiştir. Beslenme alışkanlıklarının ağız içerisinde hassasiyete neden olabileceği veya bazı vitamin ve mineral eksikliklerine neden olarak RAS patogenezinde rol oynayabileceği belirtilmiştir (66).

Diş macunlarında yaygın olarak bulunan ve denatüre edici etkisi olduğu bilinen sodyum lauril sülfat (SLS) kullanımının aftöz lezyonlar üzerinde de etkisi olduğu konusunda tartışmalı veriler mevcuttur. SLS içeren diş macunlarının RAS insidansını artırdığı yönündeki çalışmaların yanı sıra (73-75); bu tip macunların RAS görülme sıklığında diğer macunlar ile bir farklılığının olmadığını belirten çalışmalar da mevcuttur (76).

2.1.1.3.f. İlaç reaksiyonları: Bazı ilaçların ağız içerisinde aftöz ülserlere benzer lezyonlara neden olabildiği bildirilmiştir Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü olan kaptopril, altın tuzları, niflumik asit, nikorandil, fenindion, fenobarbital bu ilaçlardan bazılarıdır. Ayrıca diklofenak, piroksikam gibi nonsteroid antienflamatuar ilaçlar da afta benzer oral ülserasyonların oluşumunu stimüle edebilmektedir (32,77). RAS'lı hastalarda yapılan bir araştırmada, hastaların %66,25'inde RAS başlangıcından itibaren aralıklı olarak çeşitli ilaçların kullanımı tespit edilmiştir. En çok kullanıldığı saptanan ilaç grubunun nonsteroid antienflamatuar ilaçlar olduğu ve aynı zamanda bu ilaçlar, analjezikler, kas gevşeticiler ve antibiyotikler ile RAS gelişimi arasında istatistiksel olarak pozitif bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir (78). Nikorandil anjina tedavisinde

kullanılan bir ilaçtır ve kullanımı olan bireylerde oral ülserasyon sıklığı %5 olarak tahmin edilmektedir. Ancak ülserasyona neden olan mekanizma net olarak bilinmemektedir. İlaçlara bağlı olarak gelişen ülserasyonlar genellikle ilacın kesilmesi ile kaybolur ve tekrar ortaya çıkmazlar (32,78).

2.1.1.3.g. Mikrobiyal faktörler: RAS patogenezinde çeşitli mikroorganizmaların yer aldığı düşünülse de yapılan bazı çalışmalar mikroorganizmalar ve aftlar arasında kesin bir ilişki olmadığını belirtmektedir. Genel olarak oral streptokoklar RAS patogenezinde mikrobiyal ajan olarak düşünülmektedir. Oral kavitedeki streptokokların, direkt patojenik etki gösterebildiği gibi antikor üretimini tetikleyerek antijenik uyarıya sebep olduğu ve keratinosit antijenik determinantları ile çapraz reaksiyon sonucunda RAS patogenezinde önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (54).

Mide ve duodenal ülserlerin oluşumunda oldukça ciddi bir risk faktörü olan *Helicobacter pylori (H. pylori*)'nin, RAS oluşumunda da etkin bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda RAS hastalarında *H. pylori* saptanmışken bazı çalışmalarda ise hastalık ile *H. pylori* arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir (79-81). *H. pylori* pozitif RAS hastalarına eradikasyon tedavisinden sonra genel olarak semptomların şiddetinde ve aftların tekrarlamasının azaldığı aynı zamanda hastaların % 29,2'sinde ise semptomların tamamen kaybolduğu bildirilmiştir (82). Diğer bir çalışmada da *H. pylori* eradikasyon tedavisi ile RAS'lı hastalarda ülserlerin sıklığının ve iyileşme süresinin kısaldığı tespit edilmiştir (83). RAS ile *H. pylori* arasında potansiyel bir bağlantı olduğu vurgulanmaktadır.

RAS etiyolojisinde bakteriyel ajanlar gibi viral ajanların da etken olabileceği düşünülmektedir. RAS ile *Herpes simplex* virüsü (HSV) arasında etiyolojik olarak ilişki bulunmamasına rağmen hastalık sıklıkla HSV enfeksiyonu ile karıştırılabilmektedir. Bazı çalışmalarda *Varicella zoster* (VZV) ve sitomegalovirüsün (CMV) aftöz ülserler ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (84,85).

Mikroorganizmaların RAS etiyolojisindeki rolleri, çelişkili sonuçlar nedeniyle kesinlik kazanmamıştır. Aftöz ülserlerin topikal veya sistemik steroidler ve immünosupresif diğer ajanlarla tedavi edildiğinde olumlu sonuç vermesi ancak antibakteriyel ve antiviral ajanlara karşı ise yanıt vermemesi aftöz ülserlerin enfeksiyondan ziyade enflamatuar bir mekanizma ile ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Bu nedenle RAS için viral veya bakteriyel tutulum etiyolojik bir faktörden ziyade immün bozukluğun yanında sekonder bir etken olarak düşünülmektedir (86).

2.1.1.3.h. Hormonal etkenler: Literatürde menstrual siklus, hamilelik ve menapoz gibi özellikle kadınlarda hormonal değişikliklere sebep olan dönemlerde RAS lezyonlarının görülme sıklığının arttığını gösteren çalışmalar olsa da aksi yönde bulgular da bulunmaktadır (87). Oral kontraseptif kullanan kadınlarda ve hamilelerde aftöz ülserlerde remisyon olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra doğumdan sonra oral ülserlerin yeniden alevlendiği gözlenmiştir (37). Kadınların yaklaşık %10'u ilk RAS ataklarını 50-59 yaş arasında yaşamaktadır. Ancak RAS ile menopoz arasında bir ilişki olduğu henüz ortaya konulmamıştır (32).

Östrojen hormonu hücresel reseptörler yolu ile vajina epiteli ve oral mukoza gibi vücuttaki birçok yassı epitelin bulunduğu bölgede hücresel farklılaşmaya neden olmaktadır. RAS ve menstrual siklus arasındaki ilişkinin premenstrual evrede düşen östrojen üretimine ve buna bağlı olarak oral mukozada oluşan travmaya duyarlılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (3,88).

2.1.1.3.ı. İmmünolojik bozukluklar: RAS'lı hastaların hem hücresel hem de hümoral immünitelerinde değişiklik olduğu düşünülmektedir. HIV pozitif hastalarda ciddi ülseratif lezyonların oluşması ve immünoglobulin seviyelerinde saptanan değişiklikler bu düşünceyi desteklemektedir (3). Ayrıca aktif RAS'lı hastalarda sağlıklı kontroller ve inaktif hastalarla karşılaştırıldıklarında antikora bağımlı hücresel sitotoksisitede rol alan γδ T hücrelerinde artış tespit edilmiştir. Bu durum RAS hastalarında oral mukozaya karşı artmış bir sitotoksisite olduğunu düşündürmektedir (89).

2.1.1.3.i. Sigara kullanımı: Sigara kullanımı ile RAS arasında negatif bir ilişki bulunmaktadır. Sigara kullanan kişilerde sigara kullanmayanlara göre daha az RAS görüldüğü bilinmektedir. Bazı hastalarda ise sigarayı bıraktıklarında ağız içiresinde ülserler görülmeye başlamaktadır. Sigara içenlerde meydana gelen hiperkeratinizasyon mukozal yüzeylerde ülser oluşmasına engel olduğundan daha az RAS görülmektedir (90). Artmış keratin tabakası, mikrobiyal penetrasyon ve travma gibi ülserlere sebep olabilecek etkenlere karşı mukozada mekanik bir savunma sağlamaktadır. Yapılan bir araştırmada, RAS hastalarında nikotinin antienflamatuar etki oluşturarak doza bağlı koruyucu bir etkisinin olabileceği düşünülmüş ancak bu koruyucu etki mekanizması ise netlik

kazanmamıştır (91). Nikotinin ayrıca adrenal steroidlerin üretimini indüklediği ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ve interlökin 1 ve 6 (IL-1 ve IL-6) üretimini azalttığı için koruyucu etki gösterebileceği de düşünülmektedir (92).

2.1.1.4. Rekürrent aftöz ülserler ile ilişkili sistemik hastalıklar

2.1.1.4.a. Behçet hastalığı: Behçet hastalığı oral, genital ve oküler bölge tutulumu görülen ve sebebi bilinmeyen bir multisistem hastalıktır. Bu hastalıkta oral aftlar, vasküler bulgular, paterji pozitifliği, genital ülserler, deri ve göz bulguları ise tanı kriteri olarak belirlenmiştir (93). Aftöz ülserler behçet hastalığında % 99 oranında görülürken, hastaların % 67'sinin kliniğe ilk başvuru sebebini oluşturmaktadırlar (32).

Behçet Hastalığında görülen aftöz ülserler, genelde diğer sistemik belirtilerden önce başlar ve minör, majör veya herpetiform tipte olabilir. RAS ve Behçet hastalığında görülen aftöz lezyonları birbirinden ayıran bir farklılık bulunmamaktadır (94). Behçet hastalığında majör aftların görülme sıklığı %37 gibi bir oranla belirgin biçimde RAS'dan daha yüksek olup; ülserlerin sayısı daha fazla sayıda ve daha ciddidir (95).

2.1.1.4.b. Reiter sendromu: Reiter Sendromu genellikle enfeksiyonlar tarafından tetiklenen ve deri, mukozalar, gastrointestinal sistem ve kardiovasküler sistemi tutabilen bir hastalıktır. Hastaların yaklaşık %10'unda aftöz ülserler görülürken diğer belirtileri ise artrit, konjonktivit ve üretrittir (3).

2.1.1.4.c. Gastrointestinal sistem hastalıkları: Çölyak hastalarında %10-18 oranında RAS görüldüğü ve hastalığın tedavisi ile aftların da genellikle gerilediği bildirilmiştir (96). Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi enflamatuar bağırsak hastalıklarında da RAS görülebilmektedir (37). Crohn hastalığında oral ülser görülme sıklığı % 6 olarak bildirilmiştir (97).

2.1.1.4.d. MAGIC sendromu (oral ve genital ülserler, kıkırdak iltihabı): Nadir görülen bu sendromda primer olarak kulak, burun ve hava yolundaki kıkırdakları tutan ve tekrarlayan polikondrit ve artrit ile birlikte Behçet hastalığı görülür. Buna bağlı olarak da etkilenen bireylerde oral ve genital ülserler görülmektedir (3,34,98).

2.1.1.4.e. PFAPA sendromu (periyodik ateş, aftöz stomatit, farenjit, adenit)**:** Genel olarak 5 yaş altı çocuklarda görülen ve etiyolojisi tam olarak bilinmeyen, periyodik yüksek ateş ataklarıyla ile birlikte AS, farenjit ve servikal adenit görülen bir hastalıktır (3,99).

2.1.1.4.f. Sweet’s sendromu: Ateş, nötrofili, yüzde ve ekstemitelerde eritematöz deri plakları ve nodülleriyle karakterize nadir görülen bir sendromdur. Genelde buna aftöz lezyonlar da eşlik eder ve sistemik steroidlere olumlu cevap verirler (3,100).

2.1.1.4.g. Siklik nötropeni: Siklik nötropeni, nötrofil sayısının 3 haftalık periyotlarda düşüşü ile karakterize halsizlik, AS ve servikal adenopatinin görüldüğü hematolojik bir hastalıktır. Ateş ve nötropeni spontan olarak iyileşir. Oral bulguları ise RAS, gingivitis ve gingival kanama, alveolar kemiği kaybı ve diş kayıpları olarak sayılabilmektedir (3,101).

2.1.1.5. Rekürrent aftöz stomatitin immunopatogenezi: Aftöz ülserin, oral mukozanın belirli bölgelerine karşı artan immünolojik reaksiyona yanıt olarak geliştiği düşünülmektedir (102-105). Bu reaksiyon, belirli immün süreçleri aktive eden ve uygun olmayan şekilde başlatılan sitokinler dizisinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (102,104). RAS'lı hastalarda, viral/ bakteriyel antijenler veya stres gibi henüz tam olarak tanımlanmamış bir tür tetikleyici etkene yanıt olarak bağışıklık sisteminin işlevinin bozulduğu tespit edilmiştir. Literatürde pek çok çalışma RAS gelişiminde otoimmünizasyonun rolünü vurgulamaktadır (94,106,107). RAS patogenezinde hümoral ve hücre-aracılı her iki tip bağışıklık tepkisinin bozulduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (34). Bu nedenle, RAS hastalarında immünolojik yanıtın mekanizmasını belirlemek için bu hastalarda sitokin profilini tanımlamak gerekmektedir.

Sitokinler insan vücudundaki bağışıklık tepkisini indükleyen ve belirleyen önemli faktörlerdendir. IL-2, IL-12, IFN-c (İnterferon c) ve TNF-α gibi Thl tipi sitokinler, otoimmünizasyona yatkınlığı belirler, hücresel tip tepkiyi indükleyerek IgG salgılanmasını uyarırlar. IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 gibi Th2 tipi sitokinler ise antienflamatuar özelliktedir ve hümoral bağışıklık tepkisini uyararak immunglobulin E (IgE) salgılanmasını indüklerler. Literatürde pek çok çalışma Th1 tipi immünolojik yanıtın RAS'ın gelişiminde önemli bir rol oynadığını öne sürmektedir (102,104,105,108,109). Sağlıklı kontrollere kıyasla RAS hastalarında Th1 sitokinin önemli ölçüde daha yüksek salgılandığı tespit edilmiştir. Lewkowicz ve ark. periferik kan mononükleer hücreleri tarafından hem hastalığın akut fazında hem de remisyon döneminde IL-2, IFN-c ve TNF-α üretiminin arttığını gözlemlemiştir. Aynı zamanda, sağlıklı kontrollere kıyasla RAS hastalarında antienflamatuar sitokinlerden dönüştürücü

büyüme faktörü beta (TGF-β) ve IL-10'un salgılanmasının da önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir (104). IL-2 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinler RAS'ın aktif basamağında rol alarak remisyon süresini azaltırken, IL-10 gibi antienflamatuar sitokinler iyileşme sürecinde epitel proliferasyonunu stimüle etmektedir. Bu sebeple IL-10 seviyesinin düşmesi ve özellikle travma sonrasında daha düşük seviyede IL-10 üretimi epitelizasyonu geciktirir ve ülserlerin iyileşme süresinin uzamasına neden olur (110). Benzer şekilde, Albanidou-Farmaki ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, RAS hastalarının periferik kanında sağlıklı kontrollere kıyasla proinflamatuar sitokinler (IL-2, IL-12 ve IFN-c) üretebilen T lenfositlerinin sayısının arttığını ve IL-10 üreten hücre sayısının ise azaldığı tespit edilmiştir (108). Ayrıca Borra ve ark., RAS'lı hastalarda Th2 gen kümesine kıyasla Th1 tipi yanıt gen kümesinin ekspresyonunun arttığını göstermiştir (102). Elde edilen bu sonuçlar proinflamatuar ve antienflamatuar sitokinlerin üretimindeki dengesizliğin, yatkın kişilerde otoimmünizasyon ve RAS gelişimine katkıda bulunabileceğini doğrulamaktadır (110-113).

2.1.2. Rekürrent Aftöz Stomatitin Tedavisi

RAS'ın gerçek nedenine yönelik kesin bir kanaat olmadığı için tümüyle etkin bir tedavi ve korunma yöntemi de bulunmamaktadır. Hastaların çoğunda görülen minör aftlar daha hafif seyrettiği için bu hastalarda ilaç tedavisine ihtiyaç duyulmaz. Hastalığın hafif seyrettiği pek çok hastada, oral hijyenin sağlanması, iritasyon yapmayan ve SLS içermeyen diş macunu kullanımı, uygun fırça kullanımı ve ağrı için palyatif tedavi ile hastalığı kontrol altına almak mümkündür (3,32). Ancak tekrarlayan aft atakları olan ve şiddetli ağrı sebebiyle yemek yeme, yutkunma ve konuşma güçlüğü yaşayan hastalarda günlük yaşam konforu ciddi oranda olumsuz etkilendiğinden dolayı semptomatik tedavi uygulanması gerekmektedir.

Uygulanacak tedavideki temel amaç; hastanın hissettiği ağrıyı azaltmak, beslenmenin sağlanması, ülserin iyileşme süresinin kısaltılması ve tekrar sıklığının azaltılmasıdır (3,114). Tedaviye başlanmadan önce hastalığın başlamasını tetikleyen muhtemel predispozan faktörler dikkate alınmalı ve altta yatabilecek kimyasal/gıda alerjileri, hematolojik eksiklikler, sistemik hastalıklar tespit edilmelidir. Ayrıca hastalara, ağız içi ülserleri tetikleyebileceği düşünülen sert, baharatlı, tuzlu, yüksek asitli, irrite edici gıdalardan ve alkollü içeceklerden uzak durmaları tavsiye edilmelidir (3).

2.1.2.1. Topikal tedavi: RAS tedavisinde genel olarak ilk seçenek lokal rahatlama sağlayan gargaralar, spreyler, lokal anestezikler, antienflamatuar, analjezik ajanlar ve topikal kortikosteroidler gibi hızlı sonuç veren etkin topikal ajanlardır. Topikal tedavi ile ağız içi enfeksiyonun önlenmesi, mekanik irritasyon ve lokal travmalara karşı koruyucu bariyer oluşturma, analjezik ve antienflamatuar etkinin sağlanması, aktif ülserlerin tedavi süresinin kısaltılması ve rekürrensin önlenmesi amaçlanmaktadır (114,115). Ancak ağız mukozasının hareketli olması, tükürük salgısının sürekli ağız içerisini yıkaması yemek yeme, içme ve konuşma fonksiyonlarının etkisi ağız içerisinde uygulanan topikal ajanların kalıcılığını azaltmakta ve etkisini kısıtlamaktadır (116). Topikal tedavi uygulanmadan önce ağız içerisinin uygun şekilde temizlenmeli mümkün olduğunca ülser yüzeyi kuru olmalı ve ülser alanının kaplayacak miktarda jel veya krem uygulanmalıdır. Uygulama sonrasında az yarım saat boyunca bir şey yemek ve içmekten kaçınılmalıdır. Topikal uygulama doktorun tavsiyesine göre günde 3-4 kez tekrarlanmalıdır.

2.1.2.1.a. Lokal anestezikler: RAS tedavisinde kullanılan lidokain ve benzokain içeren topikal anestezikler ağrının azaltılmasında oldukça etkilidir. Lidokain ve benzokain içeren krem, sprey veya jel formları ülser alanına doğrudan uygulandığında ağrıyı tatmin edici düzeyde azaltarak semptomatik rahatlama sağlamaktadır (33,117).

2.1.2.1.b. Lokal steroidler: Topikal anestezik ve antienflamatuar ajanların lokal olarak uygulaması ile istenen tedavi sağlanamadığı durumlarda topikal kortikosteroidler daha etkili sonuçlar verebilmektedir. Ayrıca topikal kortikosteroidlerin ve topikal anestezik ajanların beraber kullanımı da etkili sonuçlar sağlamaktadır (117). Topikal ve sistemik steroidler, aft oluşumu ile ilişkili enflamatuar süreci sınırlar ve T lenfositler üzerine etki göstererek hastalığın etyolojisinde yer alan alerji, travma ve mikroorganizmalar gibi etkenlere karşı gelişen immün yanıtı baskılarlar. Bu amaçla topikal steroidlerden olan fluosinonid, triamsinolon ve klobetasol RAS tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Doğrudan lezyonlara uygulanan bu topikal steroid preparatları, lezyonların daha kısa sürede küçülmesini sağlayarak iyileşmeyi hızlandırmaktadır (33,117).

Triamsinolon, klobetasol, prednizolon ve deksametazon gibi topikal steroidler RAS tedavisinde kullanılmaktadır. Na'mah ve ark. sık kullanılan triamsinolon asetonid

ile deksametazon pomadı karşılaştırdıkları çalışmalarında her ikisinin de benzer derecede etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (118).

Ağrılı ve daha büyük boyutlu olan majör lezyonlar için ise intralezyonel uygulanabilen kortikosteroidler daha iyi düzeyde fayda sağlamaktadır. Özellikle şiddetli ağrıya sebep olan derin ülserlerde intralezyonal triamsinolon uygulanmaktadır (119). Topikal jellerin veya pomatların kullanılamadığı ya da ülserlerin çok büyük boyutta veya sayıda olduğu durumlarda ise kortikosteroidler gargara şeklinde de kullanılabilmektedir (120). Ancak ağız gargarası formunda uygulandığında lezyon ile temas süresi kısalmakta ve etkinlik azalmaktadır. Bunun yerine ülser alanında temas süresinin daha uzun olduğu mukoadezif ürünler ile daha etkili sonuçlar alınabilmektedir (121).

Topikal steroidlerin uzun süreli kullanımında süper enfeksiyon riski göz önünde bulundurulmalıdır. Uzun süreli kullanımların oral kandidiyazise sebep olma ihtimali nedeniyle sekonder enfeksiyon riskini azaltmak için ağız hijyenine oldukça dikkat edilmelidir.

2.1.2.1.c. Antimikrobiyal, antiseptik ve antienflamatuar ajanlar: Tetrasiklin grubu ilaçlar, ülser oluşumunu indükleyen kollejenazların ve metalloproteinazların lokal olarak inhibisyonunu sağladıkları için RAS tedavisinin topikal uygulamaları arasında önemli bir yere sahiptir. Bu ilaçlar ayrıca immün modüle edici etki ve antienflamatuar etki göstererek hücre yıkımına ve ülser oluşumuna yol açan süreçleri önlerler (119,120,122,123). Tetrasiklin içeren ağız gargaraları iyileşme süresini hızlandırdıkları için semptomlarda rahatlama sağlamakta ve sekonder enfeksiyon gelişmesini önlemektedir. Ancak, tetrasiklinin, ülserlerin tekrarlaması üzerinde etkisi olmadığı tespit edilmiştir (124). Ayrıca tetrasiklinin 5 günden daha uzun süreli kullanımlarında tat ve deri reaksiyonları, oral kandidiyazis ve angular cheilitis, tat almada bozukluk, yanma ve boğaz ağrısı gibi yan etkiler bildirilmiştir (3). Doksisiklin veya minosiklin gibi diğer tetrasiklin türevi antibiyotiklerin de gargara veya jel formlarında RAS hastalarında ağrıyı azalttığı bulunmuştur (125).

Diklofenak ve hyaluronik asit içeren jellerin lidokain içeren jellere göre ağrıyı azaltmada daha etkili olduğu bulunmuştur (126). Gargara şeklinde kullanılan antibakteriyel bir ajan olan klorheksidinli gargaralar da RAS tedavilerinde kullanılmaktadır. Ancak bu ajanın ülserli gün sayısında azalma olduğunu belirten çalışmalar olduğu gibi, belirgin bir etkinliğinin olmadığını belirten yayınlar da

bulunmaktadır. Ayrıca tatsızlık hissi ve dişlerde renklenme gibi yan etkileri de söz konusudur. Gargara formunda bir diğer sık kullanılan benzidamin hidrokloridinin de geçici olarak ağrıyı azalttığı görülmüştür (119,127).

Bazı diş macunları ve gargaraların içerisinde bulunan triklosanın, antibakteriyel, antienflamatuar ve analjezik etkileri nedeniyle gargara formunda kullanıldığında oral ülserlerde iyileşmeye katkı sağladığı bildirilmiştir (128). Amleksanoks, mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber antienflamatuar ve antialerjik etkileri olan topikal bir diğer ajandır. Amleksanoksın aftöz ülserlerin prodromal döneminde %5'lik krem şeklinde kullanıldığında aftöz ülserlerin sayısında ve ağrıda azalma sağladığı tespit edilmiştir (129).

2.1.2.2. Sistemik tedavi: RAS'ın ciddi seyrettiği, topikal tedavilerin yeterli olmadığı, ülserlerin derin ve büyük olduğu durumlarda sistemik tedavilerin tercih edilmesi gerekebilmektedir.

2.1.2.2.a. Sistemik kortikosteroidler: Topikal tedavi seçenekleri ile tedavi sağlanamadığında sistemik kortikosteroidler kullanılmaktadır. Büyük ülseratif lezyonları kontrol etmek için en sık kullanılan kortikosteroid prednizolondur. Yapılan bir çalışmada 5 mg'lık prednizolon tabletler günde 1 kez 3 ay boyunca kullandırılmış ve sonuç olarak hastalarda ağrı, lezyon sayısı ve lezyon boyutunda belirgin azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca prednizolonun sistemik ve topikal formunun beraber kullanılması etkinliği daha da artırmak için tavsiye edilmektedir (130-132).

2.1.2.2.b. Kolşisin: Kolşisinin aftöz ülserlerin sayısını ve görülme sıklığını azalttığı ve tedavide etkili olduğu görülmüştür. Prednizolon ile kolşisinin etkisi karşılaştırıldığında her iki tedavinin de benzer derecede etkili olduğu ve lezyonları önemli ölçüde azalttığı ancak tedavi kesildiğinde aftların rekürrensinin sık karşılaşılan bir durum olduğu belirtilmiştir (133).

2.1.2.2.c. Dapson: Dapson hem antibakteriyel hem de antienflamatuar etkileri bulunan sentetik bir anilin türevidir. Nötrofillerin aktivasyonunu ve kemotaksisini engelleyerek Behçet hastalığında görülen oral ve genital ülserlerin sayısını ve boyutunu azalttığı bilinmektedir. Ancak sıklıkla methemoglobinemi ve hemoliz gibi yan etkileri görülmektedir (134).

2.1.2.2.d. Antimetabolitler: Aftöz ülser tedavisinde azathioprin ve metotreksatın etkili olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak sistemik yan etkileri nedeniyle kullanımı oldukça kısıtlıdır (130).

2.1.2.2.e. Siklosporin: Siklosporinler, güçlü immünosüpresif ilaçlardır. T hücre aracılı immüniteyi baskıladıkları için immün sistem bozukluklarının rol aldığı pek çok hastalığın tedavisinde kullanılırlar. Behçet hastalığı tanısı konmuş hastalar ile yapılan bir çalışmada çeşitli dozlarda siklosporin ile tedavi edilen hastaların %70'inde aftöz ülserlerde azalma görüldüğü bildirilmiştir (130).

2.1.2.2.f. Talidomid: Orogenital aftlarda etkili olduğunu bildiren çalışmalar olsa da teratojenik etkileri ve diğer ağır yan etkileri sebebiyle kullanımı tavsiye edilmemektedir (130).

2.1.2.2.g. İnterferon-α: Behçet hastalığında interferon-α ile tedavinin orogenital lezyonlarda parsiyel ya da tamamen gerileme sağladığı tespit edilmiştir (135).

2.1.2.2.h. Penisilin G: Penisilin G gibi sistemik antibiyotikler üzerinde yapılan çalışmalar ilacın ülserlerin boyutunu küçülttüğü ve semptomların iyileşmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (136).

2.1.2.2.ı. Pentoksifilin: Pentoksifilin, TNF-α gibi birçok proinflamatuar sitokinin üretimini inhibe etmekte ve CD8+ T hücreleri üzerine supresif etki göstermektedir. Scully ve ark. RAS hastalarında, nötrofil fonksiyonu, kemotaksis ve TNF-α inhibitörü olan pentoksifilin ile tedavi edilebileceğini bildirmiştir (137). Bu ilacın ülserlerin ağrı, boyut ve sayısında azalma sağlamasının yanında ilaç tedavinin kesilmesi ile birlikte lezyonların nüks ettiği tespit edilmiştir (138,139).

2.1.2.2.i. Levamizol: CD4+ hücre/ CD8+ hücre oranını düzenleyen immünolojik etkilere sahip bir ilaçtır. RAS tedavisinde etkisini değerlendirmek için birçok çalışma yapılmıştır ve farklı başarı oranları ile çeşitli sonuçlar bildirilmiştir (140). Steroidlerle beraber ya da monoterapi olarak kullanılan levamizolün oral ve genital aftlarda etkili olduğu belirtilmiştir (141,142). Yapılan çalışmalarda, levamizol tedavisinin aft sayısını ve iyileşme süresini azalttığı, ülser rekürrensini ise hastaların %43'ünde yarıya düşürdüğü belirtilmiştir (137,140).

2.1.2.2.j. İnfliximab ve Etanercept: Anti-TNF antikoru olan infliximabın oral ve genital ülserler üzerine oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Bu ilaç genellikle

intravenöz yolla uygulanır ve ilk doz sonrasında lezyonlarda hızlı bir iyileşme sağlanırken yaklaşık 6-8 hafta boyunca rekürrens gelişmez (143). Etanercept, TNF-α reseptörü olan bir füzyon proteinidir. Yapılan çalışmalar subkutan uygulandığında oral aftöz lezyonlarda oldukça iyi yanıt gözlendiği belirtilmiştir (144,145).

2.2. KARADUT-*MORUS NİGRA* L.

Morus nigra L. (*M. nigra*), Türkiye'de karadut olarak bilinen Moraceae familyasına ait ağaç formunda bir bitkidir. Morus adının Latince gecikme anlamına gelen "mora" kelimesinden türediği düşünülmektedir. Bu bitki çiçek açmak için soğuk havanın tamamen bitmesini beklediğinden dolayı en geç çiçek açan bitkilerden birisidir. Bu nedenle ağaçların akıllısı olarak da anılmaktadır (146). *M. nigra*, Güneybatı Asya ve Orta Asya için yerel bir bitki türüdür. Aynı zamanda yüzyıllardır Avrupa'da ve Akdeniz çevresinde yetiştirilmektedir. Anadolu, kaliteli karadut yetiştirmek için uygun şartlara sahiptir (146).

Karadut ağacının hemen hemen tüm kısımları tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Meyveleri, yaprakları, kökleri, gövde kabukları gibi tüm kısımlarından çeşitli sekonder metabolitler izole edilerek tanımlanmıştır. Bitkiden elde edilen ekstrelerin ve izole edilen bileşiklerin çok yönlü farmakolojik ve biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Karadutun ülkemizde geleneksel olarak halk arasında oldukça yaygın kullanımı mevcuttur. Yapılan etnobotanik ve etnofarmakolojik çalışmalar yaprak, meyve, kök ve kök kabuklarının halk arasında tedavi edici amaçlarla kullanıldığını göstermektedir. Pek çok farmakolojik etkisi bulunan *M. nigra* L. meyveleri halk arasında pekmez, marmelat, meyve suyu formunda sıklıkla ağız yaralarının tedavisinde kullanılmaktadır. Karadut meyvelerinde fenoller, flavonoidler, antosiyaninler, karotenoidler, yağ asitleri, askorbik asit ve çeşitli organik asitler gibi biyolojik olarak aktif birçok bileşen bulunmaktadır (9). Bu da özellikle tamamen olgunlaşmış meyvelerinde yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (10). Ayrıca yaprakların diüretik, hipoglisemik ve hipotansif aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (12). Buna karşılık kök kabuğu uzun yıllardır antienflamatuar, antitussif ve antipiretik amaçlar için kullanılmaktadır (11).

Farklı çalışmalar, tip II diyabetli hastalarda glukoz seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir (13). Ayrıca geleneksel olarak dizanteriye karşı bir preparat olarak ve tonik, yatıştırıcı, müshil, antihelmintik, balgam söktürücü ve emetik olarak

kullanılmaktadır (14). Son zamanlarda ise inflamasyon ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu inhibe eden karadut meyvelerinin yüksek antinosiseptif özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (15). Meyvelerindeki antioksidan ve antienflamatuar etki gibi mevcut biyolojik aktiviteleri, polifenol bileşenleri ve özellikle antosiyaninler ile ilişkili bulunmuştur (16). *M. nigra,* meyve ve yaprak ekstrelerinin potansiyel farmakolojik etkileri ve halk arasındaki geleneksel kullanımı göz önünde bulundurulduğunda mukoadezif jel formunda oral ülserlerin tedavisinde kullanılabilecek ürünlerin geliştirilmesi açısından yüksek potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

2.2.1. Türkiye'de Geleneksel Halk Tıbbında Kullanımı

Anadolu'da özellikle karadut meyveleri ile yapılan pekmez ve meyve suları ağız yaralarının tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (18). Halk arasında meyvelerden hazırlanan şurup ve gargaralar; ağız ve boğaz hastalıklarında, bademcik enfeksiyonlarında, ağız yaralarında, dişeti enfeksiyonlarında, çocuklarda ağız içerisinde görülen pamukçuk enfeksiyonlarında kullanılır. Ayrıca yaprak infüzyonları ateş düşürücü, ağrı kesici olarak; yaprak dekoksiyonları ise diş ve diş eti iltihaplarında ve yaralarında kullanılmaktadır. Ayrıca yaprakları şeker hastalığına karşı kullanılmaktadır. Kök ve kök kabukları ise müshil ve tenya düşürücü olarak kullanılmaktadır (18,19).

2.2.2. Fitokimyasal Bileşimi

Karadutun meyve, yaprak, gövde ve kök kabuklarında farklı bileşenler tespit edilmiştir. Genel olarak antosiyaninler, organik asitler, flavonoidler bulunmaktadır. *M. nigra* meyvelerinin besin öğeleri Tablo 2.2.'de verilmiştir (9,147-149).

M. nigra meyveleri yüksek oranda antosiyanin içerir. Meyvelerinde siyanidin-3-*O*-glikozit, siyanidin-3-*O*-rutinozit, siyanidin-3-*O*-ramnozit, pelargonidin-3-*O*-glikozit, pelargonidin-3-*O*-rutinozit bulunmaktadır. Meyvelerinde ayrıca kersetin, gallik asit, vanilik asit, klorojenik asit, şiringik asit, sinnamik asit, sinapik asit, kamferol, kersetin-3-*O*-rutinozit, kaempferol-3-*O*-rutinozit bulunmuştur (149-151). Yaprak ekstrelerinde kuinik asit, askorbik asit, sitrik asit, gallik asit, protokateşik asit, klorojenik asit, kersetin, kersetin di-*O*-glikozit, rutin, kamferol 3-*O*-rutinozit, izokuersitrin, morusin, germanikol bileşikleri tespit edilmiştir (152).

Kök ve kabuklarında ise 1-deoksinojirimisin (DNJ), norartokarpanon, eukrenon, mornigrol A, mornigrol B, mornigrol C, mornigrol D, mornigrol G, mornigrol H, dihidrokamferol, albanin A, albanin E, morasin M, albafuran C, albafuran A, albafuran B, mulberrofuran L, stilbenoid oksiresveratrol, morasin, kuvanon C, α-amirin asetat, β-sitosterol-3-*O*-*β*-D-glikozit, soroseal, sanggenon E, 5'-geranil-5,7,2',4'-tetrahidroksiflavon, steppogenin-7,40-di-*O*-*β*-D-glikozit, 5,7-dihidroksikumarin-7-(6-*O*-*β*-dapiofuranosil-*β*-Dglikopiranozit), mulberrozit A, mulberrozit B, 7-[[6-O-(6-deoksi-*α*-L-mannopiranozil)-*β*-Dglikopiranozil]oksi]-2H-1-benzopiran-2-one, kserobozit, steppogenin-7-*O*-*β*-D-glikozit, morasinozit M, 2,4,2',4'-tetrahidroksikalkon, moracin O, kuvanon G, moracin C, cudraflavone C, moracin N, kuvanon H, morakalkon A, mulberrofuran J, kuvanon U, kuvanon E, oksiresveratrol-2-*O*-*β*-D-glikopiranozit, oksiresveratrol-3'-*O*-*β*-D- glikopiranozit, mulberrofuran B bileşikleri daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (153-161).

Tablo 2.2: *Morus nigra* L. meyvelerinin besin öğeleri

İçerik	***Miktar***	***Kaynak***
Lipit (%)	0,95	(9,147,149)
Linoleik asit (%)	61,85	
Palmitik asit (%)	12,06	
Oleic acid (%)	14,75	
Protein (%)	8,9–10,85	
P (mg/100g)	232	
K (mg/100g)	922	
Ca (mg/100g)	132	
Cu (mg/100g)	0,4	
Fe (mg/100g)	4,2	
Na (mg/100g)	59	
Mg (mg/100g)	106	
Mn (mg/100g)	4,2	
Se (mg/1000g)	0,008	
Zn (mg/100g)	3,2	
Vitamin C (mg/100mL)	21,8	
Tiamin (mg/100mg)	58	
Nikotinik asit (mg/100mg)	0,2	
Riboflavin (mg/100mg)	92	

2.2.3. *Morus nigra* L. Farmakolojik ve Biyolojik Etkileri

2.2.3.1. Antioksidan aktivite: Oksidatif stres, vücudun oksidan ve antioksidan sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelmektedir. Bu bozulma reaktif oksijen türleri (ROS) gibi hücre içi oksitleyici ajanların sistemik artışının yanı sıra antioksidan savunma kapasitesinin azalması sonucu oluşmaktadır.

Yaşlanma, kanser, diyabet, ateroskleroz, kronik enflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, HIV enfeksiyonu, iskemi ve reperfüzyon hasarı ve obstrüktif uyku apnesi gibi pek çok hastalıkta ROS'un kritik rolü bulunmaktadır (162,163). Doğal kaynaklardan elde edilen fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi fitokimyasallar yüksek antioksidan aktiviteye sahip bileşenler içerdiklerinden pek çok araştırmaya konu olmuşlardır (164-166). Karadut, antosiyaninler açısından oldukça zengin olduğundan dolayı sahip olduğu yüksek antioksidan kapasite pek çok çalışma ile doğrulanmıştır. Yüksek antioksidan özelliklerinin yanı sıra antienflamatuar, antimikrobiyal, antiobezite, antidiyabetik, antihiperlipidemik, antihipertansif, kardiyoprotektif ve antikanser gibi pek çok biyolojik aktiviteye de sahiptir (167-169).

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sülfonik asit), süperoksit anyon radikali ve hidroksil radikali süpürücü etki gibi çok sayıda araştırma yöntemi ile *M. nigra*' nın antioksidan özellikleri kanıtlanmıştır (11). Ayrıca lipid peroksidasyon testi (170-172), antioksidan enzim aktivitesi (173-175), β-karoten ağartma testi (176), demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) testi (168,177,178), protein karbonil testi (170,173), GSH (Glutatyon) ölçümü (179), hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynaklı hasar testi (180,181), NO radikal süpürme testi (182), süperoksit dismutaz (SOD) benzeri aktivite (183), bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) deneyi (178,184,185), fosfomolibden deneyi (184,186) ve ROS ölçümü (187) gibi tüm antioksidan ölçüm yöntemleri ile yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu açıkça gösterilmiştir.

Bu in vitro deney ve testlerin yanı sıra karadut meyve ve yaprak ekstrelerinin insülin sinyal yolağına katılabildiği, çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenlediği, SOD, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalazın (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini iyileştirdiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (188,189). Ayrıca malondialdehit (MDA), kan üre nitrojeni (BUN), serum kreatinin (Scr), NO ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) konsantrasyonunu azaltmaktadır

(177,190). Meyvelerde bulunan antosiyaninler ise lipid peroksidasyonunu önlemekte ve DNA'nın üç boyutlu yapısını ve termal stabilitesini güçlendirerek DNA'yı oksidatif hasardan korumaktadır (149,178,191).

2.2.3.2. Antienflamatuar aktivite: Enflamasyonun kardiyovasküler, otoimmün, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok majör kronik hastalığı da başlatan ilk basamak olduğu düşünülmektedir (192). Bu sebeple vücuttaki enflamatuar yanıtların inhibe edilmesi veya kontrol altına alınması, kronik hastalıkların tedavisinde temel yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmektedir. Padilha ve arkadaşlarının *M. nigra* yaprak ekstrelerinin antienflamatuar etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, karragenan kaynaklı pençe ödemi ve pamuk pelet implantasyonu ile indüklenen fibrovasküler doku büyümesi araştırılmıştır. Ekstrelerin karragenan tarafından indüklenen pençe ödemini azaltarak antienflamatuar etki gösterdiği ve granülomatöz doku oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur (193).

Wang ve ark., *M. nigra* kök kabuklarından izole ettikleri üç yeni bileşik (mornigrol D, mornigrol G ve mornigrol H) ile daha önce bilinen altı bileşiğin (norartokarpetin, dihidrokampferol, albanin A, albanin E, morasin M ve albafuran C) antienflamatuar aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında; mornigrol D ve norartocarpetin bileşiklerinin, trombosit aktive edici faktör tarafından indüklenen sıçan polimorfonükleer lökositlerinden β-glukuronidaz salınımını inhibe ederek güçlü antienflamatuar aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (158). Zelová ve ark., *M. nigra*'nın kök kabuğundan izole edilen bileşiklerin antienflamatuar aktivitelerini araştırmış ve lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan makrofajlarda, izole edilen ganggenon E'nin kontrole kıyasla TNF-α üretimini önemli ölçüde azalttığını tespit etmiştir (159).

Chen ve ark., *M. nigra* meyvelerinin flavonoid ekstresinin ksilen kaynaklı kulak ödemini ve karragenan kaynaklı pençe ödemini doza bağlı olarak önleyebileceğini bildirmiştir. Meyve ekstrelerinin ksilen kaynaklı inflamasyonda IL-1β, TNF-α, NO ve interferon-gama (IFN-y) dahil proinflamatuar sitokinlerin seviyelerini de önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (190).

M. nigra meyve ve yaprak ekstrelerinin LPS ile indüklenen septik farelerde bronkoalveloar lavaj sıvısındaki lökosit sayısını ve serum TNF seviyelerini önemli ölçüde azalttığını ve deneklerin hayatta kalma oranını artırabildiği gösterilmiştir. *M. nigra* ekstrelerinin uygulanmasıyla çoğu hepatik ve serum sitokin düzeyleri değişmemiş olsa

da, sepsisin önemli bir aracısı olan TNF'nin serum düzeyleri, *M. nigra* ekstreleri ile tedavi edilen grupta septik hayvan grubuna göre önemli ölçüde daha düşük tespit edilmiştir (189).

Ribeiro ve ark., *M. nigra*'nın etanolik ekstresinin farelerde yılan zehri ile indüklenen pençe lezyonları üzerindeki antienflamatuar ve antinosiseptif etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında *M. nigra* ekstreleri ve bu ekstrelerden izole edilen rutin ve kersetin bileşiklerinin etkinliklerini değerlendirmişlerdir. *M. nigra* etanolik ekstresinin, rutin ve kersetinin yılan zehrinin neden olduğu lokal ödemi azalttığı, ayrıca etanolik ekstrenin serotonin ve bradikinin tarafından tetiklenen ödemi önlediği, karragenan tarafından indüklenen pençe ödemi ve peritoneal lökosit infiltrasyonunu da azalttığı tespit edilmiştir. *M. nigra*'nın muhtemelen lökosit göçünün inhibisyonu, serotonin ve bradikinin eylemlerinin modülasyonu yoluyla antienflamatuar ve antinosiseptif etkiler gösterdiği düşünülmüştür. Görülen antienflamatuar aktivitenin, *M. nigra* ekstrelerinin ilaç dağıtım sistemlerine dahil edilmesinden sonra bile korunduğu görülmüştür (194).

2.2.3.3. Antinosiseptif etki: Souza ve ark. tarafından *M. nigra* kök kabuklarından izole edilen morusin bileşiğinin antinosiseptif etkisi bildirilmiştir. Morusin, asetik asit kaynaklı karın kasılması ve formalin kaynaklı ağrı üzerinde önemli derecede etki göstermiş ve ayrıca farelerde sıcak plaka testinde de etkili bulunmuştur (195). Padilha ve ark. farelerde *M. nigra* yapraklarının metilen klorür ekstresinin antinosiseptif etkisini araştırmış ve *M. nigra* yaprak ekstrelerinin, herhangi bir akut toksisite olmaksızın asetik asit kaynaklı kıvranmayı ve formalin kaynaklı ağrıyı önemli ölçüde ve doza bağlı olarak azalttığı tespit etmiştir (193). Chen ve ark. *M. nigra*'nın taze meyvelerinden elde edilen toplam flavonoid ekstrelerinin ve ana aktif bileşenlerin antinosiseptif özelliklerini değerlendirmiş ve *M. nigra*'dan elde edilen toplam flavonoidlerin, formalin ile indüklenen ağrı-tepki davranışlarının süresini doza bağlı olarak düşürdüğünü göstermiştir (190). Yazarlar daha sonra yaptıkları çalışmada ise üç farklı dut meyvesinin ekstrelerini (*M. alba, M. nigra ve M. mongolia*) karşılaştırmış ve *M. nigra* meyvelerinin diğer türlere göre daha fazla antosiyanin ve flavonol içerdiğini bulmuştur. *M. nigra*'dan elde edilen toplam flavonoid ekstresi ile tedavi edilen grupta formalin ile indüklenen sekonder ağrı fazının (enflamatuar faz) süresi, kontrol grubundan önemli ölçüde daha kısa tespit edilmiştir. Enflamatuar sitokin IL-6'nın azaldığı ve

antienflamatuar sitokin IL-10'un ise arttığı bulunmuştur. Bu çalışmada ilginç bir şekilde, *M. nigra* meyvelerinin üç ana bileşeninin (siyanidin-3-*O*-glikozit, rutin ve izokersetin) bir karışım olarak ekstre halinde kullanıldıklarında formalin kaynaklı ağrının süresini önemli ölçüde azaltsa da, bu üç ana bileşeninin tek tek kullanıldığında aynı etkiyi göstermedikleri tespit edilmiştir (15).

2.2.3.4. Antimikrobiyal aktivite: Yapılan çalışmalar *M. nigra* yaprak, meyve ve kök kabuğu ekstrelerinin, bu ekstrelerin fraksiyonlarının ve izole edilen bazı bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerini ortaya koymuştur. Tahir ve ark., *M. nigra* yaprak ekstrelerinin ve ekstrelerin fraksiyonlarının antibakteriyel etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında etil asetat fraksiyonunun *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) bakterilerine karşı; kloroform fraksiyonunun, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *B. subtilis*'e karşı; metanol fraksiyonunun *B. subtilis'*e karşı antibakteriyel özellik gösterdiğini tespit etmiştir (196). Souza ve ark., tarafından yapılan çalışmada, *M. nigra* yapraklarının etanolik ekstresinin *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ve *E. coli*'ye karşı bakterisidal aktiviteler sergilediği bulunmuştur. Ayrıca yaprakların hegzan, kloroform ve etil asetat ekstrelerinde de *B. cereus* ve *E. faecalis*'e karşı güçlü antibakteriyel aktivite gözlenmiştir (176).

Bir diğer çalışmada *M. nigra* meyvelerinin toplam flavonoid ekstresinin antibakteriyel aktiviteleri, *E. coli, P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı değerlendirilmiş ve üç suşu da güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (15). *M. nigra* meyvelerinin taze meyve suyunun beş Gram-pozitif ve üç Gram-negatif bakteri suşuna karşı antimikrobiyal aktiviteleri, geleneksel antibiyotiklerle karşılaştırılmış ve standart dozlarda diğer antibiyotiklerden genellikle daha küçük inhibisyon bölgeleri üretse de, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere özellikle de *P. aeruginosa*'ya karşı geniş spektrumlu bir antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (197).

Minhas ve ark., farklı çözücüler ile hazırlanan beş farklı *M. nigra* meyve ekstresinin konvansiyonel antibiyotikler ve antifungal ajan olan nistatin ile karşılaştırmalı olarak, 16 bakteri ve 2 mantar suşuna karşı antimikrobiyal etkisini araştırmıştır. *M. nigra* meyvelerinin etanolik ve aseton ekstrelerinin, *E. coli, S. aureus* ve *Neisseria spp.*'ye; metanolik ekstrenin *Klebsiella pneumoniae* ve *Neisseria spp*.'ye; kloroform ekstresinin

Serratia marcesscens, Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*), *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a ise karşı yüksek derecede duyarlı inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir (198).

M. nigra meyvelerinin etanolik ekstresinin akneye neden olan iki suşa, (*S. epidermidis* ve *Propionibacterium acnes*'e (*P. acnes*)) karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bulunmuştur (199). *M. nigra*'nın kök kabukları, meyveleri ve yapraklarından ayrı ayrı hazırlanan ekstrelerin *S. epidermidis* ve *P. acnes*'e karşı antibakteriyel etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada ise kök kabuklarının daha güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (200).

M. nigra meyve suyu ve metanol ekstresinin *Candida (C.) albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis* ve *Geotricum candidum*'a karşı antikandidal etki sergilediği de görülmüştür (201).

Mazzimba ve ark., *M. nigra*'dan izole edilen oxyresveratrol, moracin M, cyclomorusin, morusin, kuwanon C ve kuwanon C'nin türevi bileşenlerin *S. aureus, B. subtilis, Micrococcus flavus, S. faecalis, Salmonella abony* ve *P. aeruginosa*,'ya karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (202).

Mascarello ve ark. çalışmalarında, *M. nigra* kök kabuğundan izole edilen sekiz bileşiğin (Kuwanon L, G ve H; cudraflavanone A; morusin, oxyresveratrol; chalcomoracin ve norartocarpetin) anti-tüberküloz aktivitesini değerlendirerek *M. tuberculosis* protein tirozinaz fosfataz (PTP) inhibitörü açısından potansiyellerini belirlemişlerdir. Bileşiklerin hepsi, *M. tuberculosis* PTP-B'yi önemli ölçüde inhibe etmiş ve en güçlü iki bileşik kuvanon G ve H olarak bulunmuştur. Ayrıca kuvanon G, sitotoksik olmayan bir konsantrasyonda makrofajlar içinde *M. tuberculosis*'in büyümesini %61,3 oranında inhibe ederek, izole edilen en umut verici antitüberküloz etkili bileşik olarak tespit edilmiştir (203).

2.2.3.5. Antikanser aktivite: Kanser, düzensiz ve kalıcı hücre büyümesi ve proliferasyonu ile karakterize yaşamı tehdit eden bir hastalık durumudur. Kanserde hücresi proliferasyonunu sürdürmenin ana itici güçlerinden biri olarak programlanmış hücre ölümü (apoptoz) indüksiyonu kanser tedavisinde makul bir strateji olarak kabul edilmektedir (204-206).

Çakıroğlu ve ark., çalışmalarında *M. nigra* meyve ekstrelerinin ve *M. nigra* 'dan elde edilen morniga M'nin antikanser aktivitelerinin insan kolorektal kanser (HT-29)

hücre hattında, hücre canlılığını doza bağlı olarak önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (207). Qadir ve ark., *M. nigra* yapraklarının sulu metanol ve hegzan ekstrelerinin, serviks adenokarsinomu (HeLa) hücre hattına karşı doza bağlı antikanser aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (208). *M. nigra* meyvelerinin çeşitli ekstrelerinin insan adenokarsinom hücre hatlarına karşı anti-proliferatif ve apoptotik etkileri de bildirilmiştir (209,210).

Ahmet ve ark., *M. nigra*'nın taze ve kuru meyve ekstrelerinin antikanser etkilerini MCF-7 hücre hattı (insan meme kanseri) üzerinde değerlendirmiş ve etanolik ekstrelerin doza ve zamana bağlı olarak MCF-7 hücrelerinin hücresel büyümesini engellediğini göstermiştir (209). Turan ve ark., *M. nigra* meyve ekstresinin PC-3 hücreleri (insan prostat kanseri) üzerindeki antikanser aktivitelerini değerlendirmiş ve PC-3 hücrelerine karşı orta derecede sitotoksisite sergilediğini tespit etmişlerdir (210).

2.2.3.6. Antidiyabetik aktivite: Diabetes mellitus, insülin üretimi, salgılanması ve/veya kullanımında metabolik bozulmaya bağlı hiperglisemi ile karakterize kronik bir endokrin bozukluktur. Diyabet, hastalarda meydana gelen kardiyovasküler, nörolojik ve renal sistemlerdeki birçok önemli komplikasyonun gelişimi ile yakından ilişkilidir (211).

M. nigra'nın çeşitli kısımlarından elde edilen ekstrelerinin ve izole edilen bazı aktif bileşenlerinin antidiyabetik etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Abd El-Mawla ve ark., *M. nigra* yaprak ekstrelerinin ve hücre kültürlerinde flavonoid içeriklerinin birikmesini indüklemek için metil jasmonat ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin hipoglisemik etkinliğini araştırmış ve. *M. nigra*'dan elde edilen ekstrelerin, streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda doza bağlı olarak plazma glukoz konsantrasyonlarını düşürdüğünü ve insülin seviyelerini yükselttiğini tespit etmiştir. Ayrıca hücre kültüründen elde edilen ekstreler ile tedavi edilen grupta biraz daha yüksek hipoglisemik etki gözlenmiş ve bu durum metil jasmonat tarafından indüklenen flavonoidlerin ilave etkisini göstermiştir (154). Başka bir çalışmada da benzer şekilde *M. nigra* yapraklarının hidroetanollü ekstreleri nikotinamid ve STZ ile indüklenen diyabetik ratlarda açlık kan şekerini ve 2 saatlik glikoz konsantrasyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edildi (212).

Kan damarlarında diyabetin neden olduğu değişiklikler, metalloproteinazların (MMP'ler) patofizyolojik aktivitesini artırabilir. MMP'lerin inhibisyonunun insülin

direnci ve oksidatif stresi iyileştirebileceği bilinmektedir (173,213). Araujo ve ark., *M. nigra* yaprak ekstrelerinin hipoglisemik etkisinin diyabetik sıçanların karaciğerlerindeki MMP-2 ekspresyon ve aktivitesinin azalması yoluyla gösterdiğini tespit etmişlerdir (173). Ayrıca *M. nigra* dallarının ekstrelerinden izole edilen fenolik bileşikler ve izoprenil flavonoidlerin, peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptör gama (PPARy) aktivasyonu ve α-glukozidaz inhibisyonu mekanizmaları ile oldukça iyi düzeyde antidiyabetik aktivite gösterdiği bulunmuştur (214,215). Diğer bir çalışmada, *M. nigra* yapraklarının sulu ekstresi ile 3 haftalık tedavi uygulanan, diyabetik ve diyabetik olmayan gebe sıçanlarda serum glikoz seviyelerini etkilememiş ancak yavru sıçanlarda diyabete bağlı oluşan anomalilerin azaldığı tespit edilmiştir (175).

Silva ve ark., diyabetik farelerde *M. nigra* yapraklarının hegzan fraksiyonunun karbonhidratların sindirimi ve emilimi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada uygulanan ekstrenin karbonhidrat sindirimini azaltarak antihiperglisemik etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Görülen bu etkinin ekstrede bulunan izokersetin ve kamferol-3-O-ramnozit bileşenlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (216). Silva ark., tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *M. nigra* yapraklarının etanolik ekstresinin hegzan ve kloroform fraksiyonları antidiyabetik özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Sadece hegzan fraksiyonu ile uygulanan tedavi hem açlık hem de tokluk hiperglisemiyi azaltmıştır. Ayrıca hegzan fraksiyonu deneklerin vücut ağırlığını, hepatik glikojen içeriğini korumuş; tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri ve nitrit seviyelerini azaltmış ve süperoksit dismutazı restore etmiştir. Hegzan fraksiyonu ile kompleks karbonhidratların sindirimi ve bağırsak glikoz emilimi önlenmiştir. Elde edilen sonuçlar *M. nigra*'nın antidiyabetik aktivitesinin ince bağırsakta insülin duyarlılığındaki artış, antioksidan özellikler ve karbonhidrat emilimindeki azalma ile açıklanabileceğini düşündürmektedir (216,217).

Junior ve ark., tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *M. nigra* yapraklarının etanolik ekstresinin akut hipoglisemik, hipolipidemik ve antioksidan etkileri, 14 gün boyunca normal ve alloksan kaynaklı diyabetik tedavi ile değerlendirilmiş ve bu ekstrenin hiperglisemiyi azalttığını, oral glukoz toleransını iyileştirdiğini ve alloksan ile indüklenen diyabetik sıçanlarda aterojenik indekste bir azalmaya yol açan dislipidemi ve oksidatif stresi en aza indirdiğini tespit etmişlerdir (218). Karadut meyvelerinin ise antidiyabetik aktivitesi hakkında henüz yayınlanmış bir rapor bulunmamaktadır.

2.2.3.7. Antihiperlipidemik aktivite: Kolesterol, hücre zarının yapısal bir bileşeni olup akışkanlığı ve geçirgenliği modüle eden aynı zamanda steroid hormonu ve safra asidi sentezi için öncü görevi yapan bir lipit molekülüdür. Serumda aşırı kolesterol birikimi ile karakterize tipik bir hiperlipidemi türü olan hiperkolesterolemi, koroner kalp hastalıkları ve ateroskleroz ilerleme çok ciddi bir risk faktörüdür. Ayrıca, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolün azaltılmasının ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol düzeylerindeki iyileşmenin, anti-aterojenik duruma fayda sağlayacağı bildirilmiştir (219-221).

Volpato ve ark., *M. nigra* sulu ekstresinin diyabetik ve diyabetik olmayan gebe sıçanlarda maternal lipid ve oksidatif stres profili, üreme sonuçları ve fetal anomali insidansı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında diyabet oluşturulan sıçanlarda, yaprak ekstresi ile tedavi edilen grubun MDA, kolesterol, trigliseritler ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) düzeylerinde azalma tespit etmiştir. *M. nigra* ekstresi ile tedavi edilen diyabetik sıçanlardan elde edilen fetüslerde, diyabetik gruba kıyasla daha az iskelet ve viseral anomali görülmüştür (175).

Mahmoud tarafından *M. nigra* meyvelerinin hiperkolesterolemik diyetle beslenen sıçanlarda lipit profili ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada, *M. nigra* meyveleri ile beslenen sıçanlarda hiperkolesterolemik diyetle beslenen sıçanlara kıyasla MDA, NO, toplam kolesterol, trigliserit, LDL ve VLDL düzeylerinde önemli düşüşler görülmüştür. Ayrıca toplam antioksidan kapasite ve HDL düzeylerinde önemli artış tespit edilmiştir. Sonuç olarak *M. nigra* tüketiminin hiperkolesterolemi riskini azaltabileceği sonucuna varılmıştır (172).

Zeni ve ark., hiperlipidemik sıçanlar ile yaptıkları çalışmada *M. nigra* yaprak infüzyonlarının lipid düşürücü etkisini değerlendirmiştir. *M. nigra* yaprak infüzyonu ile tedavi edilen deneklerde serum kolesterol, trigliserit ve normalize edilmiş lipoprotein seviyelerinde düşüş görülmüştür. Ayrıca yaprak infüzyonu hiperlipidemik sıçanların karaciğer, böbrek ve beyinlerinde lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir. Bu çalışma, *M. nigra* yaprak infüzyonunun dislipidemik durum ve ilgili oksidatif stres üzerinde potansiyel bir terapötik etkisi olduğunu göstermektedir (222).

Jiang ve ark., deneysel olarak ateroskleroz oluşturulan sıçanlarda *M. nigra* etanol ekstresinin etkilerini ve altında yatan mekanizmaları araştırdıkları çalışmalarında ekstre ile tedavi edilen grupta, kolesterol, trigliserit ve LDL kolesterol düzeylerinin önemli

ölçüde düştüğünü; ayrıca MDA seviyesinin önemli ölçüde azaldığını, anti-oksidatif enzim aktivitelerinin ise arttığını tespit etmişlerdir. Histopatolojik incelemeler *M. nigra* etanol ekstresinin aterosklerotik sıçanlarda hepatik steatozu azalttığını ve intima-media kalınlığını ve arteriyel aterosklerotik lezyonları azalttığını göstermiştir. Bu sonuçlar, aterosklerotik sıçanlarda *M. nigra* etanol ekstresinde bulunan antosiyaninler ve flavonoidlerin lipid metabolizması anormalliklerini düzenlediği, antioksidatif aktiviteleri artırdığı ve aterosklerotik lezyonları azaltarak ateroskleroz gelişimini baskıladığını göstermektedir (171).

2.2.3.8. Organ koruyucu aktivite

2.2.3.8.a. Hepatoprotektif etki: Karaciğer, toksinleri uzaklaştırmak, enerji depolamak, immünolojik roller, salgı ve boşaltım işlevleri dahil olmak üzere pek çok hayati göreve sahiptir. Virüsler, hepatotoksik kimyasallar, ilaçlar, alkol ve kalıtsal bozuklukların neden olduğu bazı hastalıklar karaciğerde hasara neden olabilmektedir. Oksidatif stres ve inflamasyon, karaciğer hasarının en önemli nedenlerindendir (223).

Tag, metotreksata bağlı gelişen hepatotoksik etkisine karşı *M. nigra* yapraklarının etanolik ekstresinin hepatoprotektif etkisini hem vivo hem in vitro (insan hepatoma HepG2 hücreleri) olarak değerlendirmiştir. Denekler metotreksat ile birlikte yaprak ekstresi aldıklarında aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP) ve laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitelerinde önemli bir azalma sağlayarak karaciğer hasarını azalttığı görülmüştür. *M. nigra* ekstresi ve metotreksat ile birlikte tedavi edilen grupta karaciğer ve vücut ağırlığı arasındaki oran olarak tanımlanan ve karaciğer hasarı ve karaciğer iltihabı için bir gösterge olarak kabul edilen hematosomatik indeks de sadece metotreksat alan grup ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde azalmıştır. Karaciğerin histolojik yapısı, tek başına metotreksat alan ratlar ile karşılaştırıldığında, yaprak ekstresi verilen grupta neredeyse normal karaciğer görünümü ortaya koyduğu tespit edilmiştir (224).

Karbon tetra klorür (CCl4)'ün karaciğer enzimlerinin serum seviyelerini, hepatositlerde oksidatif stresi arttırdığı ve bu bileşiğe maruz kalan sıçanların karaciğerinde patolojik değişikliklere (artan Kupffer hücrelerinin sayısı, vakuolizasyon ve pericentral ven nekrozu) neden olduğu gösterilmiştir. *M. nigra* meyvelerinin ve meyve ekstrelerinin CCl4'e maruz kalan hücrelere/hayvanlara uygulanması, glutatyon peroksidaz ve SOD aktivitelerini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir (225). Ekstrenin

ayrıca ayrıca lipid peroksidasyonunu azalttığı, AST ve gama-glutamil transferaz seviyelerinde artışı önlediği ve karaciğerin histolojik görünümünü iyileştirdiği görülmüştür (225,226).

Aşırı dozda parasetamol alımı hepatositlerde glutatyonun tükenmesine yol açar. Glutatyon kaybı, ROS ve nitrojen türlerinin oluşumunu arttırır ve bu nedenle mitokondriyal disfonksiyona, lipid peroksidasyonuna ve hatta akut hepatik nekroza yol açar (227). *M. nigra* yapraklarının hidroalkolik ve n-hegzan ekstrelerinin hepatoprotektif aktivitesi, parasetamol ile indüklenmiş farelerde değerlendirilmiş ve ekstrelerin karaciğer enzimleri ve toplam bilirubin düzeylerini düşürdüğü, karaciğerin histolojisini iyileştirdiği bulunmuştur. *M. nigra*'nın karaciğer üzerine yararlı etkilerinin, iyi bilinen bir hepatoprotektif fitokimyasal olan silimarin ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu bulunmuştur (228,229).

Yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, *M. nigra*'nın hepatik steatozu iyileştirdiği, serum lipidlerini (kolesterol, trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein) azalttığı, hepatik lipid peroksidasyonunu azalttığı, antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı, insülin direncini hafiflettiği, ve glikoz homeostazını iyileştirdiği tespit edilmiştir (171,230). Sıçanlarda yüksek yağlı diyetle indüklenen NAFLD (non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı) üzerine yapılan bir başka çalışmada, *M. nigra* meyve ekstresinin 10 hafta süreyle uygulanması serum ALT, AST, toplam kolesterol, triaçilgliserol ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol düzeylerini düşürmüştür. Histolojik analiz, ekstrenin lipid birikimini iyileştirdiğini göstermiştir. Bu etki, kolesterol homeostazı ile ilgili genlerin ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ekstrenin, hepatik ROS üretimini ve mitokondriyal oksidatif stresi inhibe ettiği bu nedenle de *M. nigra*'nın antihepatosteatoz aktivitesi, yüksek antioksidan özelliğinin yanı sıra yağ asitleri ve kolesterol sentezini inhibe etme kabiliyetine bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır (231).

M. nigra'nın hepatoprotektif etkisi, diyabetli hayvan modellerinde de araştırılmıştır. Streptozotosin ve alloksan ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, yaprak ekstrelerinin yükselmiş AST, ALT, trigliseritler ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinin serum seviyelerini normal haline getirebildiği görülmüştür (218,232). Ekstrelerin, diyabet modeli çalışılan araştırmalarda glutatyon seviyesini arttırdığı, lipid peroksidasyonunu

azalttığı, SOD/katalaz dengesini geri kazandırdığı ve karaciğerin histopatolojisi üzerine iyileşme sağladığı tespit edilmiştir (173,232).

M. nigra'nın karaciğer üzerindeki faydalı etkileri, hücre çalışması tasarımlarında da gösterilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında, *M. nigra*'nın meyve suyu, hidroalkolik ekstresi ve polifenolik ekstresi, izole edilmiş sıçan hepatositlerinde tert-bütil hidroperoksitin neden olduğu lipid peroksidasyonu üzerinde önemli bir inhibitör etki göstermiştir (9).

Yaşlı farelerde D-galaktoz ile indüklenen bilişsel bozukluk ve oksidatif stres üzerinde, yaprak ekstresinin etkileri incelenmiş ve karaciğerde SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini önemli ölçüde arttırdığı ve lipid peroksidasyonunu bastırdığı görülmüştür (174). Lipopolisakkarit ile indüklenen sepsisli farelerde, *M. nigra* yaprakları ve meyve ekstreleri, TNF seviyelerini azaltmış ve karaciğerin glutatyon içeriğini arttırmıştır (189). Dietilnitrozamin kaynaklı hepatoselüler karsinomlu sıçan modelinde, *M. nigra* meyve ekstresinin, oksidatif stresi azaltıp, Wnt4/β-katenin yolunu inhibe ederek hepatoprotektif etki gösterdiği ve hayvanların hayatta kalma sürelerini uzattığı tespit edilmiştir (233).

2.2.3.8.b. Böbrek koruyucu etki: *M. nigra* meyvelerinin hidroalkolik ekstresinin alloksan ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum ve böbrek dokularındaki biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (234). Diyabetik ve pozitif kontrol (150 mg/kg metformin) gruplarına kıyasla *M. nigra* meyve ekstresi ile 8 haftalık tedaviden sonra daha hafif glomerüler hasar gözlenmiş ve renal glomerüler damarlarda mezenkimal doku genişlemesi gözlenmemiştir. *M. nigra* ekstresi ile tedavi edilen grupta serum kreatinin düzeyinde artış gözlemlenmesine rağmen, bu grubun serum glukoz ve üre düzeyleri diyabetik ve pozitif kontrol gruplarına göre daha düşük bulunmuş ve *M. nigra* meyvelerinin diyabetik nefropati ve buna bağlı böbrek dokusu hasarı üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (234).

STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda *M. nigra* ekstresinin böbrek fonksiyonlarını yansıtan biyokimyasal parametreleri (serum kreatinin, üre ve ürik asit) önemli ölçüde iyileştirdiği ve böbrek kıvrım tübüllerinde daha hafif histopatolojik glikojen birikimi, yağ dejenerasyonu ve lenfosit infiltrasyonu sergilediği görülmüştür (235). Benzer şekilde STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda diyabetik nefropatinin ilerlemesini geciktirmede *M. nigra* meyve ekstresinin etkisini araştıran başka bir

çalışmada 4 hafta tedavi sonrasında, serum glukoz, insülin, kreatinin ve albümin, mikroalbüminüri konsantrasyonlarında iyileşme olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca MDA, lipid peroksit seviyeleri ve katalaz aktivitesi de iyileştirildi. Böbrek dokularının histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda *M. nigra* meyve ekstresi ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda glomerüler sklerozda önemli bir iyileşme olduğu ve TNF-α, vasküler hücre yapışma molekülü-1 (VCAM-1) ve fibronektin mRNA ekspresyonunun da aşağı regülasyonunun sağlandığı tespit edilmiştir (236).

2.2.3.8.c. Gastroprotektif etki: Nesello ve ark., *M. nigra* meyvelerinin metanolik ekstresinin dişi farelerde mide mukozasını asitli etanol ile indüklenmiş akut mide ülserine karşı koruduğunu bildirmiştir. Bu çalışma sonucu, mide dokusundaki epitel hasarının derecesinin azaldığını gösteren makroskopik ve mikroskobik temsili görüntülerle doğrulanmıştır. Mide koruyucu etkinin altında yatan mekanizmaları daha fazla araştırmak için mide mukozasındaki lipid hidroperoksit ve glutatyon seviyeleri ölçülmüş ve ekstrenin mide hasarının gelişiminde rol oynayan oksidatif stresi iyileştirdiği ortaya konulmuştur (179).

2.2.3.8.d. Nöroprotektif etki: Turgut ve ark., *M. nigra* yaprak ekstresinin fenolik asit içeriğini ve DNA hasar koruma potansiyelini belirlemek ve yaşlanan farelerde ekstrenin D-galaktoz ile indüklenen bilişsel bozukluk ve oksidatif stres üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada *M. nigra* ekstresi kullanımının D-galaktoza kıyasla öğrenme işlev bozukluklarını düzelttiği, bellekte tutmayı artırdığı ve MDA seviyelerini düşürürken SOD, GPx (Glutatyon peroksidaz) ve CAT aktivitelerini artırdığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda D-galaktoz kaynaklı öğrenme işlev bozukluğu ve hafıza kaybını önleyerek potansiyel nöro-koruyucu rolünün olduğu ortaya konulmuştur (174).

Dalmagro ve ark., farelerde *M. nigra* ve başlıca fenolik bileşikleri şiringik asidin antidepresan benzeri aktivitelerini değerlendirmek için yaptıkları çalışmalarında her iki uygulamanın da farelerde davranışsal testlerde antidepresan benzeri özellik sergilediğini göstermektedir. Sonuçlar, *M. nigra*'nın antidepresan benzeri etkisinin, kısmen şiringik asidin etkisine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, gözlemlenen etki, farelerin hem serumunda hem de beyninde nitro-oksidatif sistem modülasyonunu göstermektedir. Bununla birlikte, *M. nigra* yaprak ekstresi ve siringik asit, glutamat ile inkübe edilen hipokampal ve serebral korteks dilimlerinde iyi hücre canlılıkları sergileyerek, bunların

glutamat kaynaklı toksisiteye karşı uygun nöroprotektif etki gösterdiklerini ortaya koymaktadır (170).

2.2.3.9. Antimelanojenik aktivite: Derideki melanin pigmentasyonu ultraviyole radyasyona karşı cildin önemli bir savunma mekanizmasıdır. Ancak tirozinaz tarafından katalize edilen anormal melanin hiperpigmentasyonu ciltte estetik problemlere neden olmaktadır (237-239). Antimelanojenik bir strateji olarak, tirozinaz inhibitörleri, pigmentasyonla ilişkili cilt problemlerinin tedavisinde ve cilt beyazlamasını sağlamak için giderek daha çok dikkat çekici hale gelmiştir.

Zhang ve ark., *M. nigra*'nın köklerinden izole edilen 2,4,2',4'-tetrahidroksi-3-(3-metil-2-butenil) kalkon (TMBC)'nin tirozinaz aktivitesi ve melanin biyosentezi üzerindeki inhibitör etkisini araştırmış ve iyi bilinen bir cilt depigmentasyon maddesi olan kojik asitten daha güçlü bir şekilde tirozinazı inhibe ederek melanogenezi modüle ettiği bulunmuştur. Ayrıca, TMBC, önemli sitotoksisite olmaksızın B16 melanoma hücrelerinde hem hücresel tirozinaz aktivitesini hem de melanin biyosentezini etkili bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. TMBC'nin melanogenez üzerindeki inhibitör etkisinin, tirozinaz gen ekspresyonunun baskılanmasından ziyade tirozinaz aktivitesinin doğrudan inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülmüştür (240).

Zheng ve ark., ise *M. nigra*'nın köklerinin etanolik ekstresinden izole edilen toplam 29 bileşenin tirozinaz inhibitör özelliklerini taramış ve bileşikler arasında dokuz bileşiğin (5'-geranil-5,7,2',4'-tetrahidroksiflavon, steppogenin-7-0-β-D-glukozit, 2,4,2',4'-tetrahidroksikalkon, morasin N, kuwanon H, mulberrofuran G, morachalcone A, oxyresveratrol-3'-O-β-D-glucopyranoside ve oxyresveratrol-2-O-β-D-glucopyranoside), kojik asitten daha iyi tirozinaz inhibitör aktivite gösterdiğini taspit etmişlerdir. 2,4,2′,4′-tetrahidroksikalkon ve morakalkon A'nın IC_{50} (Yarım maksimal etkili konsantrasyon) değerlerinin, kojik asitten sırasıyla 757 kat ve 328 kat daha düşük olması, *M. nigra*'nın etkili bir doğal tirozinaz inhibitörü olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir (161).

Freitas ve ark. da *M. nigra* yapraklarının standardize etanolik ekstresinin beş farklı partisinin hepsinin, tirozinaz inhibitör aktivite sergilediğini bildirmiştir (241). Koyu ve ark., *M. nigra* meyvelerinin mikrodalga destekli ekstraksiyonunu değişken koşullarda test etmiş ve sonuç olarak, en yüksek tirozinaz inhibe edici aktivitenin en yüksek miktarda antosiyanin içeriğine sahip ekstrede olduğunu bulunmuştur. Bu da antosiyaninlerin

tirozinaz inhibisyonu açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır (150).

2.2.3.10. Yara iyileştirici aktivite: Anadolu'da özellikle karadut pekmezi ve meyve suları ağız yaralarının tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (18). Halk arasında *M. nigra* meyvelerinin ve yapraklarının ağız yaralarında kullanımı vardır (18,19).

Doğan ve ark., yaptıkları bir çalışmada radyoterapi alan hastalarda kara dut pekmezinin oral mukozitis gelişimine etkisini incelemiş ve geleneksel olarak kullanılan pekmezin koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (242). Yıldırım ve ark., tarafından yapılan başka bir çalışmada ise karadut ekstresinin deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda alveolar kemik rezorpsiyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada *M. nigra*'nın sistemik uygulanmasının bölgesel alveolar kemik rezorpsiyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği ve deneysel periodontitis modellerinde periodontal iyileşmeye katkıda bulunduğu ortaya koyulmuştur (243).

Mirjalili ve ark., tarafından diyabetik sıçanlarda *M. nigra* meyvelerinin yara iyileştirici etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada sıçanların sırtında dairesel yaralar oluşturulmuş ve meyvelerden elde edilen ekstreler bu yaralara topikal olarak uygulanmıştır. *M. nigra* ekstresinin topikal olarak uygulanması, yara kontraksiyonunu hızlandırmış, epitelyal, granüle tabakaların oluşumunu içeren histolojik indeksleri iyileştirmiş ve onarılan dokuda kollajen yoğunluğunu artırarak iyi bir yara iyileştirici aktivite sergilemiştir (244).

Akkol ve ark., tarafından insizyon ve eksizyon yara modelleri kullanılarak *M. nigra*'nın yara iyileştirme aktivitesini araştırmak için yapılan çalışmada liyofilize meyve ekstresi önemli yara iyileştirme aktivitesi gösterirken, su ile hazırlanan yaprak ekstresinin etkinlik göstermediği tespit edilmiştir (245).

Zhou ve ark., *M. nigra* yapraklarının yara iyileşmesini ve anti-inflamatuar potansiyelini insizyon ve eksizyon yara yöntemleri ile araştırmıştır. Sıçanlarda karragenan kaynaklı inflamasyonda pençe ödemi ölçülerek antienflamatuar aktivite değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar, yaprak ekstresinin pençe ödemini inhibe ettiğini ve kutanöz yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermektedir (246).

2.2.4. *Morus nigra* L. Toksikolojisi

M. nigra çok eski zamanlardan beri geleneksel tıpta gıda ve tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır. Literatürde bu bitkinin kronik kullanımı ile ilgili toksikolojik veriler oldukça sınırlıdır. Yılmaz ve ark., tarafından *M. nigra* meyvelerinin potansiyel genotoksik etkilerini incelemek amacıyla kültürlenmiş insan periferik lenfositlerini kullanarak yapılan çalışmada meyve suyunun herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığını ve mitomisin kaynaklı genomik değişikliklere karşı koruyucu aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (247).

M. nigra yapraklarının güvenlik raporları ise tartışmalıdır. Bir çalışma, dut yaprağı sulu ekstresinin (42 gün boyunca günde iki kez 100 mg/kg) oral yoldan uygulanmasının hem normal hem de diyabetik hayvanlarda serum ALT ve AST aktivitelerinde önemli bir artışa neden olduğunu göstermiştir (248). Öte yandan, yaprakların etanolik ekstresinin (1000 mg/kg'a kadar, oral, 28 gün boyunca) böbrek ve karaciğer dokularına karşı toksik etkiler oluşturmadığı bildirilmiştir (249). Ayrıca, yaprakların etanolik ekstrenin akut toksisitesinin değerlendirilmesi amacıyla farelerde intraperitoneal olarak 2 g/kg ve oral olarak 5 g/kg dozlarında hiçbir ölüm ve toksisite belirtisi göstermediği görülmüştür (250). Bu nedenle, elde edilen kanıtlara göre, *M. nigra*'nın akut ve subakut tüketiminin önemli toksik etkilerle ilişkili olmadığı düşünülmektedir.

2.3. GREEN SENTEZ (YEŞİL SENTEZ) ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLER

Nanopartiküller son yıllarda; ilaç, kimya ve biyomedikal gibi pek çok alanda önem kazanmıştır. Metal ve metal oksit nanopartiküller yeni uygulama alanları ile pek çok çalışmaya konu olmakta ve özellikle farmakolojik özellikleri açısından ilaç kimyası ve teknolojisi alanında da her geçen gün ilgi çekmektedir (251,252).

Demir oksit (Fe_3O_4 veya γ-Fe_2O_3), titanyum dioksit (TiO_2), seryum dioksit (CeO_2), bakır oksit (Cu_2O veya CuO), silika (SiO_2), altın, gümüş, platin ve çinko oksit (ZnO) gibi nanopartiküller, benzersiz farmasötik özellikler ve yeni farmakolojik işlevler göstermektedir.

Parçacık boyutu ve gözeneklilik gibi kontrol edilebilir özelliklere sahip metal bazlı nanoterapötikler, ilaç dağıtımı ve terapötik aktivitenin biyomedikal uygulamaları açısından oldukça değerlidir (251,253,254).

Metal oksit nanaopartiküllerinin oluşturulmasında; sol-jel yanma, microemulsion, hidrotermal metod, sonokimyasal yöntem gibi konvansiyonel kimyasal yöntemlerin yanında son zamanlarda green (yeşil) sentez yöntemi diğer yöntemlere göre daha biyouyumlu özellikleri nedeniyle ilgi çekmektedir (22). Bakteriler, funguslar ve bitkiler aracılığıyla nanopartiküllerin sentezlenmesi green sentez (GS) olarak adlandırılmaktadır. GS yaklaşımı; uygun maliyetli, çevre dostu, biyouyumlu ve güvenli bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır (Şekil 2.1.) (20,255).



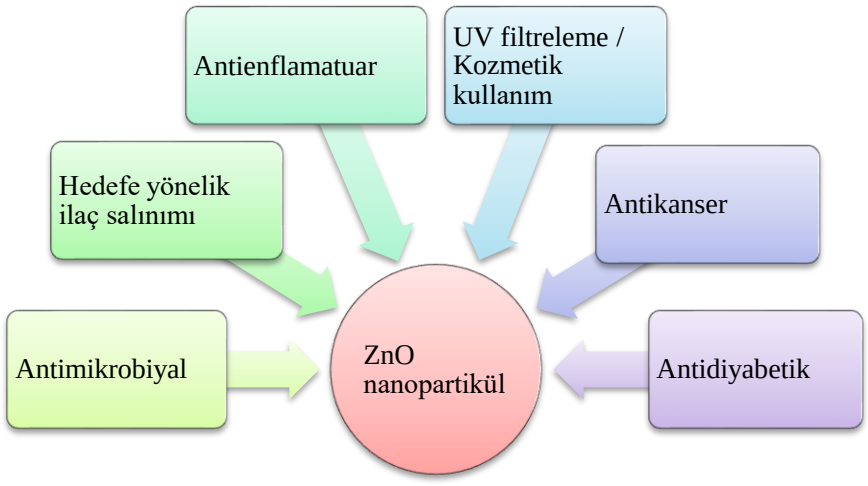
Şekil 2.1: Green sentez yönteminin avantajları

GS yaklaşımı ZnO nanopartiküllerinin büyük ölçekli üretimlerine izin vermektedir (21). Biyomimetik yaklaşımlar aracılığıyla sentezlenen nanopartiküller daha fazla katalitik aktivite göstermektedir. Ayrıca, GS yaklaşımı sentez sürecinde pahalı ve toksik kimyasalların kullanımını ortadan kaldırmaktadır (22). NP sentezinde kullanılan bu doğal bitki ekstrelerinde hem indirgeyici ajan hem de capping veya dengeleyici ajan gibi davranan bazı fitokimyasallar bulunmaktadır. Kökler, yapraklar, saplar, tohumlar, meyveler gibi bitkinin farklı kısımlarının ekstreleri hem indirgeyici hem de stabilizasyon maddesi olarak işlev gören fitokimyasallar bakımından zengin olduğu için

nanopartiküllerin yeşil sentezinde kullanılmaktadır (23). Ayrıca; sentez süresinin kısa olması ve maliyetli ekipman ve ilave kimyasal madde kullanımı gerektirmemesi bu yöntemin önemli avantajlarındandır (24).

Değişik şekillerde ve boyutlardaki nanopartiküllerin büyük ölçekli ve kararlı üretimine öncülük ettiklerinden dolayı bitkisel ekstreler nanopartikül sentezinde en çok tercih edilen doğal kaynaklardan biridir (256). Biyoredüksiyon, bitkilerden salgılanan polisakkaritler, polifenolik bileşikler, vitaminler, amino asitler, alkaloitler, terpenoidler gibi fitokimyasalların yardımıyla metal iyonlarının veya metal oksitlerin değerlikli metal NP'lere indirgenmesini sağlamaktadır (24).

ZnONP'ler; elektronik, optik ve biyomedikal alanındaki geniş uygulama yelpazesi nedeniyle son yıllarda ilgi odağı olmuştur (25,255). Metal oksit nanopartiküller içerisinde ZnONP'ler üretimleri ucuz, kolay ve güvenli olduğundan dolayı ayrı bir öneme sahiptir. ABD "Gıda ve İlaç İdaresi" (FDA- Food and Drug Administration), ZnONP'leri genellikle güvenli metal oksit kategorisinde sınıflandırmaktadır (26). ZnO nanopartikülleri geniş bant aralığı nedeniyle mükemmel bir yarı iletken özellik (3.37 eV) sergilemektedir. Ayrıca, yüksek hızlı bağlanma enerjisi (60 meV), yüksek katalitik aktivite, optik, UV filtreleme, iltihap önleyici, yara iyileştirici gibi önemli özelliklere sahiptir (27,28). UV filtreleme özelliği sayesinde güneşten koruyucu losyonlar gibi kozmetik ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (257). İlaç salınımı, antikanser, antidiyabetik, antibakteriyel, antifungal gibi çok çeşitli biyomedikal uygulamalara sahiptir (Şekil 2.2.) (255,258).



Şekil 2.2: Çinko oksit nanopartikül kullanım alanları

ZnONP, hedefe yönelik ilaç salınımı gibi uygulamalarda da kullanılmaktadır. ZnONP'ler adsorpsiyona bağlı membran hasarı ve ROS aracılı hücresel toksisite yoluyla antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (259). Tıbbi cihazlar için ZnONP'ler içeren cerrahi ve endüstriyel yapıştırıcılar (örn. Neopren yapıştırıcı) kullanılmaktadır (260). ZnONP'lerin geniş kullanım alanları göz önünde bulundurularak bu tez çalışmasında GS yöntemi ile *M. nigra* yaprak ve meyve ekstreleri ile ZnONP'ler sentezlenmiş ve deney hayvanlarında oluşturulan AS modelinde yara iyileştirici etkinliği değerlendirilmiştir.

2.3.1. Çinko Oksit Nanopartikül Sentez Yöntemleri

ZnONP'ler konvansiyonel veya konvansiyonel olmayan yöntemler kullanılarak sentezlenebilir. Geleneksel yöntemler arasında fiziksel, kimyasal ve biyolojik (yeşil) sentez teknikleri yer alırken, geleneksel olmayan yöntem olarak da mikroakışkan reaktör tabanlı sentez bulunmaktadır.

2.3.1.1. Konvansiyonel yöntemler: NP sentezlemek için yukarıdan aşağıya (top-down) ve aşağıdan yukarıya (bottom-up) yaklaşımları kullanılmaktadır (261,262). Yukarıdan aşağıya yaklaşım, yığın malzemelerin fiziksel olarak dilimlenmesini (öğütme ve püskürtme gibi yöntemlerle) ve nano boyutlu malzemelere küçülmesi ile gerçekleşir (262). Aşağıdan yukarıya yaklaşım ise, kimyasal veya biyolojik sentez, kontrollü biriktirme ve büyüme yoluyla nanoyapılar oluşturmak için atomları ve molekülleri kullanır (261). "Yeşil sentez" olarak adlandırılan biyolojik sentez ise en basit, verimli, tekrarlanabilir ve ekolojik açıdan uygun bir seçenektir. Bununla birlikte, yeşil sentez mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (263).

2.3.1.1.a. Fiziksel yöntemler: Fiziksel yöntemler arasında ark deşarj yöntemi, yüksek enerjili bilyalı öğütme, termal buharlaştırma, metal püskürtme, fiziksel buhar biriktirme, atomizasyon, tavlama elektrospreyleme, ultrasonik iridasyon ve lazer ablasyonu gibi yöntemler yer almaktadır. Bu prosesler kimyasal olarak saf ve teknik olarak basittir, bu da bu yöntemleri büyük miktarlarda endüstriyel üretimleri gerçekleştirmek için daha tercih edilir kılmaktadır (264-267). Elektrik ark deşarj sentezine dayanan ark plazması, yığın malzemeleri yoğuşma ve buharlaştırma yoluyla nanomalzemelere dönüştürmek için en yaygın kullanılan fiziksel yöntemlerden birisidir (268).

2.3.1.1.b. Kimyasal yöntemler: Kimyasal NP sentez yöntemleri arasında mikroemülsiyon, sol-jel, çökeltme, hidrotermal, solvotermal ve kimyasal buhar sentezi gibi yöntemler yer almaktadır (269,270). Katı ve sıvı fazların fiziksel durumlarına dayanan ıslak kimyasal sentez, NP'lerin üretilmesi için en yaygın kullanılan yöntemdir (270). Endüstriyel ölçekli kimyasal sentez sırasında, partikül boyutunu kontrol etmek ve aglomerasyonu önlemek için toksisitelerine rağmen cappig ajanları/ stabilizatörler yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmünojenik ve apoptotik/nekrotik potansiyele sahip olmalarına rağmen trietilamin (TEA), oleik asit, tiyogliserol ve polietilen glikol gibi stabilizatörler kullanılmaktadır. Kimyasal indirgeme yöntemi ile büyük miktarda NP sentezi gerçekleştirilebilir ancak reaktiflerin toksik olması ve üretilen yan ürünlerin çevre dostu olmaması gibi dezavantajları bulunmaktadır (271).

2.3.1.1.c. Biyolojik yöntemler: Biyolojik yöntemler, çevre dostu olmaları ve toksik ajanlar kullanılmasını gerektirmedikleri için fiziksel ve kimyasal sentez yöntemlerine kıyasla iyi bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (22,255). Mikroorganizmalar (bakteri, mantar, maya, alg), DNA, proteinler ve bitki ekstreleri NP'lerin biyolojik sentezi için kullanılmaktadır (22,255). Bu doğal ajanlar, özellikle bitkisel kaynaklı ekstreler ile hem indirgeyici ajan hem de stabilize edici ajan olarak işlev gören bazı fitokimyasalları içermektedir. Bu bileşenler sayesinde reaksiyon ortamına ekstra stabilize ajan eklenmesine gerek kalmamaktadır. Biyomimetik yaklaşımla sentezlenen NP'ler daha fazla katalitik aktivite göstermekte, pahalı ve toksik kimyasalların kullanımını azaltmaktadır. Ancak, biyolojik sentez yoluyla NP üretme mekanizmaları halen tam olarak anlaşılamamıştır (22,272,273).

• Bitki ekstreleri aracılığı ile çinko oksit nanopartikül sentezi: Yaprak, gövde, kök, meyve ve tohum gibi bitki parçalarından elde edilen ekstrelerin bileşiminde bulunan özel fitokimyasallar ZnONP sentezi için kullanılmaktadır. Bitkilerden elde edilen doğal ekstreleri NP sentezinde kullanmak oldukça çevre dostu, ucuz bir işlemdir ve herhangi bir toksik ajan kullanımını gerektirmemektedir. Diğer yöntemlere göre daha az zaman almakta, pahalı ekipman ve prekürsör kullanımı gerektirmemektedir. Sonuç olarak da safsızlık içermeyen oldukça saf ve miktar açısından zenginleştirilmiş bir ürün sentezlenmiş olur (22). Bitkiler, NP yeşil sentezinin en çok tercih edilen kaynağıdır çünkü büyük ölçekli üretim, daha stabil, çeşitli şekil ve büyüklükte NP'lerin üretimine imkân vermektedirler (22,256). Biyo-indirgenme, bitki ekstresinde bulunan polisakkaritler,

polifenolik bileşikler, vitaminler, amino asitler, alkaloitler, terpenoidler gibi fitokimyasalların yardımıyla metal iyonlarının veya metal oksitlerin 0 değerlik metal NP'lerine indirgenmesini sağlamaktadır (24,256,274).

Bitkilerden yeşil sentez ile ZnONP'lerin basit bir şekilde hazırlanması için en sık olarak uygulanan yöntem, bitki kısmının temizlenip kurutularak ince boyutlarda öğütülmesi ve uygun konsantrasyonda ekstre hazırlamak için uygun miktarda su ilave edilerek kaynatılmasıdır. Bu metodda ekstre süzülür ve gerekirse santrifüjlenerek elde edilen berrak ekstre sentez işleminde kullanılır. Ekstrenin bir miktar hacmi çinko nitrat, çinko asetat veya çinko sülfat çözeltisi ile karıştırılır ve istenilen sıcaklık ve sürede karıştırma işlemi uygulanarak sentez gerçekleştirilir. Farklı ekstreler ve farklı sentezler için sıcaklık, pH, ekstre konsantrasyonu ve süre gibi parametreler ile yöntemin optimizasyonu gerekebilir. Sentezlenen NP'ler karışımın rengini açık sarıya ya da beyaza dönüşmesine neden olur (263,274,275). Daha sonra, NP'lerin sentezini doğrulamak için bir ultra viyole ve görünür bölge (UV-Vis) spektrofotometrisi ile uygun dalga boyu aralığında spektrumu alınır. Ardından karışımın santrifüjlenmesi, yıkanarak temizlenmesi ve kristal NP eldesi için uygun şartlarda kurutulması gerekir. Daha sonrasında ise sentezlenen NP'lerin şekil, boyut ve morfolojisi açısından diğer analitik yöntemlerle doğrulaması yapılır (22,255,276).

Bitki ekstreleri aracılığıyla ZnONP sentezinin kesin mekanizmaları henüz tam olarak doğrulanmamıştır. Bu anlamdaki temel belirsizlik ekstrelerde NP oluşum sürecinde rol alan aktif bileşenlerin tam olarak tanımlanmasındaki zorluktur. Bazı çalışmalar çinko iyonu ile kompleks oluşturan fitokimyasalların ZnONP oluşumu için gerekli olan önemli bir adım olduğunu bildirmektedir. ZnONP sentezinin flavonoidler, fenolik ve terpenoid bileşikler aracılığı ile gerçekleştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bileşiklerin çeşitliliği ve bitki ekstrelerindeki karmaşık yapı, bileşenlerin konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermesi GS yaklaşımını çok yönlü hale getirmektedir. Bu sebeple GS yöntemi ile NP sentezinde kontrollü boyut ve şekil sağlamak için sentez mekanizmasını tam olarak belirlemek oldukça zordur (276).

• Bakteriler aracılığıyla çinko oksit nanopartikül sentezi: Bakteriler aracılığıyla NP sentezi mikroorganizmalar tarafından üretilen NP'lerin toksik bileşik içermemesi nedeniyle çevreci bir yaklaşım olarak kabul görmektedir. Ancak bakterilerin taranmasının

uzun bir süreç gerektirmesi, kültür besiyerinin kontaminasyonu önleme zorluğu, tüm süreç boyunca dikkatli bir şekilde izlenmesinin gerekli olması, NP boyutu ve şekli üzerinde kontrol edilememesi gibi çeşitli dezavantajları vardır. Aynı zamanda bakteri yetiştirmek için kullanılan ortamla ilişkili maliyet de yükselmektedir (277-279). *B. licheniformis* tarafından sentezlenen çevre dostu bir yaklaşımla ZnO nanoçiçekleri sentezlenmiş ve bunların fotokatalitik aktiviteleri incelendiğinde mevcut olan fotokatalitik maddelere kıyasla daha gelişmiş bir fotokatalitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerdeki daha büyük oksijen boşluğunun, gelişmiş fotokatalitik aktivite özelliği kazandırdığı varsayılmış ve bu nedenle etkili bir biyoremediasyon aracı olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (279).

• Algler aracılığıyla çinko oksit nanopartikül sentezi: Algler, Chlorella gibi tek hücreli formlardan kahverengi algler gibi çok hücreli olanlara kadar değişen fotosentetik organizmalardır. Algler, bitkilerdeki kökler ve yapraklar gibi temel yapılardan yoksundur. Deniz yosunları, kırmızı pigmentli Rhodophyta, kahverengi pigmentli Phaeophyta ve yeşil pigmentli klorofitler gibi içlerinde bulunan pigmente göre sınıflandırılırlar. Literatürde de altın ve gümüş NP sentezi için alglerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak ZnONP sentezi için kullanımları sınırlıdır (280,281). Mikroalgler, toksik metalleri parçalama ve onları daha az toksik formlara dönüştürme yetenekleri nedeniyle özel ilgi görmektedir. ZnONP sentezi için Sargassaceae familyasına ait *Sargassum muticum* ve *S. myriocystum* kullanılmıştır (280).

• Mantarlar aracılığıyla çinko oksit nanopartikül sentezi: Mantardan NP'lerin hücre dışı sentezi, büyük ölçekli üretim, uygun işleme ve ekonomik uygulanabilirlik nedeniyle oldukça faydalıdır. Mantar suşları, daha iyi toleransları ve metal biyobirikim özellikleri nedeniyle bakterilere göre daha çok tercih edilir (22). *Aspergillus fumigatus*'un misellerinden ZnONP'ler sentezlenmiş ve NP'lerin ortalama boyutunun 3,8 nm olduğu görülmüştür (282). *Trichocomaceae* familyasına ait *Aspergillus terreus*'tan sentezlenen NP'lerin boyut aralığı ise SEM ile teyit edilmiş ve X- ışını Difraktometresi (XRD) analiz sonuçları üzerinden Debye-Scherrer denklemi kullanılarak hesaplanan ortalama boyut 29 nm olarak bulunmuştur (283). *Candida albicans* kullanılarak sentezlenen NP'ler, SEM, TEM ve XRD analizi ile onaylanan benzer 15-25 nm boyut aralığı göstermiştir (284). *Aspergillus* türleri, ZnONP sentezi için yaygın olarak kullanılmaktadır ve mantar suşlarından sentezlenen NP'ler, çoğu durumda küresel şekilli olarak gözlenmektedir.

• Diğer yeşil kaynaklar aracılığı ile çinko oksit nanopartikül sentezi: NP sentezi için diğer bazı yeşil kaynaklar olarak yumurta albümini, L-alanin, çözünebilir nişasta gibi biyouyumlu kimyasallar da kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin çekirdeklenme ve sentez reaksiyonlarında her türlü yan ürünün üretimini ortadan kaldıran hızlı, ekonomik bir işlemdir. İyi dağılmış yapıları ile kontrollü şekil ve boyutta nanoparçacıkların oluşumuna imkan verir (285-287).

2.3.1.2. Mikroakışkan reaktör tabanlı nanopartikül sentezi (konvansiyonel olmayan yöntem): Mikroakışkan reaktör, küçük ölçekli üretim için kullanılabilecek minyatür, geleneksel olmayan bir sentez aracıdır (288). Mikroakışkan reaktör sistemleri, reaksiyon ortamlarındaki akışı manipüle eder ve böylece reaksiyonun daha iyi kontrol edilmesini sağlar (289). Mikroakışkan reaktör mikro ölçekte reaktanları karıştırdığından, viskozite, akışı etkileyen ana faktördür (290,291). Böylece mikroakışkan ortamda karıştırma, difüzyon ve laminer akış yoluyla gerçekleşir. NP'ler sentezlenirken reaksiyon sıcaklığı mikroakışkan reaktörde sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir (291). Bir mikroakışkan reaktörün mikro kanalında, reaksiyonlar, düşük sıcaklıklarda (15-20 °C) indirgeyici maddeler ve metal tuzları ile kontrol edilir. Reaktanlar karıştırıldıktan sonra indirgeme yoluyla dinamik öncüler oluşturulur. Son olarak, NP çekirdeklenmesi ve büyümesi daha yüksek bir sıcaklıkta (80-90 °C) meydana gelir. Yüksek derecede kristallik ve küçük boyut dağılımına sahip yüksek kaliteli NP'ler üretmek için, nanoparçacık üretiminin her adımı kontrol edilmeli ve istenen aşamada sonlandırılmalıdır (290).

Mikroakışkan reaktör sistemlerinin NP sentezinde birçok avantajı bulunmaktadır. Klasik ve makro ölçekli sentez ile karşılaştırıldığında, bir mikroakışkan reaktör küçük reaktif hacimleri kullanarak; seçicilik, çevre dostu olma, kısa reaksiyon süresi ve gelişmiş güvenlik sunmaktadır. Bu sistemler akademide ve endüstride reaksiyon optimizasyonu için kullanılabilir (292,293). Akışın kontrol edilebilmesi (örneğin, sürekli veya parçalı akışlar), gelişmiş özelliklere ve geliştirilmiş performansa sahip yüksek kaliteli ürünler üretmek için mikroakışkan reaktördeki reaksiyon koşullarını (örneğin, sıcaklık, süre ve reaktif konsantrasyonları) değiştirebilmeyi sağlar (294).

ZnONP'leri sentezlemek için mikroakışkan reaktör sistemleri de kullanılmış ve mikroakışkan reaktörde, ZnONP'/nano teller bir hidrotermal yöntem kullanılarak sentezlenmiştir (295). Azzouz ve ark., ZnO tohumlarından ZnO nanotellerinin sentezini

bildirmiş ve bunların sudan, uçucu organik bileşikleri uzaklaştırma yeteneklerini araştırmıştır (294).

2.3.2. Nanopartiküllerin Yeşil Sentezini Etkileyen Faktörler

NP yeşil sentezi sırasında ortam sıcaklığı, pH, süre, ekstre konsantrasyonu ve fitokimyasal bileşimi gibi şartlar NP oluşumunu, boyutunu ve morfolojisini etkilemektedir. Birçok araştırmacı, ekstre konsantrasyonunun arttırılmasıyla daha geniş bant aralığı enerjili daha küçük parçacıkların oluşumunun sağlanabileceğini bildirmiştir (296,297). Madan ve ark., tarafından bildirilen çalışmada, *Azarichta indica* ekstresinin sentezdeki miktarı 4, 10, 12, 15 ve 20 mL arasında değiştirildiğinde, bu numunelerden elde edilen UV-Vis spektrumları, sırasıyla 376; 373,55; 372,34; 372 ve 371,98 nm'de absorpsiyon bantları göstermiştir. Buradan ekstre miktarındaki artışla absorpsiyon zirvesinin daha düşük dalga boylarına doğru kaydığı ve dolayısıyla optik bant aralığı enerjilerinde sabit bir artışa yol açtığı gözlemlenmiştir. Karşılık gelen bant aralığı enerjileri sırasıyla 3,29; 3,31; 3,33; 3,33 ve 3,33 eV olarak tespit edilmiştir (298).

Ali ve ark., tarafından rapor edilen başka bir çalışmada *Aloe vera* ekstresi kullanarak ZnONP oluşumunda hem konsantrasyon hem de pH varyasyonu incelenmiştir. 5.0- 10.0 pH arası pH değişimi incelenmiştir. Çalışma sonuçları ZnONP biyosentezi için gereken optimum pH'ın 8.0-10.0 aralığında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Düşük pH aralığı (5.0 ila 7.0) için düşük absorpsiyon bulunmuştur. Bu gözleme dayanarak, daha düşük bir pH'ta çekirdeklenme yerine kümelenmenin baskın olduğu sonucuna varılmıştır (296).

Sıcaklık ve pH ile birlikte, sentez reaksiyonunun süresi de NP'lerin morfolojisini etkileyen faktörlerden birisidir. Reaksiyonun gerektiğinden daha uzun sürmesi agregasyona neden olabilmektedir. Reaksiyon süresinin ZnO ve Seryum katkılı ZnONP'lerin partikül boyutu üzerindeki etkisi incelendiğinde; reaksiyon süresindeki artışla birlikte partikül boyutunda artış gözlemlenmiştir (299).

Sıcaklık, NP'lerin boyut, morfolojisi ve sentez oranını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. NP'lerin çeşitli şekilleri (üçgen, oktahedral, küresel ve çubuk benzeri), boyutu ve sentezi sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Sıcaklık arttıkça, reaksiyon hızında ve çekirdeklenme merkezlerinin oluşumunda artış olmaktadır. Reaksiyon sıcaklığının artması ile (50-70 °C), NP'lerin boyutlarının daha tutarlı ve küresel olduğu bulunmuştur (300).

Kalsinasyon sıcaklığı, sentezlenen ZnO nanoparçacıklarının boyutunu belirleyen başka bir faktördür. Azizi ve ark., sırasıyla 100°C'den 200°C'ye artan kalsinasyon sıcaklığı ile bant aralığı enerjisinde 3.30 eV'den 3.27 eV'ye düşüş gözlemlemiştir. Bu çalışmaya göre, sentezlenen ZnONP'lerin dalga boyu pikleri, artan kalsinasyon sıcaklığı ile 372 nm'den 382 nm'ye yükselmiştir. Pik pozisyonundaki bu değişiklik, partiküllerin morfoloji, boyut, yüzey mikro yapısında değişikliklere neden olmuştur (301).

Görüldüğü üzere daha küçük parçacıkların oluşumundan birçok faktör sorumludur. Bitki ekstrelerinin konsantrasyonunun arttırılması daha küçük partiküller sağlamakta, reaksiyon sıcaklığı partikül boyutunu ve stabilitesini artırırken, kalsinasyon sıcaklığındaki artış aglomerasyona (veya daha büyük partiküllerin oluşumuna) neden olmaktadır. Yüksek pH, düşük pH yerine optimum absorbansı ve küçük partikül boyutu elde edilmesini sağlamaktadır. Tüm bu faktörler göz önünde bulundurularak ve optimize edilerek istenilen boyutta ZnONP elde edilebilir.

2.3.3. Fizikokimyasal Karakterizasyon

İn vitro ve *in vivo* deneyler için tasarlanmış nanomalzemelerin fizikokimyasal özelliklerinin araştırılmasını gerekmektedir. Bu özellikler; aglomerasyon/toplanma, katalitik potansiyel, bileşim, konsantrasyon, kristal faz, safsızlık, yağ çözünürlüğü/oleofilite, parçacık boyutu/boyut dağılımı, uzunluk, saflık, şekil, yüzey kimyası, suda çözünürlük/hidrofiliklik ve zeta potansiyeli gibi bir dizi analizi içerir (302).

2.3.3.1. Görünüm, kristallik, parçacık boyutu, morfoloji ve gözeneklilik: Çinko oksit NP'leri (81.38 g/mol, m.p. 1975 °C) beyaz, renksiz ve kokusuz bir katıdır. Çinko oksit kristal yapıları esas olarak altıgen wurtzite ve kübik çinko karışımlı formları alır (303). Her bir tetrahedral Zn atomunun dört oksijen atomu ile çevrelendiği veya bunun tersi olduğu altıgen wurtzit formu yaygındır ve genellikle kararlıdır (303,304). Çinko oksit NP'lerin çapı 200 nm'den küçüktür ve pek çok alanda kullanımı vardır. Daha önce bahsedildiği gibi, ZnONP'ler bir, iki veya üç boyutlu yapılara sahiptir. Ayrıca agregatlar oluştururlar ve çok seviyeli gözenekliliğe sahip üç boyutlu ağlar halinde kendiliğinden birleşebilirler (271).

2.3.3.2. Karakterizasyon araçları: Tasarlanmış NP'lerin özelliklerini tanımlamak için karakterizasyon araçları gereklidir. ZnONP'lerin kristal yapısını,

morfolojisini, parçacık boyutu/boyut dağılımını ve yüzey özelliklerini (spesifik yüzey alanı ve gözeneklilik) belirlemek için çeşitli analizler yapılır.

2.3.3.2.a. Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi: İncelenen nanoparçacıkların absorbans ve optik bant aralığı enerjisinin elde edilebildiği UV-Görünür (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi önemli bir optik karakterizasyon tekniğidir. Biyosentezlenmiş ZnONP'lerin UV-Vis analizine ilişkin literatür araştırması, ZnO nanoparçacıklarının oluşumu için kanıt sağlamaktadır. Sangeetha ve ark., Aloe ekstreleri ile sentezledikleri ZnONP'lerin kimyasal olarak sentezlenene kıyasla daha geniş bir bant aralığı enerjisine sahip olduğunu belirtmiştir. Bu ayrıca biyosentez yoluyla oluşturulan NP boyutunun kimyasal olarak sentezlenenlere göre çok daha küçük olduğunu göstermektedir (27). Madan ve ark., *Azarichta indica* kullanılarak biyosentezlenen ZnONP'lerin bant aralığı enerjisinin, nano rejimdeki kuantum boyutu etkilerine çıkardıkları 377 nm'deki absorpsiyon zirvesine karşılık gelen 3.87 eV olduğunu bildirmiştir (298). Biyosentezlenen ZnO nanoparçacıklarının kimyasal olarak sentezlenenlere kıyasla daha küçük parçacık boyutu dağılımına sahip olabileceği görülmektedir (27). Ancak bu çalışmalarda UV-Vis çalışmaları sadece ZnONP oluşumunu doğrulamak ve optik bant aralığı enerjisini hesaplamak için uygulanmıştır. XRD analizi, incelenen nanopartiküllerin partikül boyutunu sağlamasına rağmen, UV-Vis çalışmaları aracılığıyla da aynı şeyin doğrulanması gerekmektedir.

2.3.3.2.b. Fourier transform kızılötesi spektroskopisi: Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR), ZnO bağlarının varlığına ek olarak, bitki özlerinin mevcudiyetinin bağ bilgisi yoluyla doğrulanabileceği çok önemli bir karakterizasyon tekniğidir. ZnONP'lerin biyosentezinin gerçekleştiği mekanizma hakkında bir fikir edinirken, biyosentezlenmiş numunenin FTIR spektrumları alınmalıdır. Karşılaştırma yoluyla, çinko tuzlarının indirgenmesinden sorumlu olan fitokimyasallara (yani indirgeyici ajanlar olarak) ve stabilizasyon sürecinden sorumlu olanlara (yani, capping/stabilize edici ajanlar olarak) işaret etmek mümkün olabilir (276). M. Ramesh ve ark., biyosentezden sonra *Solanum nigrum* ve ZnONP yaprak ekstresinin FTIR spektrumları arasında karşılaştırma yapmış ve her iki spektrumda da rastgele protein sarmalına (1240-1261 cm^{-1}) atfedilebilecek olan amid III bandının varlığı gözlenmiştir. Ayrıca protein moleküllerinin (1404 cm^{-1}) amino asit kalıntılarını temsil eden bantlarda (1126, 1030 ve 605 cm^{-1}) karboksil yan grupları bulmuşlardır. Bu gözlem sayesinde,

Solanum nigrum yaprağı ekstresi kullanılarak biyosentezlenen ZnONP'lerin, fonksiyonel gruplar içeren fitokimyasallar (proteinler gibi) ve metabolitler (terpenoidler gibi) ile çevrili olduğunu doğrulamışlardır. Ayrıca amino asit kalıntılarından ve proteinlerden gelen karbonil gruplarının çinko metal iyonu ile bağlanma konusunda güçlü bir yeteneğe sahip olduğunu da göstermişlerdir. Bu nedenle, bu çalışmaya göre proteinlerin, ZnONP oluşumundan ve stabilitesinden sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır (305).

Matinise ve ark., FTIR çalışmaları yoluyla sadece ZnONP oluşumunu doğrulamakla kalmamış, aynı zamanda sentezden hangi fitokimyasalların sorumlu olduğunu ve hangilerinin stabilizasyon amacından sorumlu olduğunu da göstermiştir. Bu çalışmaya göre ekstre spektrumunda bantları daha geniş, sentezlenen ZnONP spektrumunda küçük görülen fitokimyasallar çinko tuzunun (çinko nitrat) ZnO'ya indirgenmesinden kaynaklanmıştır. Çalışmada ZnONP oluşumunda L-askorbik asit, klorojenik asit ve kersetinin rol aldığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar, proteinler, terpenoidler, fenolik asitler ve diğer polifenoller gibi fitokimyasalların varlığının ZnONP oluşumu ve stabilizasyonu için bir ortam sağladığını açıkça göstermektedir (306).

2.3.3.2.c. X-ışını difraktometresi**:** X-ışını kırınımı, inorganik, karbon bazlı veya karmaşık kristal malzemelerin boyut, şekil ve kristal yapılarını analiz etmek için kullanılan bir tekniktir (302). Atom ölçeğinde yüksek uzaysal çözünürlük sunar, ancak kristal malzemelerle sınırlıdır ve elektron kırınımı ile karşılaştırıldığında daha düşük yoğunluğa sahiptir. ZnONP'ler için, kırınım tepeleri (2θ derece) kullanılarak saf altıgen bir wurtzite yapısı tanımlanır ve aşağıdaki Miller-Bravais endekslerine atfedildi: (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) ve (201) (JCPDS No.89-0510 veya JCPDS No.36-1541) (307). Ayrıca XRD sonuçları ortalama partikül boyutunun hesaplanmasına da imkan vermektedir. Khalafi ve ark., klorella sulu ekstresi kullanarak saf ZnONP'leri sentezlemiş ve XRD modeliyle belirlendiği gibi bir altıgen wurtzite yapısı (19.44 nm; Debye-Scherrer denkleminden hesaplanmış) bildirmiştir (308). Abdullayeva ve ark., nanoçiçek, nanotabaka ve nanoçubuk benzeri üç boyutlu ZnO nanoyapılarının kristalliğini araştırmış XRD modellerine göre, tüm ZnO nanoyapıları Miller-Bravais indekslerinin (100), (002) ve (101)'den altıgen wurtzite tipi olduğu tespit edilmiştir (309).

2.3.3.2.d. Taramalı (scanning) elektron mikroskobu: Taramalı elektron mikroskobu, NP'lerin boyut, boyut dağılımı, şekil, agregasyon, dağılım (kriyo-SEM) ve

kristalliği (elektron geri saçılım tespiti) belirlemek için kullanılan yüksek çözünürlüklü bir analiz yöntemidir (302). İnorganik, organik, karbon bazlı, biyolojik ve karmaşık malzemeleri analiz etmek ve bunların küresel veya eş eksenli parçacıklar, tüp, çubuk, lif veya başka şekillerde olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir. Taramalı elektron mikroskobu ile fizyolojik olmayan koşullar altında iletken veya kaplanmış malzemelerin analizi de yapılabilir. Biyomalzemeler için ise kriyojenik yöntem ile analiz etmek gerekir. SEM analizlerinden küreler ve çubuklar dahil olmak üzere çeşitli ZnONP şekilleri rapor edilmiştir (310,311). Çapı 50 nm'den küçük olan küre tipi ZnONP'ler ve elektrokimyasal biyosensörlerde glikozu saptamak amacıyla yapılmış nano petekler, nanoçubuklar, nanolifler, nanoteller ve nano çiviler şeklinde şekillendirilmiş ZnONP'ler de bildirilmiştir (311).

2.3.3.2.e. Transmisyon elektron mikroskobu: Transmisyon elektron mikroskobu boyut ve boyut dağılımını ölçen ve nanomalzeme şekillerinin SEM'e kıyasla daha yüksek çözünürlükle doğrulanabildiği bir analiz yöntemidir (302). Agregasyon, dispersiyon ve kristal yapı TEM ile belirlenebilir. TEM tekniğinde fizyolojik olmayan koşullar altında çok ince örneklerle analiz yapılır. SEM analizide de olduğu gibi inorganik, organik, karbon bazlı, biyolojik ve karmaşık malzemeleri küresel, eş eksenli parçacıklar, borular, çubuklar veya lifler olarak görselleştirmek için kullanılır. ZnONP'lerin boyutu, boyut dağılımı, kristal yapıları ve agregatları TEM kullanılarak analiz edilmektedir (312-314). TEM tekniği, sentez sırasında stabilizatör (gliserol)-çinko kaynağı oranlarına dayalı olarak ZnONP'lerin boyut, boyut dağılımı ve morfolojisini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (302,314).

2.3.3.2.f. Brunauer–Emmett-Teller analizi: Brunauer–Emmett-Teller analizi, inorganik, karbon bazlı ve karmaşık malzemelerin küresel ve eş eksenli parçacıklarının spesifik yüzey alanını ve gözenekliliğinin analiz edildiği bir tekniktir. Bu teknik, uçucu bileşik içermeyen malzemelerin analizi ile sınırlıdır. Ayrıca BET ile partiküller ve partikül olmayan gözenekli malzemeler arasında ayrım yapılamaz (315).

2.3.4. Çinko Oksit Nanopartiküllerin Farmakolojik ve Biyolojik Etkileri

ZnONP'ler, antikanser, antidiyabetik, antimikrobiyal, antienflamatuar ve yara iyileştirme gibi çeşitli biyomedikal aktiviteler gösterirler. Ayrıca görüntüleme ajanlarında ve biyosensörlerde de kullanılırlar (316).

2.3.4.1. Antimikrobiyal aktivite: ZnONP'ler, adsorpsiyonun neden olduğu membran hasarı ve ROS aracılı hücresel toksisite yoluyla antimikrobiyal aktivite gösterirler (310,316). *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa, P. vulgaris, B. subtilis, B. megaterium, Sarcina lutea, Klebsiella pneumonia, C. albicans* ve *A. niger*'e karşı etkili oldukları ise bulunmuştur (253,259,317).

ZnO'nun antimikrobiyal aktivitesi, bitki ekstreleri kullanılarak biyosentez yoluyla arttırılabilir. Bakteri hücresinin dış kısmı yani plazma zarı ZnONP ile karşılaştığında yapısı bozulur ve hücrenin geçirgenliğinde değişiklik meydana gelir. ZnONP daha sonra hücrenin normal işleyişini gerçekleştirdiği sitoplazmaya doğru hareket eder. Hidrojen peroksit ve reaktif oksijen türleri (hidroksil radikalleri ve singlet oksijen gibi) gibi türler üretir ve bu da hücre ölümüne neden olur. Ancak kesin mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır (276,318). Jones ve ark., olası mekanizmayı hücre zarı ve bakteri sitoplazması içinde NP birikimi olabileceğini ifade etmişlerdir. Araştırmalarında ZnONP'lerin *E. coli*'ye karşı yaklaşık 3-10 mM konsantrasyonda bakteri büyümesinde %100 inhibisyon sağladığını bildirmişlerdir (319).

Bakteri hücrelerinde NP birikimi, ZnONP'lerin çinko iyonlarının serbest kalması ile ilgili başka bir antibakteriyel mekanizma ile de ilişkili olabilir. Bazı çalışmalar, büyüme ortamına sızan Zn^{2+} iyonlarının ZnO toksisitesinden sorumlu olabileceğini iddia etmektedir. Kahru ve ark., metalik nanopartiküllerden metal iyonlarının salınmasının antimikrobiyal etkiden sorumlu olabileceğini vurgulamışlardır (320-322).

Sentezlenen ZnONP'lerin mikroplara karşı etkisi, inhibisyon bölgesi aracılığıyla doğrulanabilir; inhibisyon bölgesi ne kadar yüksek olursa, ZnONP etkisi o kadar büyük olmaktadır. İnhibisyon bölgesi, incelenen NP'lerin boyutuyla ters orantılıdır, yani partikül boyutu ne kadar küçük olursa inhibisyon bölgesi daha büyük gözlenir. Rajiv ve arkadaşları tarafından *Parthenium hysterophorus* kullanılarak yeşil sentezlenen ZnONP'lerin boyuta bağlı antifungal aktivitesi incelenmiş ve daha büyük partikül boyutuna sahip olanlara kıyasla daha küçük boyutlu ZnONP'lerin daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (297).

İnhibisyon bölgesinin kapsamını belirleyen diğer bir parametre de ZnO numunesinin konsantrasyonudur. *Limonia acidissima* L. yaprak ekstresi kullanılarak hazırlanan ZnONP'lerin oldukça patojenik bir bakteri olan Mycobacterium tuberculosis üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda ZnONP konsantrasyonu ne kadar

yüksekse, inhibisyonun da o kadar fazla olduğunu ortaya çıkmıştır. Ayrıca, çalışmada ZnONP'lerin *M. tuberculosis* bakterisine karşı etkisinin ayrıntılı mekanizmasından da bahsedilmiştir (323). Konsantrasyonun etkisi, esas olarak mikropların membran geçirgenliğinin artması ve böylece daha fazla sayıda ZnONP'nin hücre içine girmesinin kolaylaşmasına bağlanmıştır. Bu durum sonuçta hücrenin metabolizmasını değiştiren membran bozulmasına neden olmuş ve bu da sonunda hücre ölümüne yol açmıştır (324).

Yuvakkumar ve ark. tarafından *Nephelium lappaceum* kabuğu ekstresi ile hazırlanan ZnONP'ler kullanılarak pamuklu kumaşlarda bulunan bakteri kolonisi inhibe edilmiştir. Standart bir ticari nano ZnONP ile biyosentezlenmiş ZnONP arasında bir karşılaştırma yapılarak biyosentezlenmiş ZnONP kullanımının daha etkili olduğu tespit edilmiştir (21).

Bitki ekstreleri kullanılarak ZnONP'lerin antimikrobiyal aktivitesinin mikroplara karşı etkili olan aktif fitokimyasalların varlığına bağlı olarak arttırılabileceği düşünülmektedir. Daha küçük boyutlu ZnONP'ler daha yüksek aktivite göstermektedir. Ayrıca konsantrasyona bağlı sonuçlar aracılığıyla, daha yüksek konsantrasyonun daha iyi sonuçlar verdiği de bilinmektedir. Ayrıca, biyolojik olarak sentezlenen ZnONP'ler konvansiyonel antibiyotiklere benzer sonuçlar sağlamaktadır (276).

2.3.4.2. Antikanser aktivitesi: Çinko, vücutta homeostazı sürdürmek için birçok enzimin aktivitesini düzenleyen temel bir eser elementtir (325,326). Çinko ayrıca hücreleri kansere karşı koruyan hümoral ve hücresel bağışıklıkta da rol oynar. Çinko eksikliği, DNA mutasyonu ve p53 bozulması yoluyla kanser hücrelerinin oluşması ve yayılmasına neden olmaktadır (325,327,328). ZnONP'ler, diğer çinko malzemelere kıyasla kanser hücrelerine karşı geçirgenliği artırır ve ROS üretilmesi yoluyla kanser hücrelerini öldürebilir (325,329). ZnONP'ler, HepG2 (hepatoselüler karsinom), PC-3, A549 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri), B16F10/A375 (melanom), HeLa, HNSCC (baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom), LoVo/CaCo-2 (kolon kanseri), MCF-7 (meme adenokarsinomu) ve T98G (glioma) hücrelerine karşı tek ajan olarak araştırılmıştır (316,326,330).

ZnONP'ler, kemoterapötiklerin hedefe yönelik ilaç dağıtımı için ilaç taşıyıcı sistem olarak da incelenmiştir (326-330). Foto-uyarımlı, paklitaksel ve sisplatin yüklü ZnONP'ler de UV-A ışıması altında HNSCC hücrelerine karşı teranostik olarak kullanılmıştır (326). Doksorubisin ve daunorubisin ZnONP aracılı ilaç dağıtım sistemleri

kullanılarak MCF-7, A549, K562 (duyarlı lösemi) ve K562/A02 (dirençli lösemi) hücrelerine karşı denenmiştir. Doksorubisin, 0.1 mg/mL konsantrasyonda ZnONP'lere yüklenmiş ve stabilize edilmiştir. Doksorubisin yüklü ZnONP'ler, MCF-7 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite göstermiştir (329). Daunorubisin, kanser hücrelerine karşı pH'a duyarlı ilaç salınımı için altıgen ZnONP çekirdekli çok katmanlı lipozomlara eklenmiştir (330). Aynı zamanda, lösemi hücrelerine karşı sinerjistik antikanser aktivite oluşturmak için aminopolisiloksanla kaplanmış ZnONP'ler de yapılmıştır (331).

2.3.4.3. Antienflamatuar aktivite: ZnONP'ler, patojenlere veya kimyasallara yanıt olarak antienflamatuar aktivite göstermektedir. ZnONP'ler, aktive edilmiş mast hücreleri ve makrofajlarda NF-kB ve kaspaz 1'i inhibe ederek IL-1β ve IL-18 gibi proinflamatuar sitokinlerin üretimini bloke ederek inflamasyonu azaltır. IL-1 ve TNF-α ile birlikte TH2 sitokini olan IL-13 ile ilgili p53'ü artırarak ve timik stromal lenfopoietin üretimini azaltarak mast hücre proliferasyonunu inhibe eder. Ayrıca lipopolisakarit ile indüklenen siklooksijenaz-2 ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunu baskılar (332,333).

Wiegand ve ark., ZnO-fonksiyonelleştirilmiş bir tekstil (Benevit Zink+, Benevit Van Clewe, Dingden, Almanya) ürünü geliştirmiş ve bu ürünün atopik dermatit hastalarının cildinde antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve bakteri üremesini azalttığı tespit edilmiştir (334). Yao ve ark., ZnONP-gömülü titanyum dioksit (TiO2) nanotüplerin antibakteriyel ve antienflamatuar aktivitelere sahip olduğunu tespit etmiştir (335).

2.3.4.4. Yara iyileştirici etki: Temel bir mikro besin maddesi olarak çinkonun, yara onarımında oldukça önemli rolleri bulunmaktadır. Fibrin pıhtısı oluşumuna, enflamatuar yanıtın çözülmesine, hücre proliferasyonu, reepitelizasyon, granülasyon ve anjiyogeneze ve hücre dışı matrisin yeniden modellenmesine katkıda bulunur (29,30).

ZnONP'ler, yaralara uzun süreli çinko temini sağlayarak, hücreye etkili bir şekilde nüfuz etmek, bağışıklık sistemini modüle etmek ve dezenfeksiyon sağlamak gibi ilgi çekici terapötik etkilere sahiptir. Arttırılmış antibakteriyel etkileri ve yeniden epitelizasyona katkıları çeşitli yara çalışmaları ile bildirilmiştir (31,336). Gao ve ark., cilt yaralarının kapatılması için antimikrobiyal doku yapıştırıcıları olarak ZnONP'leri araştırmış ve aljinat/nano-ZnO kompozit bandajlar *S. aureus* ve *E. coli* ile enfekte olmuş yaralarda iyileştirici etki gösterdiği görülmüştür (337). Jin ve ark., ZnO nanoçubuklarının

doku mühendisliği için adiposit türevli kök hücrelerin (ADSC'ler) proliferasyonunu arttırdığını bildirmiştir (338). Zn/(Cu) ve ZnO/morina karaciğeri yağının topikal farmasötik formülasyonları, hücresel çoğalma ve yeniden epitelizasyon oranlarını düzenlemiştir. Özellikle, ZnO/morina karaciğeri yağı merhemi, deksametazon tedavisi ile geciktirildikten sonra yara iyileşme oranını önemli bir şekilde arttırmıştır (339).

2.3.4.5. Antidiyabetik aktivite: Çinkonun, vücutta metabolik homeostazı sürdürmek için gereken enzimlerin işlevindeki rolü nedeniyle tip 1 ve tip 2 diyabeti iyileştirebileceği düşünülmektedir (340,341). Temel bir mikro besin olarak çinko, insülinin sentezi, depolanması ve salgılanması ile ilişkilidir (342). Spesifik olarak çinko, çinko-insülin heksamerleri aracılığıyla insülinin yapısal bütünlüğünü arttırır. Çinko ayrıca glikoz emilimini engelleyerek ve iskelet kası ve yağ dokusu tarafından glikoz alımını artırarak kan glikoz seviyelerini düşürmektedir. El-Gharbawy ve ark., bir antidiyabetik ilaç olan vildagliptinin (10 mg/kg/gün, oral uygulama) ve altıgen ZnONP'lerin tip 2 diyabet modelinde beta hücrelerinin yapısını ve işlevini restore ettiğini bildirmiştir (340). Umrani ve Paknikar, tip 1 ve 2 diyabetli sıçan modellerinde altıgen ZnONP'lerin (10–15 nm) antidiyabetik aktivitesini göstermiştir (341).

2.3.4.6. Fotokatalitik aktivite: Tekstil endüstrisinden kaynaklanan bir atık olarak yayılan boyalar, uygun şekilde bertaraf edilmediği takdirde su ve çevre kirliliğine neden olur. Bu durum sucul canlıların yaşamını tehlikeye atmaktadır. Bu durum çevreye herhangi bir zarar vermeden böyle bir sorunun üstesinden gelmek için yeni yöntemlerin araştırılmasına ve organik kirleticileri (boyaları) parçalamak için fotokatalizin keşfine yol açmıştır (343). ZnONP'ler, toksik olmaması, yüksek elektron hareketliliği, daha iyi stabilite ve maliyet etkinliği gibi özelliklerinden dolayı en çok tercih edilen fotokatalizörler arasındadır. Stan ve ark., metilen mavisi boyanın bozunma verimliliğine dayalı olarak *Allium sativum, Allium cepa, Petroselinum crispum* kullanarak biyosentezlenmiş ZnONP'ler ile normal ZnONP'ler üzerinde karşılaştırmalı bir çalışma yürütmüştür. Araştırmalarında, bozunma sırasını ZnONP (*Allium sativum*) > ZnONP (*Allium cepa*) > ZnONP (*Petroselinum crispum*) > ZnONP olarak tespit edilmiştir. Biyosentezlenmiş ZnONP'lerin normal ZnO ile karşılaştırıldığında üstünlüğünün, partiküllerin boyutunun daha küçük olması nedeniyle katalizör yüzeyinde daha fazla sayıda reaksiyon alanına sebep olması nedeniyle olduğu düşünülmüştür (344).

Fotokatalizör aktivitede diğer bir önemli parametre ise ZnONP'lerin morfolojisidir. Farklı yapılar, reaktif türlerin ve boya moleküllerinin adsorpsiyon ve reaksiyonlarının meydana geldiği çeşitli derecelerde reaksiyon bölgelerine sahiptir. Sharma, ZnO nanoparçacıklarının farklı yapılarının sentezlendiği ve Alizarin Red-S boyasına karşı fotodegradasyon etkinliklerinin incelendiği bir deneyde, bozunma etkinliğinin nano çiçeklerde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Nano çiçekler, muhtemelen daha yüksek sayıda reaksiyon bölgesi nedeniyle, diğer ZnONP'ler arasında en etkili fotokatalizör olarak bulunmuştur (345).

ZnONP'lerin boyutu ve morfolojisi, çalışma için alınan ZnONP miktarı, boya çözeltisinin konsantrasyonu ve kullanılan ışık kaynağının yoğunluğu gibi parametreler göz önüne alındığında, bozunma işleminin verimliliği arttırılabilmektedir.

2.4. MUKOADEZİF SİSTEMLER

Mukoadezyon kavramı ilaç teknolojisinde oldukça ilgi görmektedir. Adezyon, basınca duyarlı bir yapıştırıcı ile bir yüzey arasındaki temas sonucu oluşan bağ olarak tanımlanmaktadır. Mukoadezif ilaç dağıtım sistemleri, uygulama veya absorpsiyon bölgesinde dozaj formunun kalma süresini uzatır. Bu sistem dozaj formunun alttaki absorpsiyon yüzeyi ile yakın temasını kolaylaştırır ve böylece ilacın terapötik etkinliğini geliştirir. Günümüzde hem sistemik hem de lokal etkiler için oral, bukkal, nazal, rektal ve vajinal yolla uygulanabilen birçok mukoadezif ilaç dağıtım sistemi geliştirilmiştir (346,347).

Mukoadezif ilaç dağıtımı için tasarlanan dozaj formları, hastalar tarafından kabul edilebilecek kadar küçük ve esnek olmalı, ayrıca tahrişe neden olmamalıdır. Mukoadezif dozaj formunun arzu edilen diğer özellikleri arasında yüksek ilaç yükleme kapasitesi, kontrollü ilaç salımı (tercihen tek yönlü salma), iyi adezif özellikler, pürüzsüz yüzey, tatsızlık ve uygun uygulama yer almaktadır.

Ayrıca, mukoadezif sistemlerin, dozaj formu ile emici mukoza arasında yakın temas nedeniyle emici dokuda yüksek ilaç akışı sağlamaktadır (348). Bukkal, vajinal, rektal gibi farklı uygulama yolları olan mukoadezif ilaç sistemlerinin pek çok avantajı bulunmaktadır (349).

• İlacın uygulandığı bölgede adezyon nedeni ile kalma süresi artar ve böylece ilacın absorpsiyonu artırılabilir.

• Kontrollü salım sistemi ile ilaç uygulama sıklığı azaltılabilir.

• Mukozal yüzeyden emilimin hızlı olmasından dolayı etki daha hızlı başlar.

• İlaç lokalize bir bölgeye uygulandığı için doza bağlı gelişebilecek yan etkiler minimize edilebilir.

• İlaç gastrointestinal bozunma ve ilk geçiş etkisine uğramadan ilgili mukozadan emilim sağlanarak etki gösterir.

• Hedefe yönelik ilaç uygulaması yapılabilir.

• Uygulama kolaylığı nedeniyle hasta uyumu daha iyi sağlanır.

• Tüm bunlar ilacın biyoyararlanımını artırabilir (349).

2.4.1. Mukoadezyon Mekanizmaları

Mukoadezyon mekanizmaları temas aşaması ve konsolidasyon aşaması olarak iki aşamada incelenir. İlk aşama, mukus tabakası ile derin temasın başladığı formülasyonun yayılması ve şişmesiyle mukoadezif ve mukus zarı arasındaki temas olmasıdır (350,351).

Konsolidasyon aşamasında ise mukoadezif malzemeler nem mevcudiyeti ile aktive edilir. Nem, mukoadezif moleküllerin serbest kalmasını, zayıf van der Waals ve hidrojen bağları ile bağlanmasını izin sağlar. Aslında konsolidasyon adımını açıklayan iki teori bulunmaktadır: difüzyon teorisi ve dehidrasyon teorisi. Difüzyon teorisine göre, mukoadezif moleküller ve mukusun glikoproteinleri, zincirlerinin iç içe geçmesi ve ikincil bağların kurulması yoluyla karşılıklı olarak etkileşir. Bunun gerçekleşmesi için, mukoadezif sistem hem kimyasal hem de mekanik etkileşimleri destekleyen özelliklere sahiptir. Örneğin, hidrojen bağı oluşturma gruplarına (–OH, –COOH), anyonik yüzey yüküne, yüksek moleküler ağırlığa, esnek zincirlere ve mukus tabakası boyunca yayılmaya yardımcı olan yüzey aktif özelliklere sahip moleküller, mukoadezif özellikler gösterebilir (350,351).

2.4.2. Mukoadezyon Teorileri

Mukoadezyon karmaşık bir süreçtir ve ilgili mekanizmaları açıklamak için çok sayıda teori ortaya konulmuştur. Bu teoriler mekanik kilitleme, elektrostatik, difüzyon iç içe geçme, adsorpsiyon ve kırılma teorilerini içerir. Tüm bu teoriler, bireysel ve alternatif teorilerden ziyade, mukus/substrat etkileşiminin farklı aşamalarında yer alan tamamlayıcı

süreçler olarak düşünülmektedir. Her teori, mukoadezyon sürecini tanımlamak için oldukça önemlidir. Müsinin başlangıçta ıslanması ve daha sonra polimerin müsin tabakasına difüzyonu, böylece tabakalardaki kırılmanın yapışmayı veya elektronik aktarımı etkilemesine ve de sonuç olarak mukoadezyonu sağlayan adsorpsiyona neden olma ihtimali bulunmaktadır. Mukoadezif bir bağın oluşturulduğu mekanizma, mukus zarının ve mukoadezif materyalin doğasına, formülasyon tipine, bağlanma prosesine ve bağlanma ortamına bağlı olarak değişmektedir (351,352).

2.4.2.1. Islanma teorisi: Islanma teorisi, sıvı veya düşük viskoziteye sahip sistemlerin yüzeye yayılmak için yüzeye yakınlık göstermesi ve temas açısı gibi ölçüm tekniklerinin kullanıldığı bir teoridir. Genel olarak temas açısı ne kadar düşükse, afinitenin o kadar büyük olacağını belirtir. Yeterli yayılabilirliği sağlamak için temas açısı sıfıra eşit veya sıfıra yakın olmalıdır. Bu teori, iyi miktarda mukoadezyon elde etmek için temas açısının ile yüzey ve ara yüzey enerjilerinin azaltılması gerektiğini açıklamaktadır (351).

2.4.2.2. Difüzyon teorisi: Difüzyon teorisi hem polimer hem de müsin zincirlerinin, yarı kalıcı bir yapışkan bağ oluşturmak için yeterli derinliğe nüfuz etmesini tanımlayan bir teoridir. Polimer zincirlerinin penetrasyon derecesi ile yapışma kuvvetinin arttığına inanılmaktadır. Bu penetrasyon hızı, difüzyon katsayısına, mukoadezif zincirlerin esnekliğine ve doğasına, hareketliliğe ve temas süresine bağlıdır. Literatüre göre, verimli bir biyoyapışkan bağ oluşturmak için gereken iç içe geçme derinliği 0,2-0,5 μm aralığındadır (351). Bir polimerin yapışma kuvvetine, penetrasyon derinliği yaklaşık olarak polimer zincir boyutuna eşit olduğunda ulaşılır. Difüzyonun gerçekleşmesi için, ilgili bileşenlerin karşılıklı olarak iyi çözünürlüğe sahip olması önemlidir. Yani hem mukoadezif hem de mukus benzer kimyasal yapılara sahip olmalıdır. Yapısal benzerlik ne kadar fazlaysa, mukoadezif bağ o kadar iyi olmaktadır (351).

2.4.2.3. Kırılma teorisi: Kırılma teorisi, mukoadezyonun mekanik ölçümü üzerine yapılan çalışmalarda en çok kullanılan teorilerden birisidir. Adezyon gerçekleştikten sonra iki yüzeyi ayırmak için gereken kuvvet analiz edilir. Bu kuvvet, kopmaya karşı direnç testlerinde sıklıkla, maksimum ayrılma kuvveti ve yapıştırıcı etkileşiminde yer alan toplam yüzey alanı oranıyla hesaplanır. Kırılma teorisi sadece parçaları ayırmak için gereken kuvvetle ilgili olduğundan, polimer zincirlerinin iç içe geçmesini veya difüzyonunu hesaba katmaz. Sonuç olarak, polimer zincirlerinin mukus

tabakasına nüfuz etmediği katı veya yarı katı mukoadezif malzemeler için hesaplamalarda kullanılması daha uygundur (350,351).

2.4.2.4. Elektronik teori: Bu teori, mukus ve mukoadezif sistem arasında elektron transferi yoluyla meydana gelen ve yapısal farklılıklardan kaynaklanan yapışmaya dayanan bir teoridir. Mukus ve mukoadezif arasındaki elektron transferi, mukus ve mukoadezif ara yüzeyinde çift katmanlı elektrik yüklerinin oluşmasına neden olur. Sonuç olarak, bu çift tabaka içinde çekici kuvvetlerin oluşmasına neden olmaktadır (351,353).

2.4.2.5. Adsorpsiyon teorisi: Bu teoride, adezyon, yapışkan polimer ve mukus substratı arasındaki çeşitli yüzey etkileşimlerinin (birincil ve ikincil bağlanma) sonucunda meydana gelmektedir. Kemisorpsiyonlardan kaynaklanan birincil bağlar, kalıcılıkları nedeniyle genellikle istenmeyen iyonik, kovalent ve metalik bağ nedeniyle yapışma ile sonuçlanır (354). İkincil bağlar esas olarak van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağı nedeniyle ortaya çıkar. Bu etkileşimler "kırılmak" için daha az enerji gerektirirken, yarı kalıcı bağlar olma avantajına sahip olduklarından, mukoadezyon süreçlerinde en belirgin yüzey etkileşimi şeklidir (355).

2.4.2.6. Mekanik teori: Mekanik teoriye göre adezyon, kaba yüzey üzerindeki düzensizliklerin mukoadezif ajan tarafından doldurulması sonucu gerçekleşmektedir. Ayrıca bu düzensizlikler adezyonun gerçekleşmesinde gerekli olan etkileşimler için mevcut yüzey alanını artırmaktadır (351,356).

2.4.3. Mukoadezyonu Etkileyen Faktörler

2.4.3.1. Moleküler ağırlık: Molekül ağırlıkları 100000 üzerindeki polimerlerin mukoadezif gücü artmaktadır. Molekül ağırlığı yüksek olan polimerlerin düşük molekül ağırlığındaki polimerlere göre daha iyi yüzeyler arası etkileşim gösterdikleri belirtilmektedir (347).

2.4.3.2. Esneklik: Mukoadezyon, polimer zincirlerinin arayüzey bölgesine difüzyonu ile başlar. Bu nedenle, mukusla istenen dolaşmayı elde etmek için polimer zincirlerinin önemli derecede esneklik göstermesi önemlidir (357). Genel olarak polimerlerin hareketliliği ve esnekliği viskoziteleri ve difüzyon katsayıları ile ilişkili

olabilir. Çünkü bir polimerin esnekliğinin yüksek olması mukus ağına daha iyi difüze olmasına neden olmaktadır (358).

2.4.3.3. Çapraz bağlama yoğunluğu: Ortalama gözenek boyutu, çapraz bağlı polimerlerin sayısı ve ortalama moleküler ağırlığı ve çapraz bağlanmanın yoğunluğu, bir polimer ağının üç önemli ve birbiriyle ilişkili yapısal parametresidir. Bu nedenle, artan çapraz bağlanma yoğunluğu ile birlikte suyun polimer ağına difüzyonunun daha yavaş meydana gelmesi ve bunun sonucunda polimerin daha az şişmesine ve polimer ile müsin arasında daha düşük bir iç içe geçme hızına neden olmaktadır (358).

2.4.3.4. Hidrojen bağı kapasitesi: Hidrojen bağı, bir polimerin mukoadezyonunu etkileyen bir başka önemli faktördür. İstenen polimerler, hidrojen bağları oluşturabilen fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır ve bu hidrojen bağı potansiyelini geliştirmek için polimerin esnekliği önemlidir (358). Poli (vinil alkol), hidroksillenmiş metakrilat ve poli (metakrilik asit) gibi polimerler ve bunların tüm kopolimerleri iyi hidrojen bağı kapasitesine sahiptir (359).

2.4.3.5. Hidrasyon: Mukoadezif bir polimerin genleşmesi ve yeterli büyüklükte uygun bir makromoleküler mes oluşturması, polimer ve müsin arasındaki interpenetrasyon sürecini geliştirmek ve polimer zincirlerinde hareketliliği indüklemek için hidrasyon gereklidir. Polimer şişmesi, polimer ile mukus ağı arasındaki hidrojen bağı ve/veya elektrostatik etkileşim için mukoadezif bölgeleri açığa çıkararak mekanik bir karışmaya izin verir (358). Bununla birlikte, optimum şişme ve mukoadezyonun meydana geldiği yerde, mukoadezif polimerin kritik bir hidrasyon derecesi mevcuttur (359).

2.4.3.6. Elektriksel yük: Mukoadezif polimerlerin yükü hakkında daha önce, iyonik olmayan polimerlerin, anyonik polimerlere kıyasla daha küçük bir yapışma derecesine maruz kaldığı görülen bazı genellemeler yapılmıştır. Polimer üzerindeki anyonik yük, mukoadezyon için gerekli özelliklerden biridir (359). Bazı katyonik polimerlerin, özellikle nötr veya hafif alkali bir ortamda, üstün mukoadezif özellikler göstermesi beklenmektedir (360). Ek olarak, kitosan gibi bazı katyonik yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin iyi yapışma özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir (361). Membran yükünün mukoadezyon üzerindeki etkisi hakkında önemli bir literatür yoktur, ancak membranın pH'ı polimerlerin iyonize veya iyonize olmayan formlarını etkileyebileceğinden mukoadezyonu etkileyebileceği düşünülebilir (362).

2.4.3.7. Konsantrasyon: Polimer konsantrasyonu çok düşük olduğunda, mukusun birim hacmi başına nüfuz eden polimer zincirlerinin sayısı azalır ve bu nedenle polimer ile mukus arasındaki etkileşim de azalmaktadır. Genel olarak, daha konsantre polimer ile daha uzun nüfuz eden zincir uzunluğu ve daha iyi adezyon ile sonuçlanacaktır. Bununla birlikte, her polimer için, polimerin önemli ölçüde sarmal bir yapı nedeniyle "sertleşmemiş" bir yapı ürettiği kritik bir konsantrasyon vardır. Sonuç olarak, çözücünün polimere erişimi ve polimerin zincir penetrasyonu büyük ölçüde azalır. Bu nedenle, daha yüksek polimer konsantrasyonları bazı durumlarda mukoadezif özellikleri fiilen azaltabilir. Bu faktörü ele alan çalışmalardan biri, film oluşturucu polimerler olarak polivinilpirolidon veya poli (vinil alkol) bazlı esnek polimerik filmlerin yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasının polimerin mukoadezif özelliklerini artırmadığını göstermiştir (363).

2.4.3.8. Çevresel ve fizyolojik faktörler: Mukoadezyonu etkileyen çevresel ve fizyolojik faktörler bulunmaktadır. Tükürük akış hızı ve müsin döngüsü, pH, temas süresi, yeme-içme bu faktörler arasında sayılabilmektedir (349,364). Tükürük akış hızı ve müsin döngüsü, biyoadezyonu etkileyen en önemli faktörlerdendir. Çünkü tükürük, polimer için etkileşim ve çözünme ortamı olmakla birlikte ortamın pH'sını da belirlemektedir. pH değişkenliği polimerin iyonizasyonunu değiştirerek biyoadezif özelliğini etkilemektedir (364). Temas süresi ile biyoadezif etkinlik arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır. Biyoadezif sistemin mukozaya yapışabilmesi için belirli bir süre basınçla temas ettirilmesi gerekmektedir. Hastalık vb. durumlarla değişebilen müsin döngüsü de temas süresini etkileyen faktörlerdendir (347). Yemek yeme, içme ve konuşma da bukkal bölgede mukoadezyonu etkilemektedir. Bu sebeple bukkal biyoadezif formülasyonların tasarımında bu fonksiyonların göz önünde bulundurulması gerekmektedir (364).

2.4.4. Mukoadezyonun Ölçüm Yöntemleri

Mukozaya adezyon özelliklerinin analiz edilmesi, ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde temel unsurlardan birisidir. Dozaj formlarının mukoadezif özellikleri, geleneksel olarak, gerilme çalışmaları, görsel ayrılma / çözünme zamanı yöntemleri ve akış tutma teknikleri gibi in vitro yöntemlerle değerlendirilir (365,366).

Mukoadeziflik ölçümü yöntemleri:

• Gerilme direnci metodu

• Wilhelmy tablası yüzey gerilim metodu

• Değiştirilmiş yüzey gerilim metodu

• Floresans işaretleme metodu

• Akış kanal metodu

• Özafagusa yapışma metodu

• Software kontrollü penetrometre (Texture Analyser) metodudur.

2.4.5. Mukoadezif İlaç Uygulama Bölgeleri

Mukoadezif polimerlerin farmakolojik olarak yaygın uygulama alanları arasında ağız boşluğu, göz konjonktivası, vajina, burun boşluğu ve gastrointestinal tüp (GİT) bulunur.

Dil altı mukozası, çok sayıda düz kas varlığından dolayı bukkal mukozaya göre nispeten daha geçirgendir. Bu nedenle, dilaltı uygulama formülasyonları, aktif ajanı hızlı bir şekilde salmak üzere tasarlanırken, mukoadezif formülasyon, aktif ajanın kontrollü bir şekilde salınmasını gerektirdiği için bukkal mukoza aktif ajanların verilmesi için daha uygundur (367).

Bukkal uygulama sistemlerinin geliştirilmesi için kullanılan çeşitli mukoadezif polimerler arasında siyanoakrilatlar, poliakrilik asit, sodyum karboksimetilselüloz, hyaluronik asit, hidroksipropilselüloz, polikarbofil, kitosan ve gellan bulunur. Salım sistemleri ayrıca etken maddenin tükürük tarafından yıkanmasını önlemek için genellikle ilaç ve su geçirmeyen bir film ile kaplanabilir (368).

Bukkal kavite gibi, nazal kavite de mukoadezif polimerlerin uygulanabileceği formülasyonların geliştirilmesi için potansiyel bir alan sağlar. Nazal mukoza tabakasının yüzey alanı yaklaşık 150-200 cm^2'dir. Partiküllü bir maddenin burun mukozasında kalma süresi, yabancı partiküllü bir maddenin mevcudiyetinde mukosiliyer tabakanın aktivitesinin artması nedeniyle 15-30 dakika arasında değişir. Nazal dağıtım sisteminin geliştirilmesi için formülasyonların geliştirilmesinde kullanılan polimerler arasında metil vinil eter, hidroksipropilmetilselüloz (HPMC), sodyum karboksimetilselüloz (CMC), karbopol-934P ve Eudragit RL-100 bulunur (369-371).

Sürekli gözyaşı oluşumu ve göz kapaklarının hareketi nedeniyle, aktif ilacın oküler boşluktan hızlı bir şekilde çıkarılması, aktif maddelerin biyoyararlanımını azaltır. Bu durum, ilaçların oküler insert veya yama kullanılarak en aza indirilebilir. Oküler uygulama için kullanılan mukoadezif polimerler arasında tiyolatlı poli (akrilik asit), poloksamer, selüloz asetoftalat, metil selüloz, hidroksi etil selüloz, poli (amidoamin) dendrimerler, poli (dimetil siloksan) ve poli (vinil pirolidon) bulunur (372-374).

Vajinal ve rektal lümen de aktif ajanların hem sistemik hem de lokal olarak verilmesi için araştırılmıştır. Bu uygulama yolu ile sistemik uygulama için amaçlanan aktif maddeler, hepatik ilk geçiş metabolizmasına uğramaz. Ancak, aktif maddenin vajinal/rektal lümen içinde hareketi etkinliği düşürebilmektedir. Dağıtım sisteminin geliştirilmesi için mukoadezif polimerlerin kullanılması, bunların lümen içerisinde daha uzun süre kalmasını sağlayabilir ve ve böylece daha iyi terapötik etkinlik gösterir. Vajinal ve rektal dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılan polimerler arasında müsin, jelatin, polikarbofil ve poloksamer bulunur (375,376).

GİT mukoadezif formülasyonların geliştirilmesi için araştırılan potansiyel bir alandır. Mukoadezif polimerler kullanılarak gastrointestinal sistemin belirli bir yerindeki dağıtım sistemlerinin geçiş süresinin modülasyonu, araştırmacılar arasında büyük ilgi uyandırmıştır.

Oral uygulama sistemlerinin geliştirilmesi için kullanılan çeşitli mukoadezif polimerler arasında kitosan, poliakrilik asit, aljinat, polimetakrilik asit ve sodyum karboksimetil selüloz bulunur (377).

Her bir mukoadezyon bölgesi, dozaj formunun o bölgede uzun süreli kalması temel özelliği ile birlikte kendi avantaj ve dezavantajlarına sahiptir. Bukkal ve dilaltı bölgelerde, ilk geçiş metabolizmasını atlamakla birlikte hızlı bir başlangıç avantajı vardır, ancak bu bölgeler tat alma, gıda alımı ve tükrük salgısı nedeniyle çeşitli dezavantajlara sahiptir. GİT'de mikrovillus nedeniyle iyileştirilmiş miktarda absorpsiyon şansı vardır, ancak asit kararsızlığı ve ilk geçiş etkileri gibi bir dezavantajı bulunmaktadır. İlacın lokal etkisi için rektal ve vajinal bölgeler uygundur ancak uygulama zorluğu bulunmaktadır. Nazal ve oftalmik yollar, mukosiliyer drenajın dozaj formunu bölgeden temizlemesi nedeniyle dezavantaja sahiptir (362).

Bukkal kavite, yaklaşık 50 cm^2'lik sınırlı bir yüzey alanına sahiptir, ancak bölgeye kolay erişim, aktif maddelerin verilmesi için tercih edilen bir yer olmasını sağlamaktadır.

Bu alan, oral lezyonların lokal tedavisine ek olarak hepatik ilk geçiş metabolizmasından kaçınarak farmakolojik olarak aktif ajanları sistemik olarak verme fırsatı da sunar (378).

2.4.6. Mukoadezif Dozaj Formları

2.4.6.1. Tabletler: Tabletler küçük, düz ve oval yapıda olup yaklaşık 5-8 mm çapındadır. Geleneksel tabletlerin aksine, mukoadezif tabletler, büyük bir rahatsızlık duymadan yemek yeme, içme ve konuşmaya izin verirler. Yumuşarlar, mukozaya yapışırlar ve çözünme ve/veya salınım tamamlanana kadar uygulama bölgesinde kalabilirler. Mukoadezif tabletler genel olarak kontrollü salım ilaç dağıtımı için kullanılma potansiyeline sahiptir, ancak mukoadezif özelliklerin tablete bağlanması ek avantajlara sahiptir. Örneğin, yüksek yüzey-hacim oranı nedeniyle ilaçların verimli absorpsiyonunu ve gelişmiş biyoyararlanımını sağlanmaktadır ve mukus tabakasıyla çok daha yakın bir temas oluşmaktadır. Mukoadezif tabletler, midede bulunanlar da dahil olmak üzere herhangi bir mukozal dokuya yapışacak şekilde özelleştirilebilirler. Böylece lokalize ve sistemik kontrollü ilaç salınımı imkanı sunarlar. Mide epitelinin mukozal dokularına mukoadezif tabletlerin uygulanması, lokalize etki için kullanılır.

Mukoadezif tabletler, ilacı uzun süre saldıkları, ilaç uygulama sıklığını azalttığı ve hasta uyumunu iyileştirdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır. Mukoadezif tabletlerin en büyük dezavantajı ise uzun süreli ve tekrarlanan kullanım için zayıf hasta uyumuna yol açan fiziksel esnekliklerinin olmamasıdır (379-382).

2.4.6.2. Filmler: Mukoadezif filmler, esneklik ve rahatlık açısından yapışkan tabletlere göre tercih edilebilirler. Ek olarak, kolayca yıkanıp tükürük ile uzaklaştırılan oral jellerin mukoza üzerinde nispeten kısa kalma sürelerini engelleyebilirler. Ayrıca, ağız hastalıkları için lokal uygulama durumunda, filmler ayrıca yara yüzeyinin korunmasına yardımcı olarak ağrıyı azaltmaya ve hastalığı daha etkili bir şekilde tedavi etmeye yardımcı olur. İdeal bir film esnek, elastik ve yumuşak olmalı, ancak ağız hareketleri nedeniyle kopmaya dayanacak kadar güçlü olmalıdır. Aynı zamanda, istenen etki süresi boyunca ağızda tutulabilmesi için iyi bir mukoadezif özellik göstermelidir (383-385).

2.4.6.3. Yamalar: Yamalar, geçirimsiz bir arka katman, ilacın kontrollü bir şekilde serbest bırakıldığı ilaç içeren bir rezervuar katmanı ve mukozal tutunma için bir

mukoadezif yüzeyden oluşan laminatlardır. Yama sistemleri, transdermal ilaç dağıtımında kullanılanlara benzemektedir (386,387).

2.4.6.4. Jeller ve merhemler: Jeller ve merhemler gibi yarı katı dozaj formları ağız mukozasında kolay dağılma avantajına sahiptir. Ancak yarı katı dozaj biçimlerinden ilaç dozlaması, tabletler, yamalar veya filmlerdeki kadar doğru olmayabilir. Mukoadezif formülasyonlar kullanılarak, jellerin uygulama alanında uzun süre tutulması sağlanmaktadır. Bazı mukoadezif polimerler, örneğin, sodyum karboksimetilselüloz, karbopol, hyaluronik asit ve ksantan zamkı sıvıdan yarı katıya bir faz değişikliğine uğrar. Bu değişiklik, ilaçların sürekli ve kontrollü salımıyla sonuçlanan viskoziteyi arttırır.

Hidrojeller ayrıca bukkal ilaç dağıtımı için umut verici bir dozaj formudur. Sulu bir ortamda hidrate olan polimerlerden oluşurlar ve difüzyon veya erozyon yoluyla daha sonra yavaş salım için ilaç moleküllerini fiziksel olarak yakalarlar (388-391). Mukoadezif jellerin uygulanması, ağız boşluğunda uzun bir alıkonma süresi, yeterli ilaç penetrasyonu ve ayrıca yüksek etkinlik ve hasta tarafından daha rahat kabul edilebilirlik gibi avantajlara sahiptir (378,392-394).

2.5. EMULJELLER

Jeller, büyük miktarda sulu veya hidroalkolik bir sıvının kolloidal katı parçacıklar ağı içinde tutulmasıyla oluşur (395). Jellerin birçok avantajının yanı sıra hidrofobik ilaçların dağıtımı konusunda önemli bir dezavantajı bulunmaktadır (396). Emüljeller ise bu sınırlamaların üstesinden gelmek için özel hazırlanmış ajanlardır (397).

Su içinde yağ emülsiyonları veya yağ içinde su emülsiyonları olmak üzere iki tür emüljel vardır. Bunlar bir jelleştirici ajanın eklenmesiyle jelleştirilir. Her iki emüljel türü de ilaç taşıyıcı araç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Deriye ve mukozaya kolayca nüfuz edebildikleri için ayırt edici bir kaliteye sahiptirler (395,398).

Su fazına jelleştirici bir ajanın ilavesiyle klasik bir emülsiyon oluşur; bu formülasyon emüljel olarak adlandırılır. Başka bir ifadeyle ilaç dağıtımını iyileştirmek için birden fazla formülasyon bir araya gelerek, yani klasik jel formülasyonu ile emülsiyon bir araya getirilerek emüljel formülasyonu meydana gelir. Bu formülasyonlar hem jel hem de emülsiyon özelliklerine sahiptir ve bu nedenle uygulanma noktasında pek çok avantajları bulunmaktadır (395,397,399).

Emüljellerin, tiksotropik, yumuşatıcı, kolay çıkarılabilir olması, uzun raf ömrüne sahip olmaları, biyouyumlu olmaları, hastalar tarafından kolay kabul edilebilir, şeffaf görünümlü ve yağsız olmaları gibi olumlu özellikleri de bulunmaktadır (398).

Amerikan Farmakopesi tarafından açıklanan jel tanımına göre; jeller, sıvı ile çevrelenmiş küçük inorganik parçacıklardan veya büyük organik moleküllerden oluşan yarı katı dispersiyonlardır. Jellerin de çeşitli avantajları vardır, ancak hidrofobik ilaçların dağıtımı söz konusu olduğunda hala birçok sınırlaması bulunmaktadır.

Bu sınırlamalara bir çözüm bulmak ve ilaçların jel formülündeki dağılımının sağlamak için, hidrofobik ilaçların emülsiyonda ve sonra jelde birleştirildiği emüljel teorisi ortaya çıkmıştır. Böylece hem jelin hem de emülsiyonların faydalarının elde edildiği bir yaklaşım sağlanmaktadır (400).

2.5.1. Emüljellerin Avantajları

Emüljel kullanımının birçok avantajı bulunmaktadır. İntravenöz tedavinin bazı sakıncalarından kaçınmak, gastrik boşalma, farklı enzimlerin varlığı, pH değişikliği gibi absorpsiyonu etkileyen koşulların üstesinden gelmek sağladıkları avantajların başında gelmektedir (401). Daha yüksek sıvı bileşeni içermesi nedeniyle ilaçların çözünmesini hızlandırır. İlaçların ve sıvıların çoğu için merhem veya krem bazı ile birleştirilmiş bir araç içerisinde hareket etmesine izin verir (402).

Hidrofobik ilaçlar, emülsiyonlar kullanılarak jellere etkili bir şekilde dahil edilebilir. Ancak çoğu, doğrudan bir jel bazına birleştirilemez ve ilacın serbest bırakılması sırasında çözünürlük engeli ortaya çıkabilir (403). Bu sorunu çözmek için emüljeller kullanılır. Emüljeller, yağ globüllerinin sulu fazda dağılmasını takiben hidrofobik ilaçların yağ fazına dahil edilmesine yardımcı olur, bu da emülsiyon oluşumu ile sonuçlanır. Hazırlanan emülsiyon daha sonra daha iyi stabilite sağlayan jel fazına karıştırılabilir. Bu da ilacın daha iyi stabilitesini ve salınımını sağlar. Ayrıca emüljellerin oluşumları, kullanımları ve hasta tarafından kabul edilebilirlikleri nedeniyle diğer ilaç dağıtım sistemlerinden daha üstün olduğu kabul edilir (404).

Bir diğer önemli konu da ajanın stabilitesidir. Tozlar doğaları gereği higroskopiktir. Kremlerde de bozulma veya faz inversiyonu görülürken, benzer şekilde merhemlerde de bozulma görülebilmektedir. Emuljeller ise diğer transdermal preparatlara kıyasla daha iyi stabilite gösterirler (397,399,403,405).

Emüljeller, daha iyi ilaç yükleme kapasitesi gösterirler. Nano boyuttaki niozomlar ve lipozomlar gibi diğer ilaç dağıtım sistemleri veziküler yapıları nedeniyle sızıntıya neden olabilirken emüljeller, daha çok ilaç yükleme kapasitesine sahiptir (397-399,403,405).

Emüljellerin üretimi veya hazırlanması, üretim fizibilitesini artıran basit ve kısa adımlardan oluşur. Emüljelin hazırlanması için özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmaz. Emüljellerin hazırlanmasında kullanılan malzemelerin kolay temin edilebilir olması ve maliyetinin ucuz olması nedeniyle üretim maliyeti düşüktür (404).

Bununla birlikte emüljellerin üretimi sırasında sonikasyona gerek yoktur, bu nedenle veziküler moleküllerin üretiminde ortaya çıkan sorun, yani ilaç bozulması görülmez. Emüljeller ayrıca kontrollü salımın yanı sıra yarılanma ömürleri daha kısa olan ilaçların etkisini uzatmak için de tercih edilirler. Son olarak bu jeller daha az yağlı olduklarından ve cilt yüzeyine uygulanması kolay olduğundan dolayı hasta uyumu oldukça iyi seviyededir (406,407).

2.5.2. Emüljellerin Dezavantajları

Pek çok avantajının yanı sıra emüljellerin dezavantajları da vardır. Başlıca dezavantajları ilacın partikül boyutunun büyük olması, dolayısıyla deriden geçememesi, geçirgenliğinin zayıf olması, cilt alerjisi veya kontakt dermatit oluşması veya emüljel uygulandığında kabarcık oluşmasıdır (404,408).

2.5.3. Emüljelin Hazırlanması İçin Gerekli Bileşenler

2.5.3.1. Yağ fazı: Emüljellerin oluşumunda mineral yağ, bitkisel yağ gibi çeşitli yağlar yağ fazı olarak kullanılmaktadır. Oral preparatlarda yaygın olarak kullanılan yağlar biyolojik olarak parçalanamayan mineraller ve hint yağıdır. Ayrıca pamuk tohumu ve mısır yağı gibi diğer bitkisel yağlar da kullanılır (409,410). İzopropil palmitat, izopropil miristat, izopropil stearat ve sıvı parafin de yağ fazı olarak kullanılabilmektedir (411).

2.5.3.2. Su fazı: Emüljellerde çoğunlukla sulu faz için distile su ve alkol kullanılmaktadır (412).

2.5.3.3. Emülgatör: Emülsifikasyonu teşvik etmek ve üretim sırasında stabiliteyi kontrol etmek amacıyla Tween-20, 40, 60, 80, PEG-40, stearik asit, sodyum

stearat yaygın olarak kullanılmaktadır (409). Bu ajanlar kıvamı artırıcı ve jelleştirici ajan olarak da kullanılabilmektedir. Karbomer 934-940, sodyum aljinat, sodyum CMC ve gellan zamkı da yaygın olarak kullanılır. Carbopol 940, HPMC 2910, Carbopol-934, HPMC, Sodyum CMC gibi çeşitli jelleştirici maddeler de aynı amaçla kullanılabilmektedir (411-414).

2.5.3.4. Penetrasyon arttırıcı: Bu ajanlar, geçici cilt geçirgenliğini arttırmak için kullanılır. Cildin bileşenlerine geçerek onlarla etkileşime girerler. Karanfil yağı, zeytinyağı, sodyum lauril sülfat, palmitat, lesitin [5%] ve oleik asit [1%] yaygın olarak kullanılmaktadır. Oleik asit, üre, mentol, izo-propil miristat, okaliptüs yağı gibi farklı penetrasyon artırıcılar da bulunmaktadır (400,412).

Penetrasyon arttırıcıların özellikleri:

• Vücut içinde herhangi bir farmakolojik etkiye sahip olmamalıdırlar. Bu onların herhangi bir reseptör bölgesine bağlanmamaları gerektiği anlamına gelmektedir (415).

• Kozmetik olarak cilde uygun olmalı ve herhangi bir cilt tahrişine veya rahatsızlığına neden olmamalı (402).

• Toksik olmamalı (396).

• İlaçlar ve eklenen yardımcı maddeler ile uyumlu olmalı (407).

• Uzaklaştırıldığında bariyer özellikleri hızla geri dönmeli (407).

Penetrasyon arttırıcıların mekanizması, stratum corneum yapısının bozulması veya proteinlerle hücre içi etkileşim ile cilt geçirgenliğinde geçici ve geri dönüşümlü bir artış sağlamaktır (416-419).

2.5.4. Emüljellerin Karakterizasyonu ve Yapılan Analizler

• Fiziksel görünüm: Hazırlanan emülsiyon formülasyonları, renk, homojenlik, kıvam, faz ayrımı ve pH açısından görsel olarak incelenir.

• Reolojik Analizler (Viskozite analizi)

• Yayılabilirlik

• pH ölçümü

• Şişme İndeksi

• İlaç içeriğinin belirlenmesi

• Yama testi

• Mikrobiyolojik testler

• İlaç salım çalışmaları ve Ex-vivo bioadezyon testleridir (397).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar:

- Etanol, Asetonitril, Formik asit (HPLC grade) (Merck, Almanya)
- Zn (OAc) $2H_2O$ (Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya)
- Propilen glikol (PG), Sıvı parafin (SP), İsopropil miristat (IPM) (Yasin Teknik, Türkiye)
- Tween 40, Metil paraben (MP), Hidroksipropil Selüloz (HPC), orta molekül ağırlıkta kitosan ve Carbopol 934 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya)
- Propil paraben (PP) (Doğa İlaç, Türkiye)
- Span 20 (Merck, Almanya)
- Ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye), Xylasin (Rompun-Bayer, Almanya)
- Biyokimyasal analizler için kullanılan TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, GSH, NO, TAS, TOS ELİSA rat kitleri (Sunred Bio, Shanghai, China)

Çalışmamızda kullanılan standartlar:

- Gallik asit; ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 149-91-7, Product No. PHL89198 (St Louis, MO, ABD)
- 4-hidroksibenzoik asit; 99.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 99-96-7, Product No. PHL83051 (St Louis, MO, ABD)
- Klorojenik asit; ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 327-97-9, Product No. PHL89175 (St Louis, MO, ABD)
- Vanilik asit; ≥97.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 121-34-6, Product No. 94770 (St Louis, MO, ABD)
- Kafeik asit; ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 331-39-5, Product No. C0625 (St Louis, MO, ABD)
- Epikateşin; ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 490-46-0, Product No. E4018 (St Louis, MO, ABD)
- *p*-kumarik asit; ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 501-98-4, Product No. C9008 (St Louis, MO, ABD)

• Ferulik asit; ≥99.0% (HPLC), Supelco, CAS Number: 1135-24-6, Product No. 90034 (Darmstadt, Almanya)

• Salisilik asit; ≥99.0%, Sigma Aldrich, CAS Number: 69-72-7, Product No. PHL80529 (St Louis, MO, ABD)

• Rutin; ≥94.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 207671-50-9, Product No. R5143 (St Louis, MO, ABD)

• Kikorik asit; ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 6537-80-0, Product No. C7243 (St Louis, MO, ABD)

• Apigenin-7-*O*-glikozit; ≥97.0% (HPLC), Supelco CAS Number: 578-74-5, Product No. 44692

• Sinnamik asit; ≥99.0% (HPLC), Sigma Aldrich, CAS Number: 140-10-3, Product No. 8.00235

• Kersetin; ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 117-39-5, Product No. Q4951

• Naringenin; ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 67604-48-2, Product No. PHL89738

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

- Heidolph Rotary Evoporator Hei-VAP Precision (Heidolph, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Isaolab, Almanya)
- Orbital çalkalayıcı (Onilab, ABD)
- Ultrasound Sonikatör (Isolab, İstanbul, Türkiye)
- Liyofilizatör (Christ 2-4 LSCbasis, Almanya)
- UV-Vis Spektrofotometre 1900 (Shimadzu, Kyoto, Japonya)
- Nüve NF-400 Santrifüj (İstanbul, Türkiye)
- Nüve DF 290/490/590 -80 Derin Dondurucu (İstanbul, Türkiye)
- Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus HPLC ve PDA Dedektör (Shimadzu, Kyoto, Japonya)
- Phenylhexyl 4.6 x 150 mm, 3 µm (UP) C18 Kolon (GL Sciences InterSustain, Japan)
- X- Işını Difraktometresi (Panalytical Empyrean ve HighScore Plus Software, Malvern Panalytical, İngiltere)
- Taramalı Elektron Mikroskobu FEI QUANTA FEG 450 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD)

- FTIR (PerkinElmer 1720-X Fourier Transform spectrometer)
- Viscosimeter (Brookfield DVE, UK)
- pH metre (Mettler Toledo, İsviçre)
- TAXT Plus® Texture Analyzer (Stable Microsystem, UK)
- Eppendorf 5810R (New York, ABD)
- İzofluran Sedasyon Cihazı (RWD R540 Mice&Rat Animal Anesthesia Machine, China)
- Homojenizatör (IKA T25 digital ULTRA-TURRAX)
- ELİSA Cihazı (Biochrom Ez Read 400, UK)
- Işık mikroskobu (Zeiss Scope.A1, Axio, Germany)
- Mikrotom (Thermo Fisher Scientific Microm HM 325, Waltham, MA, USA)

3.3. MORUS NİGRA BİTKİ MATERYALİNİN TOPLANMASI

M. nigra yaprak ve meyve materyalleri Adıyaman ili Merkez ilçesi Uzunömer Köyü'nden Temmuz 2020 tarihinde toplandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: *Morus nigra* L. yaprak ve meyveleri

Bitkinin botanik teşhisi Adıyaman Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ömer Kılıç tarafından yapıldı. Bitkinin herbaryum kaydı Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır (Herbaryum Numarası: HUEF21048) (Şekil 3.2). Meyvelerin bir kısmı dondurulmuş ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -24^{o}C' de saklanmıştır. Meyvelerin bir kısmı ise gölgede kurutulmuştur. *M. nigra* yaprakları da temizlenmiş ve gölgede kurutularak ekstreler hazırlanana kadar uygun koşullarda saklanmıştır. Kurutulan bitki materyalleri ekstraksiyon işlemlerinden önce ince toz halinde öğütülmüştür.



Şekil 3.2: *Morus nigra* L. herbaryum kayıt örneği

3.4. MORUS NİGRA MEYVE VE YAPRAK EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI

3.4.1. Çinko Oksit Nanopartikül Green Sentezi için Hazırlanan Ekstreler

M. nigra meyve ve yaprak ekstreleri ile ZnO nanopartiküllerin green sentezi için öncelikle uygun ekstreler hazırlandı. 5 g kurutulmuş ve toz haline getirilmiş yaprak 100 mL distile su ile yaklaşık 30 dakika kaynatıldı. Daha sonrasında ekstreler soğutulup süzüldü ve içerisinde partikül kalmaması için santrifüj edildi. Benzer şekilde kurutulmuş ve toz haline getirilmiş meyve numunesinden de 5 g tartılarak 100 mL distile su ile 50°C'de 60 dakika karıştırılarak ekstre edildi. Sonrasında ekstre süzüldü ve santrifüjlenerek içerisinde partikül kalmamasına dikkat edildi. Hazırlanan ekstreler sentez işlemine kadar +4°C'de uygun şartlarda saklandı. İhtiyaç duyulduğunda benzer şekilde aynı yöntemle taze ekstre hazırlandı.

3.4.2. Aftöz Stomatit Tedavisinde Uygulanacak Mukoadezif Jeller için Hazırlanan Ekstreler

M. nigra meyve ve yapraklarından jel formülasyonlarında kullanılmak üzere çeşitli ekstreler hazırlandı. Meyve ekstrelerinde spektroskopik yöntemle antosiyanin miktar tayini ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile fenolik bileşenlerin analizi yapıldı. Benzer şekilde yaprak ekstrelerinde de HPLC ile fenolik bileşenlerin analizi yapıldı. Yapılan analizler sonucunda uygun ekstreler ile jel formülasyonu oluşturuldu.

*M. nigra'*nın kurutulmuş meyve numuneleri ile sulu, etanollü ve asitli etanollü ekstreler hazırlandı. Sulu meyve ekstresi için 50 g kuru meyve tartılarak 500 mL distile su ilave edildi. Öncelikle yarım saat kadar 40°C'de sonikatör ile ekstre edildi. Ultrasonik ekstraksiyon sonrasında 8 saat orbital çalkalayıcı ile ekstraksiyon yapıldı. Sulu ekstreler iki kez süzme işlemi sonrasında santrifüjlendi ve 40°C'de alçak basınç altında evoporatörde yoğunlaştırıldı. Yoğunlaştırılan sulu kısım -24°C'de donduruldu ve -80°C'de 0,02 mbar alçak basınçta liyofilizatörde kurutuldu. Etanollü ekstre ise %96 etanol kullanılarak hazırlandı. 50 g kuru meyve tartılarak 500 mL etanol ile yarım saat kadar 40°C'de sonikatörde ekstre edildi. Daha sonrasında orbital çalkalayıcıda 8 saat ekstraksiyon işlemi yapıldı. Elde edilen ekstrenin çözücüsü rotary evoporatörde alçak

basınç altında uzaklaştırıldı. Asitli etanol ekstresi için 50 g kuru meyve %1'lik HCl içeren %96 etanol çözeltisi ile aynı yöntemle ekstre edildi.

M. nigra' nın kurutulmuş ve toz haline getirilmiş yaprak numuneleri ile sulu ve etanollü ekstreler hazırlandı. Sulu ekstre için 50 g toz edilmiş kuru yaprak tartıldı ve 500 mL distile su ile 60°C'de sonikatörde ekstre edildi. Daha sonrasında orbital çalkalayıcıda 8 saat çalkalandı. Ekstre iki kez süzüldü ve santrifüj edilerek evoporatörde 50°C'de alçak basınç altında yoğunlaştırıldı. Yoğunlaştırılan ekstre dondurularak -80°C'de alçak basınçta liyofilizatörde kurutuldu. Kurutulan ekstre analizlerde kullanılana kadar -24°C'de saklandı. Yaprakların etanol ekstresi ise meyve ekstresine benzer şekilde %96 etanol ile yapıldı. 50 g toz edilmiş yaprak numunesi 500 mL etanol ile sonikatörde daha sonrasında orbital çalkalayıcıda çalkalanarak ekstre edildi. Daha sonrasında ekstre süzülüp santrifüjlenerek ekstrenin çözücüsü rotary evoporatörde alçak basınç altında uzaklaştırıldı.

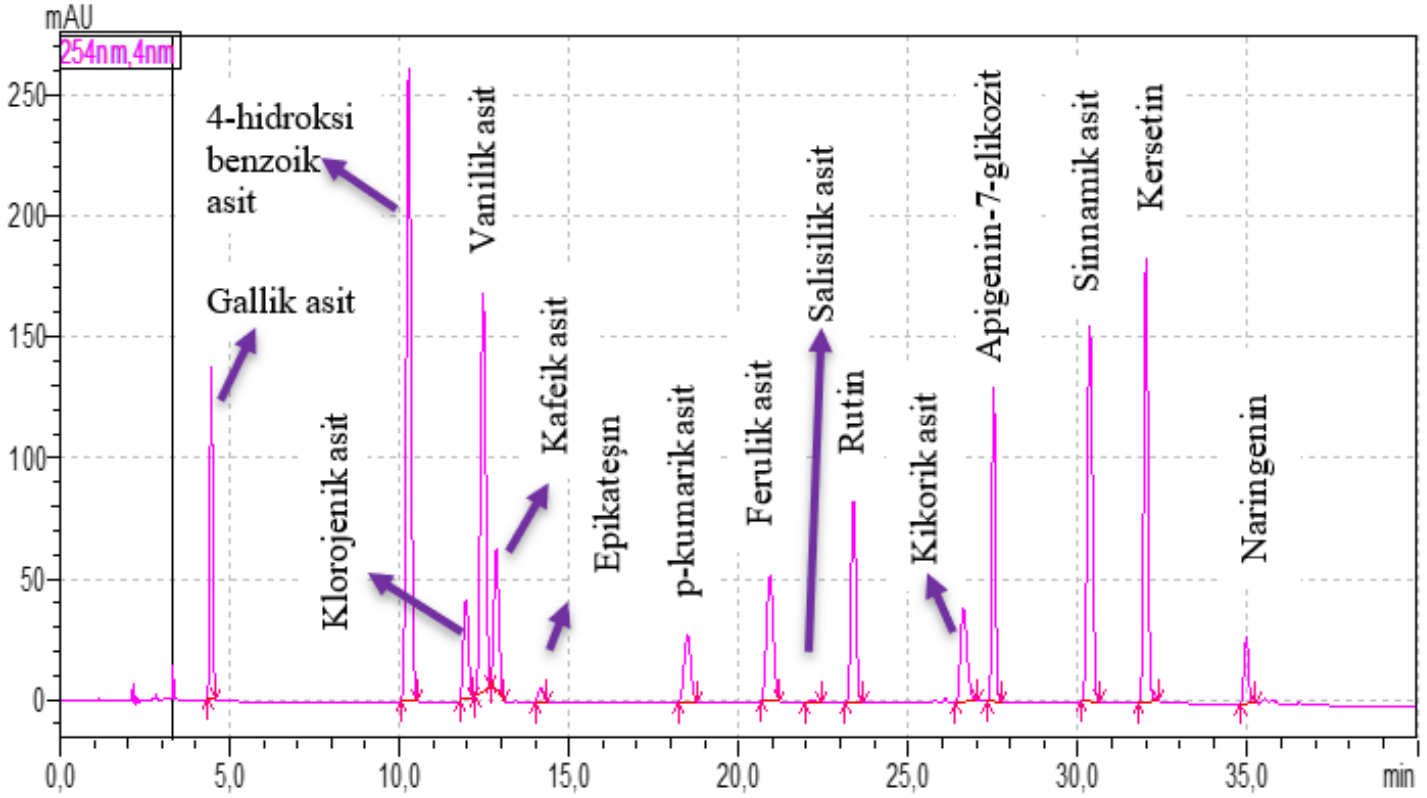
3.4.3. *Morus nigra* L. Meyve ve Yaprak Ekstrelerinin HPLC Analizleri

Kantitatif analiz için Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus marka HPLC cihazı kullanıldı. Dedektör olarak PDA detektör (254 nm'de tarama yapıldı), ayrım için Phenylhexyl 4.6 x 150 mm, 3 µm (UP) (GL Sciences InterSustain Made in Japan) C18 ters faz dolgu maddeli kolon kullanıldı. Hareketli faz olarak %0,1 formik asit/deiyonize su (Çözücü A) ve asetonitril (Çözücü B) ile Tablo 3.1'deki pompa programı kullanıldı. Analiz boyunca mobil faz akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlandı. Numune ve standartlar cihaza 10 µL olarak enjekte edildi. Kolon sıcaklığı ise 30 °C olarak ayarlandı.

Tablo 3.1: HPLC pompa program

Adımlar	Akış hızı (ml/dk)	Zaman (dk)	% Çözücü B (asetonitril)	%Çözücü A (%0,1 formik asit/deiyonize su)
Adım 1	1.00	0,01	5	95
Adım 2	1.00	7	9,5	90,5
Adım 3	1.00	20	17	83
Adım 4	1.00	35	40	60
Adım 5	1.00	40	0	100
Adım 6	1.00	40,01	Stop	

Yukarıda Tablo 3.1'de verilen metot uygulanarak 15 tane fenolik bileşik tarandı. Her bir fenolik bileşiğin maksimum absorbans verdiği dalga boyu belirlenerek maksimum dalga boylarında tarandı. Ardından standart grafikleri çizildi. Standartlara ait 254 nm'deki HPLC kromotogramı Şekil 3.3'te; standart bileşiklerin HPLC bilgileri Tablo 3.2'de verilmiştir. Daha sonra bitkilerin hazırlanan ekstreleri 1 mg/mL konsantrasyonunda HPLC'ye verilerek analiz edildi.



Şekil 3.3: 15 Fenolik bileşiğin 254 nm'deki HPLC kromatogramı

Tablo 3.2: Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin HPLC bilgileri

Sıra	İsim	Alıkonma zamanı	Birimi	Maksimum Dalga Boyu	Standart kalibrasyon denklemi	R^2	Limit of Detection (LOD)	Quantification of Detection (QOD)
1	Gallik asit	4,352	mg/L	271nm	y=29799,9x+6494,60	0,9995	0,7440	2,2547
2	4-hidroksibenzoik asit	10,217	mg/L	254nm	y=40036,7x+1238,33	0,9995	0,6445	1,9531
3	Klorojenik asit	12,073	mg/L	325nm	y=28066,0x+25870,2	0,9990	1,3687	4,1476
4	Vanilik asit	12,437	mg/L	260nm	y=48654,4x-26981,1	0,9997	1,0565	3,2017
5	Kafeik asit	12,850	mg/L	248nm	y=16914,9x-1409,46	0,9972	3,1730	9,6153
6	Epikateşin	14,150	mg/L	277nm	y=4788,08x+789,457	0,9986	8,4615	25,641
7	*p*-kumarik asit	18,486	mg/L	308nm	y=64013,4x-19190,2	0,9933	1,3807	4,1841
8	Ferulik asit	20,971	mg/L	322nm	y=46665,0x-14606,2	0,9928	1,3865	4,2016
9	Salisilik asit	21,929	mg/L	235nm	y=23472,2x+25113,1	0,9994	4,6906	14,2140
10	Rutin	23,494	mg/L	254nm	y=17392,1x-5957,13	0,9959	2,1258	6,4420
11	Kikorik asit	27,011	mg/L	327nm	y=7443,82x+72484,6	0,9887	3,9639	12,0120
12	Apigenin-7-*O*-glikozit	27,574	mg/L	336nm	y=39321,9x+1685,18	0,9993	0,7295	2,2107
13	Sinnamik asit	30,234	mg/L	276nm	y=75026,0x-11276,0	0,9988	0,6776	2,0533
14	Kersetin	32,008	mg/L	254nm	y=26403,4x+1558,71	0,9997869	1,2724	3,8560
15	Naringenin	34,939	mg/L	288nm	y=24207,0x+2212,93	0,9920277	1,3147	3,9840

3.4.4. *Morus nigra* L. Meyve Ekstrelerinin Toplam Monomerik Antosiyanin Miktar Tayini

Antosiyaninler pek çok tıbbi bitkide bulunan kendine özgü pembe, mor, mavi ve kırmızı tonlarda renkleri olan sekonder metabolitlerdir. Antosiyanin pigmentlerinin ortam pH'sına bağlı olarak renk değiştirmesi bu bileşiklerin başlıca özelliklerinden biridir. Bu özelliklerinden faydalanarak spektroskopik yöntemle antosiyanin miktar tayini yapılabilmektedir. pH 1.0 ve pH 4.5'a ayarlanmış tampon çözeltileri içerisinde spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri arasındaki fark, örneğin antosiyanin miktarıyla doğru orantılı olarak değişmektedir. Bu nedenle spektroskopik olarak monomerik antosiyanin miktarı tayini yöntemin temel ilkesi, pH 1.0 ve pH 4.5'deki renk farklılığının spektrofotometrik yolla ölçümüne dayanmaktadır. Literatürde daha önce tanımlanan bu miktar tayini yönteminden yararlanılarak meyve ekstrelerinin antosiyanin miktar tayini yapılmıştır (420).

Analizin yapılabilmesi için öncelikle pH 1.0 ile pH 4.5 olan iki farklı tampon çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler:

pH 1,0 tamponu: 0,025M KCl tampon çözeltisi hazırlanır ve çözeltinin pH değeri 1,0 olana kadar HCl çözeltisi ile ayarlanır.

pH 4,5 tamponu: 0,4 M sodyum asetat tamponu hazırlanır ve pH'ı 4,5 olacak şekilde HCl çözeltisi ile ayarlanır.

Hazırlanan ve kurutulan meyve ekstrelerinden 1 mg/mL konsantrasyonda 50 mL çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 1 kısım, tampon çözeltiden 4 kısım alınarak 520 nm ve 700 nm dalga boylarında ölçüm yapıldı. (Bulanıklık unsurlarının tespit edilmesi için de 700 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.)

Örneklerin 520 ve 700 nm'de okunan absorbanslarının farkları (A520 – A700) hesaplandı. Daha sonra pH 1.0 için bulunan absorbans farkı, pH 4.5 için hesaplanan absorbans farkından çıkarılarak hesaplama yapıldı. Kör olarak distile su kullanıldı. Daha sonrasında aşağıdaki denklem kullanılarak ekstrelerdeki toplam antosiyanin miktarı siyanidin-3-glukozite eşdeğer olarak hesaplandı.

$$Toplam\ Antosiyanin\ Miktarı\ (mgL^{-1}) = (A * 10^3 * MW * DF)/(L * E)$$

A: Absorbans,

MW: Siyanidin-3- glikozidin molekül ağırlığı, (449,2 g/mol)

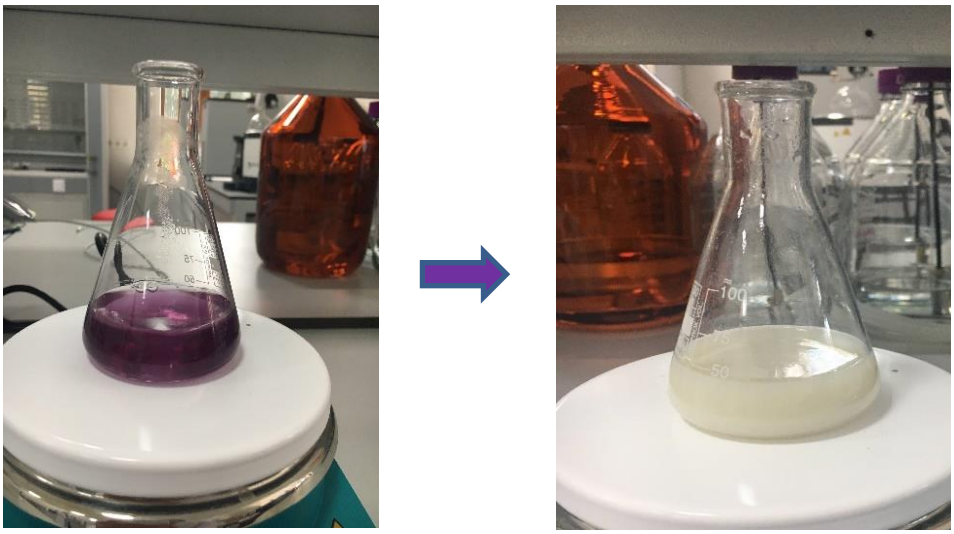
DF: Seyreltme faktörü,

E: Molar ekstinksiyon katsayısı, (26900)

L: Küvetin optik yolu (1cm) karşılığıdır.

3.5. *MORUS NİGRA* L. MEYVE VE YAPRAK EKSTRELERİNDEN GREEN SENTEZ YÖNTEMİ İLE ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

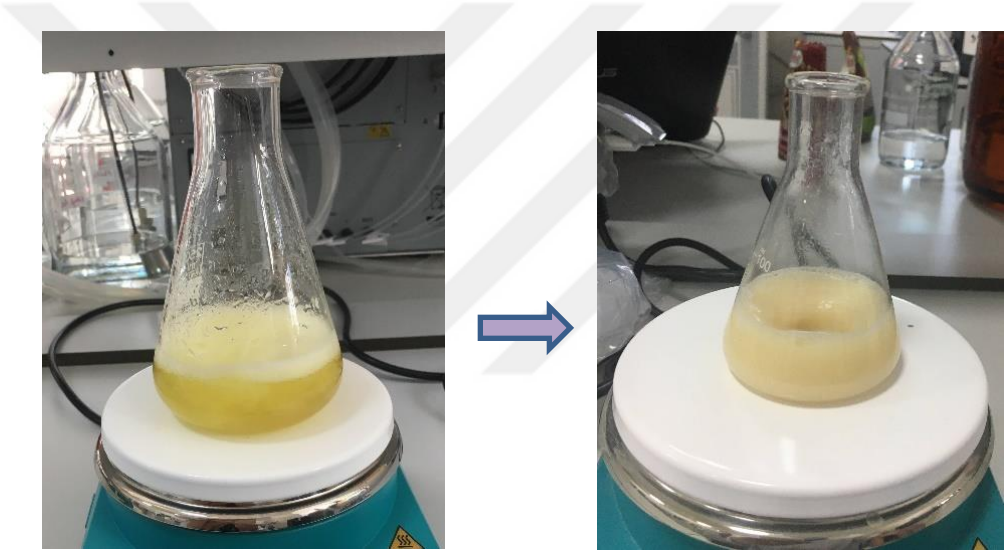
Literatürde daha önce tanımlanan GS yöntemleri modifiye edilerek sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Ali ve ark. ile Gupta ve ark., tarafından rapor edilen çalışmalarda ZnONP oluşumunda konsantrasyon, pH varyasyonu, sıcaklık gibi parametrelerin etkisi incelenmiş ve çalışma sonuçları dikkate alınarak yöntem oluşturulmuştur (296,421). 50 mL 0,05 M Çinko asetat dihidrat–çözeltisi hazırlanarak manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında tamamen çözündükten sonra içerisine 10 mL meyve ekstresi damla damla eklendi. Koyu pembe olan ekstre rengi çözeltiye ilave edilince açık mora dönüştüğü gözlendi. Çözelti oda ısısında bir süre karıştırıldıktan sonra içerisine damla damla pH 10 olana kadar derişik NaOH çözeltisi eklendi. Sonrasında 4 saat süre ile 60°C'de manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya devam edildi. Çözeltide çökme meydana geldi ve çözelti rengi açık mordan beyaza yakın krem rengine dönüştü (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Meyve ekstreleri aracılığıyla çinko oksit nanopartikül sentezi

Sonrasında ZnONP elde etmek amacıyla 4000 rpm 20 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilerek çökelti kısmı alınmıştır. Temizleme amacıyla elde edilen çökelti birkaç kez deiyonize su ve alkol ile yıkandı. Elde edilen beyaz renkli ZnONP 105° C'de etüvde kurutuldu. Kurutulmuş toz ince toz halinde ezilerek ağzı sıkı kapalı renkli cam şişelerde nem almayacak şekilde deneylerde kullanılana kadar muhafaza edildi.

Yaprak ekstresi kullanılarak yapılan sentez işleminde de meyve ekstresininkine benzer deney protokolü uygulandı. Yaprak ekstresinde çözelti rengi açık sarı renkten, açık krem rengi bir süspansiyona dönüştü (Şekil 3.5). Daha sonrasında benzer santrifüj ve temizleme işlemleri gerçekleştirildi. Kurutulan ve ince toz haline getirilen ZnONP uygun şartlar altında kullanıma kadar saklandı.



Şekil 3.5: Yaprak ekstreleri aracılığıyla çinko oksit nanopartikül sentezi

3.5.1. Çinko Oksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen nanopartiküllerin farklı analiz yöntemleri ile boyutu ve morfolojisi karakterize edildi. UV – Vis analizi için, reaksiyonun sonunda saflaştırılmış numuneden 1 mL süspansiyon alınarak 15 dakika 4000 rpm'de sonike edilmiş ve UV – Vis (Shimadzu UV-1900 Series) spektrumları 200–600 nm aralığında kaydedildi. Sentezlenen nanopartiküllerde çeşitli titreşim modlarının varlığını araştırmak için ZnONP'lerin FTIR (PerkinElmer 1720-X) analizi yapıldı. ZnONP'lerin faz yapısı, malzeme tanımlaması ve Debye- Scherer formülasyonu kullanılarak ortalama partikül boyutunun belirlenmesi XRD (Panalytical Empyrean) ile gerçekleştirildi. XRD analizi Panalytical Empyrean

cihazı ile analiz aralığı 45 Kv- 45 mA çekim modunda- Reflection- Transmission Spinner Stage donanımıyla 10-90 derece 0.0013 tarama hızında yapıldı.

Parçacıkların boyutunu ve morfolojisini tanımlamak için taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI QUANTA FEG450) görüntüleri alınmıştır. Numuneler, agat havanında homajenize olması için ezilerek ince toz hale getirilmiş, karbon bant ile stap üzerine alınarak uygun vakumda altın kaplama yapılmadan incelenmiştir. Toz numunenin analizi, ETD dedektörü ile BSE modunda yüksek vakumda ve SE LFD düşük vakumda (altın kaplanmadığı için) FEI QUANTA FEG450 model cihaz ile yapıldı. Görüntü netliği ve numune boyut açısından uygun voltaj, Z yükseklikleri ve uygun alan spotu dikkate alınarak analizler yapıldı. Cihaz maksimum 30 kV Voltaj ile çalışmakta olup yapılan analizler 20-30 kV voltaj aralığında gerçekleştirildi ve sentezlenen parçacıkların temel bileşimini analiz etmek için enerji dağıtıcı x-ışını spektrometresi (EDX) kullanıldı.

3.6. FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANIŞI

Yaprak ekstresi, meyve ekstresi ve bu ekstrelerden hazırlanan nanopartiküllerin taşıyıcısı olarak emulgel formülasyonları tercih edilmiştir. Emulgel hazırlanırken önce emülsiyon formülasyonu hazırlanmıştır. Tablo 3.3'de emülsiyon içeriği gösterilmektedir.

Tablo 3.3: Emülsiyon formülasyonunun içeriği ve madde miktarları

Madde	Miktar (%)
Su Fazı	
Propilen glikol	2
Tween 40	3,1
Propil paraben	0,2
Distile su	km 100
Yağ Fazı	
Sıvı parafin	5
İsopropil miristat	1
Span 20	1,9
Metil paraben	0,2

Emülsiyon formülasyonu hazırlanırken yağ fazı ve su fazı 50°C'ye kadar ısıtıldı. Daha sonra yağ fazı, su fazının üzerinde yüksek devirde karıştırılırken damla damla ilave edildi ve soğuyuncaya kadar formülasyon yüksek devirde karıştırılmaya devam edildi. Emülsiyon formülasyonunun stabilitesini arttırmak için HLB değeri 11-12 olarak ayarlandı. Emülsiyon soğuduktan sonra 1:1 oranda jel formülasyonu ile birleştirildi.

Jel formülasyonları ise %15 ve %25 HPC ile hazırlanmış daha sonra emuljeldeki konsantrasyonu %2,5, %5 ve %10 kitosan, %1'de Carbopol 934 olacak şekilde hazırlanan jel formülasyonunun içerisine kitosan ve Carbopol 934 ilave edildi. Kitosan stok çözeltisi %1 asetik asit çözeltisi içerisinde hazırlandı. Tablo 3.4'te emuljel formülasyonunun içeriği gösterilmiştir.

Ekstre yüklü emuljel formülasyonunun hazırlanması için ise ekstreler ve ekstre yüklü nanopartiküller emülsiyon formülasyonu hazırlanırken yağ fazında dağıtıldı ve daha sonra emülsiyon formülasyonu hazırlanarak en sonunda ise yukarıda bahsedildiği şekilde emuljel formülasyonu hazırlanmıştır. İdeal olarak belirlenen formülasyona ekstreler %5 (a/a), nanopartiküller ise %1 (a/a) konsantrasyonlarında yüklenmiştir.

Tablo 3.4: Emuljel formülasyonların içerikleri ve madde miktarları (%)

Formülasyon Kodu	PG (%)	Tween 40 (%)	PP (%)	Distile su (%)	SP (%)	IPM (%)	Span 20 (%)	MP (%)	HPC (%)	Kitosan (%)	Carbopol 934 (%)
C1	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	15	-	-
C2	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	15	2,5	-
C3	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	15	5	-
C4	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	15	10	-
C5	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	25	-	-
C6	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	25	2,5	-
C7	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	25	5	-
C8	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	25	10	-
C9	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	15	-	1
C10	2	3,1	0,2	km 100	5	1	1,9	0,2	25	-	1

PG: Propilen glikol; **PP:** Probil paraben; **km**: Kafi miktarda; **SP**: Sıvı parafin; **IPM:** İsopropil miristat; **MP:** Metil paraben; **HPC:** Hidroksipropil Selüloz

3.6.1. Boş Jel, Ekstre ve Nanopartikül Yüklü Emuljel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

3.6.1.1. Formülasyonların pH ölçümü: Formülasyonların pH ölçümleri için Mettler Toledo pH metre cihazı kullanıldı. 10 g formülasyon içerisine pH metre probu daldırılarak okuma işlemi gerçekleştirildi. Ölçümler oda sıcaklığında 5 kez tekrarlanarak gerçekleştirildi.

3.6.1.2. Formülasyonların viskozite ölçümü: Formülasyonların viskozite ölçümleri için Brookfield DVE Viscosimeter cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler için 04 numaralı spindle 30 rpm'de oda sıcaklığında ölçüm değeri sabitleşene kadar döndürüldü ve bu ölçümler 5 kez tekrarlandı.

3.6.1.3. Formülasyonların tekstür profil analizleri: Formülasyonların tekstür profili analizleri, TPA modunda bir TA-XT plus tekstür analizörü (Stable Micro Systems, Surrey, UK) kullanılarak gerçekleştirildi. 10 gramlık numuneler 50 mL Falcon tüplerine yerleştirilip 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi (Eppendorf 5810R, New York, ABD). Numuneler, 2 dakika süreyle tetikleme kuvveti tarafından 1 mm s^{-1} sabit hıza ulaşan analitik probun 10 mm üzerine yerleştirildi, ardından prob numuneye 10 milimetre indirildi. Daha sonra 0,5 mm s^{-1} hızında yüzeye döndürülüp 5 saniye sonra ikinci bir sıkıştırma başlatıldı. Elde edilen kuvvet-zaman eğrisi; sertlik, yapışma ve kohezyon gibi çeşitli mekanik parametreleri hesaplamak için kullanıldı. Analizler 25 °C'de üç kez yapıldı (422).

3.6.1.4. Formülasyonların yayılabilirlik analizleri: Formülasyonların yayılabilirliği TAXT Plus® Texture Analyzer (Stable Microsystem, UK) kullanılarak belirlendi. Test numunesi (2.0 g) dişi koninin içine yerleştirilip erkek koni, belirli bir 3 mm / s test hızında ve 10 mm / s test sonrası hızında 23 mm'ye kadar dişi koniye doğru hareket ettirildi. Jelin yayılabilirliği, sertlik (maksimum pozitif kuvvet) ve yapışkanlık (maksimum, negatif kuvvet) açısından değerlendirildi (423). Bu çalışmalarda sertlik bir parmak yardımı ile formülasyonun bölgeden kurtarılması için gereken kuvvete, yayılabilirlik ise formülasyonun uygulanan bölgede yayılabilmesi için gerekli işe atıfta bulunmaktadır (424).

3.6.1.5. Formülasyonların *ex vivo* biyoadezyon analizleri: Biyoadezyon mukavemeti, bir TAXT Plus Tekstür analizörü (Stable Micro Systems Products, Godalming, UK) kullanılarak üç kez tekrarlanarak değerlendirildi. Koyun bukkal mukozası probun ucundaki çift taraflı bandın altına yerleştirildi. Topikal formülasyonun uygulamasını simüle etmek için, her formülasyondan 15 µL petri kabına yerleştirildi. Biyoadezyon kuvveti, 60 saniye süreyle 0.5 N'lik bir kuvvet uygulandıktan sonra formülasyonu dokudan ayırmak için gereken ayrılma kuvveti olarak belirlendi (425,426).

3.7. HAYVAN DENEY MODELİ VE GRUPLARIN OLUŞTURULMASI

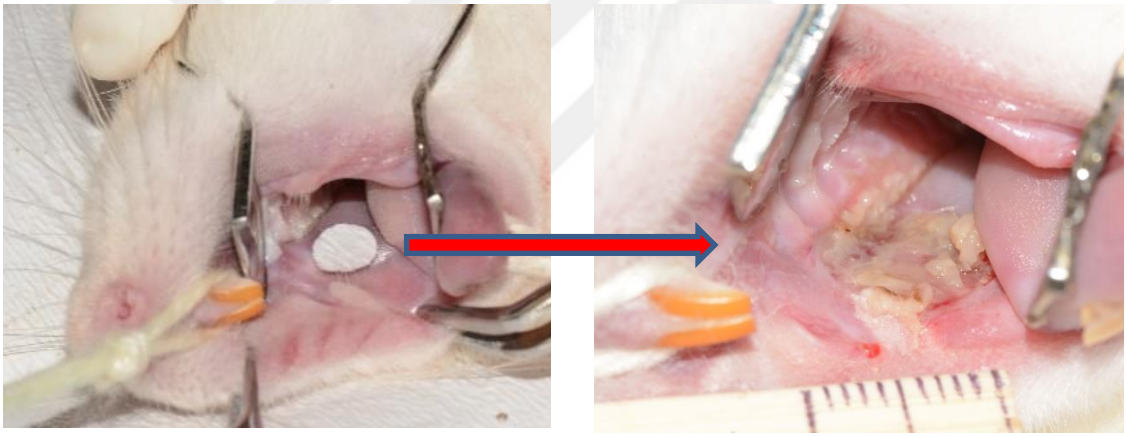
3.7.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Etik Onay

Deney hayvanları üzerinde uygulanacak çalışma için Adıyaman Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli onay alındı (Tarih: 25.06.2020; protokol no: 2020/034, EK-1). Çalışmada, Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Uygulama Merkezi tarafından yetiştirilen 4-6 aylık, ağırlıkları 400±50 g olan 108 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Merkez tarafından teslim edilen ratlar deneye başlanmadan önce genel sağlık durumu açısından değerlendirildi ve sağlıklı ratlar çalışmaya dahil edildi. Deneye dahil edilen ratlar deney süreleri boyunca üç denek aynı standart kafes içerisinde olacak şekilde, yem ve su kısıtlaması yapılmaksızın hayvan odasında (22-24 ^{o}C'de, %55-70 nem, 12 saat aydınlık/karanlık oda) tutuldu. Çalışma boyunca veteriner hekim kontrolündeki denekler, haftada bir sıcak suyla yıkanan ve dezenfekte edilen kafeslerde tutuldu. Ayrıca çalışmamızda laboratuvar hayvanlarının kullanımına yönelik olarak Avrupa Konseyi'nin önerdiği standartlara (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) (ETS 123) uyulmuştur.

3.7.2. Aftöz Stomatit Modelinin Oluşturulması

Literatürde aftöz ülser modeli deney hayvan modelleri üzerinde özellikle ağız içinde bukkal (yanak) mukoza ve dişeti gibi farklı mukozal bölgelerde uygulanmıştır. Bukkal mukozada ülser modelinin geniş bir alanda rahat uygulanabilmesi, hayvanların beslenmelerine engel teşkil etmemesi ve özellikle ilaç uygulamaları esnasında bu bölgenin korunaklı ve yeterli genişlikte olması nedeniyle ülser modelinin bukkal

mukozada oluşturulmasına karar verildi. Uygulanan deneysel metot daha önce Karavana ve ark., Vilela-Goulart ve ark., Vuletic ve ark., ile Fujisawa ve ark.'nın çalışmalarında uyguladıkları aftöz ülser oluşturma yöntemleri referans alınarak oluşturuldu (427-430). Bu yöntemde; çalışmanın başlangıcında (Gün 0), tüm ratlarda 5 mg/kg xylazine ve 30 mg/kg ketamine ile yeterli anestezi elde edildikten sonra aftöz ülser modelini elde etmek amacıyla; ratların sağ yanakta bukkal mukoza üzerine 15 µl %50 asetik asit emdirilmiş 6 mm çapında yuvarlak bir filtre kağıdı aseptik doku nekrozuna neden olmak için uygulandı ve 60 saniye boyunca dokuya bastırıldı (Şekil 3.6). 24 saat sonra (Gün 1) tüm deneklerde ülser alanının oluşumu gözlendikten sonra gözlenen ülserin histolojik özellikleri başlangıç histolojik özellikleri olarak kabul edildi ve topikal jel uygulamaları deneklerin sakrifiye edileceği 4., 7. ve 10. (denekler 3., 6. ve 9. gün tedavi aldıktan sonra ertesi gün sakrifiye edildi) günlere kadar günde iki kez olacak şekilde yapıldı.



Şekil 3.6: Deney hayvanlarında aftöz ülser modelinin oluşturulması

3.7.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Literatürde aftöz ülserlerin herhangi bir tedavi uygulamadan yaklaşık olarak 12-17 gün arasında kendiliğinden iyileştiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır. Bu durumda erken dönemdeki iyileşme süreci oldukça önem arz etmektedir. Karavana ve arkadaşları da tavşanlarda aftöz ülser modelinde yaptıkları çalışmalarında 3., 6., 9. ve 12. günlerdeki iyileşmeyi araştırmış ve 12. günde kontrol grubunda deney gruplarına benzer bir iyileşme olduğunu gözlemlemiştir. Ancak daha erken günlerde tedavi gruplarındaki iyileşme skorlarında belirgin farklılık bulunmuştur (427,431). Bu nedenle uygulanacak jellerin

etkinliğini çeşitli tedavi sürelerinde görmek amacıyla 3., 6. ve 9. gün tedavi uygulanan gruplar oluşturuldu.

Denekler rastgele seçilerek 6 ana gruba ayrıldı. Bu gruplar:

• Kontrol grubu (K) (Negatif Kontrol Grubu)

• Jel bazı ile tedavi edilen grup (B)

• *M. nigra* meyve ekstresi ile hazırlanan jel ile tedavi edilen grup (M)

• *M. nigra* yaprak ekstresi ile hazırlanan jel ile tedavi edilen grup (Y)

• *M. nigra* meyve ekstresi ile sentezlenen *M. nigra* Meyve ZnONP ile hazırlanan jel ile tedavi edilen grup (MNP)

• *M. nigra* yaprak ekstresi ile sentezlenen *M. nigra* Yaprak ZnONP ile hazırlanacak jel ile tedavi edilen grup (YNP) olarak belirlenmiştir.

Bu gruplar da kendi içerisinde 3., 6. ve 9. gün tedavi grupları olmak üzere 3 alt gruba daha ayrılarak toplamda 18 grup oluşturuldu. Belirlenen ana ve alt gruplar Tablo 3.5'te gösterilmektedir.

Tablo 3.5: Çalışmaya dahil edilen grupların dağılımı

	Alt gruplar			
Ana gruplar	**3.gün**	**6.gün**	**9.gün**	**Toplam**
K	6	6	6	18
B	6	6	6	18
M	6	6	6	18
Y	6	6	6	18
MNP	6	6	6	18
YNP	6	6	6	18
Toplam		**108**		

K grubu: Bu gruptaki deneklerde bukkal mukozada aftöz ülser modeli oluşturuldu ancak herhangi bir tedavi edici ajan uygulanmadı. Tedavi grupları ile standardizasyonu sağlamak adına sakrifiye edilecekleri günlere kadar yara yüzeyine günde iki kez serum fizyolojik uygulandı.

B grubu: Bu gruptaki ratlara bukkal mukozada aftöz ülser oluşturuldu ve terapötik ajan içermeyen boş mukoadezif jel bazı formülasyonu ile çalışmanın standardizasyonunun sağlaması açısından sakrifiye edilecekleri güne kadar günde 2 kez olacak şekilde yara yüzeyine uygulandı.

M grubu: Bu gruptaki ratlara bukkal mukozada aftöz ülser oluşturuldu ve sakrifiye edilecekleri güne kadar günde 2 kez *M. nigra* meyve ekstresi içeren mukoadezif emüljel formülasyonu ile tedavi edildi.

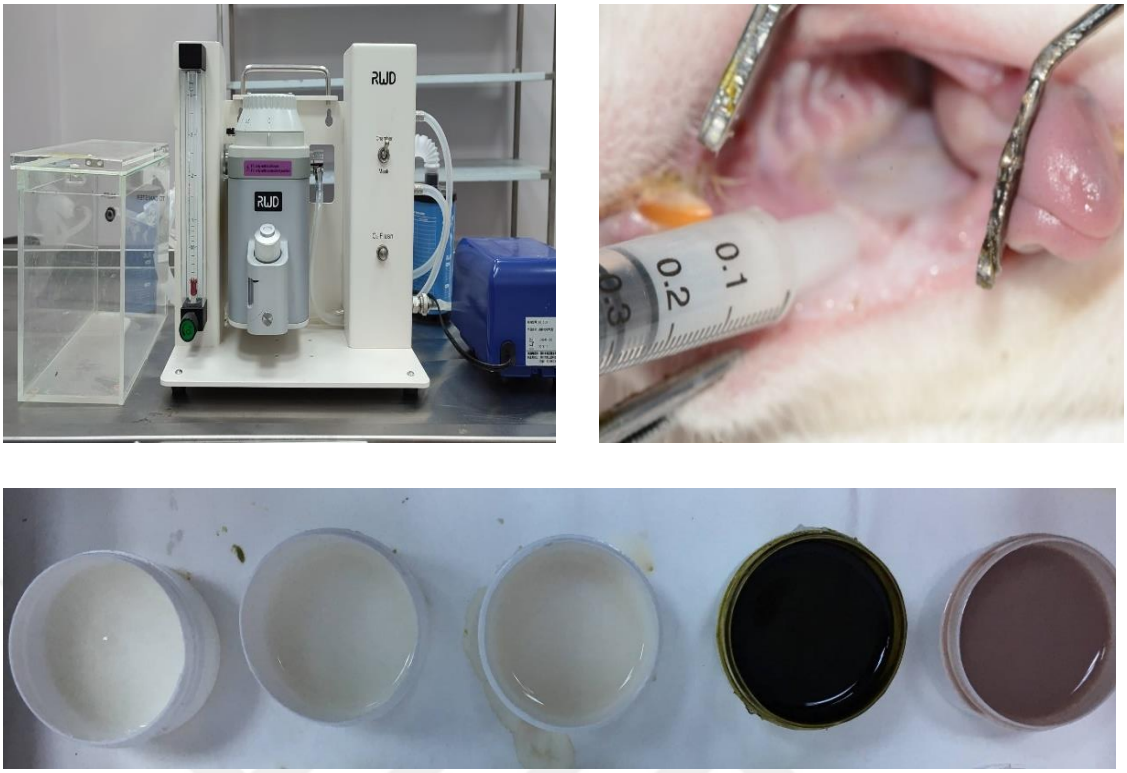
Y grubu: Bu gruptaki ratlara bukkal mukozada aftöz ülser oluşturuldu ve sakrifiye edilecekleri güne kadar günde 2 kez *M. nigra* yaprak ekstresi içeren mukoadezif emüljel formülasyonu ile tedavi edildi.

MNP grubu: Bu gruptaki ratlara bukkal mukozada aftöz ülser oluşturuldu ve sakrifiye edilecekleri güne kadar günde 2 kez *M. nigra* meyve ekstresinden green sentez yöntemi ile sentezlenen ZnONP içeren mukoadezif emüljel formülasyonu ile tedavi edildi.

YNP grubu: Bu gruptaki ratlara bukkal mukozada aftöz ülser oluşturuldu ve sakrifiye edilecekleri güne kadar günde 2 kez *M. nigra* yaprak ekstresinden green sentez yöntemi ile sentezlenen ZnONP içeren mukoadezif emüljel formülasyonu ile tedavi edildi.

3.7.4. Mukoadezif Emüljellerin Uygulanması

Deneklere her gün 12 saat ara ile günde 2 kez olacak şekilde yara alanını kaplayacak ölçüde jel uygulaması yapıldı. Jeller, iğnesiz bir enjektör yardımı ile her deneğe her uygulamada 200µL jel olacak şekilde yara yüzeyine sürülerek dağıtıldı (Şekil 3.7). Jel uygulamalarının sorunsuz yapılabilmesi için uygulama öncesinde ratlara RWD 500 anestezi cihazı ile isofluran uygulanarak sedasyon yapıldı. Uygulama öncesinde 15 saniye kadar cihazın kabininde bekletilerek sedasyon sağlandı. Yaklaşık 20 sn süren sedasyon süresinde hızlıca jel uygulamaları gerçekleştirildi.

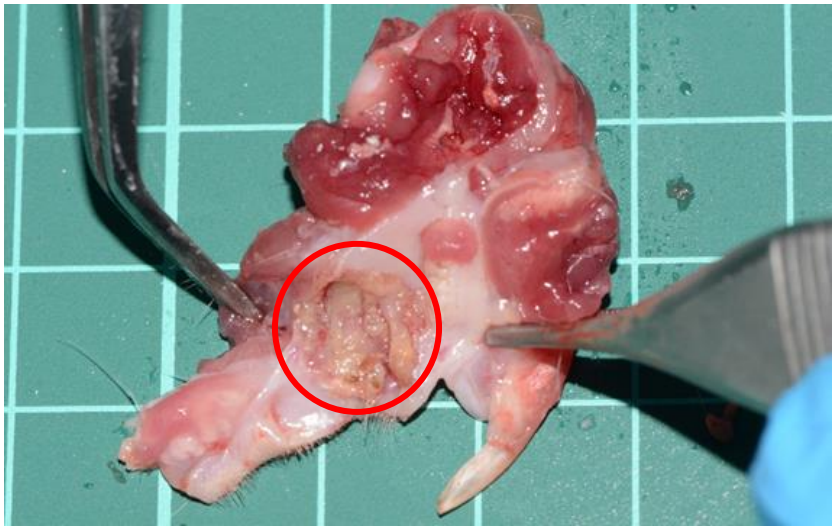


Şekil 3.7: Topikal uygulanan jel uygulaması ve kullanılan jeller

3.7.5. Sakrifikasyon Protokolü ve Örneklerin Elde Edilmesi

Deney prosedüründe belirtilen 3.,6. ve 9. gün tedavi süreleri tamamlandıktan sonra ratlar sakrifiye edildi. Sakrifikasyon işleminden önce tüm gruplardaki ratlara kas içi (i.m.) enjeksiyon ile 45 mg/kg Ketamin HCl ve 2,5 mg/kg Xylasin HCl ile anestezi uygulandı ve takibinde tüm ratlardan intrakardiyak kan alındı. Alınan kanlar 10 dakika 3000 rpm'de santrifüje edilerek gerekli biyokimyasal analizlerin yapılabilmesi için serum örnekleri elde edildi ve analiz gününe kadar -80°C'de saklanmak üzere kaldırıldı.

Daha sonra deneklerin ağız içerisindeki yara bölgesinden ve 1x1 cm'lik sağlam dokuyu da içerecek şekilde tam kat doku örnekleri alındı (Şekil 3.8). Yara bölgesinden bir miktar doku kesilerek biyokimyasal analizler için -80^{o}C'de saklandı. Daha sonra kalan doku örneği %10'luk tamponlanmış formaldehit içeren biyopsi kapları içerisine konuldu.



Şekil 3.8: Sakrifikasyon sonucu elde edilen doku örneği

3.7.6. Sakrifikasyon Protokolü Sonrasında Yapılan İşlemler

3.7.6.1. Ağırlık değişimi: Ağırlık değişimi deneklerin ağzında oluşturulan yaraların beslenmeyi ne kadar etkilediğini göstermesi nedeni ile oldukça önemli bir parametredir. Deneklerdeki kilo kaybı hayvanların hissettikleri ağrı ve ağız içerisinde bulunan yara nedeniyle beslenemediklerini göstermektedir. Denekler 0. günde ve sakrifikasyon (4., 7. ve 10. günler) günlerinde tartılarak kilo kayıpları takip edildi.

3.7.6.2. Yara alanının fotoğraflanması: Tüm deneklerin deneye başlanmadan 0. günde sağlıklı yanak dokularının fotoğrafları çekildi. Daha sonrasında deneklere deney protokolünde belirtildiği üzere 0. günde anestezi altında %50 asetik asit ile sağ yanak dokusunda ülser alanı oluşturuldu. 1. Günün sonunda tekrar tüm deneklerden oluşmaya başlanan ülser alanının fotoğrafları alındı. Daha sonrasında deneklerin sakrifiye edilmeden önce tekrar fotoğrafları alınarak kaydedildi.

3.8. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Deneklerden sakrifikasyon öncesinde alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Serum örnekleri üzerindeki analizler üreticinin talimatlarına göre ticari ELISA kitleri kullanılarak yapıldı. Ayrıca serum ve doku örneklerinden TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 ve IL-10 gibi enflamasyon belirteçleri incelendi.

Doku örnekleri homojenize edilmeden önce tartıldı ve 1/9 oranında buz soğukluğunda tamponlanmış PBS çözeltisi içinde homojenize edildi. Daha sonra 5000 rpm'de 20 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemlerinden sonra süpernatantlar temiz bir ependorf tüpe alındı ve deney sürecine kadar -80 ºC'de muhafaza edildi. Doku örneklerinde TNF- α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 ve IL-10 gibi enflamasyon belirteçlerinin seviyesini belirlemek için ratlarda kullanıma uygun olarak temin edilen ELİSA kitleri kullanıldı. Ayrıca doku örneklerinde total oksidan (TOS), total antioksidan (TAS) seviyeleri Nitrik oksit (NO) ve GSH gibi oksidasyon parametreleri de değerlendirildi.

Kitin protokolüne uygun olarak ilk önce standartlar hazırlandı, standart dilüsyonları ile grafik oluşturuldu örnekler üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde kitlere uygulandı. Sonraki aşamalar üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda her bir parametre için adım adım takip edilerek gerçekleştirildi. Son olarak her bir parametreye uygun dalga boyunda okuma gerçekleştirildi (Biochrom Ez Read 400, UK). Standartlardan grafik çizilerek her bir örnek grafiğe göre hesaplandı. Elde edilen sonuçlar dilüsyon faktörü ile çarpılarak her bir örnekteki ilgili parametrenin seviyesi belirlendi.

3.9. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Deney sonunda tüm gruplardaki ratların yanak bölgeleri alınıp formaldehit çözeltisi içerisine konuldu. Işık mikroskobu incelemeleri için rutin doku takibi yapılan parçalar öncelikle parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotomla 5 µm (mikrometre) incelikte kesitler lamlara alınıp ardından hematoksilen & eozin boyama işlemi uygulandı.

Yara alanındaki epidermal ve dermal bölgede oluşan değişiklikler histopatolojik olarak daha önce uygulanan skorlama yöntemi baz alınarak değerlendirildi. Her grupta yer alan deneklerdeki örnekler aşağıdaki tabloya göre skorlandı ve ortalamaları alınarak histolojik olarak değerlendirildi (Tablo 3.6) (429,431).

Tablo 3.6: Histopatolojik değerlendirme skorları

Skor	Histolojik değerlendirme kriterleri ve skorlama
1	Epitelyal nekroz varlığı, ancak iltihap belirtisi yok
2	Yeni kılcal çoğalma olmadan enflamatuar reaksiyon başlamış
3	Enflamatuar reaksiyon ülser tabanında birkaç kılcal proliferasyon ile belirgindir, ancak yüzeyde epitelizasyon olmaz
4	Enflamatuar reaksiyon azalmış, yeni kılcal çoğalma yüzeye ulaşmış ve yüzeyde epitelizasyon başlamış
5	Epitelizasyon tamamlanmış

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 9 ve Statistical Package for Social Sciences v23.0 (SPSS) kullanılarak yapıldı. Verilerin dağılımını değerlendirmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Verilerin normal dağılımına bağlı olarak gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları belirlemek için parametrik testler (tek yönlü ANOVA ve grupların çoklu karşılaştımaları için Tukey's testi) kullanıldı. Non parametrik verilerin istatistiksel analizi için ise Kruskal- Wallis testi ve grupların çoklu karşılaştırmaları için Dunn's testi kullanıldı. Tüm sonuçlar, ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.11. ÇIKAR ÇATIŞMASI

Çalışmada yazarlar arasında herhangi bir çıkar ilişkisi bulunmamaktadır.

4. BULGULAR

4.1. *MORUS NİGRA* L. EKSTRELERİNİN ANALİZ BULGULARI

4.1.1. *Morus nigra* L. Ekstrelerinin Verim Hesaplamaları

Hazırlanan ekstrelerin hesaplanan % verimleri Tablo 4.1'de verilmiştir. 50 g kuru meyveden su ile yapılan ekstraksiyon işleminden 2,81 g ekstre elde edildi. Kuru meyvelerin sulu ekstresinin verimi %5,63 olarak tespit edildi. 50 g kuru meyveden 3,56 g etanol ekstresi elde edildi. Etanol ekstresinin verimi ise %7,13 olarak hesaplandı. 50 g kuru meyveden 5,09 g asitli etanol ekstresi elde edildi ve ekstraksiyon verimi %10,18 olarak hesaplandı.

50 g kuru yaprak numunesinin su ile ekstraksiyonundan 3,71 g ekstre elde edildi. Ekstre verimi %7,41 olarak hesaplandı. 50 g kuru yaprak numunesinden 6,06 g etanol ekstresi elde edildi. Ekstre verimi %12,12 olarak hesaplandı.

Tablo 4.1: Meyve ve yaprak ekstrelerinin ekstraksiyon verimleri

Bitki Materyali	Çözücü	% Verim
***M. nigra* Meyve**	Su	%5,63
	Etanol	%7,13
	Asitli Etanol	%10,18
***M. nigra* Yaprak**	Su	%7,41
	Etanol	%12,12

4.1.2. *Morus nigra* L. Meyve Ekstrelerinin Toplam Monomerik Antosiyanin Miktar Tayini

Spektroskopik olarak tayin edilen antosiyanin miktarları materyal metod kısmında verilen denkleme göre hesaplandı. ZnONP sentezi için kullanılacak ekstrenin antosiyanin miktarı 3,87 mg/L; liyofilize edilmiş olan sulu ekstrede 7,12 mg/g ekstre; etanol ekstresinde 12,62 mg/g ekstre; asitli etanol ekstresinde ise 17,61 mg/g ekstre olarak

hesaplandı. Asitli etanol ekstresi en yüksek antosiyanin içeren ekstre olarak tespit edildi. Bu sebeple meyvelerin asitli etanol ekstresi ile jel yapımına karar verildi.

4.2. HPLC ANALİZİ SONUÇLARI

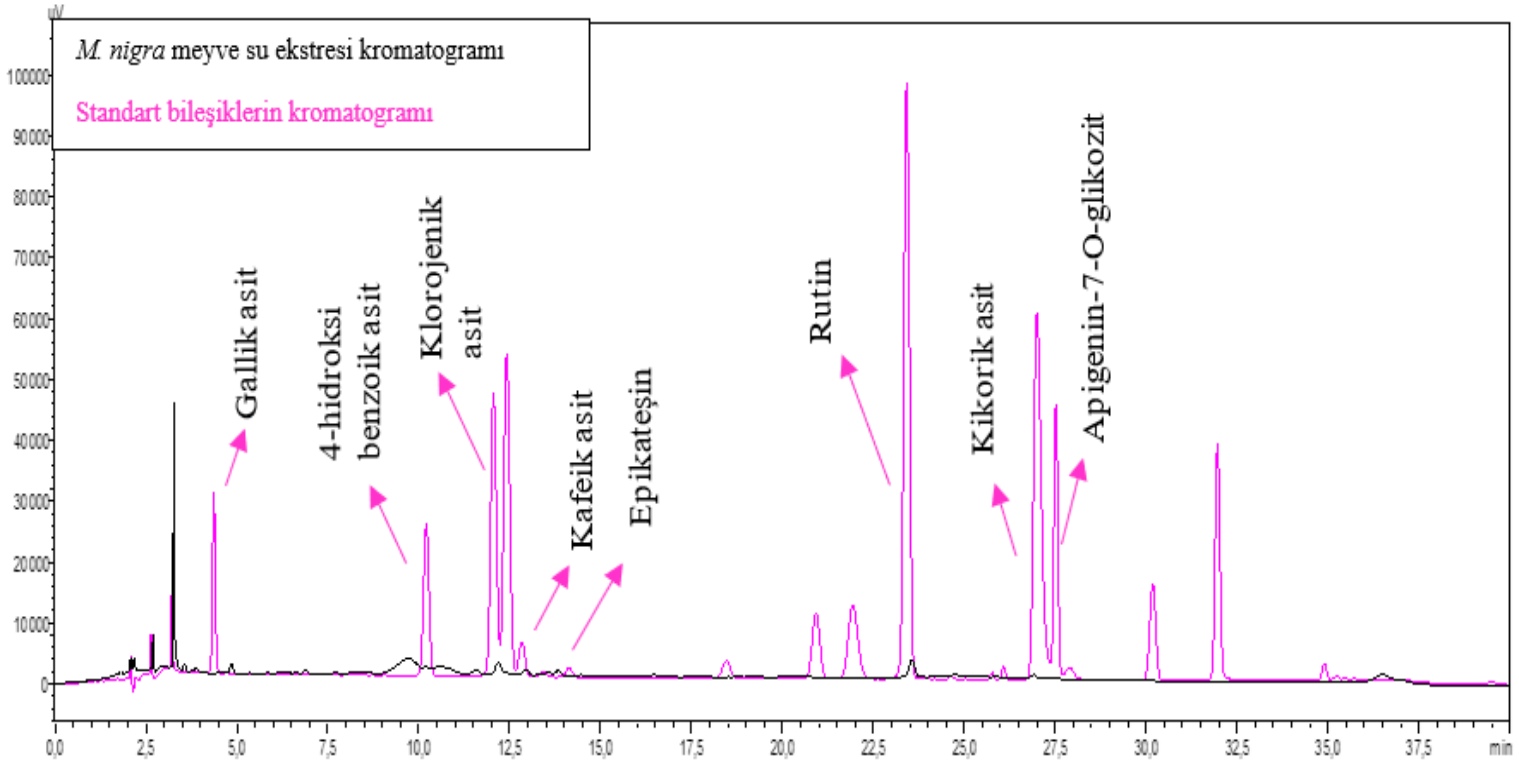
4.2.1. *Morus nigra* L. Meyve Ekstrelerinin HPLC Analizleri

4.2.1.1. *Morus nigra* L. meyvelerinden çinko oksit nanopartikül sentezi için hazırlanan su ekstresinin HPLC analizi: *M. nigra* meyvelerinden ZnONP sentezi için hazırlanan su ekstresinin HPLC-PDA analizi sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. Tespit edilen bileşiklere ait kromotogramlar aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1).

Tablo 4.2: *Morus nigra* L. meyvelerinden çinko oksit nanopartikül sentezi için hazırlanan su ekstresinin HPLC- PDA analiz sonuçları

	Standart Madde	Alıkonma Zamanı	Konsantrasyon	Birim	S/N
1	Gallik asit	4,594	0,047	mg/L	0,20
2	4-hidroksibenzoik asit	10,192	0,155	mg/L	0,93
3	Klorojenik asit	12,188	1,803	mg/L	15,10
4	Vanilik asit	Nd	0,000	mg/L	--
5	Kafeik asit	12,946	0,520	mg/L	0,98
6	Epikateşin	14,459	0,142	mg/L	0,22
7	*p*-kumarik asit	Nd	0,000	mg/L	--
8	Ferulik asit	Nd	0,000	mg/L	--
9	Salisilik asit	Nd	0,000	mg/L	--
10	Rutin	23,562	1,566	mg/L	3,00
11	Kikorik asit	26,917	0,266	mg/L	0,73
12	Apigenin-7-*O*-glikozit	26,914	0,070	mg/L	0,87
13	Sinnamik asit	Nd	0,000	mg/L	--
14	Kersetin	Nd	0,000	mg/L	--
15	Naringenin	Nd	0,000	mg/L	--

Nd: Tespit Edilmedi



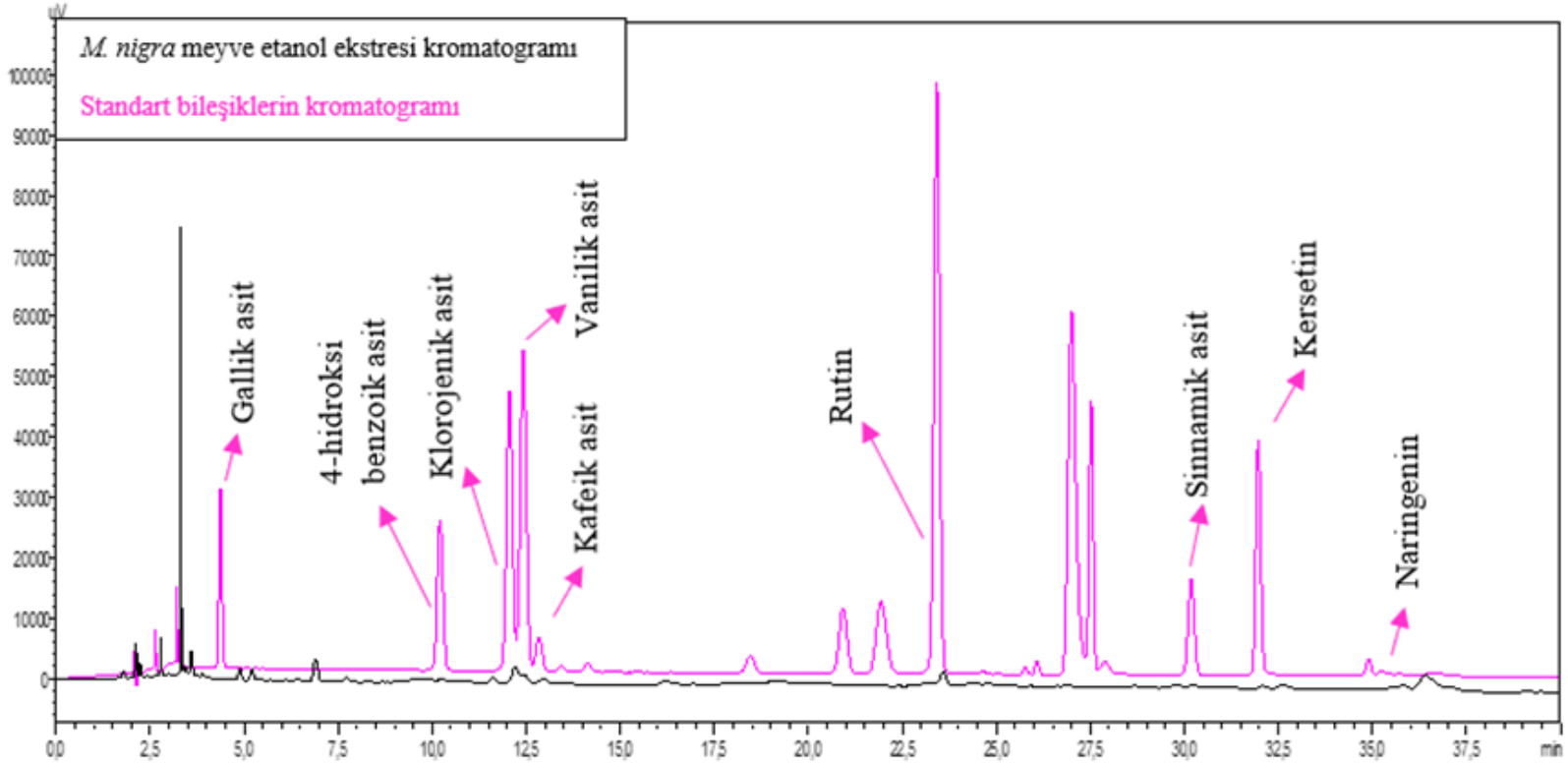
Şekil 4.1: *Morus nigra* L. meyvelerinin su ekstresine ait HPLC kromatogramı

4.2.1.2. *Morus nigra* L. meyve etanol ekstresinin HPLC analizi: *M. nigra* meyvelerinin etanol ekstresinin HPLC-PDA analizi sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir. Tespit edilen bileşiklere ait kromotogramlar aşağıda verilmiştir (Şekil 4.2).

Tablo 4.3: *Morus nigra* L. meyvelerinin etanol ekstresinin HPLC- PDA analiz sonuçları

	Standart Madde	**Alıkonma Zamanı**	**Konsantrasyon**	**Birim**	**S/N**
1	Galllik asit	4,332	0,039	mg/g	0,19
2	4-hidroksibenzoik asit	10,239	0,059	mg/g	0,27
3	Klorojenik asit	12,204	2,373	mg/g	19,62
4	Vanilik asit	12,447	0,092	mg/g	0,34
5	Kafeik asit	12,957	0,440	mg/g	0,51
6	Epikatesin	Nd	0,000	mg/g	--
7	*p*-kumarik asit	Nd	0,000	mg/g	--
8	Ferulik asit	Nd	0,000	mg/g	--
9	Salisilik asit	Nd	0,000	mg/g	--
10	Rutin	23,597	1,042	mg/g	1,30
11	Kikorik asit	Nd	0,000	mg/g	--
12	Apigenin-7-*O*-glikozit	Nd	0,000	mg/g	--
13	Sinnamik asit	30,225	0,124	mg/g	0,89
14	Kersetin	32,515	0,450	mg/g	1,49
15	Naringenin	36,469	0,199	mg/g	0,46

Nd: Tespit edilmedi



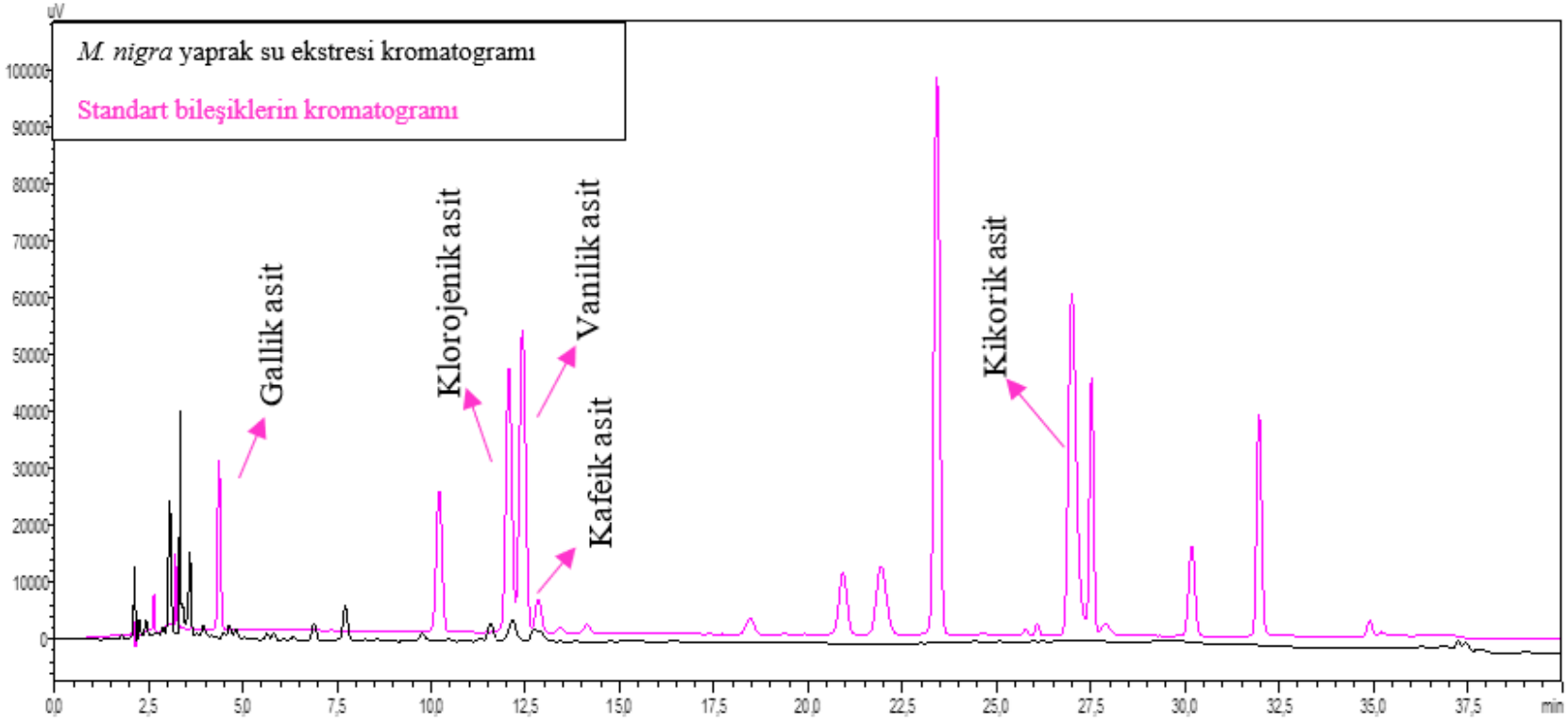
Şekil 4.2: *Morus nigra* L. meyvelerinin etanol ekstresine ait HPLC kromatogramı

4.2.1.3. *Morus nigra* L. yaprak çinko oksit nanopartikül sentezi için kullanılan sulu ekstrenin HPLC analizi: *M. nigra* yapraklarından ZnONP sentezi için hazırlanan su ekstresinin HPLC-PDA analizi sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir. Tespit edilen bileşiklere ait kromotogramlar aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3).

Tablo 4.4: *Morus nigra* L. yapraklarından çinko oksit nanopartikül sentezi için hazırlanan su ekstresinin HPLC-PDA sonuçları

	Standart Madde	Alıkonma Zamanı	Konsantrasyon	Birim	S/N
1	Gallik asit	4,488	0,199	mg/L	1,12
2	4-hidroksibenzoik asit	Nd.	0,000	mg/L	--
3	Klorojenik asit	12,159	3,255	mg/L	15,50
4	Vanilik asit	12,720	0,184	mg/L	0,83
5	Kafeik asit	12,889	0,276	mg/L	0,44
6	Epikatesin	Nd	0,000	mg/L	--
7	*p*-kumarik asit	Nd	0,000	mg/L	--
8	Ferulik asit	Nd	0,000	mg/L	--
9	Salisilik asit	Nd	0,000	mg/L	--
10	Rutin	Nd	0,000	mg/L	--
11	Kikorik asit	26,993	0,468	mg/L	0,91
12	Apigenin-7-*O*-glikozit	27,520	0,033	mg/L	0,28
13	Sinnamik asit	Nd	0,000	mg/L	--
14	Kersetin	Nd	0,000	mg/L	--
15	Naringenin	Nd	0,000	mg/L	--

Nd: Tespit edilmedi



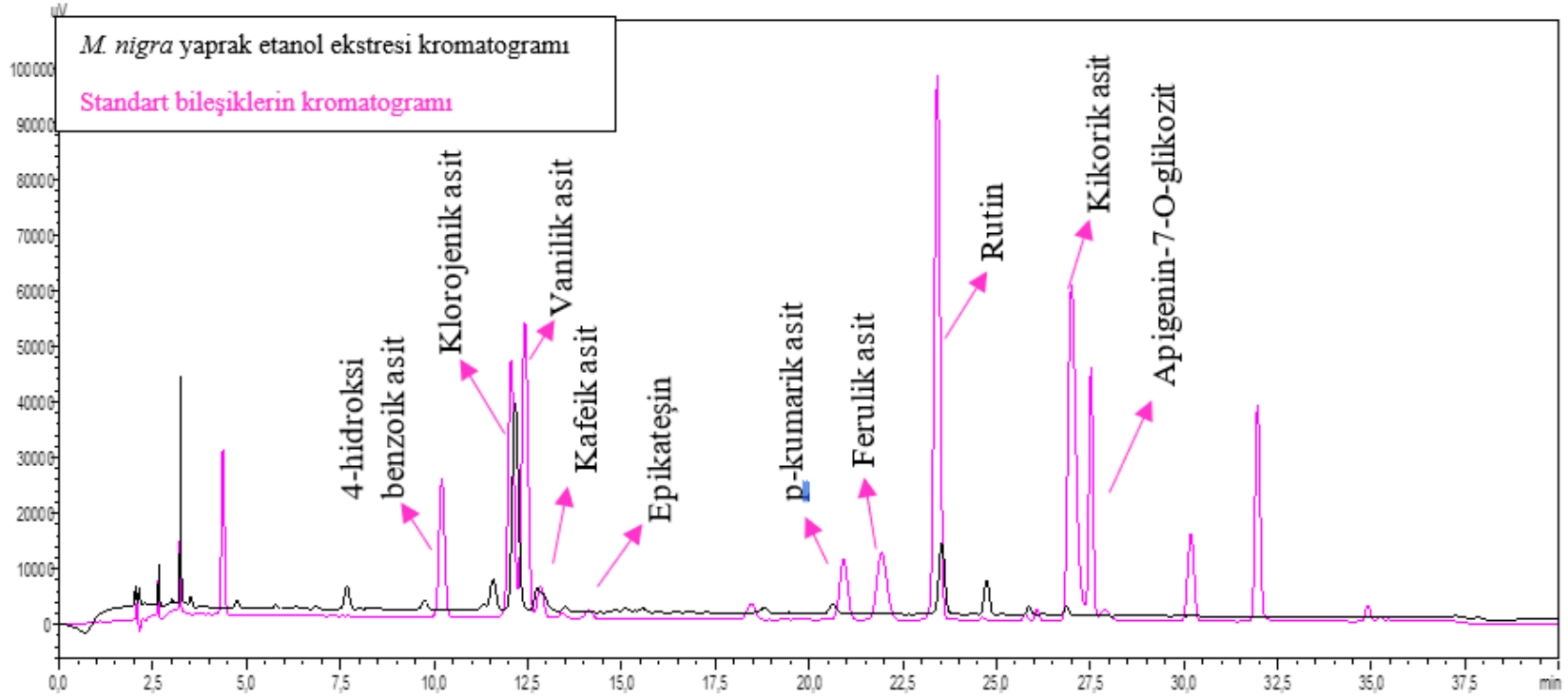
Şekil 4.3: *Morus nigra* L. yapraklarının su ekstresine ait HPLC kromatogramı

4.2.1.4. *Morus nigra* L. yaprak etanol ekstresinin HPLC analizi: *M. nigra* yapraklarının etanol ekstresinin HPLC-PDA analizi sonuçları Tablo 4.5'te verilmiştir. Tespit edilen bileşiklere ait kromotogramlar aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4).

Tablo 4.5: *Morus nigra* L. yapraklarının etanol ekstresinin HPLC-PDA sonuçları

	Standart Madde	**Alıkonma Zamanı**	**Konsantrasyon**	**Birim**	**S/N**
1	Galllik asit	Nd	0,000	mg/g	--
2	4-hidroksibenzoik asit	10,791	0,018	mg/g	0,09
3	Klorojenik asit	12,169	33,830	mg/g	113,88
4	Vanilik asit	12,760	0,375	mg/g	1,19
5	Kafeik asit	12,911	0,210	mg/g	0,22
6	Epikatesin	14,104	0,182	mg/g	0,08
7	*p*-kumarik asit	18,781	0,104	mg/g	0,22
8	Ferulik asit	20,634	0,187	mg/g	0,35
9	Salisilik asit	Nd	0,000	mg/g	--
10	Rutin	23,540	6,538	mg/g	6,73
11	Kikorik asit	26,865	0,670	mg/g	0,37
12	Apigenin-7-*O*-glikozit	26,867	0,192	mg/g	0,50
13	Sinamik asit	Nd	0,000	mg/g	--
14	Kersetin	Nd	0,000	mg/g	--
15	Naringenin	Nd	0,000	mg/g	--

Nd: Tespit edilmedi



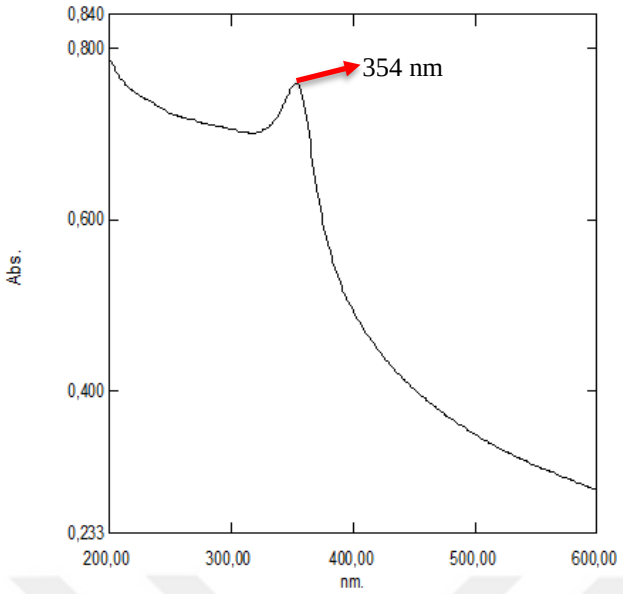
Şekil 4.4: *Morus nigra* L. yapraklarının etanol ekstresine ait HPLC kromatogramı

4.3. *MORUS NİGRA* L. MEYVE VE YAPRAK EKSTRELERİNDEN GREEN SENTEZ YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

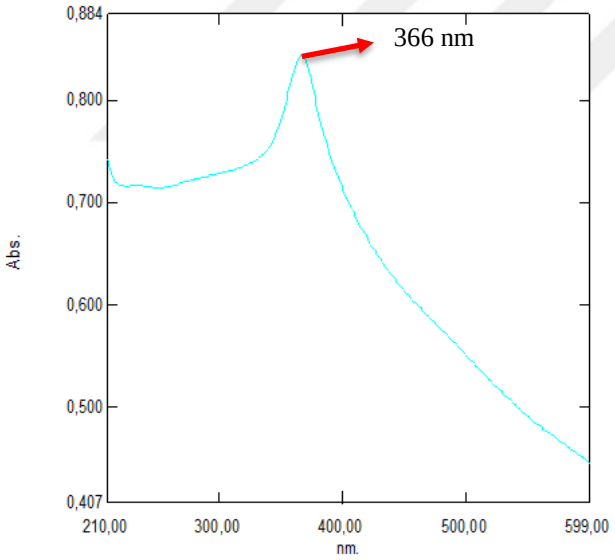
Uygun sentez metodu ile sentezlenen nanopartiküllerin farklı analiz yöntemleri ile boyutu ve yapısı karakterize edilmiştir. UV spektrofotometre ile absorbans spektrumları alınarak ZnONP sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediği doğrulanmıştır. Ayrıca FTIR, XRD, SEM ve EDX analizleri de yapılarak yapısı, morfolojisi ve boyutu doğrulanmıştır.

4.3.1. UV–Visible Spekroskopisi

Meyve ekstresi ile sentezlenen nanopartiküllerin (MNP) UV spektrumu Şekil 4.5'te; yaprak ekstresi ile sentezlenen nanopartiküllerin (YNP) UV spektrumu ise Şekil 4.6'de verilmiştir. ZnO'nun biyo-redüksiyonu, çinko metalik NP'lerin seyreltilmiş alikotlarının 200-600 nm aralığında UV-Vis spektrofotometreye tabi tutulmasıyla doğrulanmıştır. 350 nm civarında absorbans bandı görülmesi, oda sıcaklığında yüksek uyarım ve bağlanma enerjileri dolayısıyla çinko nanapartikülleri için spesifiktir. Sentezlenen MNP için 354 nm'de, YNP için ise 366 nm'de absorbans bandı görülmüştür. Absorpsiyon spektroskopisi sonucunda, partikül boyutunun küçültülmesi ile bant aralığının arttığı görülmektedir. Spektrumda elde edilen keskin tepe, sentezlenen parçacıkların boyutunun tek tip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin UV-Visible spektrumu



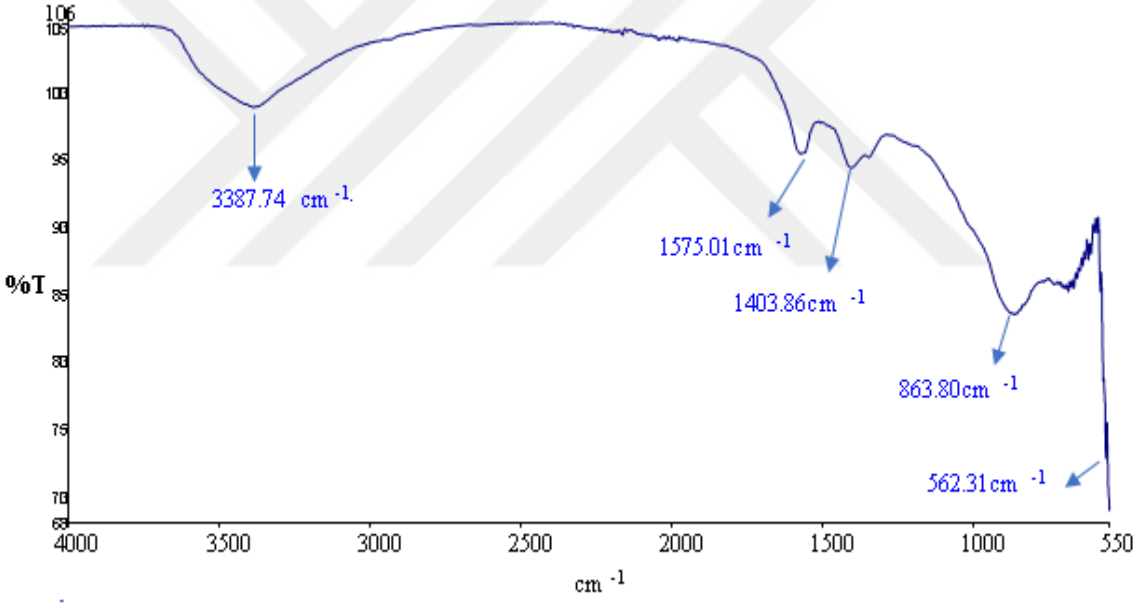
Şekil 4.6: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin UV-Visible spektrumu

4.3.2. Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi Analizi

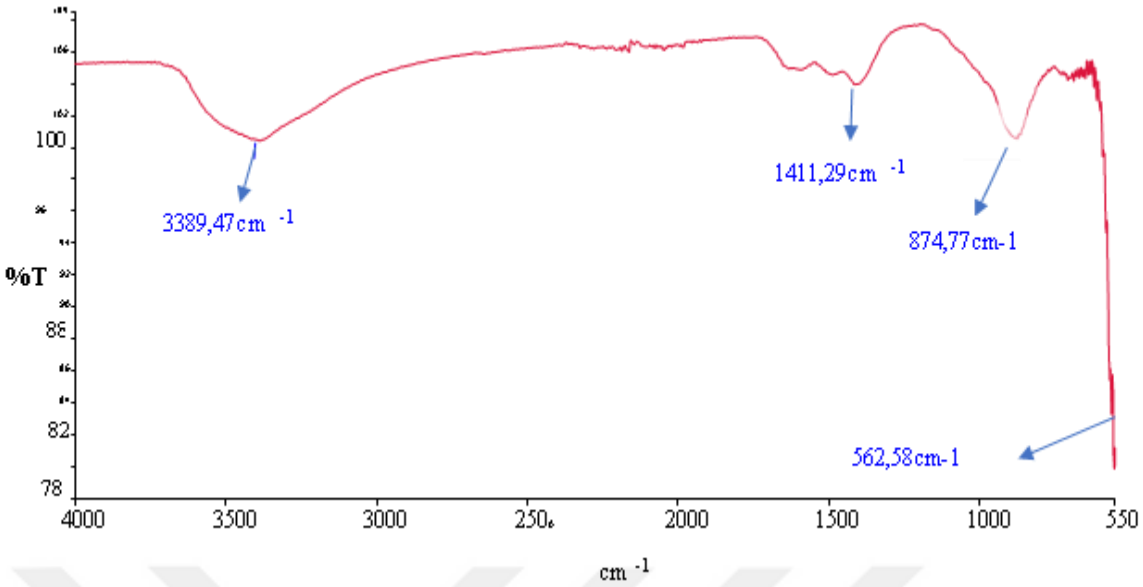
FTIR analizi ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri belirlenebilmektedir. MNP'ye ait FTIR spektrumu Şekil 4.7'de verilmiştir. 3387,74 cm^{-1}'de oluşan band -OH gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. 1575,01 cm^{-1}'de bulunan

band aromatik halkalarda bulunan C=C gerilmesi ve polifenollerde bulunan C=O gerilmesine karşılık gelmektedir. 1403.86 cm^{-1}'de bulunan band proteinlerde bulunan C-N gerilmesine karşılık gelmektedir. 863,80 cm^{-1}'de bulunan band ise aromatik yapılardan kaynaklanan C-H bağını göstermektedir. Metal oksitler genellikle 600-400 cm^{-1} aralığında band vermektedir. Sentezlenen ZnO NP spektrumunda 562,31 cm^{-1} de bulunan band Zn-O gerilmesine aittir.

YNP'ye ait FTIR spektrumu Şekil 4.8'de verilmiştir. 3389,47 cm^{-1}'de oluşan band -OH gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. 1411.29 cm^{-1}'de bulunan band proteinlerde C-N gerilmesine karşılık gelmektedir. 874,77 cm^{-1}'de bulunan band ise aromatik yapılardan kaynaklanan C-H bağını göstermektedir. 562,58 cm^{-1} de bulunan band ise Zn-O gerilmesine aittir.



Şekil 4.7: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin Fourier Transform Kızılötesi spektrumu

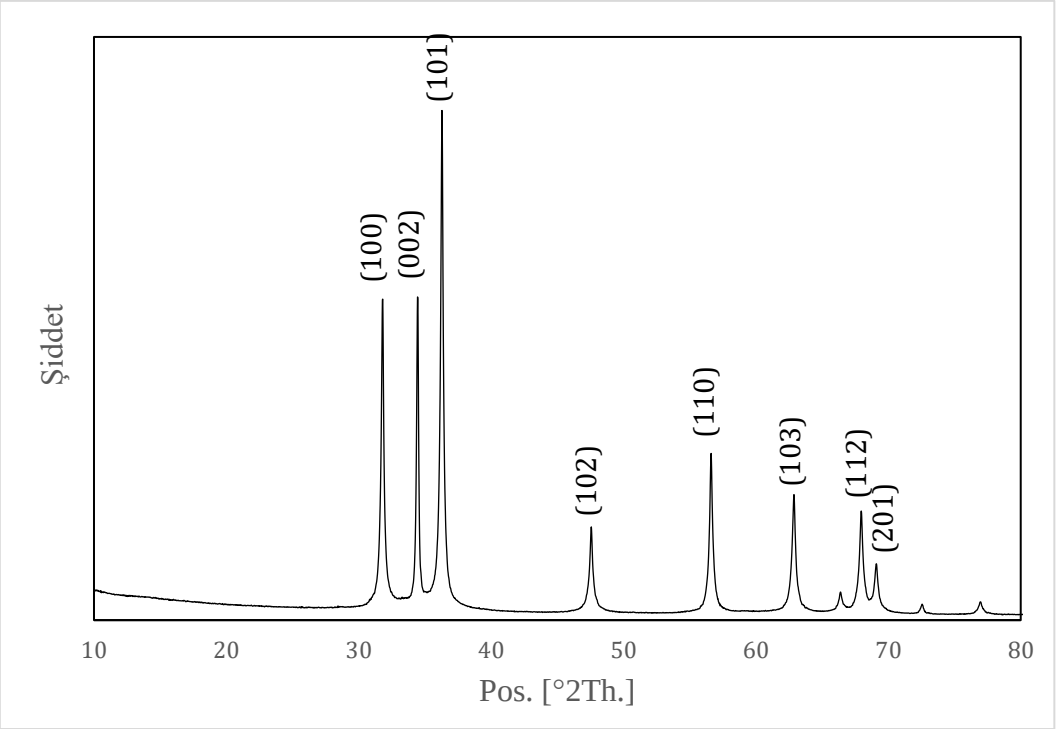


Şekil 4.8: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin Fourier Transform Kızılötesi spektrumu

4.3.3. X Işını Kırınımı

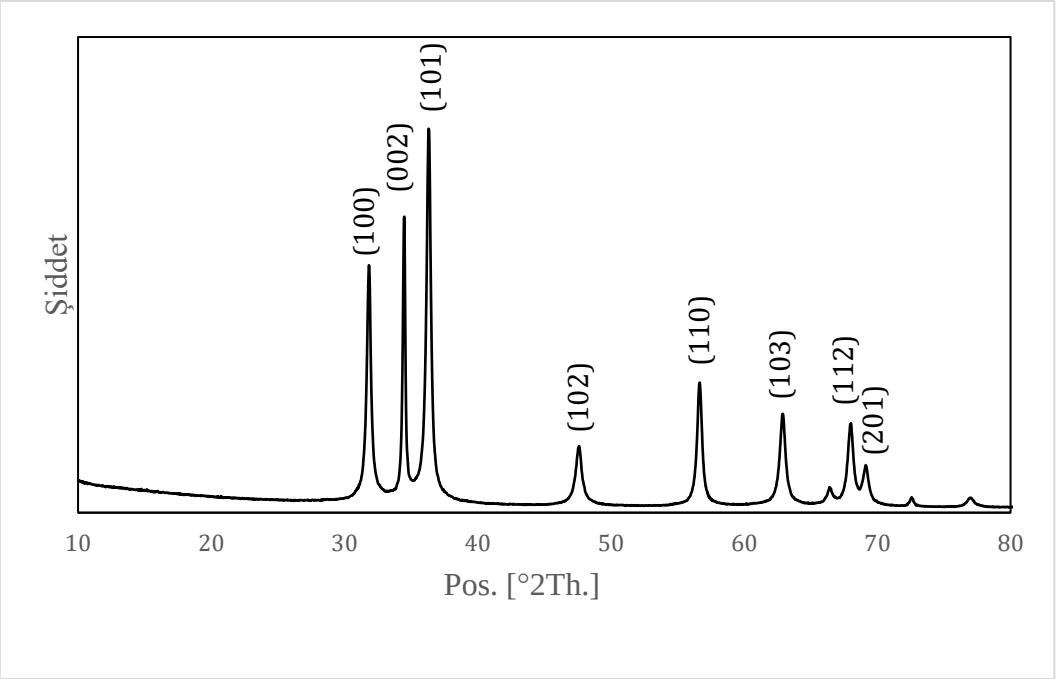
X- Işını Kırınımı, (XRD, X-Ray Diffraction) bir kristalin atomik ve moleküler yapısını incelemek için kullanılan bir analiz yöntemidir. Kristalleşmiş atomların bir X-ışını demetindeki ışınların kristale özel çeşitli yönlerde kırınımına dayanarak analiz gerçekleştirilir. Tuzlar, metaller, mineraller, yarı iletkenlerde olduğu kadar çeşitli inorganik, organik ve biyolojik moleküller de kristal oluşturabildikleri için XRD ile analiz edilebilmektedir.

Elde edilen XRD sonucuna göre çinko asetat ile sentezlenen MNP' den elde edilen pikler (100) düzleminde 31,79º, (002) düzleminde 34,42 º, (101) düzleminde 36,27º, (102) düzleminde 47,54º, (110) düzleminde 56,60º, (103) düzleminde 62,83º, (112) düzleminde 67.94º, (201) düzleminde 69,08º, (004) düzleminde 72,51º, (202) düzleminde 76,94º açılarına karşılık gelmektedir. XRD sonuçlarına göre sentezlenen MNP 98-016-3380 ve 98-005-7478 ASTM kart numaraları ile eşleşmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin X-Işını Difraktometresi paterni

YNP'den elde edilen pikler ise (100) düzleminde 31,82º, (002) düzleminde 34,46º, (101) düzleminde 36,30º, (102) düzleminde 47,58º, (110) düzleminde 56,65º, (103) düzleminde 62,88º, (112) düzleminde 67.98º, (201) düzleminde 69,13º, (004) düzleminde 72,56º, (202) düzleminde 76,99º açılarına karşılık gelmektedir. XRD sonuçlarına göre sentezlenen YNP 98-016-3380 ve 98-005-7478 ASTM kart numaraları ile eşleşmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin X-Işını Difraktometresi paterni

Sentezlenen nanopartiküllerin kristal boyutları Debye- Scherrer denklemi ile hesaplanmıştır.

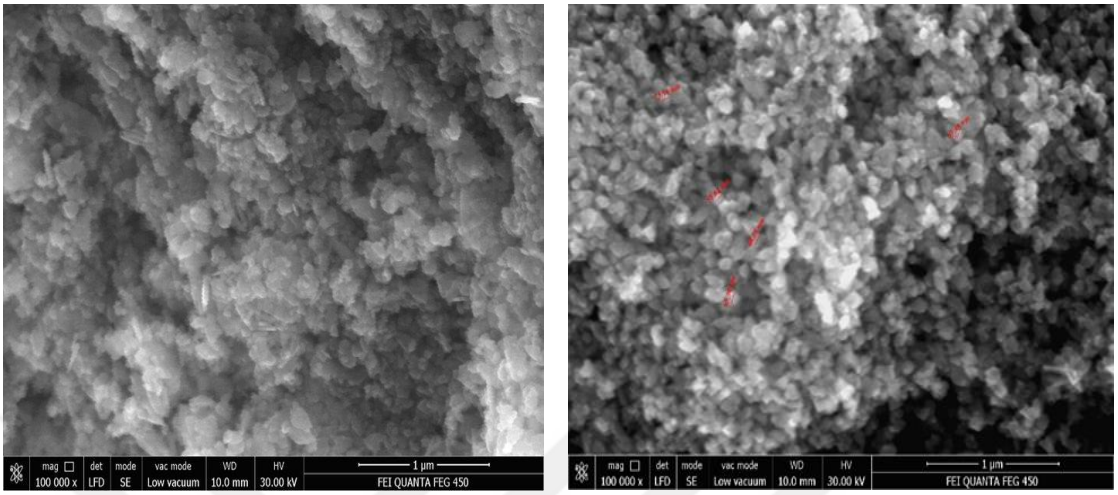
$$D = 0.9\ \lambda / \beta\ Cos\theta$$

Bu denkleme göre λ, toz kırınımında kullanılan x-ışının dalga boyu, β pikin maksimum şiddetinin yarısındaki genişliği ve θ Bragg yansıma açısıdır. Debye-Scherrer denklemi ile hesaplandığında sentezlenen MNP kristallerinin ortalama partikül boyutu 28,29 nm, YNP kristallerinin ortalama partikül boyutu ise 19,91 nm olarak hesaplanmıştır.

4.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu

Sentezlenen ZnONP'lerin şekli, yapısı ve boyutu SEM analizi ile belirlenmiştir. Sentezlenen MNP ve YNP kristallerinin SEM görüntüleri Şekil 4.11’ de verilmiştir. Prekursor olarak çinko asetat kullanıldığında, çinko oksit molekülleri yavaş büyüyerek küçük küresel yapılar şeklinde oluşur. SEM görüntülerinde ölçümü yapılan

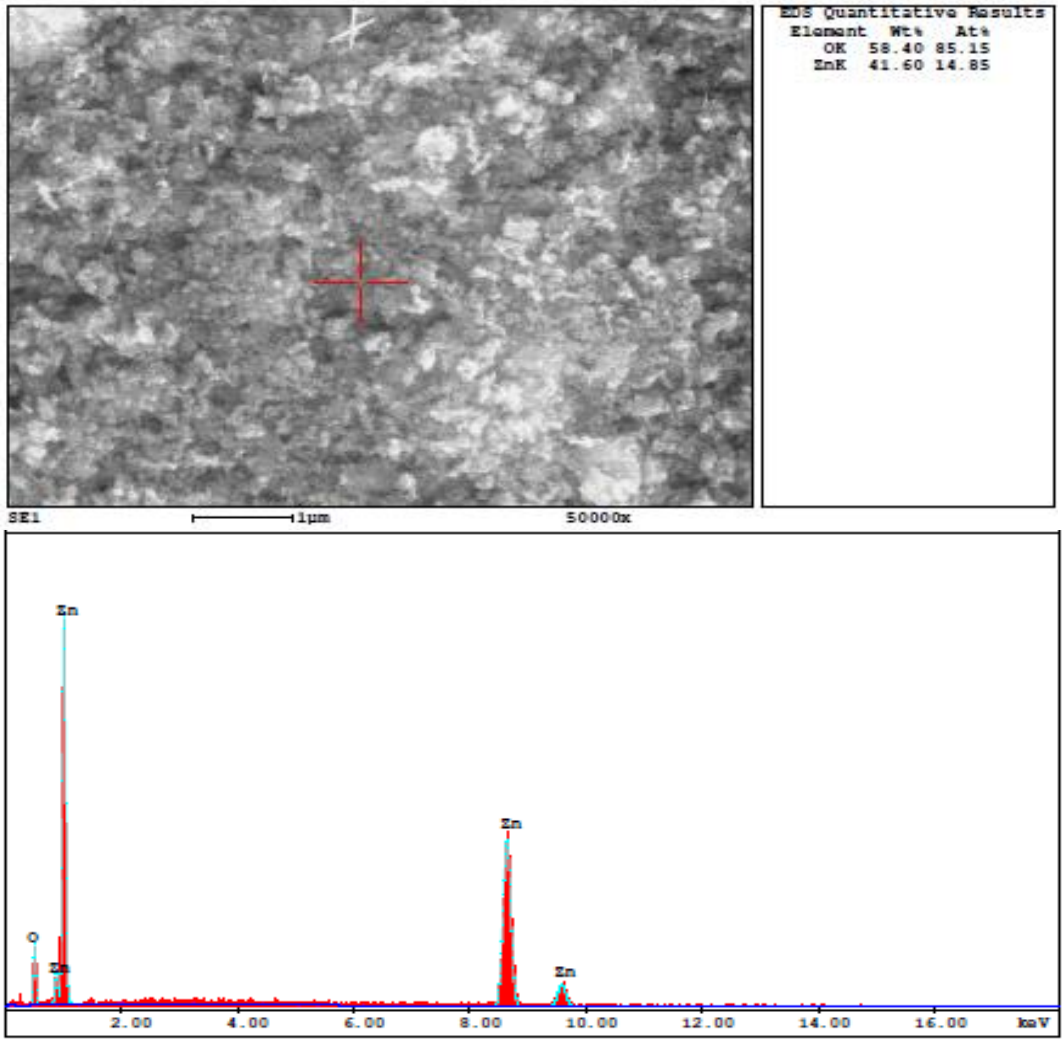
nanopartiküllerin boyutunun XRD ile uyumlu olduğu, bazılarının kurşun şeklinde biriktiği ancak genel olarak küresel bir şekle sahip olduğu görülmektedir.



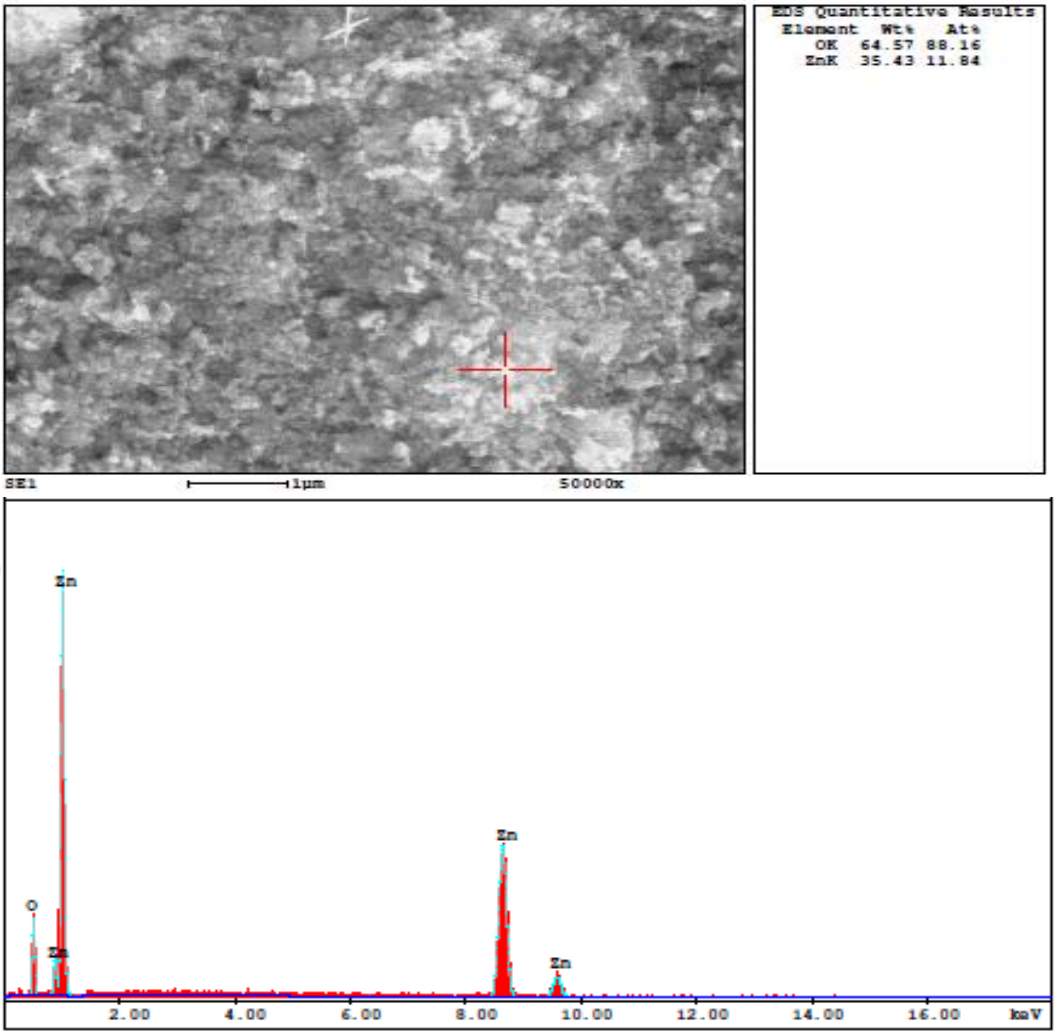
Şekil 4.11: *Morus nigra* L. meyve ekstresi (sol) ve yaprak ekstresi (sağ) ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskopu görüntüsü

4.3.5. Energy-Dispersive X-ray Spektroskopisi

MNP ve YNP partiküllerine ait EDX spektrumu (Şekil 4.12 ve 4.13) verilmiştir. EDX spektrumları ZnONP elemental kompozisyonunu vermektedir. EDX spektrumu, çinko ve oksijen olarak tanımlanan beş pik noktası göstermektedir. EDX spektrumları, numunede gerekli Zn ve O fazının mevcut olduğunu ve sentezlenen partiküllerin yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir. Buradan da anlaşıldığı gibi SEM ve EDX analiz sonuçları XRD analizleriyle elde edilen sonuçlarla uyumludur.



Şekil 4.12: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskopu görüntüsü ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrumu



Şekil 4.13: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile hazırlanan çinko oksit nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskopu görüntüsü ve enerji dağıtıcı X-ışını spektrumu

4.4. JEL FORMÜLASYONLARININ ANALİZ SONUÇLARI

4.4.1. Formülasyonların pH ve Viskozite Ölçümü

Formülasyonların pH değerleri 4,10±0,005 ile 7,83±0,032 arasında bulunmuştur. Bukkal mukozada uygulanacak formülasyonların daha çok nötral pH'da olması istenmektedir. Hazırlanan ekstre yüklü olmayan formülasyonlar dikkate alındığında kitosan eklenmiş formülasyonların pH değerlerinin asidik pH'da olduğu görülmüştür. Kitosan eklenmemiş diğer formülasyonlar dikkate alındığında ise pH değerlerinin nötral

pH'ya yakın ve bu yüzden ağız içi uygulamaya uygun formülasyonlar olarak değerlendirilmiştirler.

Formülasyonların pH ve viskozite ölçüm sonuçları Tablo 4.6'da gösterilmiştir. En yüksek viskozite ekstre yüklü olmayan C10 numaralı formülasyonda gözlenmiştir. Kullanılan jel yapıcı ajanların oranlarının değişmesi viskozite değerlerinde farklılıklara yol açmıştır. Viskozite değerinin yüksek olması formülasyonun uygulama alanında kalış süresini etkileyen önemli faktörlerden bir tanesidir. Hem pH sonuçları hem de viskozite sonuçları göz önüne alındığında C10 numaralı formülasyon ideal olarak belirlenmiştir. Bu sebeple C10 formülasyonlarına ekstreler yüklenmiştir. Daha sonra karakterizasyon çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. pH ve viskozite ölçümleri neticesinde C10-Yaprak Ekstresi, C10-Meyve Ekstresi ve C10-NP1 formülasyonlarının pH değerleri nötral pH'ya yakın olarak bulunmuştur. C10-Yaprak Ekstresi en yüksek viskoziteyi göstermiştir.

Tablo 4.6: Boş ve yüklü formülasyonların pH ve viskozite sonuçları

Formülasyon Kodu	pH±SD	Viskozite (P)±SD
C1	6,77±0,05	10,71±0,07
C2	4,53±0,02	9,88±0,05
C3	4,22±0,005	11,95±0,03
C4	4,10±0,005	10,83±0,20
C5	6,50±0,05	47,16±0,07
C6	4,71±0,02	50,96±0,26
C7	4,40±0,03	56,72±0,02
C8	4,34±0,04	50,32±0,15
C9	6,65±0,18	731,68±1,45
C10	7,52±0,01	736,32±9,64
C10-Yaprak Ekstresi	7,36±0,01	360,64±3,22
C10-Meyve Ekstresi	7,28±0,01	267,68±3,78
C10-YNP	7,52±0,01	9,76±0,67
C10-MNP	7,83±0,032	14,24±1,734

4.4.2. Formülasyonların Tekstür Profil Analizleri

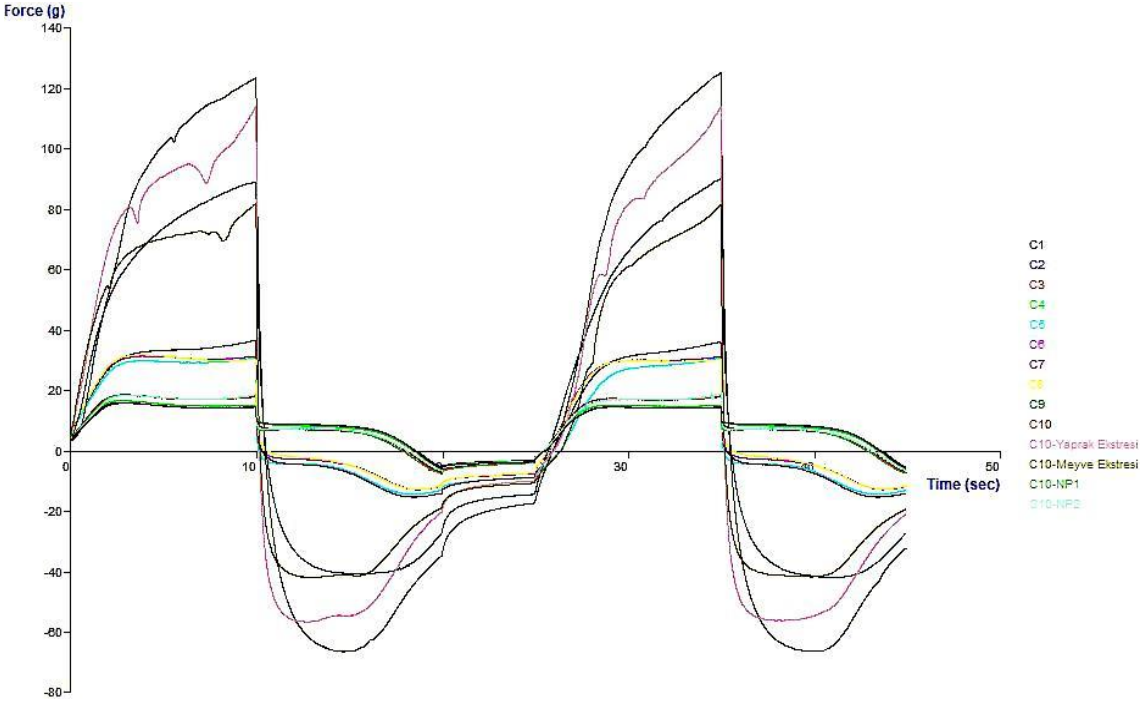
Formülasyonlar, Tablo 4.7'de sertlik, adeziflik, esneklik, koheziflik, sakızımsılık ve çiğnenebilirlik özellikleri açısından değerlendirilmiştir.

Tablo 4.7: Boş ve yüklü formülasyonların tekstür profil analizi sonuçları

Formülasyon Kodu	Sertlik(g) ±SD	Adeziflik (g.sec) ±SD	Esneklik± SD	Koheziflik±SD	Sakızımsılık±SD	Çiğnenebilirlik±SD
C1	-5,883±3,800	-30,331±36,659	0,232±0,020	0,344±0,046	-1,904±0,932	-0,429±0,168
C2	-5,589±3,995	-27,044±36,851	0,233±0,018	0,347±0,047	-1,815±1,019	-0,411±0,195
C3	-7,171±2,701	-34,586±31,144	0,224±0,015	0,328±0,040	-2,278±0,537	-0,505±0,081
C4	-5,991±3,628	-29,382±36,304	0,237±0,018	0,349±0,048	-1,978±0,883	-0,458±0,163
C5	-13,055±1,712	-140,537±47,113	0,208±0,018	0,192±0,024	-2,479±0,035	-0,515±0,038
C6	-11,660±0,919	-109,103±31,255	0,229±0,012	0,221±0,018	-2,566±0,033	-0,587±0,036
C7	20,609±31,203	-140,585±33,490	0,221±0,012	0,211±0,017	4,713±6,636	1,097±1,479
C8	-11,545±1,762	-106,647±48,393	0,229±0,016	0,231±0,036	-2,629±0,040	-0,602±0,050
C9	89,444±10,266	-424,568±22,246	0,266±0,014	0,262±0,028	23,625±5,016	6,338±1,629
C10	123,950±8,786	-619,669±25,176	0,271±0,008	0,280±0,024	34,801±4,945	9,450±1,544
C10-Yaprak Ekstresi	114,571±9,993	-509,078±64,657	0,205±0,021	0,192±0,022	22,113±4,139	4,600±1,256
C10-Meyve Ekstresi	82,530±6,321	-409,260±48,769	0,198±0,018	0,183±0,018	15,152±2,699	3,035±0,827
C10-YNP	-7,466±3,096	-39,504±39,807	0,217±0,020	0,316±0,052	-2,255±0,500	-0,483±0,058
C10-MNP	-6,589±3,860	-32,382±40,524	0,218±0,018	0,322±0,050	-1,991±0,801	-0,424±0,130

Formülasyonlar sertlik açısından değerlendirildiğinde kitosan içeren ve içermeyen formülasyonların (C1-C8) sertlik değerleri birbirine oldukça yakın bulunmuş ve formülasyonlara kitosan ilavesi sertliği belirgin oranda değiştirmemiştir.

Ancak Carbopol 934 ilavesi formülasyonların (C9-C10) sertlik değerini belirgin oranda arttırmıştır. Aynı sonuçlar formülasyonların viskozite değerlerinde de görülmüştür. Bu yüzden jellerin mekanik özelliklerinin sonuçları viskozite sonuçları ile paralellik göstermektedir. Şekil 4.14'da de formülasyonların mekanik özelliklerinin grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 4.14: Formülasyonların tekstür profil analizlerinin grafik olarak görünümleri

NP 1: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile sentezlenen çinko oksit nanopartikül
NP 2: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile sentezlenen çinko oksit nanopartikül

4.4.3. Formülasyonların Yayılabilirlik Analizleri

Formülasyonların yayılabilirlikleri sertlik, yayılma işi, yapışkanlık ve adezyon işi parametreleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Tablo 4.8 formülasyonların yayılabilirlik sonuçlarını göstermektedir.

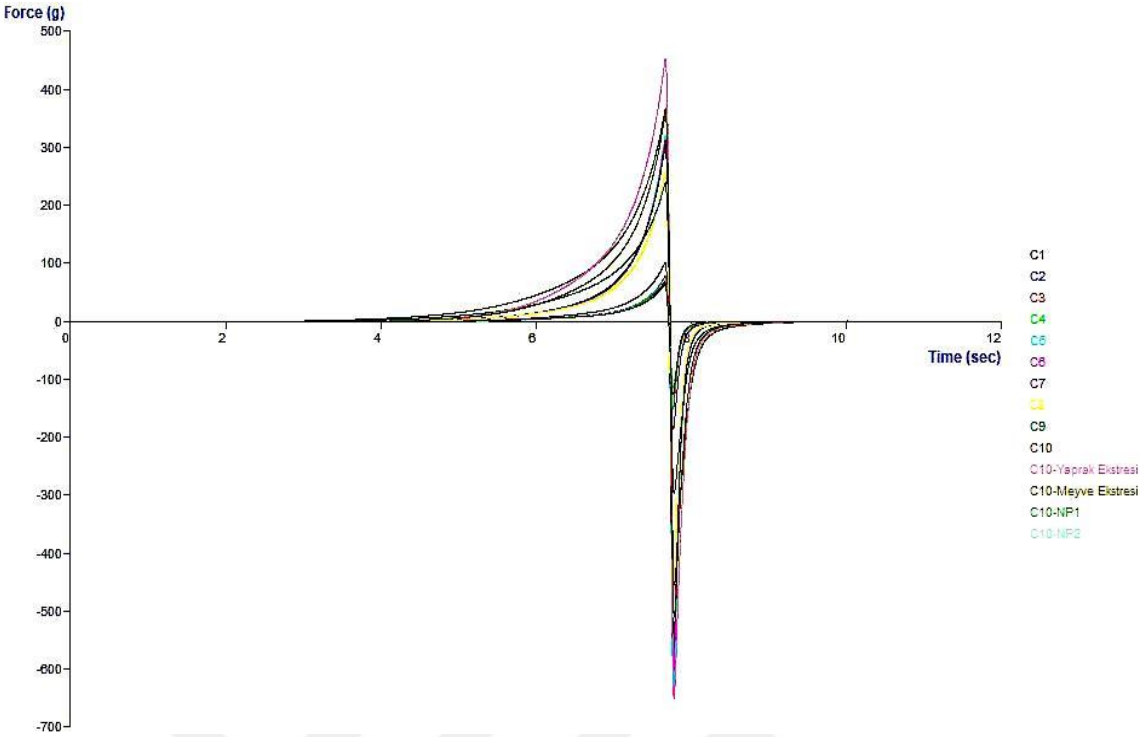
Tablo 4.8: Boş ve yüklü formülasyonların yayılabilirlik çalışması sonuçları

Formülasyon Kodu	Sertlik (g)	Yayılma işi (g.sec)	Yapışkanlık (g)	Adezyon işi (g.sec)
C1	66,26±1,09	29,12±0,73	-127,15±1,73	-16,64±0,19
C2	70,08±0,48	32,04±0,60	-126,19±0,44	-17,71±0,35
C3	102,88±1,06	49,71±0,66	-185,54±1,15	-25,82±0,22
C4	65,32±0,04	30,94±0,26	-114,22±0,23	-16,62±0,45
C5	322,68±7,49	149,44±2,26	-636,61±12,53	-81,69±0,23
C6	314,11±6,42	147,95±2,22	-602,43±13,07	-77,24±0,61
C7	305,92±6,31	149,41±4,10	-564,14±11,57	-75,94±1,26
C8	259,97±2,58	128,89±0,28	-461,81±2,18	-62,47±0,41
C9	240,79±2,18	178,48±9,38	-297,15±1,05	-58,63±1,91
C10	367,65±4,98	276,87±5,58	-455,11±7,01	-96,08±8,10
C10-Yaprak Ekstresi	455,26±0,55	279,55±5,01	-651,56±2,24	-113,20±2,21
C10-Meyve Ekstresi	361,51±0,71	220,79±0,87	-509,95±2,59	-90,40±1,11
C10-NP1	79,17±0,70	33,50±0,74	-151,58±1,32	-19,03±0,65
C10-NP2	66,03±1,59	29,62±1,01	-124,15±3,76	-16,39±0,61

Formülasyonlar değerlendirildiğinde C10 kodlu formülasyon sertliği en yüksek olarak bulunmuştur. Aynı şekilde yayılma için ihtiyaç duyulan iş de C10 numaralı formülasyonda en yüksek olarak bulunmuştur. Bu durum özelikle bukkal uygulamalar için avantaj sağlamaktadır.

Ağız içi uygulamalarda formülasyonun uygulama bölgesinde uzun süreli kalmasını sağlamak iyileşme açısından avantajlı bir durumdur. Bu açıdan ideal olarak belirlenen C10 kodlu formülasyon uygulama bölgesinde en uzun süre kalacağı düşünülen formülasyondur.

Yaprak ve meyve ekstresi yüklü ekstreler boş C10 formülasyonu ile yayılabilirlik açısından paralel sonuçlar vermişlerdir. Fakat nanopartikül yüklü formülasyonların yayılabilirlik değerleri daha düşük bulunmuştur. Şekil 4.15 formülasyonların yayılabilirlik çalışmalarının grafiksel olarak gösterimidir.



Şekil 4.15: Formülasyonların yayılabilirlik çalışmalarının grafik olarak görünümü

NP 1: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile sentezlenen çinko oksit nanopartikül
NP 2: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile sentezlenen çinko oksit nanopartikül

4.4.4. Formülasyonların *ex vivo* Mukoadezyon Analizleri

Formülasyonların *ex vivo* biyoadezyon sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir. Bu araştırmada, hazırlanan jel formülasyonlarının biyoadezif özellikleri, her bir formülasyon ile bukkal mukozası arasındaki adezif bağın üstesinden gelmek için gereken ayırma kuvvetinin değerlendirilmesi yoluyla tekstür profil analizi kullanılarak incelenmiştir. Tüm değerlendirmeler biyoadezif iş üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.9: Boş ve yüklü formülasyonların *ex vivo* biyoadezyon çalışması sonuçları

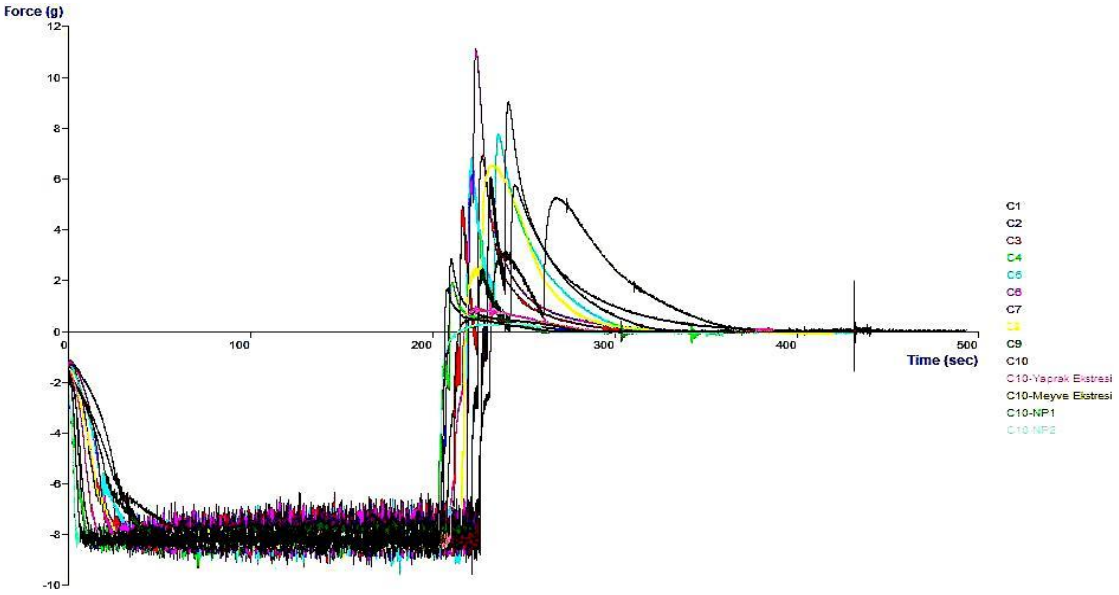
Formülasyon Kodu	Maksimum Kuvvet (Adeziflik) N	Biyoadezif İş (N.sec)	Ayrılma Mesafesi (mm)
C1	0,02±0,01	0,28±0,12	6,74±1,98
C2	0,04±0,00	0,45±0,09	7,36±0,97
C3	0,14±0,02	1,62±0,53	8,87±2,24
C4	0,03±0,01	0,32±0,15	5,97±0,87
C5	0,13±0,01	2,68±0,26	9,47±0,11

Tablo 4.9 (Devam)

C6	0,13±0,01	1,86±0,19	12,50±2,32
C7	0,15±0,00	3,02±0,34	15,19±0,85
C8	0,07±0,01	2,45±0,41	11,62±1,93
C9	0,09±0,01	2,31±0,31	9,88±0,95
C10	0,09±0,00	3,80±0,44	11,50±2,84
C10-Yaprak Ekstresi	0,01±0,00	0,39±0,21	8,11±1,76
C10-Meyve Ekstresi	0,01±0,00	0,26±0,09	7,42±0,61
C10-NP1	0,01±0,01	0,11±0,02	6,02±2,48
C10-NP2	0,00±0,00	0,12±0,02	8,00±4,99

NP 1: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile sentezlenen çinko oksit nanopartikül
NP 2: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile sentezlenen çinko oksit nanopartikül

Çalışmada kullanılan polimerler biyoadezif polimerler olarak tanımlanmaktadır. Kullanılan polimerlerin oranları arttığında biyoadezif işin de arttığı böylece mukoza ile daha güçlü bağ yaptığı bulunmuştur. Elde edilen formülasyonlarda en yüksek biyoadezif etki C10 kodlu formülasyonda bulunmuştur. Yaprak ekstresi yüklü formülasyon en yüksek biyoadezif işi göstermiş olmakla beraber nanopartikül yüklü ekstreler daha düşük biyoadezif iş göstermiştir. Şekil 4.16, formülasyonların *ex vivo* biyoadezif iş grafiklerini göstermektedir.



Şekil 4.16: Formülasyonların *ex vivo* biyoadezyon çalışmalarının grafik olarak görünümü

NP 1: *Morus nigra* L. yaprak ekstresi ile sentezlenen çinko oksit nanopartikül
NP 2: *Morus nigra* L. meyve ekstresi ile sentezlenen çinko oksit nanopartikül

4.5. HAYVAN DENEYLERİ BULGULARI

4.5.1. Deney Hayvanlarının Kilo Takibi

Denekler 0.günde ve sakrifikasyon (3.,6. ve 9. gün tedavi uygulandıktan sonra) günlerinde tartılarak kilo kayıpları açısından takip edilmiştir. Ağırlık değişimi deneklerin ağzında oluşturulan yaraların beslenmeyi ne kadar etkilediğini göstermesi nedeniyle oldukça önemli bir parametredir. Deneklerdeki kilo kaybı hayvanların hissettikleri ağrı ve ağız içerisinde bulunan yara nedeniyle beslenemediklerini göstermektedir. Deneklerin başlangıç kilo ortalamaları ve deney sonu kilo ortalamaları Tablo 4.10'da verilmiştir. Tedavi edici ajan uygulanan gruplarda kilo kaybı kontrol ve boş jel uygulanan gruplara göre oldukça azdır. Tablodan görüldüğü üzere kontrol ve boş jel gruplarında 9. günün sonuna kadar kilo kaybı devam etmiştir. Deneklerin bu gruplarda 9. gün sonunda (%15-20 arasında) ciddi oranda kilo kaybettiği görülmektedir. 3. gün gruplarında en düşük kilo kaybı MNP grubunda görülmüştür. 6. gün gruplarında ise en az kilo kaybı YNP grubunda görülmüştür. 9. gün grupları değerlendirildiğinde ise en az kilo kaybı Y grubunda görülmüş ve bu gruptaki pek çok deneğin 9. güne doğru kilo almaya başladığı gözlenmiştir. 9. günde M, MNP ve YNP gruplarındaki kilo kaybı da oldukça düşük olup gruplardaki sonuçlar birbiri ile benzerdir.

Tablo 4.10: Deney hayvanlarının kilo takibi

Grup	Başlangıç Ağırlık Ortalaması ± SD	Deney Sonu Ağırlık Ortalaması ± SD	% Ortalama Kayıp
K3	415,16 ±25,30	366,66 ± 38,83	%11,68
K6	380,83 ± 25,31	327,33 ± 34,13	%14,05
K9	343,33 ±33,20	277,17 ± 41, 37	%19,02
B3	414,00 ± 32,23	364,60 ± 40,90	%11,9
B6	430,20 ± 36,76	368,80 ± 48,42	%14,31
B9	414,66 ±41,71	347,33 ± 69,65	%16,23
M3	412,33 ± 26,38	385,16 ± 37,43	%6,59
M6	477,83 ± 21,21	451,83 ± 32,40	%5,44
M9	424,80 ±39,21	417,60 ± 46,40	%1,69

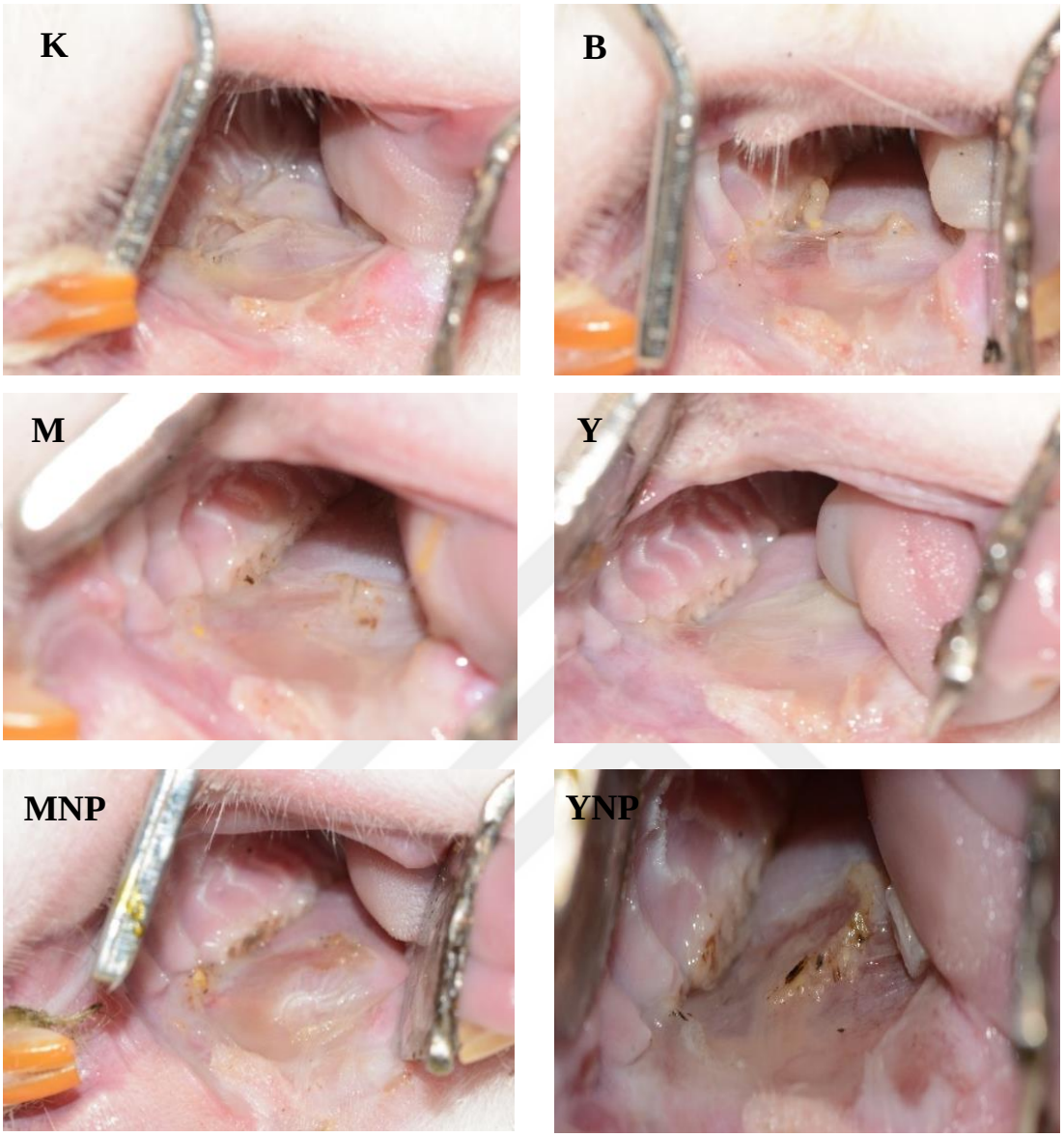
Tablo 4.10 (Devam)

Y3	403,83 ± 19,71	381,17 ± 23,12	%5,61
Y6	412,83 ± 36,52	389,67 ± 45,62	%5,61
Y9	370,33 ± 41,22	369,67 ± 46,81	%0,18
MNP3	458,00 ± 30,67	440,50 ± 38,38	%3,82
MNP6	421,00 ± 56,18	395,83 ± 57,94	%5,98
MNP9	372,67 ± 24,18	368,00 ±26,17	%1,25
YNP3	458,67 ±35,63	437,17 ± 44,16	%4,68
YNP6	461,83 ± 32,62	438,17 ± 25,23	%5,12
YNP9	458,67 ± 22,07	452,00 ± 19,48	%1,45

K: Kontrol grubu; **B:** Boş jel grubu; **M:** Meyve grubu; **Y:** Yaprak grubu; **MNP:** Meyve nanopartikül grubu; **YNP:** Yaprak nanopartikül grubu

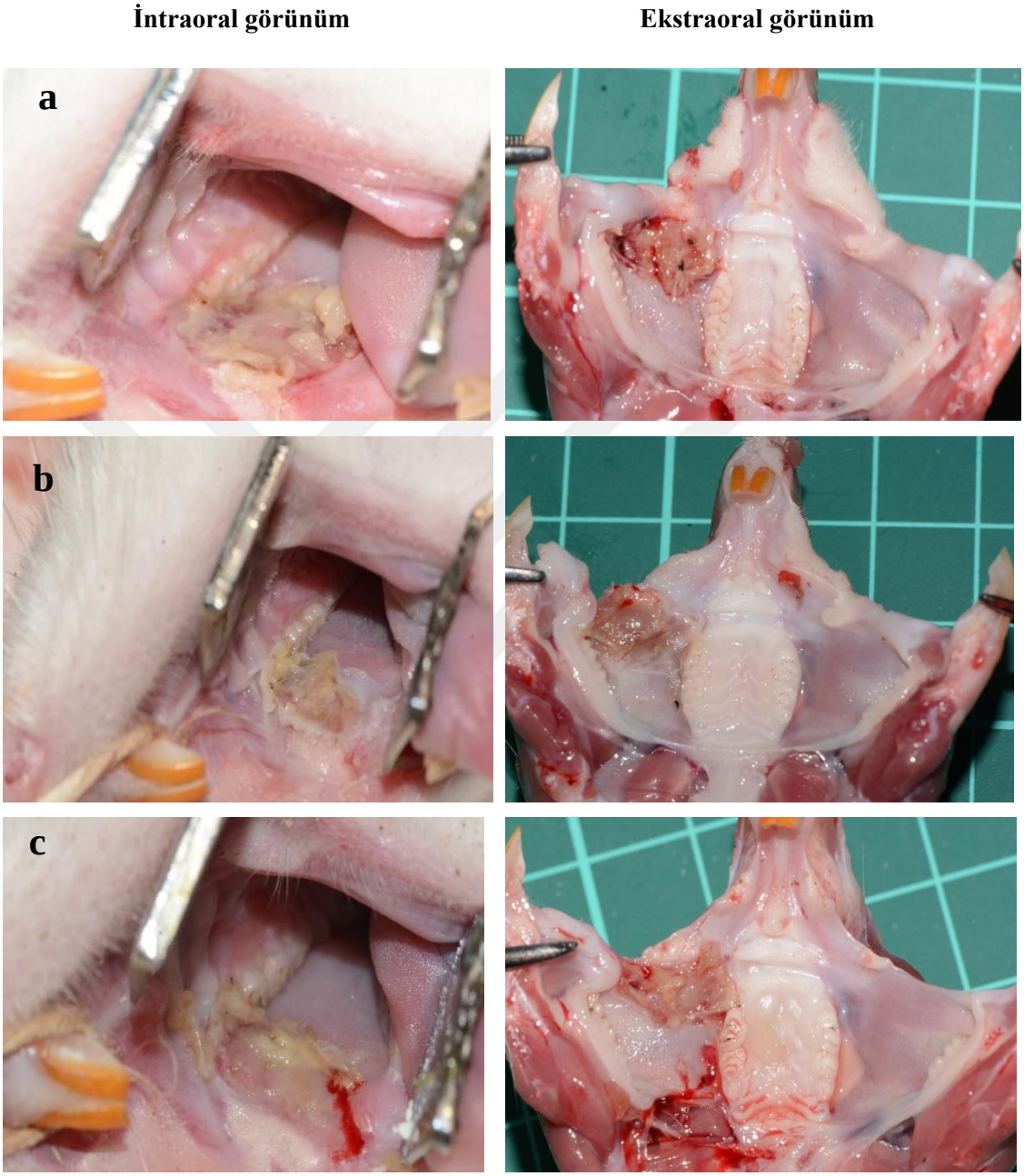
4.5.2. Deney Hayvanlarına Ait Ağız İçi Fotoğraflar

Deney prosedürü sonrası tüm gruplar 1.günde ağız içinde aftöz ülser oluşumu bakımından kontrol edildi. Kontrol, boş jel ve tüm deney gruplarında 1.günde aktif şekilde yara modelinin oluştuğu gözlendi (Şekil 4.17).



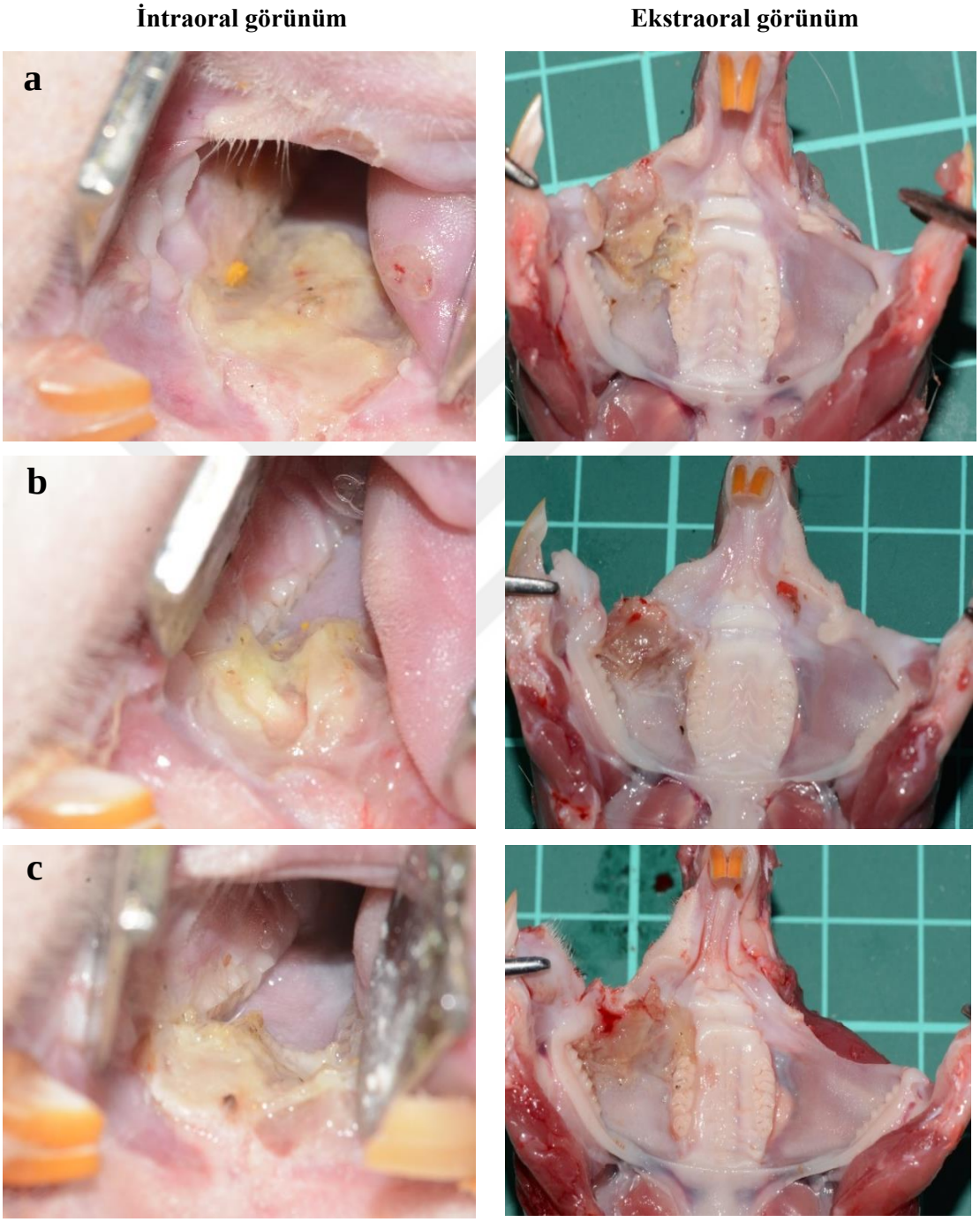
Şekil 4.17: Tüm gruplarda yara modelinin 1. gündeki ağız içi görünümü

4.5.2.1. Kontrol grubu: Kontrol grubuna ait yara modelinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü Şekil 4.18' de verilmiştir.



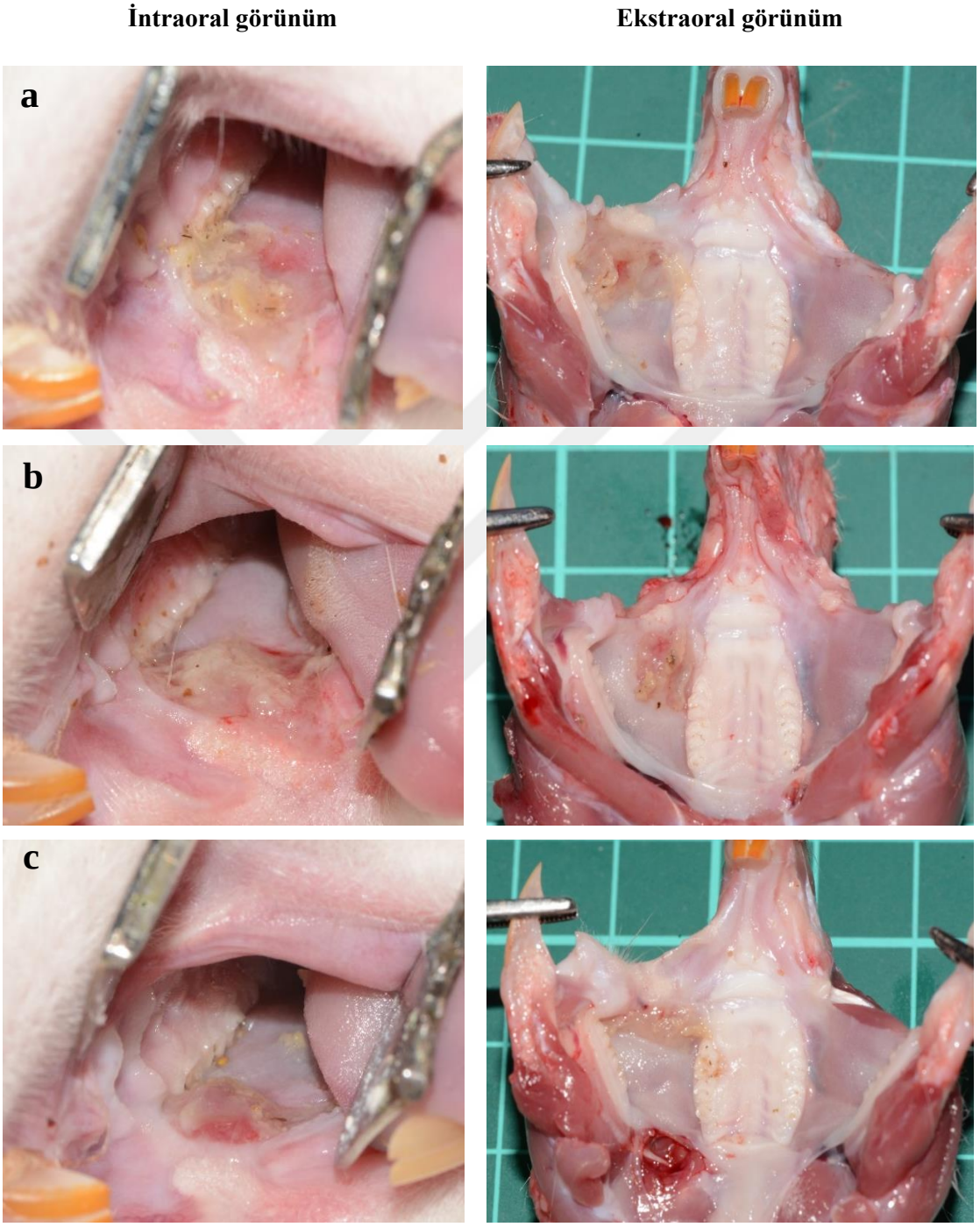
Şekil 4.18: Kontrol grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü (a: 3. gün; b: 6. gün, c: 9. gün)

4.5.2.2. Boş jel grubu: Boş jel grubuna ait yara modelinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü Şekil 4.19' de verilmiştir.



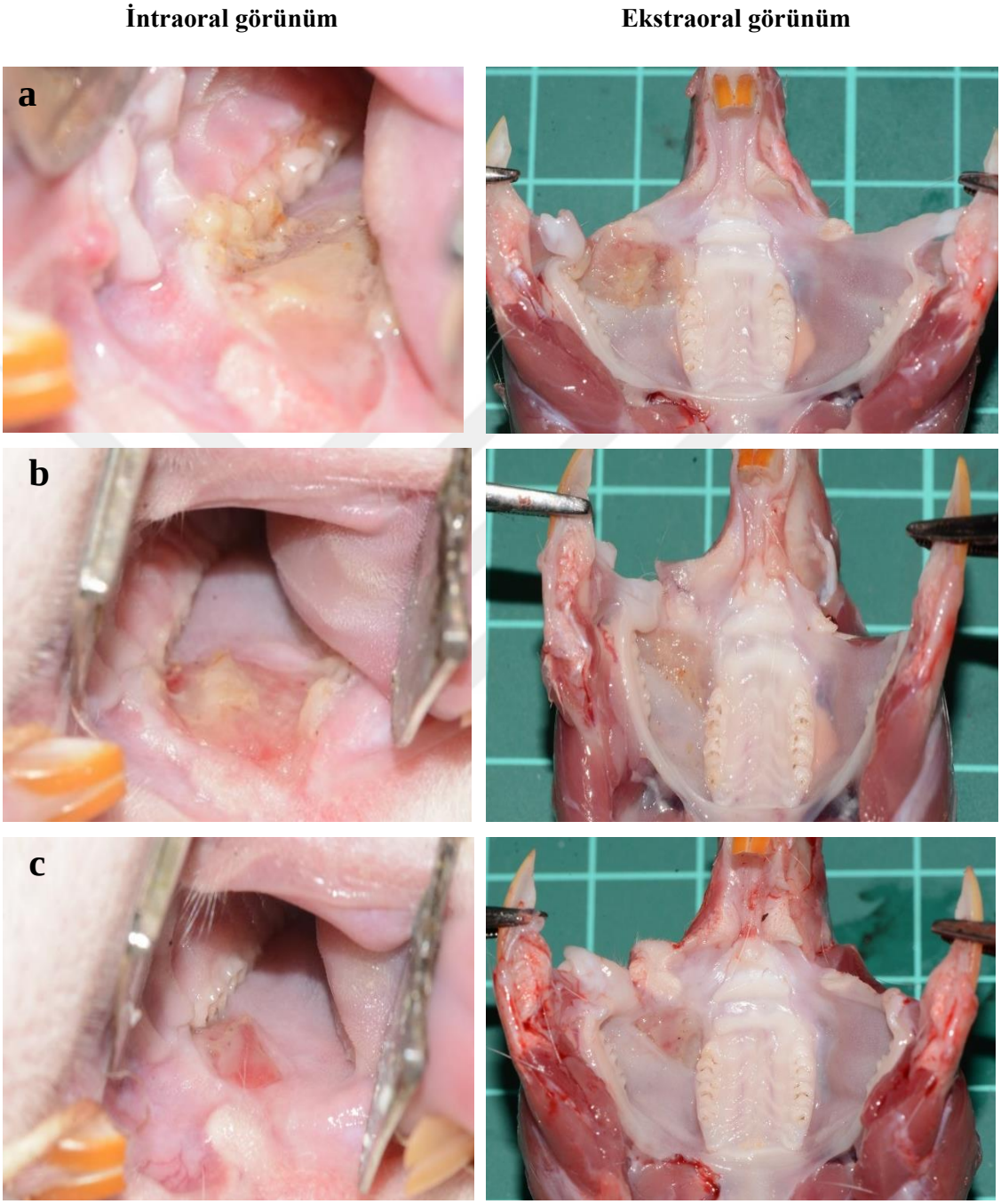
Şekil 4.19: Boş jel grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü (a: 3. gün; b: 6. gün, c: 9. gün)

4.5.2.3. Meyve ekstresi grubu: Meyve ekstresi grubuna ait yara modelinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü Şekil 4.20' da verilmiştir.



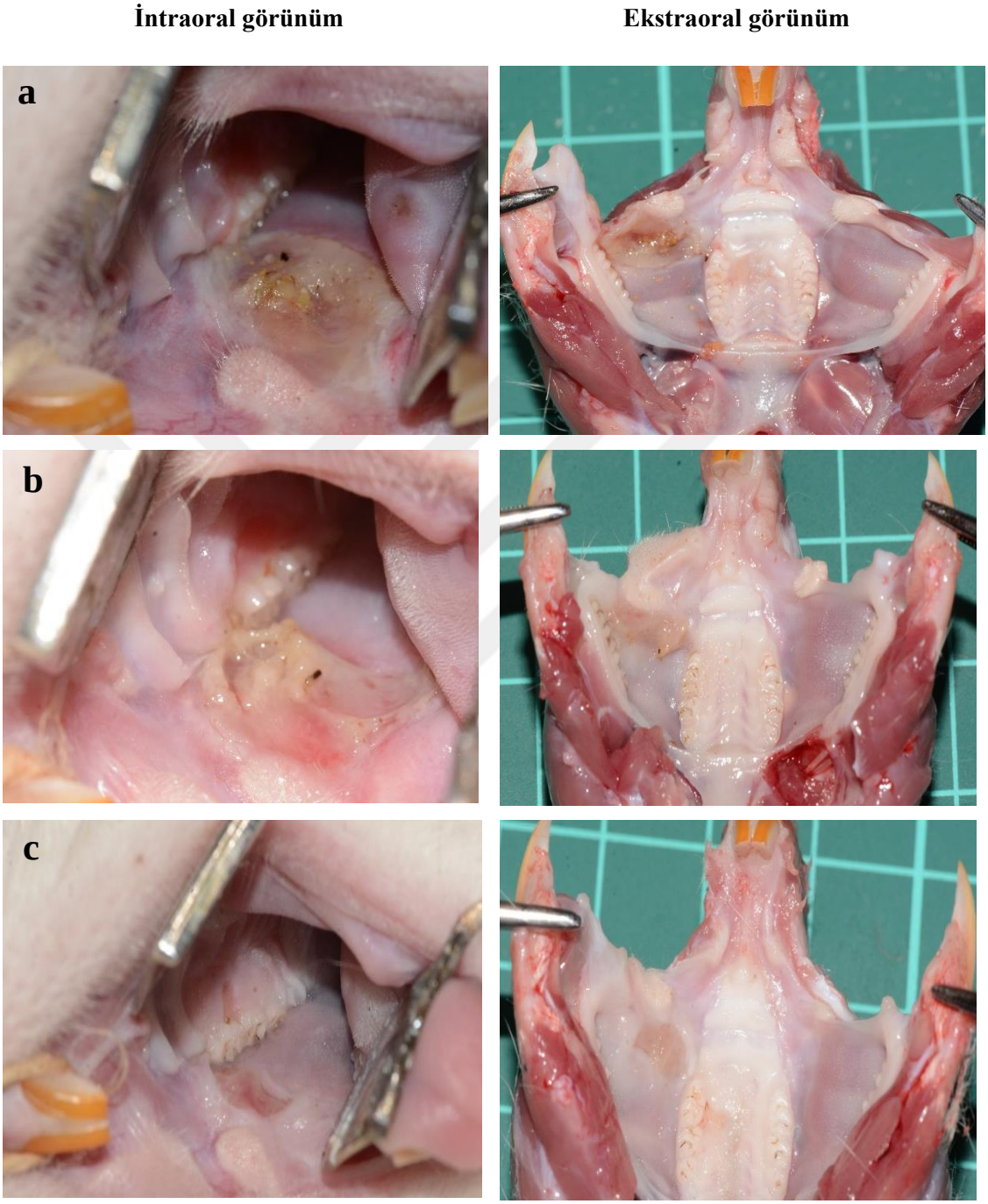
Şekil 4.20: Meyve ekstresi grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü (a: 3. gün; b: 6. gün, c: 9. gün)

4.5.2.4. Yaprak ekstresi grubu: Yaprak ekstresi grubuna ait yara modelinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü Şekil 4.21' de verilmiştir.



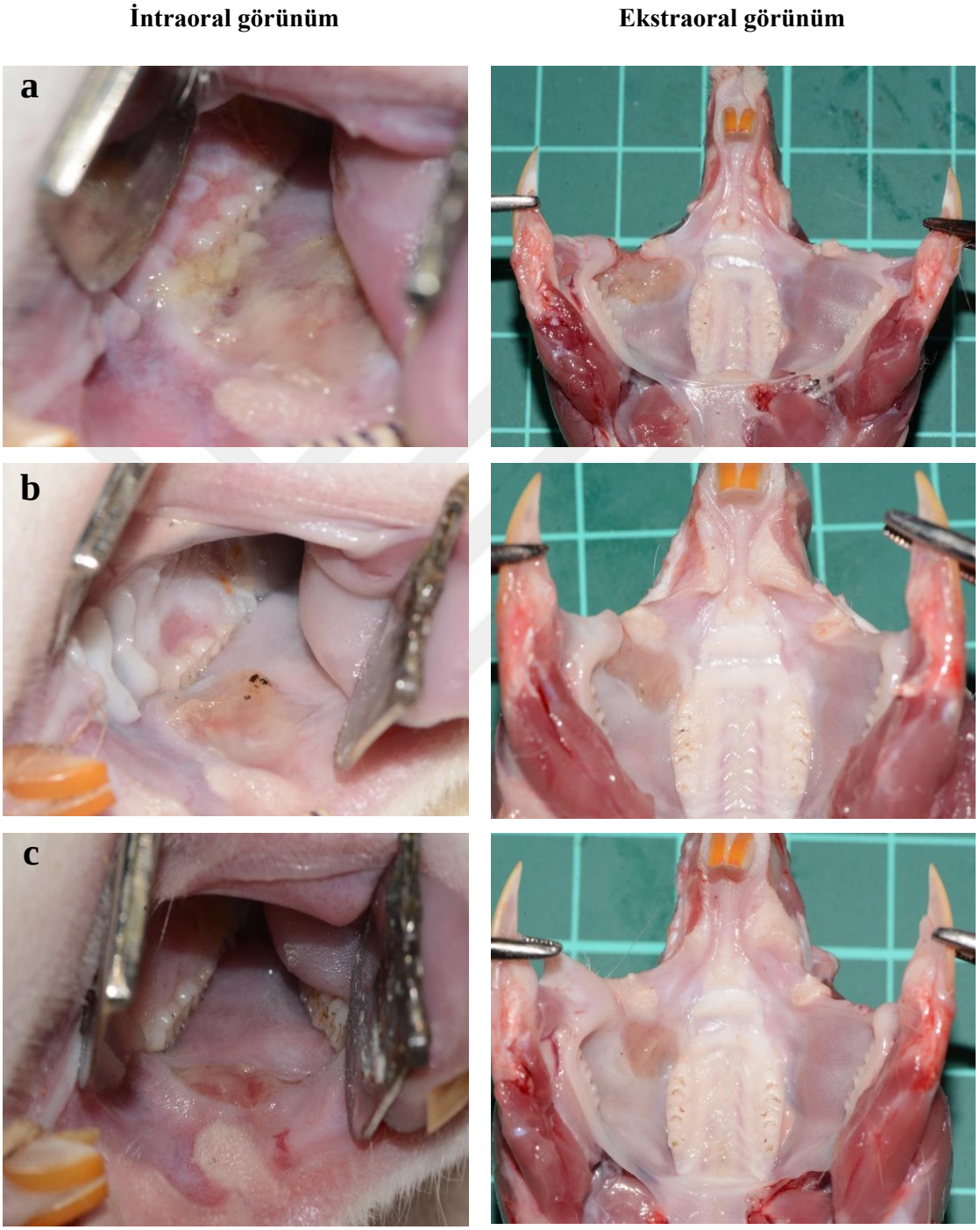
Şekil 4.21: Yaprak ekstresi grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü (a: 3. gün; b: 6. gün, c: 9. gün)

4.5.2.5. Meyve nanopartikül grubu: MNP grubuna ait yara modelinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü Şekil 4.22' de verilmiştir.



Şekil 4.22: Meyve nanopartikül grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü (a: 3. gün; b: 6. gün, c: 9. gün)

4.5.2.6. Yaprak nanopartikül grubu: YNP grubuna ait yara modelinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü Şekil 4.23' da verilmiştir.



Şekil 4.23: Yaprak nanopartikül grubundaki yara yerinin sakrifikasyon günlerine ait intraoral ve ekstraoral görünümü (a: 3. gün; b: 6. gün, c: 9. gün)

4.5.3. Serum ve Doku Örneklerinin Biyokimyasal Analiz Bulguları

4.5.3.1. Tümör nekroz faktör-α: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen ortalama TNF- α değerleri ve karşılaştırmaları Tablo 4.11 ve Şekil 4.24'de verilmiştir.

3. günde tedavi uygulanan M, Y, MNP ve YNP gruplarının serum örneklerinde TNF- α seviyeleri K ve B gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi (tüm gruplar için p<0,0001). TNF- α seviyeleri, 3. günde MNP grubunda M grubuna (p<0,0001) göre; YNP grubunda ise Y grubuna (p=0,0445) göre anlamlı derecede daha düşük bulundu. K ve B grupları ile MNP ve YNP grupları kendi arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken; Y grubu değerleri M grubuna göre (p=0,0005) anlamlı derecede düşük tespit edildi. 3. gün doku örnekleri değerlendirildiğinde ise K ve B grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. M, Y, MNP ve YNP gruplarının doku örneklerinde TNF- α seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0035; 0,0130; 0,0376; 0,0004) ve B gruplarına (p değerleri sırasıyla <0,0001; 0,0003; 0,001; <0,0001) kıyasla anlamlı derecede düşük tespit edildi. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. 3 gün tedavi uygulanan deneklerde en düşük TNF- α seviyesi serum ve doku örneklerinde YNP grubunda tespit edildi.

6. günde tüm grupların serum ve doku TNF- α seviyelerinin 3. güne kıyasla düştüğü görülmektedir. 6 günlük tedavi sonrasında deneklerde en düşük TNF- α seviyesi serum örneklerinde YNP grubunda; doku örneklerinde ise Y grubunda tespit edildi. Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. Y, MNP ve YNP gruplarının serum örneklerinde TNF- α seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0005; <0,0001; <0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0110; <0,0001; <0,0001) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. M grubunun serum örneklerinde ise TNF- α seviyeleri, K grubuna göre (p=0,0230) anlamlı derecede düşükken B grubu ile istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Serum örneklerinde gruplar kendi aralarında kıyaslandığında ise MNP grubu M grubuna (p=0,0001) göre; YNP grubu Y grubuna (p=0,0003) göre anlamlı derecede düşük bulunurken; Y ve M grubu ile MNP ve YNP grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Doku örnekleri incelendiğinde de TNF-α M, Y, MNP, YNP gruplarında K (p değerleri sırasıyla 0,0003; <0,0001; 0,0001; <0,0001) ve B (p değerleri

sırasıyla 0,0340; 0,0019; 0,0129; 0,0093) gruplarına göre anlamlı derecede düşük tespit edildi. Doku örneklerinde M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olamadığı tespit edildi.

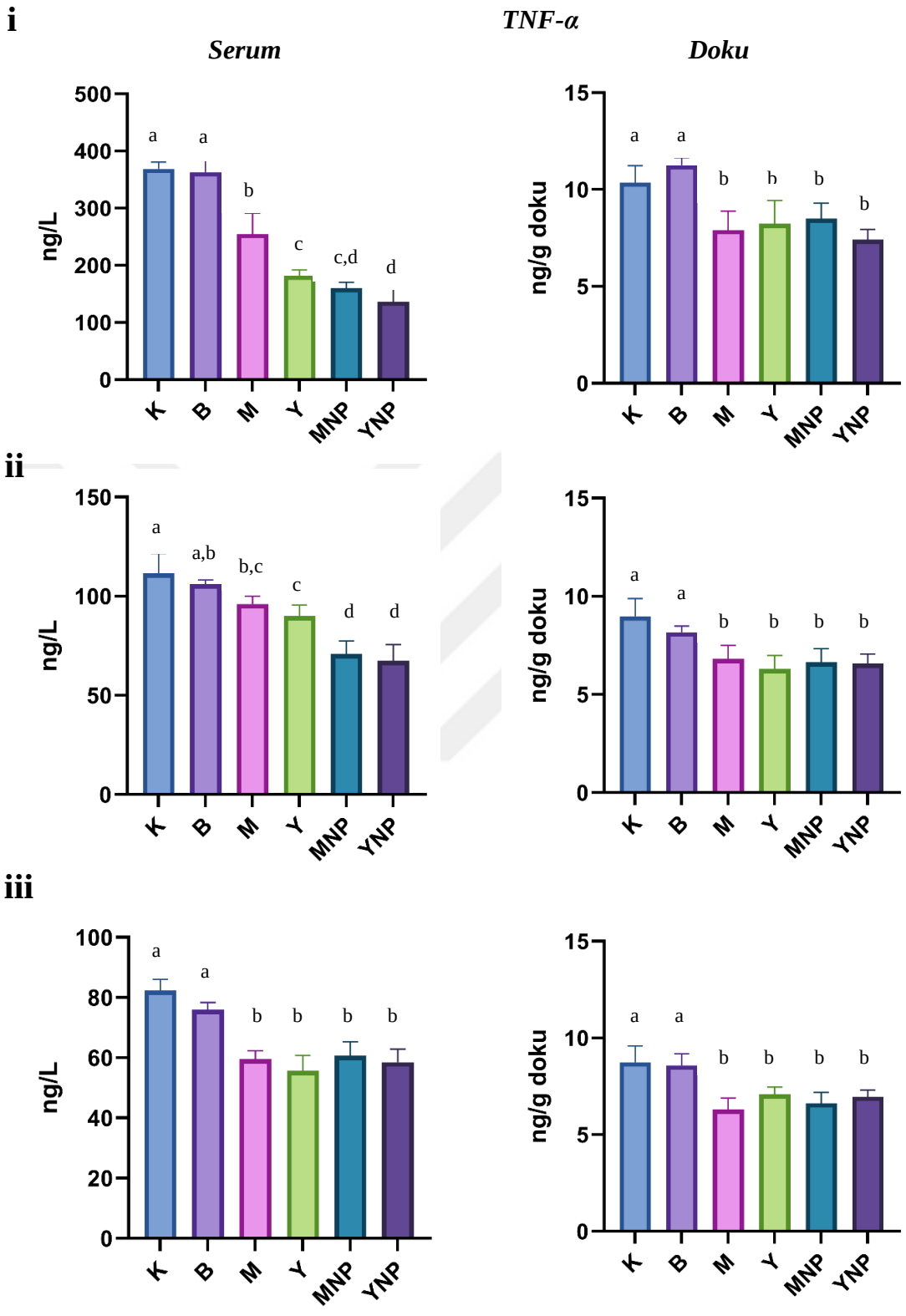
9. günde tüm grupların serum TNF- α seviyelerinin 6. güne kıyasla düştüğü görülmektedir. 9 günlük tedavi sonrasında deneklerde en düşük TNF- α seviyesi serum örneklerinde Y grubunda; doku örneklerinde ise M grubunda tespit edildi. Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. Serum örneklerinde TNF- α seviyelerinin M, Y, MNP ve YNP gruplarında K ve B gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (tüm gruplar için $p<0,0001$). M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında kıyasladığında ise anlamlı bir farklılık bulunmadığı görüldü. 9. gün doku örnekleri incelendiğinde TNF- α seviyelerinin M, Y, MNP ve YNP gruplarında K (p değerleri sırasıyla <0,0001; 0,0016; <0,0001; 0,0007) ve B gruplarına (p değerleri sırasıyla <0,0001; 0,0045; 0,0002; 0,0020) göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. 9. gün doku örneklerinde de M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında kıyasladığında anlamlı bir farklılık bulunmadığı görüldü.

Tablo 4.11: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen tümör nekroz faktör-α düzeyleri

		K	B	M	Y	MNP	YNP
Serum (ng/L)	**Gün**	**X±SD**	**X±SD**	**X±SD**	**X±SD**	**X±SD**	**X±SD**
	3. gün	368,9±11,82 [a]	363,2±26,18 [a]	254,9±36,61 [b]	181,9±10,16 [c]	160,1±10,23 [c, d]	136,5±25,6 [d]
	6. gün	111,6±10 [a]	106,1±2,06 [a, b]	96±3,92 [b, c]	90,05±5,56 [c]	70,78±6,69 [d]	67,3±8,23 [d]
	9. gün	82,4±3,62 [a]	75,92±2,48 [a]	59,57±2,73 [b]	55,74±5,07 [b]	60,69±4,60 [b]	58,55±4,28 [b]
Doku (ng/g)	***3. gün***	10,36±0,87 [a]	11,26±0,38 [a]	7,90±0,98 [b]	8,22±1,20 [b]	8,50±0,79 [b]	7,40±0,54 [b]
	6. gün	8,98±0,90 [a]	8,16±0,32 [a]	6,80±0,69 [b]	6,30±0,68 [b]	6,63±0,70 [b]	6,57±0,49 [b]
	9. gün	8,74±0,84 [a]	8,58±0,60 [a]	6,29±0,60 [b]	7,08±0,37 [b]	6,62±0,56 [b]	6,95±0,35 [b]

K: Kontrol grubu; **B:** Boş jel grubu; **M:** Meyve grubu; **Y:** Yaprak grubu; **MNP:** Meyve nanopartikül grubu; **YNP:** Yaprak nanopartikül grubu

[a, b, c, d] Aynı satırda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$). Veriler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir.



Şekil 4.24: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen tümör nekroz faktör-α seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı (i: 3. gün; ii: 6. gün, iii: 9. gün) [a, b, c, d] Sütunlarda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

4.5.3.2. İnterlökin-1β: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen ortalama IL-β değerleri ve karşılaştırmaları Tablo 4.12 ile Şekil 4.25'de verilmiştir. Tedavi edici ajan içeren jeller ile tedavi uygulanan M, Y, MNP, YNP gruplarında IL-1β seviyelerinin serum fizyolojik ve jel bazının uygulandığı K ve B gruplarına göre 3., 6., ve 9. günlerde hem serum hem de doku örneklerinde daha düşük olduğu bulunmuştur.

3 günlük tedavi sonrasında en düşük IL-1β seviyeleri serum örneklerinde MNP; doku örneklerinde ise M grubunda tespit edildi. 3. günde serum ve doku örneklerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu ($p<0,0001$). Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarının serum örneklerinde IL-1β seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0008; 0,0009; <0,0001; 0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0004; 0,0005; <0,0001; <0,0001) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi. 3. günde M, Y, MNP, YNP gruplarının serum örneklerinde IL-β seviyeleri, kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı görüldü. 3. gün doku örnekleri değerlendirildiğinde ise M, Y, MNP ve YNP gruplarının doku örneklerinde IL-1β seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0001; 0,0004; 0,0004; 0,0005) ve B gruplarına (p değerleri sırasıyla 0,0019; 0,0065; 0,0057; 0,0074) kıyasla anlamlı derecede düşük tespit edildi. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

6. günde tüm grupların serum örneklerinde IL-1β seviyelerinin 3. güne kıyasla düştüğü görülmektedir. 6 günlük tedavi sonrasında deneklerde en düşük IL-1β seviyesi serum örneklerinde MNP grubunda; doku örneklerinde ise M grubunda tespit edildi. 6. günde serum ve doku IL-1β seviyelerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarının serum örneklerinde IL-1β seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0001; <0,0001; <0,0001; <0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0129; 0,0041; 0,0012; 0,0015) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. 6. günde M, Y, MNP, YNP gruplarının serum örneklerinde IL-β seviyeleri, kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı görüldü. 6. gün doku örnekleri incelendiğinde de IL-1β; M, Y, MNP, YNP gruplarında K (p değerleri sırasıyla <0,0001; 0,0015; 0,0075; 0,0479) ve B (p değerleri sırasıyla <0,0001; <0,0001; 0,0002;

0,0018) gruplarına göre anlamlı derecede düşük tespit edildi. Doku örneklerinde M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olamadığı tespit edildi.

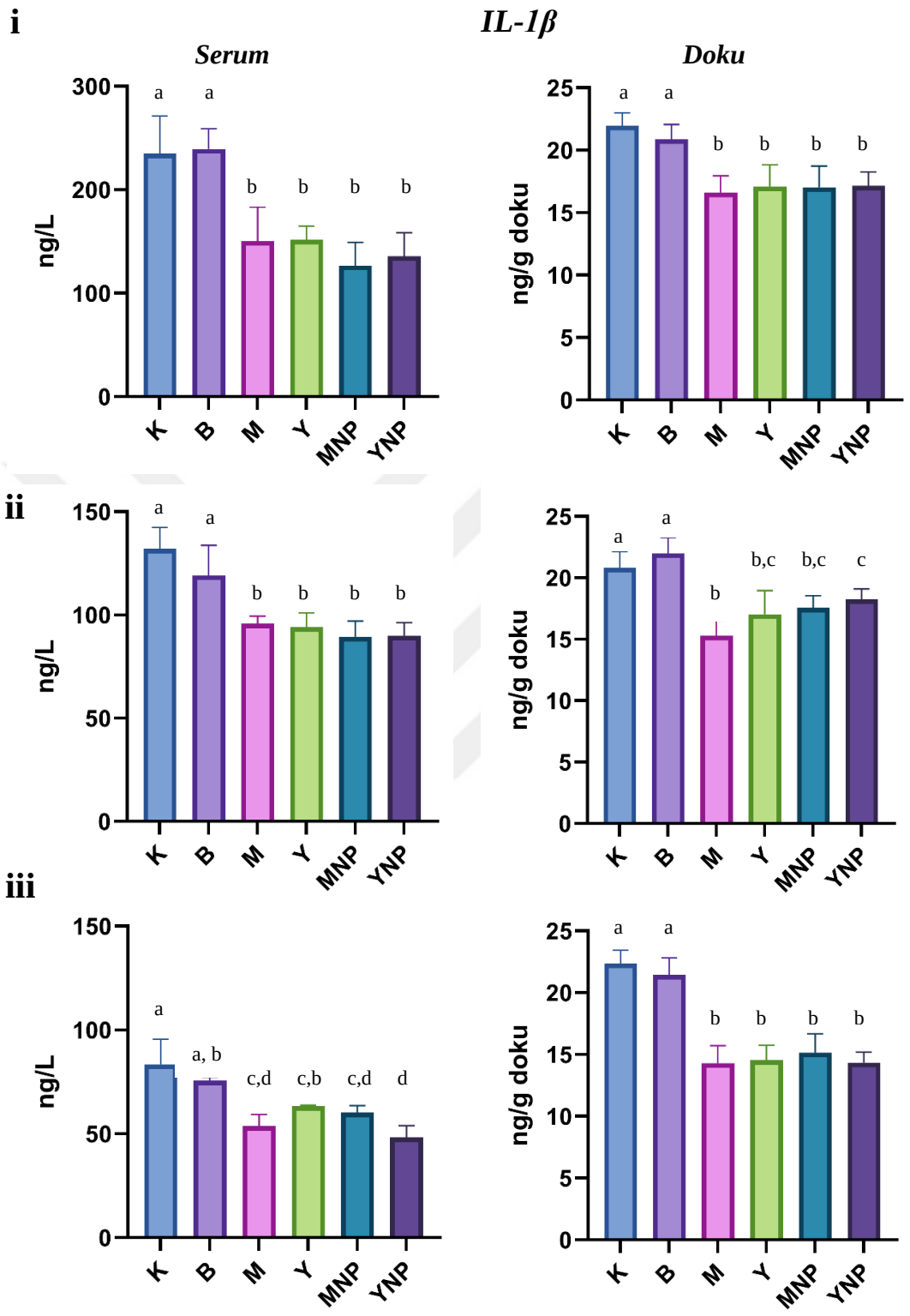
9. günde tüm grupların serum IL-1β seviyelerinin 6. güne kıyasla düştüğü görülmektedir. 9 günlük tedavi sonrasında deneklerde en düşük IL-1β seviyesi serum örneklerinde YNP grubunda; doku örneklerinde ise M grubunda tespit edildi. 9. günde tüm gruplar kıyaslandığında serum ve doku IL-1β seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). 9. gün serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. Serum örneklerinde IL-1β seviyelerinin M, Y, MNP ve YNP gruplarında K grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (p değerleri sırasıyla <0,0001; 0,0018; 0,0004; <0,0001). Serum örneklerinde M, MNP ve YNP grupları B grubuna (p değerleri sırasıyla 0,0007; 0,0208; <0,0001) göre anlamlı derecede düşükken Y grubu ile B grubu arasında anlamlı fark olmadığı görüldü. M, Y, MNP ve YNP kendi aralarında kıyasladığında ise sadece Y ve YNP grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p=0,0361$). 9. gün doku örnekleri incelendiğinde IL-1β seviyelerinin M, Y, MNP ve YNP gruplarında K ve B gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (tüm gruplar için $p<0,0001$). 9. gün doku örneklerinde de M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında kıyasladığında anlamlı bir farklılık bulunmadığı görüldü.

Tablo 4.12: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-1β düzeyleri

		K	B	M	Y	MNP	YNP
Serum (ng/L)	**Gün**	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***
	3.gün	234,9±36,47 ^{a}	239,3±19,57^{a}	150,4±33,03^{b}	151,5±13,26^{b}	126,5±22,68 ^{b}	135,6±22,75^{b}
	6. gün	132,1±10,37 ^{a}	119,1±14,59^{a}	95,83±3,63 ^{b}	94,19±6,69 ^{b}	89,44±7,63 ^{b}	89,93±6,43 ^{b}
	9. gün	83,43±12,15 ^{a}	75,54±1,79^{a,b}	53,63±5,63^{c,d}	63,28±0,53^{c,b}	60,14±3,44 ^{c,d}	48,22±5,69 ^{d}
Doku (ng/g)	***3. gün***	31,96±1,02 ^{a}	20,89±1,17 ^{a}	16,61±1,34 ^{b}	17,10±1,75 ^{b}	17,04±1,70 ^{b}	17,15±1,12 ^{b}
	6. gün	20,83±1,32 ^{a}	21,99±1,28 ^{a}	15,30±1,24 ^{b}	17,03±1,93 ^{b,c}	17,58±0,98 ^{b,c}	18,25±0,83 ^{c}
	9. gün	22,37±1,06 ^{a}	21,44±1,36 ^{a}	14,31±1,40 ^{b}	14,55±1,19 ^{b}	15,16±1,53 ^{b}	14,34±0,86 ^{b}

K: Kontrol grubu; **B:** Boş jel grubu; **M:** Meyve grubu; **Y:** Yaprak grubu; **MNP:** Meyve nanopartikül grubu; **YNP:** Yaprak nanopartikül grubu

$^{a, b, c, d}$ Aynı satırda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$). Veriler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir.



Şekil 4.25: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-1β seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı (i: 3. gün; ii: 6. gün, iii: 9. gün) [a, b, c, d] Sütunlarda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

4.5.3.3. İnterlökin-2: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen ortalama IL-2 değerleri ve karşılaştırmaları Tablo 4.13 ile Şekil 4.26'da verilmiştir. Tedavi edici ajan içeren jeller ile tedavi uygulanan M, Y, MNP, YNP gruplarında IL-2 seviyelerinin serum fizyolojik ve jel bazının uygulandığı K ve B gruplarına göre 3.,6., ve 9. günlerde hem serum hem de doku örneklerinde daha düşük olduğu tespit edildi.

3 günlük tedavi sonrasında en düşük IL-2 seviyeleri serum örneklerinde MNP; doku örneklerinde ise M grubunda tespit edildi. 3. günde serum ($p<0,0001$) ve doku ($p=0,0015$) örneklerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu. Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarının 3. gün serum örneklerinde IL-2 seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0018; 0,0037; <0,0001; <0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0029; 0,0061; <0,0001; <0,0001) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise 3. gün IL-2 serum seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

6 günlük tedavi sonrasında en düşük IL-2 seviyeleri hem serum hem de doku örneklerinde YNP grubunda tespit edildi. 6. günde serum ($p<0,0001$) ve doku ($p=0,0003$) örneklerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu. Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarının 6. gün serum örneklerinde IL-2 seviyeleri K grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (p değerleri sırasıyla 0,0214; 0,0013; <0,0001; <0,0001). M ve B grubu arasında anlamlı farklılık bulunmazken; Y, MNP ve YNP gruplarında IL-2 seviyeleri B grubuna göre anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir (p değerleri sırasıyla 0,0381; 0,0014; 0,0004). M, Y, MNP, YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında 6. gün serum örneklerinde anlamlı farklılık olmadığı görüldü. 6. gün doku örneklerinde M, Y, MNP ve YNP gruplarının IL-2 seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0184; 0,0161; 0,0083; 0,0071) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0218; 0,0190; 0,0099; 0,0085) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında 6. gün doku örneklerinde anlamlı farklılık olmadığı görüldü.

9. gün gruplarında 6. gün gruplarına kıyasla tüm gruplarda serum IL-2 seviyelerinin düştüğü görülmektedir. 9 günlük tedavi sonrasında en düşük IL-2 seviyeleri

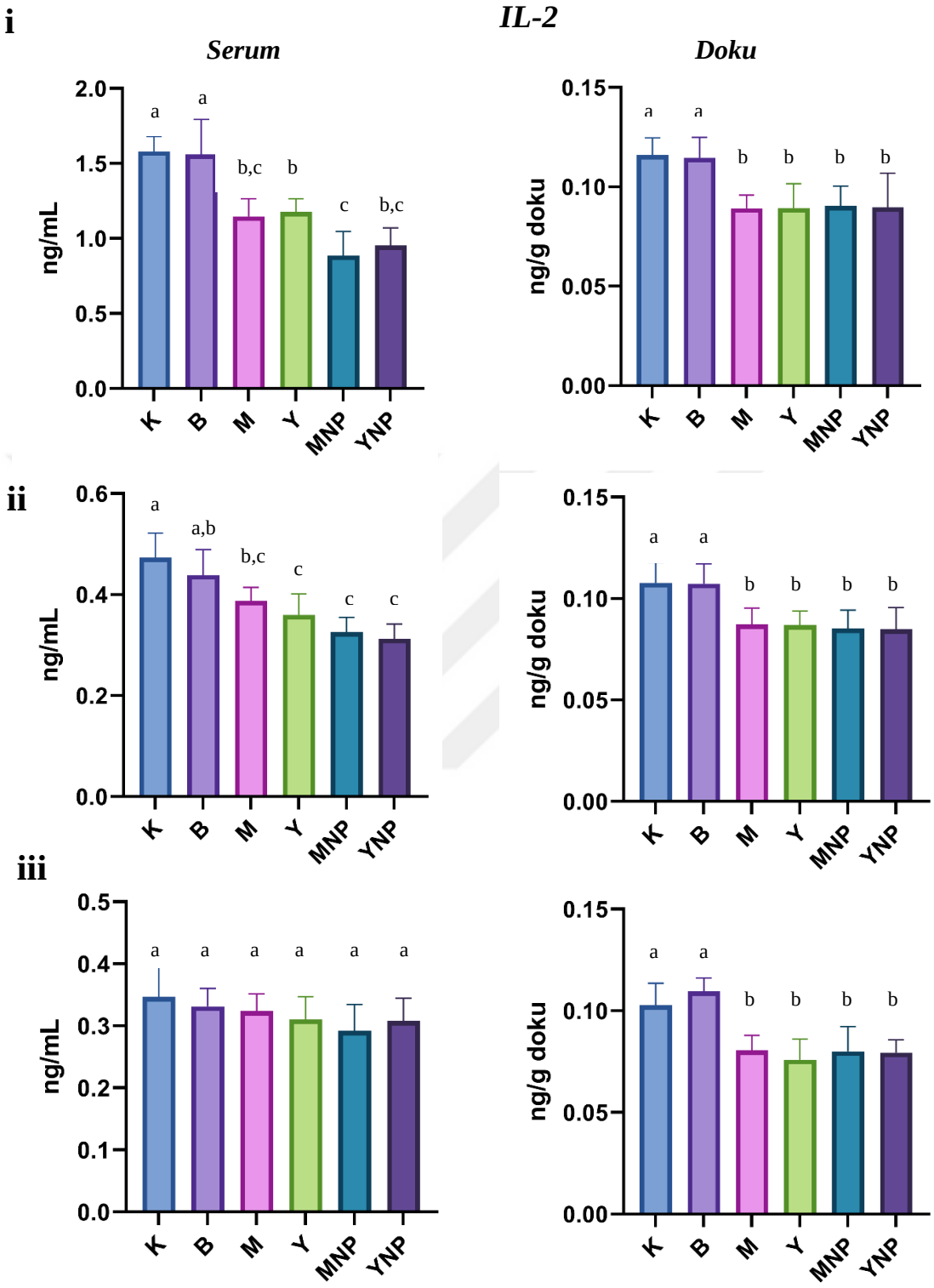
serum örneklerinde MNP, doku örneklerinde ise Y grubunda tespit edildi. 9. günde IL-2 serum örneklerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmazken doku örneklerinde gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$). 9. gün serum örneklerinde tüm gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi. 9. gün doku örneklerinde ise M, Y, MNP ve YNP gruplarında IL-2 seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0093; 0,0013; 0,0075; 0,0056) ve B (0,0005; <0,0001; 0,0004; 0,0085) gruplarına göre anlamlı derecede düşüktü. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında 9. gün doku örneklerinde anlamlı farklılık olmadığı görüldü.

Tablo 4.13: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-2 düzeyleri

		K	B	M	Y	MNP	YNP
Serum (ng/mL)	**Gün**	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***
	3. gün	1,581±0,098[a]	1,561±0,233 [a]	1,147±0,116 [b,c]	1,177±0,087 [b]	0,8866±0,161 [c]	0,952±0,119 [b,c]
	6. gün	0,473±0,048 [a]	0,438±0,050 [a,b]	0,388±0,026 [b,c]	0,359±0,041 [c]	0,325±0,029 [c]	0,312±0,029 [c]
	9. gün	0,347±0,047 [a]	0,331±0,029 [a]	0,323±0,027 [a]	0,310±0,036 [a]	0,292±0,042 [a]	0,308±0,036 [a]
Doku (ng/g)	***3. gün***	0,116±0,008 [a]	0,115±0,010 [a]	0,089±0,006 [b]	0,089±0,012 [b]	0,090±0,009 [b]	0,089±0,017 [b]
	6. gün	0,108±0,009 [a]	0,107±0,009 [a]	0,087±0,008 [b]	0,087±0,006 [b]	0,085±0,009 [b]	0,085±0,011 [b]
	9. gün	0,103±0,010 [a]	0,109±0,006 [a]	0,081±0,007 [b]	0,075±0,010 [b]	0,080±0,012 [b]	0,0793±0,006 [b]

K: Kontrol grubu; **B:** Boş jel grubu; **M:** Meyve grubu; **Y:** Yaprak grubu; **MNP:** Meyve nanopartikül grubu; **YNP:** Yaprak nanopartikül grubu

[a, b, c] Aynı satırda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$). Veriler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir.



Şekil 4.26: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-2 seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı (i: 3. gün; ii: 6. gün, iii: 9. gün) [a, b, c,] Sütunlarda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

4.5.3.4. İnterlökin-6: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen ortalama IL-6 değerleri ve karşılaştırmaları Tablo 4.14 ile Şekil 4.27'de verilmiştir. Tedavi edici ajan içeren jeller ile tedavi uygulanan M, Y, MNP, YNP gruplarında IL-6 seviyelerinin serum fizyolojik ve jel bazının uygulandığı K ve B gruplarına göre 3.,6., ve 9. günlerde hem serum hem de doku örneklerinde daha düşük olduğu tespit edildi.

3. günde en düşük IL-6 seviyeleri hem serum hem de doku örneklerinde MNP grubunda tespit edildi. 3. günde serum ($p = 0,0118$) ve doku ($p<0,0001$) örneklerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu. Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarının 3. gün serum örneklerinde IL-6 seviyeleri ile K grubu arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi. M ve MNP gruplarının 3. gün serum örneklerinde IL-6 seviyeleri B grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşük tespit edildi (p değerleri sırasıyla 0,0176; 0,0135). Y ve YNP grupları ile B grubu arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi. M, Y, MNP, YNP gruplarının 3. gün serum IL-6 değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık bulunamadı. 3. gün doku örneklerinde M, Y, MNP, YNP gruplarının IL-6 seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0159; 0,0022; 0,0014; 0,0011) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0024; 0,0003; 0,0002; 0,0002) grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktü. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise 3. gün doku örneklerinde anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

6 günlük tedavi sonrasında en düşük IL-6 seviyeleri serum örneklerinde YNP doku örneklerinde Y grubunda tespit edildi. 6. günde serum örneklerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken; doku örneklerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu ($p<0,0001$). Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. 6. Gün serum örneklerinde M, Y, MNP, YNP gruplarının IL-6 seviyeleri her ne kadar kontrol grubuna göre düşük bulunsa da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. 6. Gün doku örneklerinde ise M, Y, MNP, YNP gruplarının IL-6 seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0001; 0,0001; 0,0006; 0,0026) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0010; 0,0009; 0,0047; 0,0185) grubuna göre anlamlı derecede düşüktü. 6. gün doku örneklerinde M, Y, MNP, YNP grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

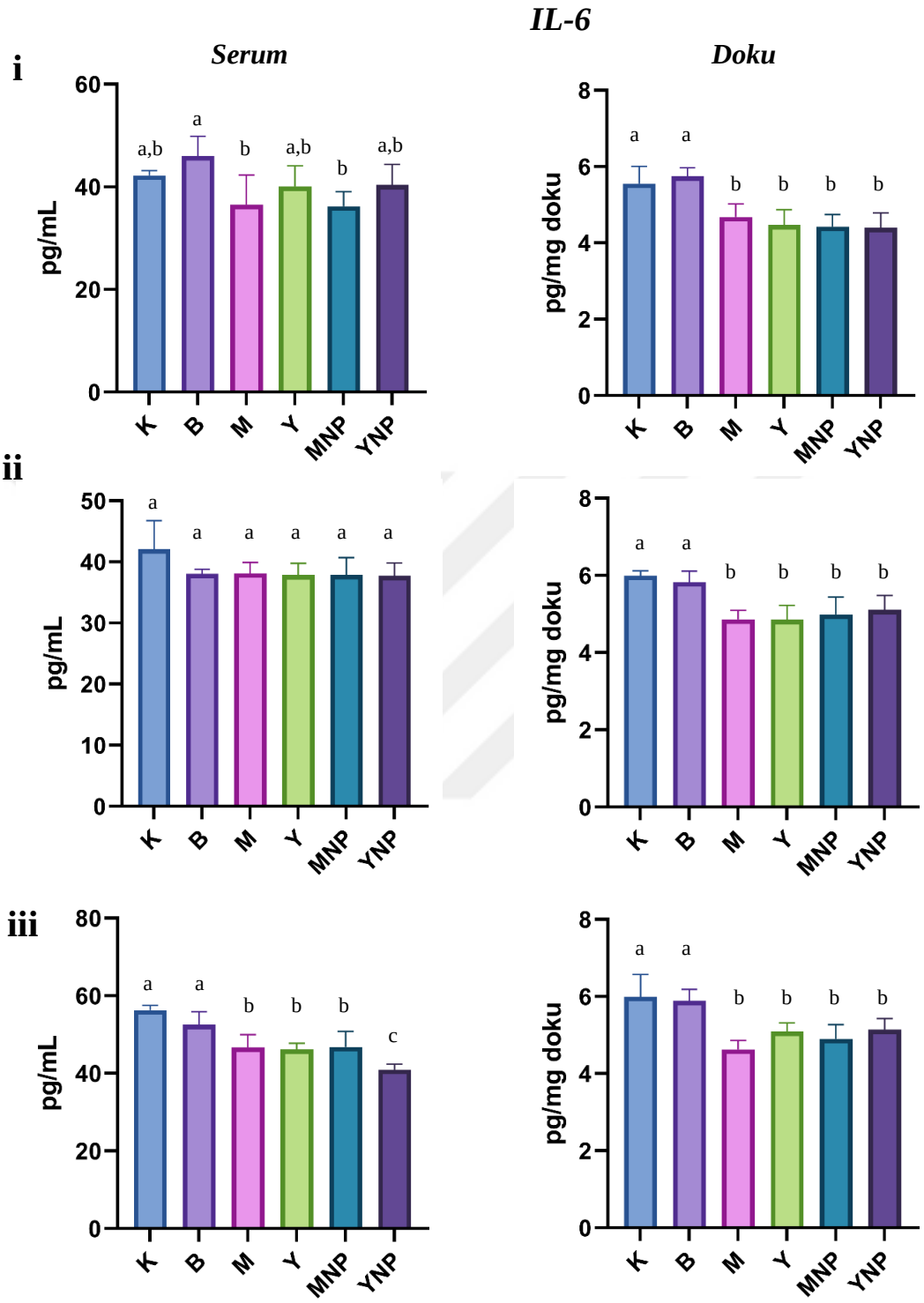
9. günde en düşük düşük IL-6 seviyeleri serum örneklerinde YNP, doku örneklerinde ise M grubunda tespit edildi. Serum ve doku örneklerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu ($p<0,0001$). Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP guruplarının 9. gün serum örneklerinde IL-6 seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0001; <0,0001; 0,0001; <0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0219; 0,0120; 0,0257; <0,0001) grubuna göre anlamlı derecede düşüktü. Serum örneklerinde M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise sadece YNP grubu diğer tüm tedavi gruplarına göre anlamlı derecede daha düşük tespit edildi (p değerleri sırasıyla 0,0274; 0,0487; 0,0234). Doku örnekleri incelendiğinde M, Y, MNP ve YNP guruplarında IL-6 seviyeleri K (p değerleri sırasıyla <0,0001; 0,0052; 0,0006; 0,0084) ve B (p değerleri sırasıyla <0,0001; 0,0168;0,0019; 0,0263) grubuna göre anlamlı derecede daha düşük tespit edildi. 9. gün doku örneklerinde M, Y, MNP, YNP grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

Tablo 4.14: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-6 düzeyleri

		K	B	M	Y	MNP	YNP
Serum (pg/mL)	**Gün**	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***
	3. gün	42,25±0,93[a,b]	46,01±3,79 [a]	36,53±5,76 [b]	40,08±4,06 [a,b]	36,22±2,84 [b]	40,39±3,98 [a,b]
	6. gün	42,11±4,63 [a]	38,06±0,73 [a]	38,14±1,75 [a]	37,83±1,94 [a]	37,91±2,76 [a]	37,72±2,09 [a]
	9. gün	56,28±1,18 [a]	52,60±3,30 [a]	46,70±3,27 [b]	46,26±1,52 [b]	46,82±4,04 [b]	40,97±1,38 [c]
Doku (pg/mg)	***3. gün***	5,556±0,445[a]	5,750±0,221[a]	4,682±0,344 [b]	4,476±0,395 [b]	4,433±0,313 [b]	4,404±0,383 [b]
	6. gün	5,995±0,125[a]	5,829±0,279[a]	4,862±0,236 [b]	4,858±0,368 [b]	4,993±0,442 [b]	5,109±0,374 [b]
	9. gün	5,999±0,571[a]	5,890±0,291[a]	4,627±0,236 [b]	5,100±0,219 [b]	4,901±0,366 [b]	5,143±0,288 [b]

K: Kontrol grubu; **B:** Boş jel grubu; **M:** Meyve grubu; **Y:** Yaprak grubu; **MNP:** Meyve nanopartikül grubu; **YNP:** Yaprak nanopartikül grubu

[a,b,c] Aynı satırda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$). Veriler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir.



Şekil 4.27: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-6 seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı (i: 3. gün; ii: 6. gün, iii: 9. gün) [a, b, c] Sütunlarda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

4.5.3.5. İnterlökin-8: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen ortalama IL-8 değerleri ve karşılaştırmaları Tablo 4.15 ile Şekil 4.28'de verilmiştir. Tedavi edici ajan içeren jeller ile tedavi uygulanan M, Y, MNP, YNP gruplarında IL-8 seviyelerinin serum fizyolojik ve jel bazının uygulandığı K ve B gruplarına göre 3.,6., ve 9. günlerde hem serum hem de doku örneklerinde daha düşük olduğu tespit edildi.

3. günde en düşük IL-8 seviyeleri hem serum hem de doku örneklerinde YNP grubunda tespit edildi. Her ne kadar M, Y, MNP ve YNP gruplarına ait serum örneklerinin ortalama IL-8 seviyeleri K ve B grubuna göre daha düşük bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. 3. gün doku örneklerinde ise tüm gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). M, Y, MNP, YNP gruplarında IL-8 seviyelerinin K (tüm gruplar için $p<0,0001$) ve B (p değeri sırasıyla 0,0055; <0,0001; <0,0001; <0,0001) gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. 3. gün doku örneklerinde M, Y, MNP, YNP grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise IL-8 seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

6. günde hem serum hem de doku örneklerinde tüm gruplarda IL-8 seviyelerinde 3. güne göre düşüş olduğu görüldü. 6. gün gruplarında en düşük IL-8 seviyeleri hem serum hem de doku örneklerinde YNP grubunda tespit edildi. 6. gün serum ve doku örneklerinde tüm gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı.6. gün serum örneklerinde M, Y, MNP ve YNP gruplarının IL-8 ortalamaları K (p değerleri sırasıyla 0,0024; 0,0005; 0,0006, 0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0028; 0,0006; 0,0007; 0,0002) grubuna göre anlamlı derecede düşüktü. 6. gün serum örneklerinde M, Y, MNP, YNP grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. 6. gün doku örneklerinde M, Y, MNP ve YNP gruplarının IL-8 ortalamaları K (p değerleri sırasıyla 0,0033; 0,0044; 0,0248, 0,0017) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0019; 0,0025; 0,0144; 0,0009) grubuna göre anlamlı derecede düşüktü. 6. gün doku örneklerinde M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

9. gün gruplarında en düşük IL-8 seviyeleri serum örneklerinde YNP doku örneklerinde ise MNP grubunda tespit edildi. Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarına ait

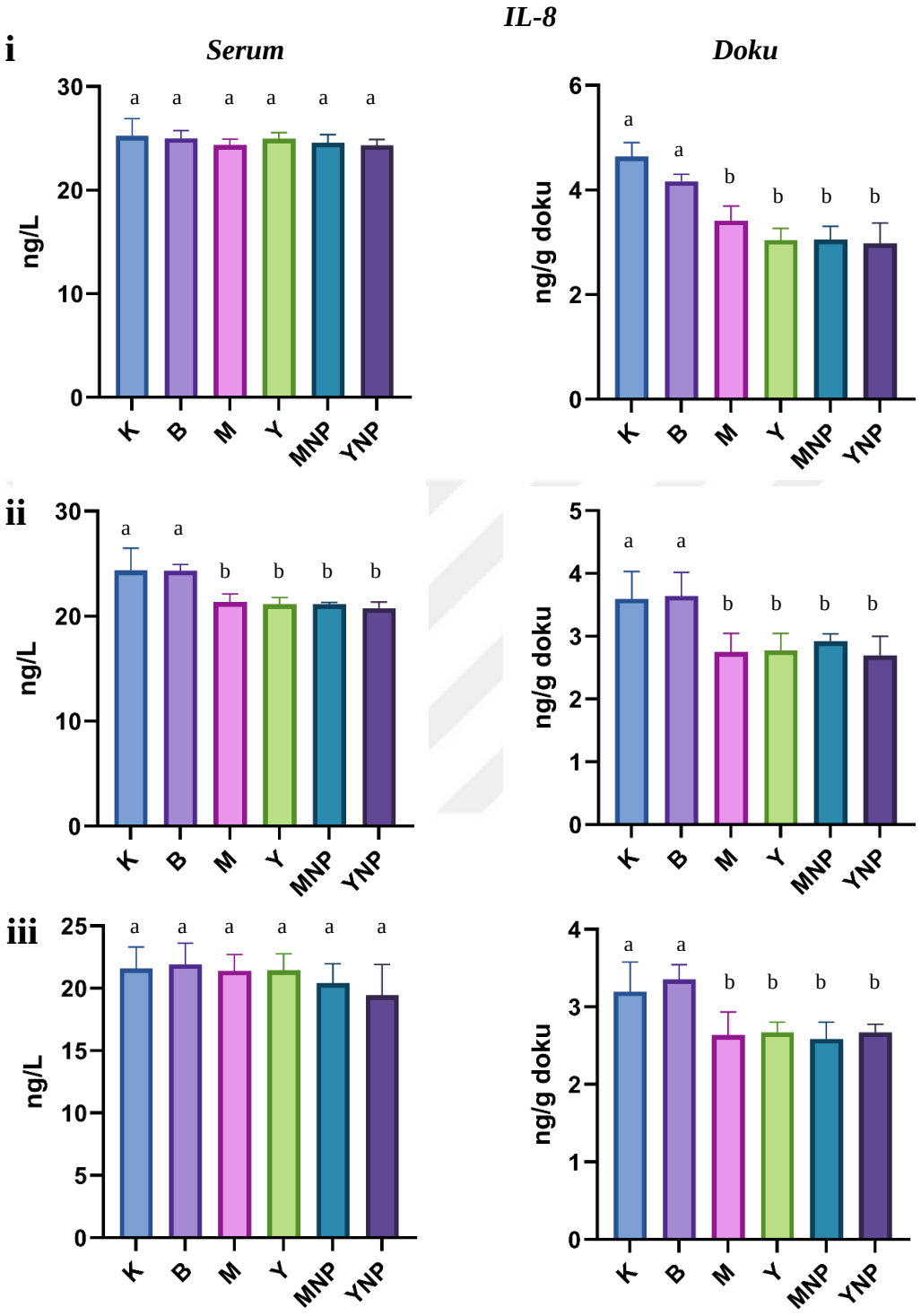
serum örneklerinin ortalama IL-8 seviyeleri K ve B grubuna göre daha düşük bulunsa da tüm gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Doku örneklerinde ise gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). M, Y, MNP ve YNP gruplarının 9. Gün doku IL-8 ortalamaları K (p değerleri sırasıyla 0,0122; 0,0202; 0,0056, 0,0211) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0010; 0,0017; 0,0005; 0,0018) grubuna göre anlamlı derecede düşüktü. 9. Gün doku örneklerinde M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

Tablo 4.15: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-8 düzeyleri

Serum	Gün	K	B	M	Y	MNP	YNP
		X±SD	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***
	3. gün	25,23±1,66 [a]	25,02±0,74 [a]	24,37±0,57 [a]	24,95±0,62 [a]	24,59±0,79 [a]	24,34±0,53 [a]
	6. gün	24,37±2,09 [a]	24,33±0,59 [a]	21,36±0,76 [b]	21,13±0,67 [b]	21,15±0,16 [b]	20,77±0,57 [b]
	9. gün	21,60±1,70 [a]	21,93±1,67 [a]	21,40±1,29 [a]	21,44±1,32 [a]	20,43±1,53 [a]	19,46±2,46 [a]
Doku							
	3. gün	6,645±0,26 [a]	4,168±0,13 [a]	3,419±0,28 [b]	3,042±0,22 [b]	3,054±0,25 [b]	2,977±0,39 [b]
	6. gün	3,599±0,43 [a]	3,645±0,37 [a]	2,753±0,29 [b]	2,776±0,27 [b]	2,922±0,12 [b]	2,697±0,30 [b]
	9. gün	3,199±0,38 [a]	3,354±0,19 [a]	2,637±0,29 [b]	2,670±0,13 [b]	2,588±0,21 [b]	2,673±0,10 [b]

K: Kontrol grubu; **B:** Boş jel grubu; **M:** Meyve grubu; **Y:** Yaprak grubu; **MNP:** Meyve nanopartikül grubu; **YNP:** Yaprak nanopartikül grubu

[a,b] Aynı satırda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$). Veriler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir.



Şekil 4.28: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-8 seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı (i: 3. gün; ii: 6. gün, iii: 9. gün) [a, b,] Sütunlarda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

4.5.3.6. İnterlökin-10: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen ortalama IL-10 değerleri ve karşılaştırmaları Tablo 4.16 ile Şekil 4.29'da verilmiştir. IL-10 antienflamatuar bir sitokindir ve bu sebeple tedavi edici ajanların uygulandığı gruplarda yüksek olması beklenir.

3. günde en yüksek IL-10 seviyeleri serum örneklerinde YNP doku örneklerinde ise MNP grubunda tespit edildi. 3. günde serum ve doku örneklerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu ($p<0,0001$). Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarının 3. Gün serum IL-10 seviyelerinin ortalamaları K (p değerleri sırasıyla 0,0080; 0,0083; 0,0023; <0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0064; 0,0066; 0,0018; <0,0001) grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek tespit edildi. 3. gün serum örneklerinde M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise sadece YNP grubu diğer gruplara göre anlamlı derecede daha yüksekti (p değerleri sırasıyla 0,0023; 0,0022; 0,0087). 3. gün doku örnekleri incelendiğinde M, Y, MNP ve YNP gruplarının hepsinde ortalama IL-10 seviyeleri K ve B grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (tüm gruplar için $p<0,0001$). Ayrıca MNP grubu M grubuna göre anlamlı derecede yüksekken Y ve YNP grubu ile M ve Y grupları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadığı tespit edildi.

6. günde tüm gruplarda hem doku hem de serum örneklerinde IL-10 seviyelerinde 3. güne göre artış olduğu tespit edildi. 6. günde en yüksek IL-10 seviyeleri serum ve doku örneklerinde YNP grubunda bulundu. 3. günde serum ve doku örneklerinde tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu (serum için $p<0,0001$; doku için $p=0,0001$). Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. 6. gün serum örneklerinde M ve Y gruplarının IL-10 seviyeleri K ve B gruplarına göre yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MNP ve YNP grupları ise K ($p=0,0016$) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0013; 0,0005) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. MNP grubu M grubuna ($p= 0,0197$) ve YNP grubu da Y ($p=0,0033$) grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek bulunurken MNP ve YNP grubu ile Y ve M gruplarının kendi aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.6. gün doku örnekleri kıyaslandığında ise M, Y, MNP ve YNP gruplarının hepsinin ortalama IL-10 seviyeleri K grubuna göre yüksek bulunurken sadece YNP grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi

(p=0,0082). Ancak M, Y, MNP ve YNP gruplarının hepsinin IL-10 seviyeleri B grubuna göre anlamlı derecede daha yüksekti (p değerleri sırasıyla 0,0079; 0,0017; 0,0107; 0,0001). 6. Gün doku örneklerinde M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

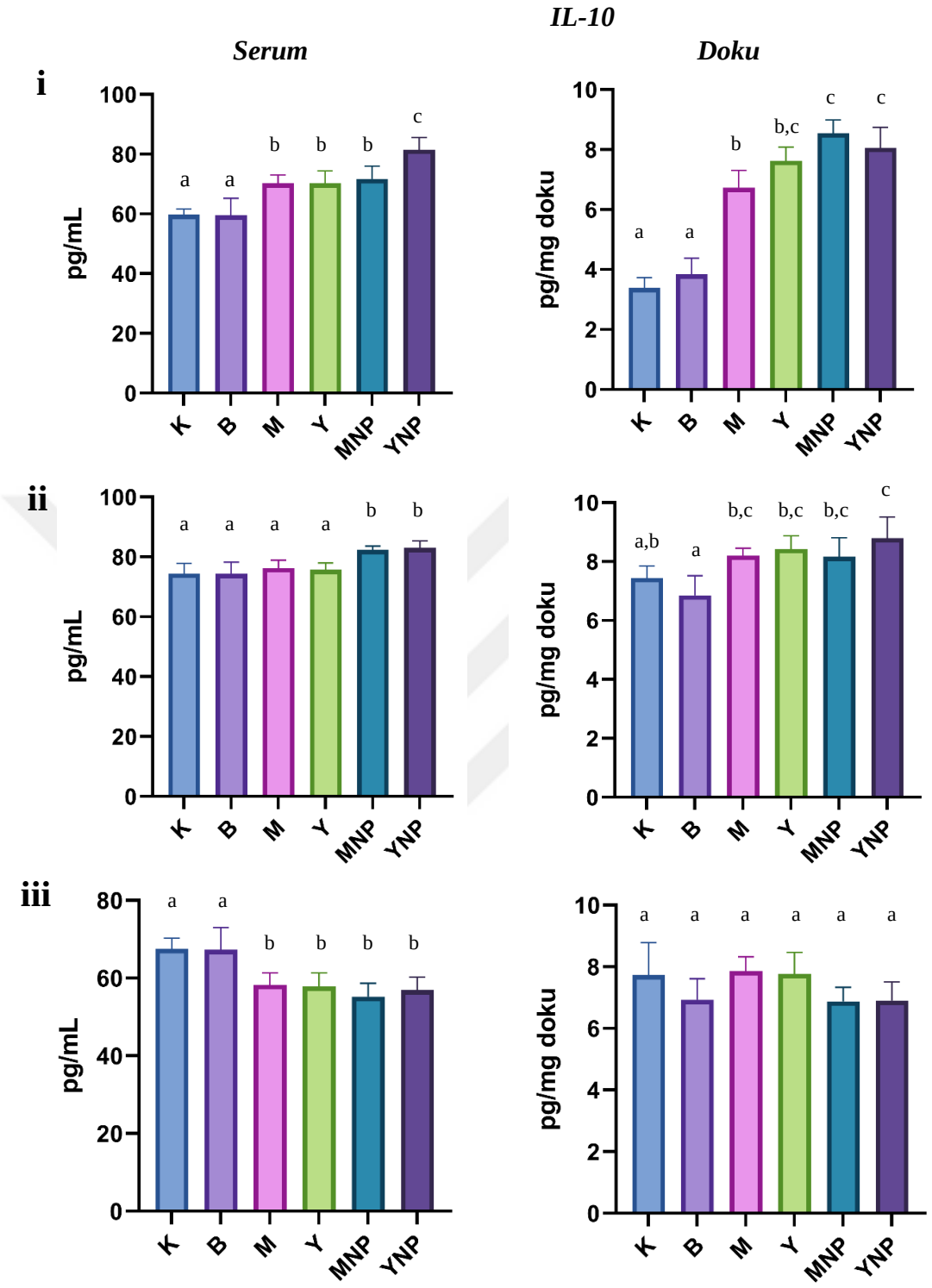
9. gün serum ve doku örneklerinde M, Y, MNP, YNP gruplarında IL-10 seviyelerinde 6. Güne göre düşüş gözlendi. K e B gruplarında diğer gruplara göre IL-10 seviyeleri daha yüksek tespit edildi. 9. gün serum örneklerinde tüm gruplar incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken ($p<0,0001$); doku örneklerinde anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. Serum ve doku örneklerinde K ve B grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. 9. Gün serum örneklerinde M, Y, MNP ve YNP gruplarında IL-10 seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0076; 0,0052; 0,0003;0,0020) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0098; 0,0067; 0,0004; 0,0026) gruplarına göre anlamlı derecede düşük tespit edildi. Serum örneklerinde M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

Tablo 4.16: Tüm gruplara ait doku ve serum örneklerinde analiz edilen interlökin-10 düzeyleri

		K	B	M	Y	MNP	YNP
Serum	**Gün**	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***
	3. gün	59,81±1,85 [a]	59,55±5,62 [a]	70,32±2,72 [b]	70,27±4,23 [b]	71,74±4,29 [b]	81,55±4,41 [c]
	6. gün	74,49±3,35 [a]	74,36±3,87 [a]	76,32±2,58 [b]	75,67±2,27 [b]	82,38±1,22 [b]	83,03±2,29 [b]
	9. gün	67,57±2,74 [a]	67,32±5,67 [a]	58,27±3,13 [b]	57,89±3,50 [b]	55,23±3,49 [b]	56,98±3,28 [b]
Doku							
	3. gün	3,391±0,34 [a]	3,835±0,54 [a]	6,726±0,58 [b]	7,632±0,45 [b,c]	8,549±0,44 [c]	8,066±0,67 [c]
	6. gün	7,448±1,04 [a,b]	6,852±0,66 [a]	8,205±0,25 [b,c]	8,425±0,44 [b,c]	8,161±0,64 [b,c]	8,795±0,72 [c]
	9. gün	7,737±5,58 [a]	6,932±0,68 [a]	7,860±0,46 [a]	7,767±0,69 [a]	6,875±0,46 [a]	6,907±0,61 [a]

K: Kontrol grubu; **B:** Boş jel grubu; **M:** Meyve grubu; **Y:** Yaprak grubu; **MNP:** Meyve nanopartikül grubu; **YNP:** Yaprak nanopartikül grubu

[a,b,c] Aynı satırda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$). Veriler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir.



Şekil 4.29: Serum ve doku örneklerinden analiz edilen interlökin-10 seviyelerinin 3., 6., ve 9. günlerde gruplara göre dağılımı (i: 3. gün; ii: 6. gün, iii: 9. gün) [a, b, c] Sütunlarda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

4.5.3.7. Total antioksidan seviye: Tüm gruplara ait doku örneklerinde analiz edilen ortalama TAS değerleri ve grup karşılaştırmaları Tablo 4.17 ve Şekil 4.30'da verilmiştir. Tedavi edici ajan içeren jeller ile tedavi uygulanan M, Y, MNP, YNP gruplarında TAS seviyelerinin serum fizyolojik ve jel bazının uygulandığı K ve B gruplarına göre 3., 6. ve 9. günlerde daha yüksek olduğu tespit edildi.

3. günde en yüksek TAS seviyesi MNP grubunda ölçüldü. 3. gün grupları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). K ve B grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. 3. gün M, Y, MNP, YNP gruplarının hepsinde TAS seviyeleri K (p değerleri sırasıyla 0,0002; <0,0001; <0,0001; <0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0002; <0,0001; <0,0001; <0,0001) grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. MNP ($p<0,0001$) ve Y ($p=0,0226$) grubu M grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Y ve YNP grubu ile MNP ve YNP gruplarının kendi aralarında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

6. günde K ve B gruplarında 3. güne göre TAS seviyeleri yükselirken M, Y, MNP ve YNP gruplarında bir miktar düşüş olduğu görüldü. Tüm gruplar değerlendirildiğinde 6. günde en yüksek TAS seviyesi MNP grubunda ölçüldü. Tüm gruplar kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). 6. Ün K ve B grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. M, Y, MNP e YNP gruplarında 6. gün TAS seviyeleri K grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p değerleri sırasıyla 0,0013; 0,0031; <0,0001; <0,0001). B grubu ile kıyaslandığında M ve Y gruplarında anlamlı bir bulunmazken; MNP ($p= 0,0003$) ve YNP ($p=0,0006$) gruplarında TAS seviyeleri B grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 6. gün TAS değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi.

9. günde en yüksek TAS seviyesi YNP grubunda ölçüldü. 3. gün grupları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p=0,0002$). K ve B grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. M ($p=0,0086$) ve YNP ($p<0,0001$) grupları K grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken Y ve MNP gruplarında ile K grubuna göre TAS seviyeleri yüksek olsa da arasında anlamlı fark olmadığı tespit edildi. B grubuna göre kıyaslandığında ise sadece YNP ($p=0,0022$) grubunda anlamlı farklılık bulunduğu görüldü. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında

değerlendirildiğinde ise 9. gün TAS değerleri bakımından yalnızca Y ve YNP grubu (p=0,0414) arasında anlamlı fark bulundu.

4.5.3.8. Total oksidan seviye: Tüm gruplara ait doku örneklerinde analiz edilen ortalama TOS değerleri ve grup karşılaştırmaları Tablo 4.17 ve Şekil 4.30'da verilmiştir. Tedavi edici ajan içeren jeller ile tedavi uygulanan M, Y, MNP, YNP gruplarında TOS seviyelerinin serum fizyolojik ve jel bazının uygulandığı K ve B gruplarına göre 3.,6. ve 9. günlerde daha düşük olduğu tespit edildi.

3. günde en düşük TOS seviyesi MNP grubunda ölçüldü. 3. gün grupları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (p<0,0001). K ve B grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. 3. gün M, Y, MNP, YNP gruplarının hepsinde TOS seviyeleri K (tüm gruplar için p<0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0001; <0,0001; <0,0001; <0,0001) grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktü. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 3. gün TOS değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi.

6. günde en düşük TOS seviyesi yine MNP grubunda ölçüldü. 6. gün grupları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (p<0,0001). K ve B grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. 6. gün M, Y, MNP, YNP gruplarının hepsinde TOS seviyeleri K (tüm gruplar için p<0,0001) ve B (p değerleri sırasıyla 0,0001; <0,0001; <0,0001; <0,0001) grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktü. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 6. gün TOS değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi.

9. günde en düşük TOS seviyesi M grubunda ölçüldü. 9. gün grupları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (p<0,0001). K ve B grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarında TOS değerleri K grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktü (p değerleri sırasıyla <0,0001; 0,0008; 0,0008; 0,0074). B grubu ile kıyaslandığında ise sadece M grubu ile anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (p=0,0013). M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 9. gün TOS değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi.

4.5.3.9. Glutatyon: Tüm gruplara ait doku örneklerinde analiz edilen ortalama GSH değerleri ve grup karşılaştırmaları Tablo 4.17 ve Şekil 4.31'de verilmiştir. Tedavi

edici ajan içeren jeller ile tedavi uygulanan M, Y, MNP, YNP gruplarında GSH seviyelerinin serum fizyolojik ve jel bazının uygulandığı K ve B gruplarına göre 3.,6., ve 9. günlerde daha yüksek olduğu tespit edildi.

3. günde en yüksek GSH seviyesi YNP grubunda ölçüldü. 3. gün grupları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). K ve B grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarının 3.gün GSH değerleri K ve B gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksekti (tüm gruplar için $p<0,0001$). M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 3. gün GSH değerleri bakımından yalnızca Y ve YNP grubu arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p= 0,0267$).

6. günde en yüksek GSH seviyesi MNP grubunda ölçüldü. 6.gün grupları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). K ve B grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarının 6.gün GSH değerleri K ve B gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksekti (tüm gruplar için $p<0,0001$). M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 6. gün GSH değerleri bakımından sadece MNP grubu M ($p=0,0225$) ve Y ($p= 0,0008$) gruplarından anlamlı derecede yüksek bulundu.

9. günde en yüksek GSH seviyesi YNP grubunda ölçüldü. 9.gün grupları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). K ve B grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. M, Y, MNP ve YNP gruplarının 9.gün GSH değerleri K grubuna göre kıyaslandığında yalnızca YNP grubu ile anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p=0,0035$). Diğer gruplarda her ne kadar GSH değerlerinin ortalaması K grubunda yüksek olsa da anlamlı bir farklılık bulunmadığı görüldü. M, Y, MNP ve YNP grupları B grubu ile kıyaslandığında ise M ($p=0,0024$), Y ($p=0,0065$) ve YNP ($p<0,0001$) gruplarında anlamlı farklılık bulunurken MNP grubunda anlamlı farklılık tespit edilmedi. M, Y, MNP ve YNP grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 9. gün GSH değerleri bakımından sadece YNP grubunun MNP grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi.

4.5.3.10. Nitrik oksit: Tüm gruplara ait doku örneklerinde analiz edilen ortalama NO değerleri ve grup karşılaştırmaları Tablo 4.17 ve Şekil 4.31'de verilmiştir. Tüm gruplar 3., 6., 9.günlerde dokuda ölçülen NO değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

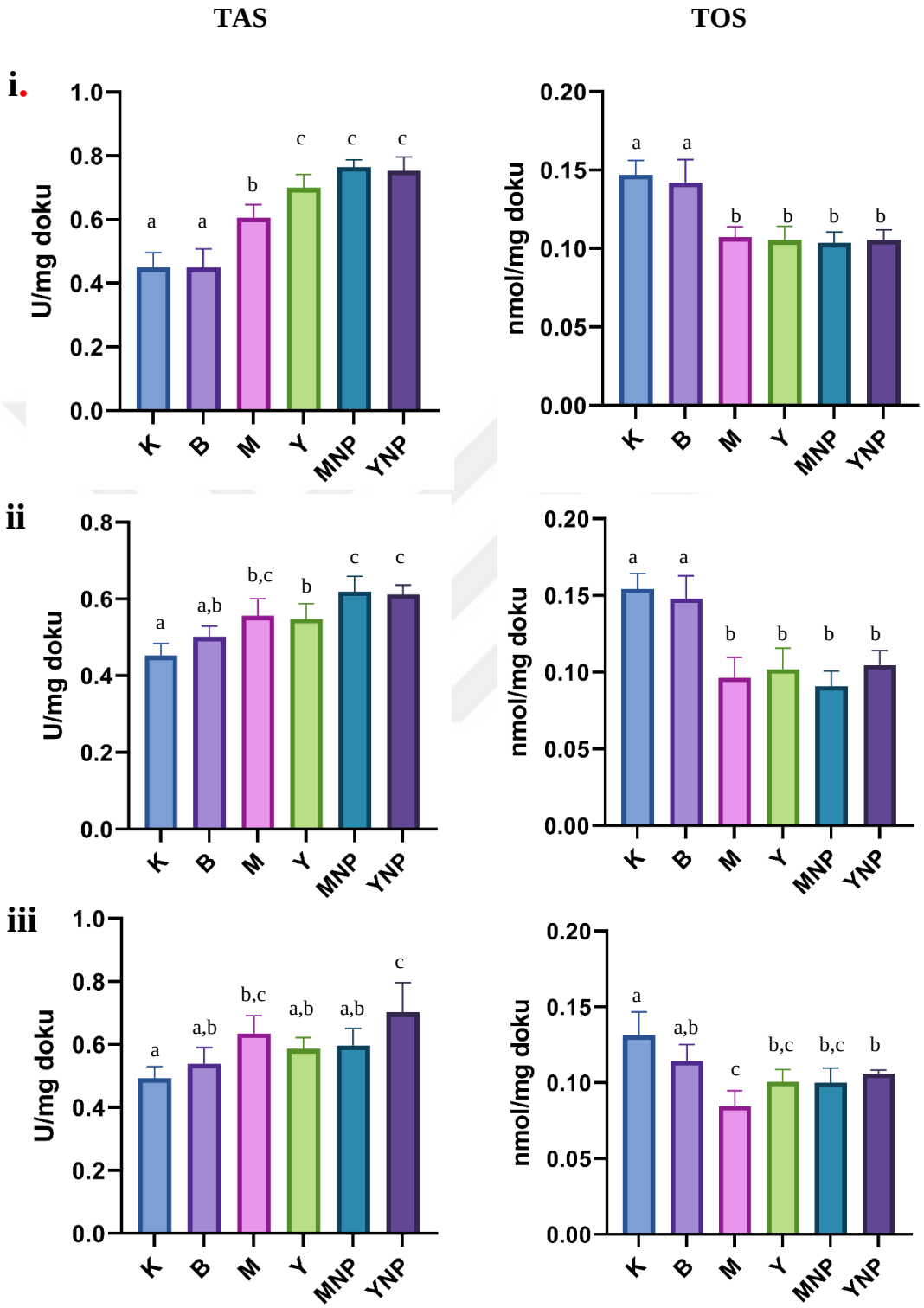
Tablo 4.17: Tüm gruplara ait doku örneklerinde analiz edilen antioksidan/oksidan parametrelerin düzeyleri

	Gün	K	B	M	Y	MNP	YNP
		X±SD	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***	***X±SD***
TAS (U/mg)	***3. gün***	0,45±0,05 ^{a}	0,45±0,06 ^{a}	0,61±0,04 ^{b}	0,70±0,04 ^{c}	0,76±0,02 ^{c}	0,75±0,04 ^{c}
	6. gün	0,45±0,03 ^{a}	0,50±0,02 $^{a, b}$	0,56±0,04 $^{b, c}$	0,55±0,04 ^{b}	0,62±0,04 ^{c}	0,61±0,02 ^{c}
	9. gün	0,49±0,04 ^{a}	0,54±0,05 $^{a, b}$	0,63±0,05 $^{b, c}$	0,55±0,03 $^{a, b}$	0,60±0,05 $^{a, b}$	0,70±0,09 ^{c}
TOS (nmol/mg)	***3. gün***	0,147±0,009 ^{a}	0,142±0,014 ^{a}	0,107±0,006 ^{b}	0,105±0,009 ^{b}	0,104±0,007 ^{b}	0,105±0,006 ^{b}
	6. gün	0,154±0,009 ^{a}	0,148±0,014 ^{a}	0,096±0,013 ^{b}	0,102±0,013 ^{b}	0,090±0,009 ^{b}	0,105±0,009 ^{b}
	9. gün	0,131±0,015 ^{a}	0,114±0,011 $^{a, b}$	0,084±0,010 ^{c}	0,100±0,008 $^{b, c}$	0,100±0,009 $^{b, c}$	0,106±0,002 ^{b}
GSH (mg/g)	***3. gün***	11,48±0,93 ^{a}	12,07±1,07 ^{a}	23,95±0,85 $^{b, c}$	23,63±0,61 ^{b}	24,64±0,92 $^{b, c}$	25,55±0,96 ^{c}
	6. gün	17,13±1,27 ^{a}	17,03±1,38 ^{a}	24,21±1,18 ^{b}	23,10±1,49 ^{b}	26,94±0,61 ^{c}	24,80±1,36 $^{b, c}$
	9. gün	17,84±1,75 $^{a, b}$	16,42±1,55 ^{a}	19,74±0,96 ^{b}	19,43±0,61 ^{b}	18,61±1,27 ^{a}	21,04±0,40 ^{b}
NO (µmol/g)	***3. gün***	0,309±0,013 ^{a}	0,319±0,027 ^{a}	0,299±0,031 ^{a}	0,297±0,019 ^{a}	0,312±0,014 ^{a}	0,303±0,017 ^{a}
	6. gün	0,315±0,012 ^{a}	0,300±0,042 ^{a}	0,294±0,025 ^{a}	0,339±0,023 ^{a}	0,296±0,007 ^{a}	0,308±0,019 ^{a}
	9. gün	0,314±0,017 ^{a}	0,295±0,015 ^{a}	0,299±0,023 ^{a}	0,303±0,028 ^{a}	0,284±0,028 ^{a}	0,280±0,025 ^{a}

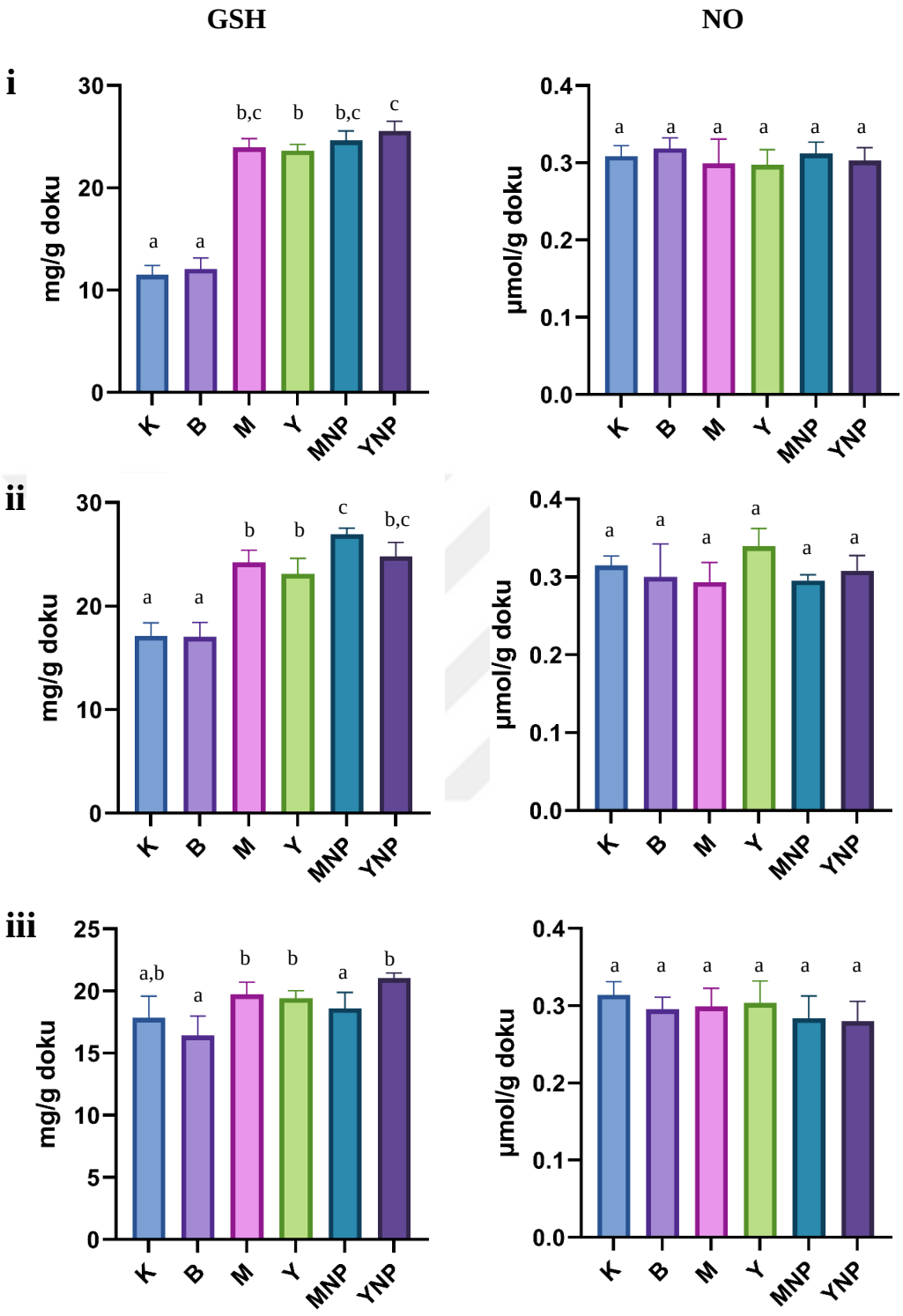
K: Kontrol grubu; **B:** Boş jel grubu; **M:** Meyve grubu; **Y:** Yaprak grubu; **MNP:** Meyve nanopartikül grubu; **YNP:** Yaprak nanopartikül grubu

^{a,b,c,} Aynı satırda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$). Veriler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir.

Grupların oksidan ve antioksidan parametreler bakımından karsılastırılması ayrıca Şekil 4.30 ve 4.31'de gösterilmiştir.



Şekil 4.30: Doku örneklerinden analiz edilen total antioksidan ve total oksidan seviyelerinin 3. (i), 6. (ii), ve 9. (iii) günlerde gruplara göre dağılımı. [a, b, c] Sütunlarda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.31: Doku örneklerinden analiz edilen glutatyon ve nitrik oksit seviyelerinin 3. (i), 6. (ii), ve 9. (iii) günlerde gruplara göre dağılımı. [a, b, c] Sütunlarda yer alan farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

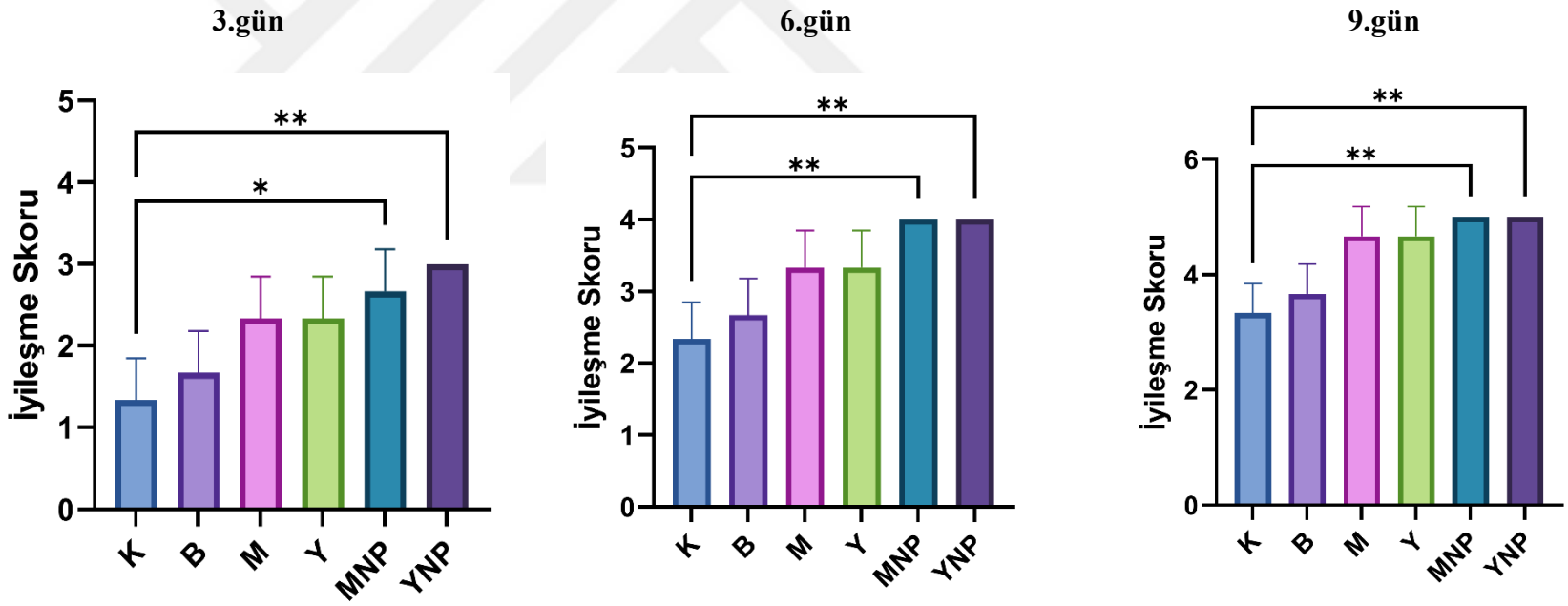
4.5.4. Histopatolojik Değerlendirmeler

Tüm gruplara ait histolojik iyileşme skorları Tablo 4.18'de verilmiştir. 3. gün gruplarına bakıldığında tüm gruplarda bukkal mukozada indüklenen ülsere bağlı olarak dermal ve epidermal alanlarda hasar görülmektedir. Hasar neredeyse tüm gruplarda epidermal alanlarda yer yer nekrotik değişikliğe sebep olmuştur. Nekrotik alanın oranı, sınırlanması gruplar arasında farklılık göstermektedir. Yine hasar sonrası geçen süre arttıkça nekrotik alanların kaybolduğu veya azaldığı görülmektedir. Hasar alanında skarlaşma da bütün gruplarda gözlenmektedir. Dermis bölgesinde hasar kendini ödem ve hücre dejenerasyonuyla göstermektedir. Enflamatuar hücre cevabı tüm gruplarda gözlenmekle birlikte gruplar arasında ve hasar sonrası geçen süreyle değiştiği görülmüştür. Özellikle K ve B grubunda enflamatuar yanıtın diğer gruplara göre geç başladığı görülmekle birlikte yanıtın azalması ve yüzeyel epitelizasyon görülmesi de gecikmiştir. Hasar sonrası geçen süre arttıkça; tüm gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde iyileşme skorlarında artış görüldü. Hasar sonrası en çabuk iyileşme gösteren ve iyileşme skorları en yüksek olan YNP ve MNP grupları oldu. 3. gün YNP grubu MNP grubuna göre daha fazla iyileşme gösterirken; 6. ve 9. günlerde gösterdikleri histolojik değişimlerin benzer olduğu görüldü. 9. günde bu iki grupta da tüm deneklerde yüzeyel epitelizasyonun ve iyileşmenin tamamlandığı görüldü. Y ve M gruplarında da iyileşme birbirine benzer şekilde görüldü. 6. ve 9. günde epitelize alanlar görülmekle birlikte epitelizasyon hızının YNP ve MNP gruplarına göre daha geride kaldığı gözlendi. B grubu iyileşme skorları açısından, M ve Y gruplarından sonra gelmekle beraber 9. gün sonunda iyileşmenin bu grupta tamamlanmadığı gözlendi. İncelenen tüm günlerde diğer gruplara kıyasla en geç iyileşmenin ise kontrol grubunda gerçekleştiği görüldü (Şekil 4.32).

Tablo 4.18: Tüm gruplara ait doku örneklerinin histopatolojik skorlanması

Gün		K	B	M	Y	MNP	YNP
3. Gün	Min	1	1	2	2	2	3
	Max	2	2	3	3	3	3
	X +SD	1,33±0,52	1,67±0,52	2,33±0,52	2,33±0,52	2,67±0,52*	3±0,00**
6. Gün	Min	2	2	3	3	4	4
	Max	3	3	4	4	4	4
	X +SD	2,33±0,52	2,67±0,52	3,33±0,52	3,33±0,52	4±0,00**	4±0,00**
9. Gün	Min	3	3	4	4	5	5
	Max	4	4	5	5	5	5
	X +SD	3,33±0,52	3,67±0,52	4,67±0,52	4,67±0,52	5±0,00**	5±0,00**

K: Kontrol grubu; **B:** Boş jel grubu; **M:** Meyve grubu; **Y:** Yaprak grubu; **MNP:** Meyve nanopartikül grubu; **YNP:** Yaprak nanopartikül grubu; **X:** Ortalama; **SD:** Standart sapma *: p<0,05; **: p< 0,01

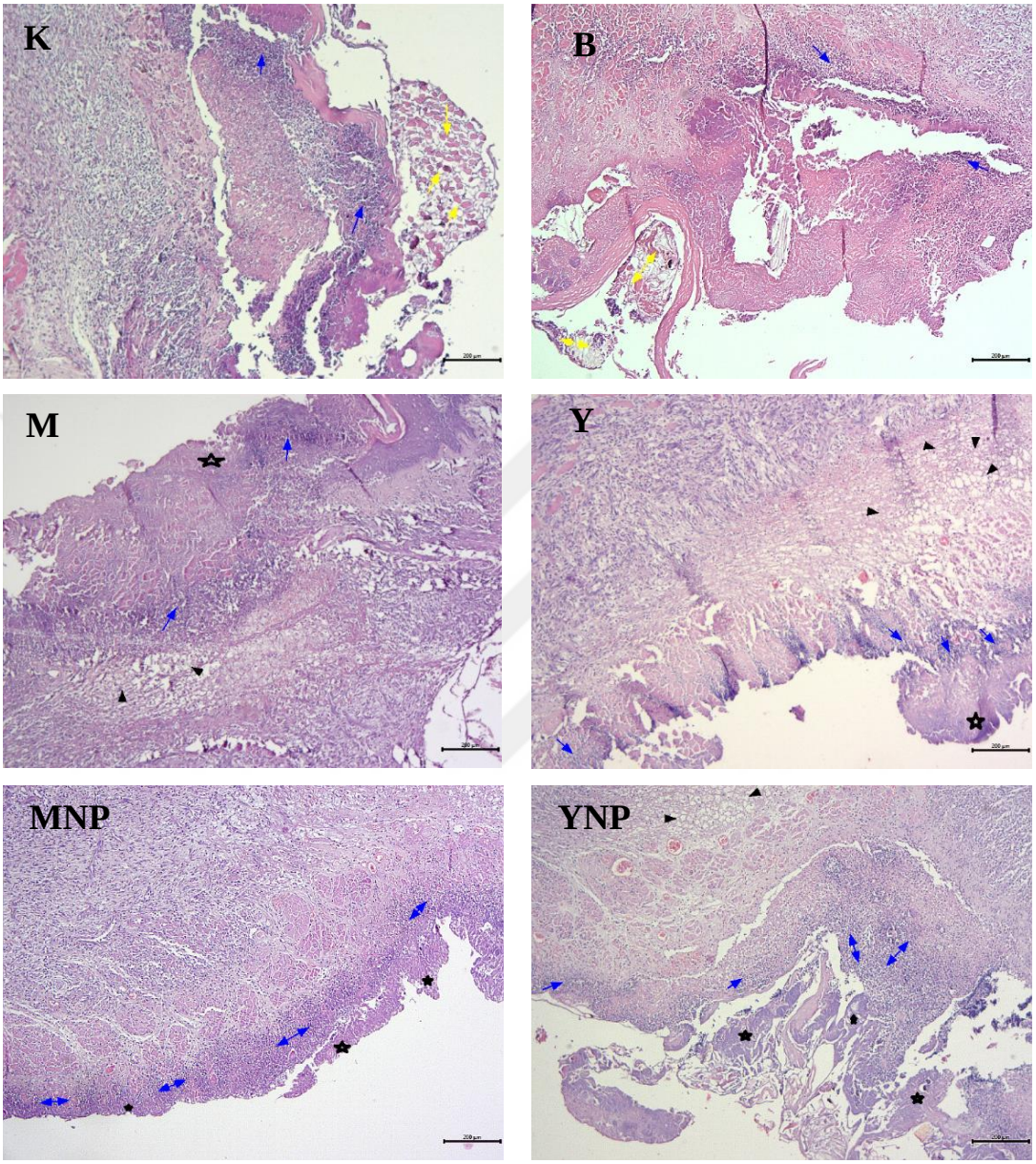


Şekil 4.32: Gruplara ait histolojik iyileşme skorlarının karşılaştırılması

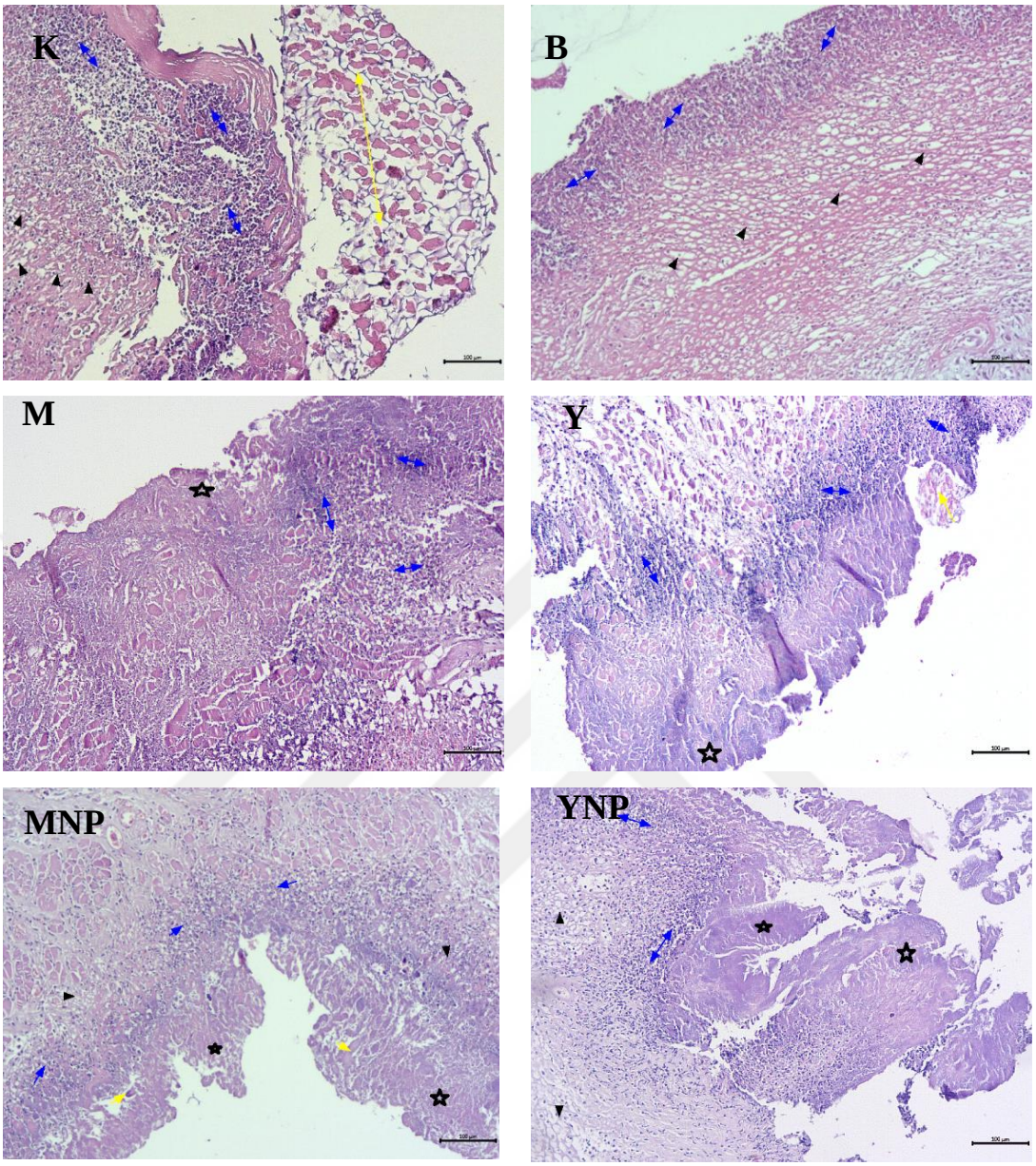
*: p<0,05

**: p<0,01

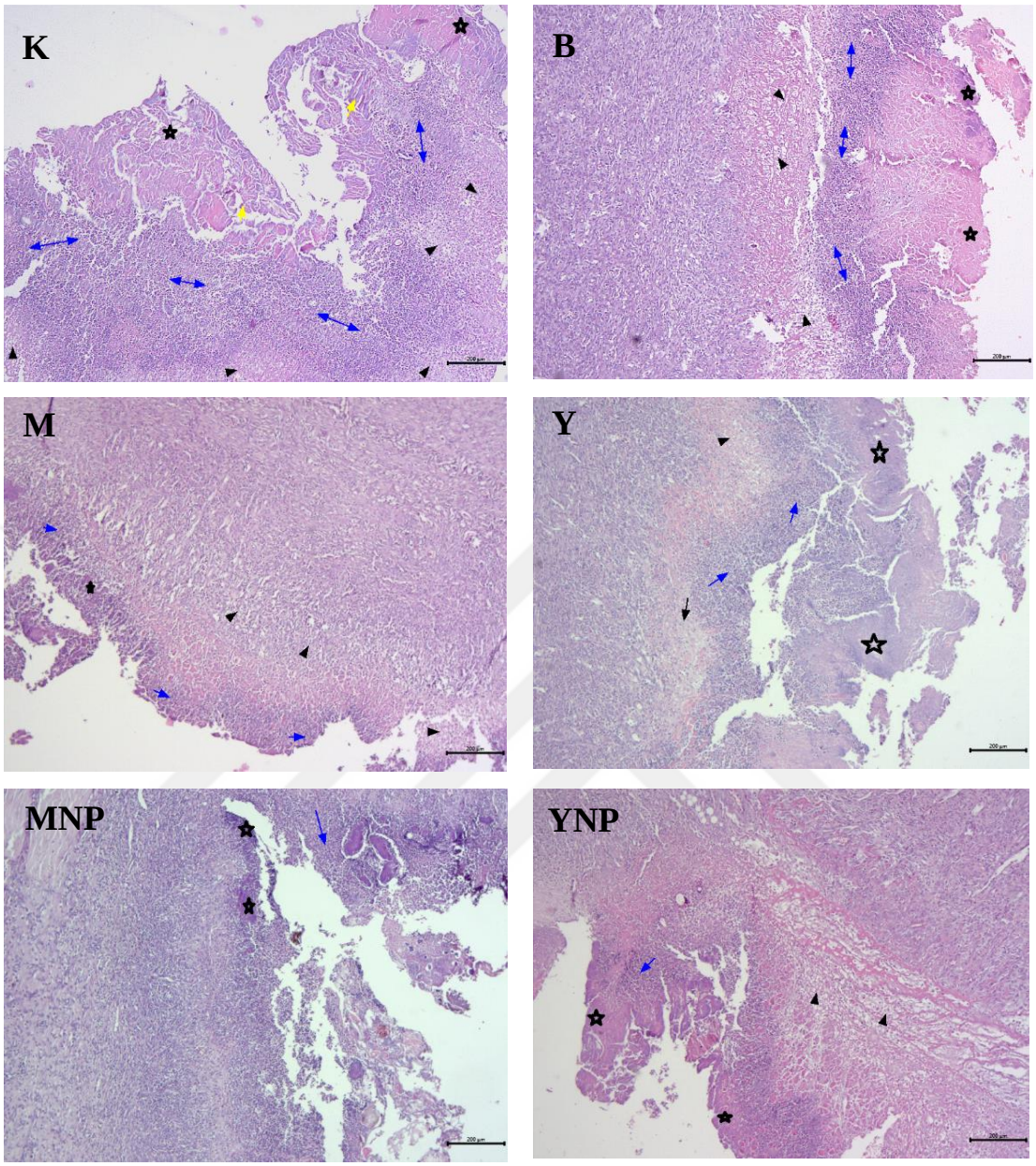
Tüm grupların 3., 6. ve 9. günlerine ait histopatolojik değerlkendirmelere ait kesit görüntüleri (X5 ve X10) Şekil 4.33-4.38'de verilmiştir.



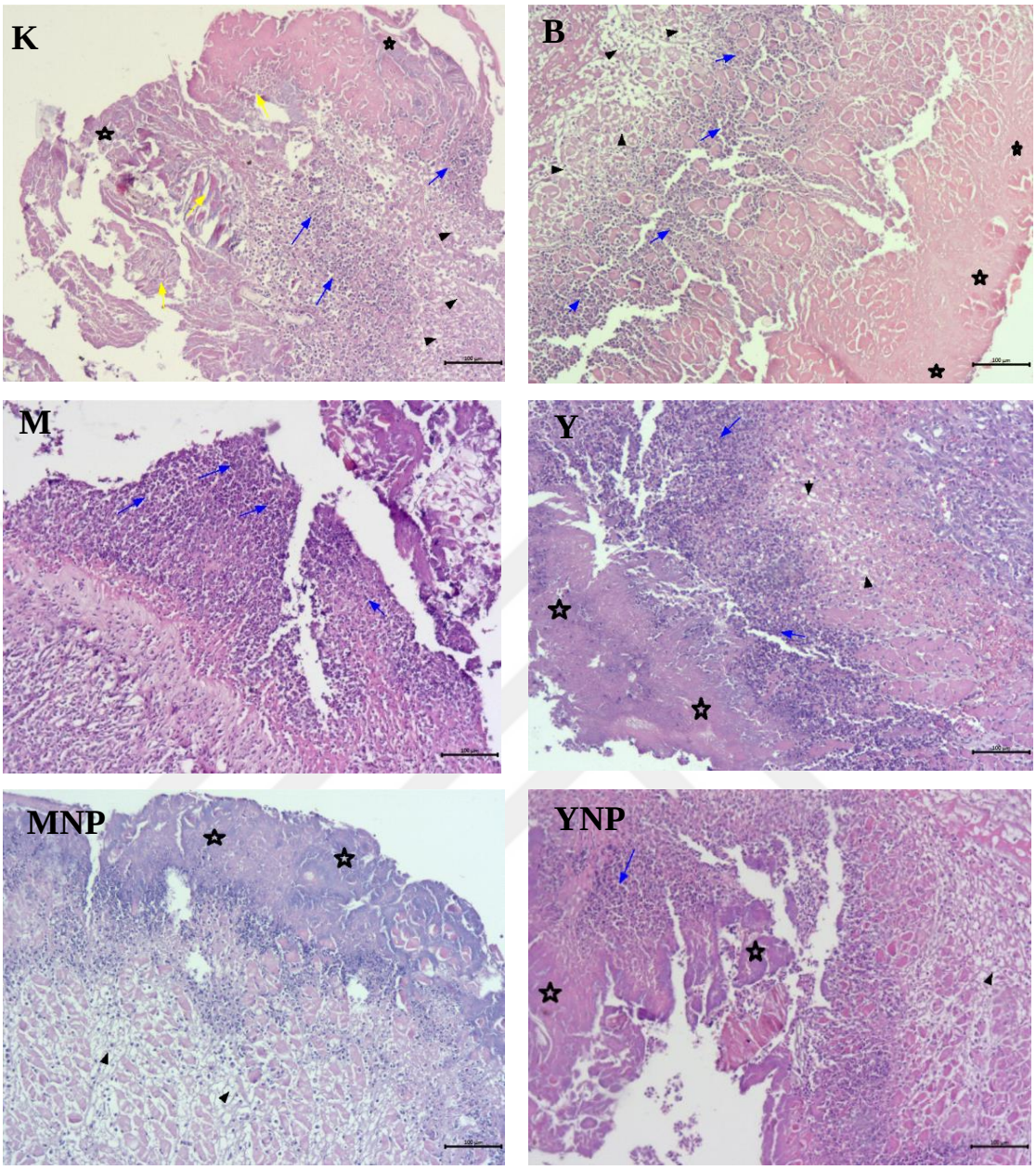
Şekil 4.33: 3. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Siyah okbaşı: Ödem, hücre dejenerasyonu; Sarı oklar: Nekrotik bölgeler; Siyah yıldız: skar, içinde hücre olmayan yara kabuğu; Mavi ok, okbaşı: inflamasyon alanı, inflamatuar hücreler, Hematoksilen eozin, X5)



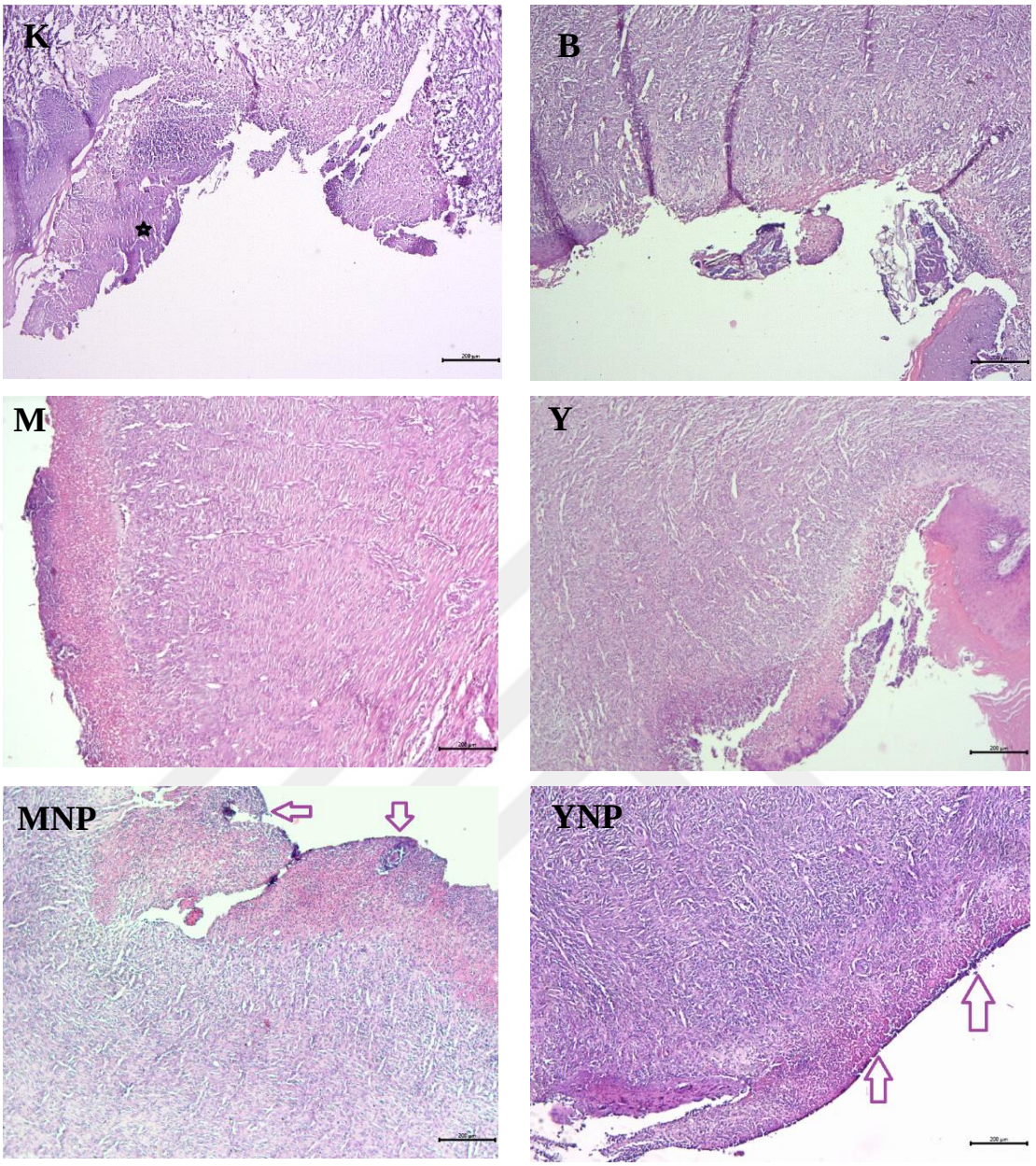
Şekil 4.34: 3. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Siyah okbaşı: Ödem, hücre dejenerasyonu; Sarı oklar: Nekrotik bölgeler; Siyah yıldız: skar, içinde hücre olmayan yara kabuğu; Mavi ok, okbaşı: inflamasyon alanı, inflamatuar hücreler, Hematoksilen eozin, X10)



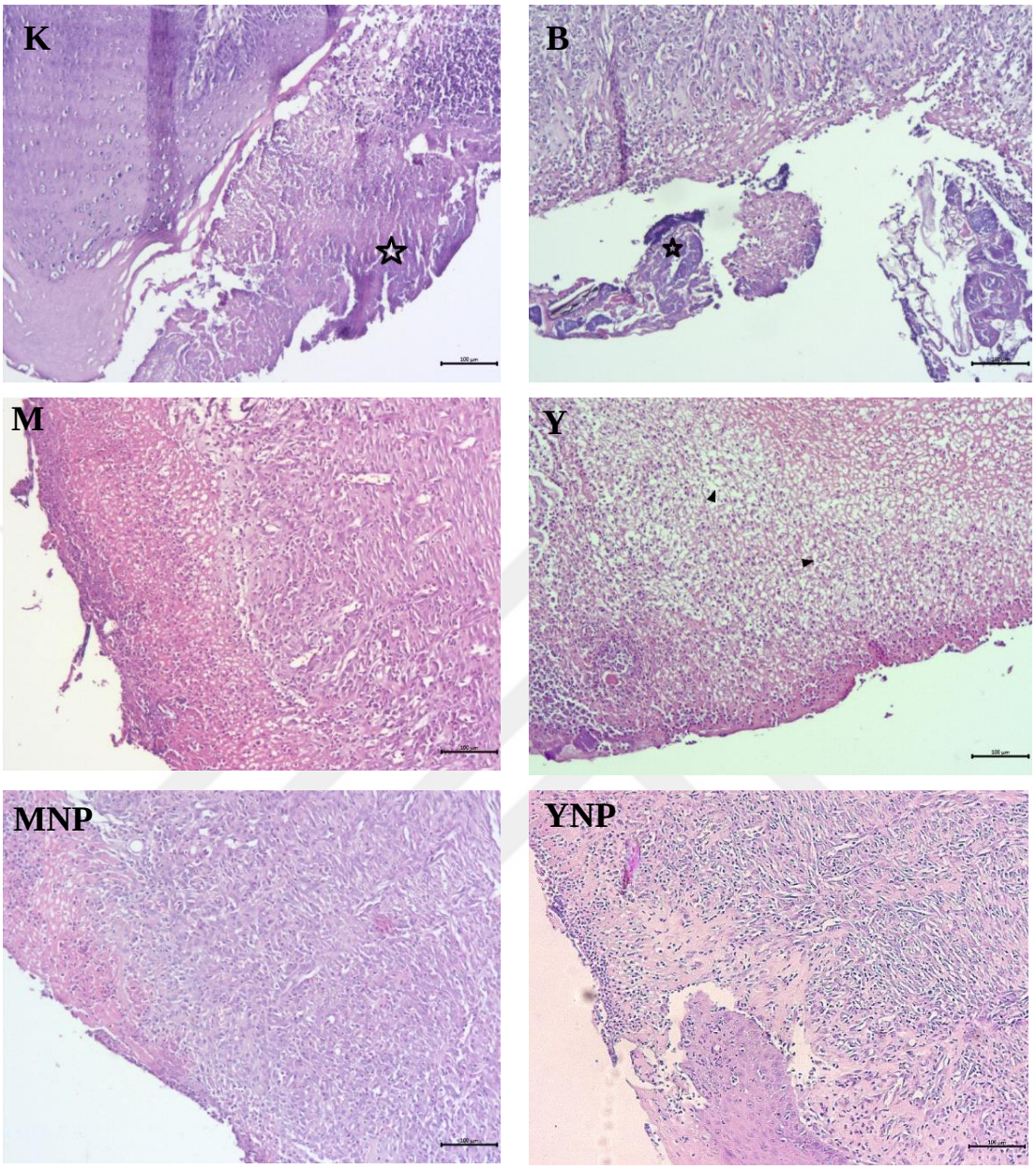
Şekil 4.35: 6. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Siyah okbaşı: Ödem, hücre dejenerasyonu; Sarı oklar: Nekrotik bölgeler; Siyah yıldız: skar, içinde hücre olmayan yara kabuğu; Mavi ok, okbaşı: inflamasyon alanı, inflamatuar hücreler, Hematoksilen eozin, X5)



Şekil 4.36: 6. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Siyah okbaşı: Ödem, hücre dejenerasyonu; Sarı oklar: Nekrotik bölgeler; Siyah yıldız: skar, içinde hücre olmayan yara kabuğu; Mavi ok, okbaşı: inflamasyon alanı, inflamatuar hücreler, Hematoksilen eozin, X10)



Şekil 4.37: 9. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Siyah yıldız: skar, içinde hücre olmayan yara kabuğu; Hematoksilen eozin, X5)



Şekil 4.38: 9. günde ülser alanındaki iyileşmenin histolojik açıdan görünümü (Siyah okbaşı: Ödem, hücre dejenerasyonu; Siyah yıldız: skar, içinde hücre olmayan yara kabuğu; Hematoksilen eozin, X10)

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızda; *M. nigra* yaprak ve meyve ekstrelerinin ve bu ekstrelerden GS yöntemi ile sentezlenmiş ZnONP'lerin topikal jel formunda deneysel olarak oluşturulmuş AS modelinde terapötik etkinliğinin histolojik ve biyokimyasal açıdan değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu amaçla uygun mukoadezif emüljel formülasyonu hazırlanmış ve ratlarda oluşturulan aftöz ülserler üzerinde terapötik etkinliği incelenmiştir. Bu tez çalışması geleneksel tıpta ağız yaraları için yaygın olarak kullanılan *M. nigra* meyvelerinin, yara iyileştirici etkileri bilinen *M. nigra* yapraklarından GS yöntemiyle sentezlenen ZnONP'leri içeren mukoadezif jel formülasyonunun AS modelinde kullanıldığı ilk çalışmadır.

Oral bölgede görülen AS'ler hastaların yutkunma, yemek yeme, içme ve hatta konuşma gibi günlük fonksiyonlarını olumsuz etkileyen ve dolayısıyla yaşam kalitelerinde düşüşe neden olan önemli bir sağlık sorunudur (1). AS etiyolojisi ve patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Ancak lokal, sistemik, alerjik, genetik, nutrisyonel ve mikrobiyal faktörler gibi altta yatan bazı etkenlere bağlı olarak gelişebildiği düşünülmektedir. Ayrıca yaş, cinsiyet ve sosyoekonomik durumla hastalığın insidansı arasında doğrudan bir ilişki de bulunmaktadır (2-4).

AS, tedavisi genellikle semptomatiktir. Tedavi protokülünde genel olarak analjezikler, antiseptikler, antibiyotikler ve kortikosteroidler gibi semptomatik rahatlama sağlayan ilaç grupları yer almaktadır (5). Sentetik ilaçların çoğu oral mikrobiyotayı değiştirebildiği gibi süperenfeksiyon, kusma, ishal, dişlerde renklenme, ağızda hissizlik gibi istenmeyen yan etkilere de yol açabilmektedir (6,7). Bu sebeplerden dolayı son zamanlarda sentetik ilaç gruplarının sağladığı semptomatik rahatlamayı sağlayabilecek daha doğal çok yönlü etki gösterebilecek seçenekler ilgi çekmektedir.

Karadut (*M. nigra* L.) Türkiye'de halk arasında ağız yaralarının tedavisinde geleneksel olarak en sık kullanılan bitkilerden birisidir. Anadolu'da özellikle karadut pekmezi ve meyve suları ağız yaralarının tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (18). Halk arasında *M. nigra* meyvelerinden hazırlanan şurup ve gargaralar; ağız ve boğaz hastalıklarında, bademcik enfeksiyonlarında, ağız ve diş

yaralarında, çocuklarda ağız içerisinde görülen pamukçuk enfeksiyonlarında kullanılır. Ayrıca yaprak infüzyonları da ateş düşürücü, ağrı kesici olarak; yaprak dekoksiyonları ise diş ve diş eti iltihaplarında kullanılmaktadır (18,19).

Karadut meyvelerinde fenoller, flavonoidler, antosiyaninler, karotenoidler, esansiyel yağ asitleri, askorbik asit ve çeşitli organik asitler gibi biyolojik olarak aktif birçok bileşen bulunmaktadır (9,10). Ayrıca enflamasyon ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu inhibe eden karadut meyvelerinin yüksek antinosiseptif özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (15). Meyvelerin fitokimyasal bileşiminde bulunan fenolik bileşenler ve özellikle antosiyaninlerin, esas olarak yüksek antioksidan ve antienflamatuar etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir (16).

Ogawa ve ark., tarafından yapılan çalışmada *M. nigra* meyvelerinin antosiyanin içeriği 16,1 mg/g ekstre olarak bulunmuş ve bu çalışmada kurutulmuş meyvelerin yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir (432). Maqsood ve ark., tarafından yapılan çalışmada meyvelerin asitli etanol ekstresinde toplam antosiyanin miktarı 18,60 mg/g ekstre olarak tespit edilmiş ve bu çalışmada meyve ekstresinin HPLC analizinde kersetin, gallik asit, vanilik asit, klorojenik asit, şiringik asit, sinnamik asit, sinapik asit ve kamferol tespit edilmiştir. Çalışmada karadut meyvelerinin etanolik ekstresinin kardiyoprotektif aktivitesi araştırılmıştır. Günlük diyetlerine kolesterol takviyesi (%2) eklenen ve sigara dumanına maruz bırakılarak hipertansiyonu indüklenen sıçanlara 2 ay boyunca 300 mg/kg *M. nigra* meyve ekstresi ile tedavi uygulanmış ve hipertansif sıçanlarda serum ve kardiyak doku antioksidanlarının aktivitelerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. *M. nigra* meyve ekstresinin, antioksidan enzimleri artırarak, lipidleri, laktat dehidrojenazı, karaciğer transaminazlarını ve kan basıncını azaltarak kardiyoprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiş ve bu etkinin antosiyaninler, flavonoller ve fenolik asitlerden kaynaklanabileceği vurgulanmıştır (151). Koyu ve ark., *M. nigra* meyvelerinin mikrodalga destekli etanolik ekstrelerinin 12,63 mg/g C3G'e eşdeğer antosiyanin içerdiğini ve ekstrelerin tirozinaz inhibe edici etkisini tespit etmiştir (150).

Wang ve ark., farklı bölgelerden toplanan *M. nigra* meyvelerinin toplam antosiyanin miktarını araştırmış ve farklı ekstrelerin 2,91-11,86 mg/g C3G eşdeğeri antosiyanin içerdiğini tespit etmişlerdir (433). Tez çalışmamızda *M. nigra* meyvelerinin asitli etanol ekstresinin diğer ekstrelerden daha yüksek antosiyanin

içerdiği tespit edilmiştir. Literatürde diğer çalışmalara benzer şekilde meyvelerden elde edilen asitli etanol ekstresinin toplam monomerik antosiyanin miktarı spektroskopik olarak ölçülmüş (420) ve 17, 611 mg/g C3G eşdeğeri olarak bulunmuştur. Bu ekstrede HPLC-PDA analizi ile literatüre benzer şekilde kersetin, gallik asit, 4-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, rutin, sinnamik asit ve naringenin tespit edilmiştir. Etanol ekstresinin HPLC-PDA analizi sonucunda majör bileşenleri ise klorojenik asit ve rutin olarak tespit edilmiştir.

M. nigra yapraklarından daha önceki çalışmalarda kuinik asit, askorbik asit, sitrik asit, gallik asit, protokateşik asit, klorojenik asit, kersetin, kersetin di-o-glikozit, rutin, kamferol 3-o-rutinozit, izokuersitrin, morusin, germanikol bileşikleri tespit edilmiştir (152). Zeni ve arkadaşları *M. nigra* yapraklarının hidroalkolik ekstresinde gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, kersetin, rutin, kateşin tespit etmişler ve hiperlipidemik sıçanlarda ekstrenin serum kolesterolünü, trigliseritleri düşürdüğünü göstermişlerdir. Ayrıca hiperlipidemik sıçanların karaciğer, böbrek ve beyinlerinde lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve bu etkinin başta klorojenik asit olmak üzere fenolik bileşenlerden kaynaklığını belirtmişlerdir (222).

Padilha ve ark., *M. nigra* yapraklarının hidroetanolik ekstrelerinin metilenklorür fraksiyonunda betunilik asit β-sitosterol ve germanicol tespit etmiş ve bu ekstrenin antienflamatuar etkilerini değerlendirmişlerdir. Karragenan kaynaklı pençe ödemi ve pamuk pelet implantasyonu ile indüklenen fibrovasküler doku büyümesi araştırılmış ve ekstrelerin karragenan tarafından indüklenen pençe ödemini azaltarak antienflamatuar etki gösterdiği ve granülomatöz doku oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur (193). Chen ve ark., *M. nigra* meyvelerinin etanolik ekstresinde rutin, C3G ve C3R tespit etmişlerdir. Elde edilen bu ekstrenin ksilen kaynaklı kulak ödemini ve karragenan kaynaklı pençe ödemini doza bağlı olarak önleyebileceği bildirilmiştir. Meyve ekstrelerinin ksilen kaynaklı inflamasyonda IL-1β, TNF-α, NO ve IFN-y dahil pro-inflamatuar sitokinlerin seviyelerini de önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (190).

de Pádua Lúcio ve ark., *M. nigra* meyve ve yaprak ekstrelerinin antienflamatuar etkilerini araştırdıkları çalışmalarında yaprakların hidroalkolik ekstresinde 3-*O*-kafeolkinik asit, 4-*O*-kafeolkinik asit, 5-*O*-kafeolkinik asit, 6-hidroksi-luteolin-7-*O*-rutinosit, kersetin-3-*O*-furanosil-2-ramosil, kersetin-3-*O*-

rutinosit; kersetin 3-*O*-glikozit; meyve ekstresinde ise 3-*O*-kafeolkinik asit, 4-*O*-kafeolkinik asit, delphinidin 3-*O*-rutinozit, 5-*O*-kafeolkinik asit, delphinidin 7-*O*-rutinozit, delphinidin-3-*O*-glikozit, siyanidin 3-*O*-glikozit, delphinidin 7-*O*-glikozit, siyanidin-*O*-glikozil-aminosulfonat, kersetin 3-*O*-rutinozit, kersetin 3-*O*-glikozit tespit edilmiştir. Bu çalışmada *M. nigra* meyve ve yaprak ekstrelerinin lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen septik farelerde bronkoalveloar lavaj sıvısındaki lökosit sayısını ve serum TNF seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ve deneklerin hayatta kalma oranını artırabildiği gösterilmiştir (189).

Ribeiro ve ark., *M. nigra*'nın etanolik ekstresinin ve bu ekstrelerden izole edilen rutin ve kersetin bileşiklerinin farelerde yılan zehri ile indüklenen pençe lezyonları üzerindeki antienflamatuar ve antinosiseptif etkinliklerini değerlendirmiştir. *M. nigra* etanolik ekstresi, rutin ve kersetin yılan zehrinin neden olduğu lokal ödemi azalttığı, ayrıca etanolik ekstrenin serotonin ve bradikinin tarafından tetiklenen ödemi önlediği, karragenan tarafından indüklenen pençe ödemi ve peritoneal lökosit infiltrasyonunu da azalttığı tespit edilmiştir (194).

Yapılan tüm bu çalışmalar *M. nigra*'nın hem yaprak hem de meyve ekstrelerinin antienflamatuar etkilerini ortaya koymaktadır. Ancak bu çalışmaların tamamında çeşitli yöntemler ile hazırlanan ekstreler sistemik olarak uygulanmıştır. *M. nigra* ekstrelerinin jel veya krem gibi topikal olarak uygulanarak antienflamatuar etkinliğini yara modelleri üzerinde gösteren çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Mirjalili ve ark., tarafından diyabetik sıçanlarda *M. nigra* meyvelerinin yara iyileştirici etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada sıçanların sırtında dairesel yaralar oluşturulmuş ve meyvelerden elde edilen ekstreler bu yaralara topikal olarak uygulanmıştır. *M. nigra* ekstresinin topikal olarak uygulanması, yara kontraksiyonunu hızlandırmış, epitelyal, granüle tabakaların oluşumunu içeren histolojik indeksleri iyileştirmiş ve onarılan dokuda kollajen yoğunluğunu artırarak iyi bir yara iyileştirici aktivite sergilemiştir (244). Ancak bu çalışmada herhangi bir merhem veya jel formülasyonu uygulanmamış ekstre direkt yara üzerine uygulanmıştır. Ayrıca herhangi bir fitokimyasal analiz de bulunmamaktadır. Bu sebeplerden dolayı çalışma tasarımında eksiklikler olduğu görülmektedir. Akkol ve ark., tarafından insizyon ve eksizyon yara modelleri kullanılarak *M. nigra*'nın meyve ve yaprak ekstrelerinin merhem formunda yara iyileştirme aktivitesini araştırmak için yapılan çalışmada

meyve ekstresi önemli yara iyileştirme aktivitesi gösterirken, su ile hazırlanan yaprak ekstresinin etkinlik göstermediği tespit edilmiştir. Meyve ekstresi ile yapılan aktivite rehberli izolasyon çalışması sonucunda kersetin-3-*O*-rutinozit ve kaemferol-3-*O*-rutinozitin etken bileşikler olduğu tespit edilmiştir (245). Yapılan bu çalışmalarda meyve ekstrelerinin yara iyileştirici etkileri görülmektedir. Her ne kadar ağız yarası üzerine çalışmalar olmasa da histolojik bulgular çalışmamız ile uyumlu olup meyve ekstrelerinin yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermektedir. Ayrıca bu çalışmalarda uygulanan tedavilerin enflamatuar ve antioksidan parametreler üzerindeki etkinliği araştırılmamıştır.

Zhou ve ark., *M. nigra* yapraklarının metanol ekstresinin yara iyileşmesini ve antienflamatuar potansiyelini insizyon ve eksizyon yara yöntemleri ile araştırmıştır. Sıçanlarda karragenan kaynaklı inflamasyonda pençe ödemi ölçülerek antienflamatuar aktivite değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, yaprak ekstresinin pençe ödemini inhibe ettiğini ve merhem şeklinde uygulandığında kutanöz yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermektedir. Ayrıca merhem formunda uygulanan yaprak ekstresi yara dokusunda antioksidan seviyeleri önemli ölçüde artırmıştır. Ancak bu çalışmada yaprak ekstrelerinin fitokimyasal analizi yapılmamış ve görülen etki herhangi bir fitokimyasala atfedilmemiştir (246). Çalışmamızda da Zhou ve ark., çalışmasına benzer şekilde *M. nigra* yaprak ve meyve ekstreleri jel formunda hem ağız yaralarının iyileşmesini hızlandırmış hem de dokuda GSH ve TAS seviyelerini artırarak iyi bir antioksidan aktivite göstermiştir. Ayrıca hem doku hem de serum örneklerinde özellikle TNF-α, IL-1β ve IL-2 gibi proinflamatuar sitokin seviyelerini düşürerek antienflamatuar etkleri açısından literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Görüldüğü üzere *M. nigra*'nın meyve ve yapraklarının yara iyileştirici ve antienflamatuar etkileri insizyon ve eksizyon yaraları ile gösterilmiştir ancak halk arasında özellikle ağız yaralarında kullanımını destekleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. *M. nigra* ağız yaralarının tedavisinde geleneksel olarak sık kullanılsa da literatürde geleneksel kullanımını daha modern yöntemlerle destekleyen çalışmalar bulunmamaktadır. Doğan ve ark., radyoterapi alan hastalarda kara dut pekmezinin oral mukozitis gelişimine etkisini incelemiş ve geleneksel olarak kullanılan pekmezin koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (242). Ancak bu çalışmada

standardize edilmiş bir kara dut ekstresi kullanılmamış, kullanılan pekmez tamamen geleneksel yöntemlerle hazırlanmış bir ürün olup ürünün fitokimyasal içeriği ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır (242). Diğer bir çalışmada Yurdakul ve ark., yaptıkları anket çalışmasında kanser tedavisi gören çocukların ailelerine tedaviye bağlı oluşan ağız yaralarını tedavi etmek için herhangi bir tamamlayıcı tedavi kullanıp kullanmadıkları sorulmuş; tedavi gören çocukların %91,1'inde ağız yaraları geliştiğini ve ailelerin %50,9'unun tamamlayıcı tedavi yöntemlerine başvurduğu belirtilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre ise ağız yaraları ve mukozitis için en çok tercih edilen ürünün karadut olduğu bildirilmiştir (434). Yıldırım ve ark., tarafından yapılan başka bir çalışmada ise karadut ekstresinin deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda alveolar kemik rezorpsiyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada *M. nigra*'nın sistemik uygulanmasının bölgesel alveoler kemik rezorpsiyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği ve deneysel periodontitis modellerinde periodontal iyileşmeye katkıda bulunduğu ortaya koyulmuştur. Periodontitis, ekstrasellüler matriks, bağ ve kemik dokularının degradasyonu ile karakterize enflamatuar bir hastalıktır. Kollajenazları içeren MMP-8 ve MMP-13, ekstrasellüler matriksin tüm bileşenlerini parçalayarak lokal enflamasyona neden olabildiğinden çalışmada periodontitis ile ilişkili MMP-8 ve MMP-13 seviyeleri hem periodontal dokuda hem de serumda incelenmiştir. Oral olarak kullanılan meyve ekstreleri doku örneklerinde MMP-8 ve MMP-13 seviyelerini doku örneklerinde anlamlı derecede düşürerek antienflamatuar aktivite sergilemiş ve periodontal iyileşmeye katkı sağlamıştır (243). Bu çalışma meyve ekstrelerinin oral kullanımının lokal dişeti enflamasyonlarında antienflamatuar aktivitesini göstermektedir. Enflamasyon ile ilişkili bulgular çalışmamız ile uyumlu olup ağız sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini desteklemektedir. Ancak bu çalışmada uygulanan ekstrenin fitokimyasal içeriği analiz edilmemiş, ekstrenin hazırlanış metodu standardize edilmemiş ve görülen etkiler herhangi bir bileşik veya bileşik grubuna atfedilmemiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda *M. nigra*'nın ağız yaraları üzerine etkinliğinin daha iyi tasarlanmış deneysel modeller üzerinde gösterildiği bilimsel çalışmalara ihtiyaç olduğu açıkça görülmektedir.

Araştırmamız kapsamında literatürde yer alan çalışmalar doğrultusunda *M. nigra* yaprak ve meyvelerinden etanol ekstreleri hazırlanmıştır. Meyve ekstreleri için asitli etanol ekstresi daha çok antosiyanin içerdiği için jel yapımında tercih edilmiştir.

Akkol ve ark., çalışmasında su ile hazırlanan yaprak ekstresinin yara iyileşmesinde etkinlik göstermemesi ve literatürde genellikle yaprakların etanolik ekstreleri ile farmakolojik aktivite çalışmalarının bulunması nedeni ile etanol ekstresi ile jel yapılması tercih edilmiştir (245). Meyve ekstresinde literatüre uyumlu olacak şekilde 17,61 mg/g C3G eşdeğeri antosiyanin miktarı ölçülmüştür. HPLC-PDA analizi sonucunda meyvelerin etanol ekstresinde kersetin, gallik asit, 4-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, rutin sinnamik asit ve naringenin tespit edilmiş ve miktar tayinleri yapılmıştır. Klorojenik asit ve rutin majör bileşenler olarak bulunmuştur. Yaprak ekstresinde ise 4- hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, epikteşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, kikorik asit ve apigenin tespit edilmiştir. Yaprak ekstresinin majör bileşenleri ise meyve ekstresi gibi klorojenik asit ve rutin olarak tespit edilmiştir. Jel formülasyonları için hazırlanan etanol ekstrelerinden sonra hem yaprak hem de meyve ekstrelerinden GS yöntemi ile ZnONP'ler sentezlenmiştir.

NP sentezi için öncelikle meyve ve yaprak ekstreleri hazırlanmış ve içerikleri analiz edilmiştir. ZnONP sentezi için kullanılan *M. nigra* meyve ekstresinin toplam antosiyanin miktarı 3,872 mg/L (siyanidin-3-glikozite eşdeğer) olarak tespit edilmiştir. Sentez için kullanılan meyve ekstresinde gallik asit, 4-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, kikorik asit, rutin, epikateşin ve apigenin tespit edilmiştir. Sentez için kullanılan yaprak ekstresinde ise gallik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, kikorik asit tespit edilmiş ve miktar tayinleri yapılmıştır. Böylece hem ekstreler hem de sentezlenen ZnONP'ler ile mukoadezif jel formülasyonu hazırlanarak ratlarda oluşturulan aftöz ülserlerde hazırlanan ajanların etkinliği değerlendirilmiştir.

ZnONP'lerin yara iyileştirici etkileri literatürde bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar ZnONP'lerin antienflamatuar ve antibakteriyel etkinliklerini ortaya koymaktadır (435).

ZnONP'ler, aktive edilmiş mast hücrelerinde ve makrofajlarda NF-kB ve kaspaz 1'i inhibe IL-1β ve IL-18 gibi proenflamatuar sitokinlerin üretiminin engellenmesi; p53'ü artırarak ve IL-13, aTH2 sitokini ile birlikte IL-1 ve TNF-α ile ilişkili timik stromal lenfopoietin üretimini azaltarak mast hücresi çoğalmasının

önlenmesi; lipopolisakkarit indüklü COX-2'nin ve uyarılabilir NO sentaz ekspresyonunun bastırılması yollarıyla antienflamatuvar etki göstermektedir (333).

Temel bir mikro besin olarak çinkonun, yara onarımında anahtar rolleri bulunmaktadır. Fibrin pıhtı oluşumuna, hasarlı yanıtın çözülmesine, hücre proliferasyonu, yeniden epitelizasyon, granülasyon ve anjiyogeneze neden olur ve hücre dışı matrisin yeniden modellenmesini sağlarlar (29,30). Yara bölgesine çinko kaynağı sağlayan ZnONP'ler hücreye etkili bir şekilde nüfuz eder ve bağışıklık sistemini modüle ederek terapötik etki sağlarlar. Bazı antibakteriyel etkileri ve yeniden epitelizasyona olan katkıları yara çalışmalarında bildirilmiştir (31). Gao ve arkadaşları cilt yaralarının kapatılması için antimikrobiyal doku yapıştırıcıları olarak ZnONP'leri kullanarak, *S. aureus* ve *E. coli* ile enfekte olmuş yaralarda aljinat/nano-ZnO kompozit bandajlar ile oldukça etkili yara kapanışı sağladığını gözlemlemişlerdir (337). Jin ve arkadaşları ZnO nanorodlarının doku mühendisliği için adiposit türevi kök hücrelerin (ADSC'ler) çoğalmasını arttırdığını bildirmişler (338). ZnO/morina yağının topikal farmasötik formülasyonları, hücresel proliferasyon ve reepithelizasyon oranlarını düzenlemektedir (339). Çinko oksit ve morina karaciğeri yağı kombinasyonunun, kontrol ve sadece bir aktif bileşen içeren formülasyonlardan daha üstün olduğu bulunmuştur. Bu kombinasyonun, tekrarlanan deksametazon tedavisi ile geciktirilmiş yara iyileşmesini hızlandırmada da oldukça etkili olduğu bulunmuştur (339). Ayrıca, hidrojel bazlı yara örtülerine dahil edildiğinde, toplam temas süresinin arttığı, keratinosit göçünü teşvik ederek yeniden epitelizasyonu iyileştirdiği tespit edilmiştir (436).

Yanıkları tedavi etmek için daha iyi bir alternatif sağlamayı ve aynı zamanda ilişkili sepsis insidansını azaltmayı amaçlayan Balaure ve ark., kollajen ve %1 portakal yağı içeren biyolojik olarak emilebilir bir matriste ZnONP içeren yara örtülerinin, yara kapanmasını hızlandırdığını ve hem in vitro hem de *in vivo* olarak bakteri üremesini önlediğini, aynı zamanda mükemmel biyouyumluluk gösterdiğini bulmuşlardır (437).

Sonia ve ark., tarafından yapılan çalışmada *Adhatoda vasica* yaprağı ekstresi ile yeşil sentezlenen ZnONP'ler bir cold krem formülasyonuna ilave edilmiş ve ticari antifungal kremlere direnç gösteren *Candida sp.*'ye karşı önemli inhibitör etki göstermiştir. Bu nedenle, bu çalışma, insan cilt enfeksiyonlarını ve oksidatif stresin

neden olduğu hücresel hasarı önemli ölçüde hafifletebilen, kozmetiklerde umut verici kolloidal ilaç taşıyıcıları olarak ZnONP'lerin kullanımını önermektedir (438).

Metwally ve ark., ise yara kapanması üzerinde kimyasal ve yeşil sentezlenmiş ZnONP'lerin etkinliğini değerlendirmiştir. Histolojik iyileşme skorları, ZnONP içeren jeller ile tedavi edilen gruplarda epitelizasyon skorunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu ve *Lawsonia inermis* aracılı yeşil sentezlenen ZnONP'lerin daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir (439). Irfan ve ark., da benzer şekilde *Acacia modesta* aracılığıyla yeşil sentezledikleri ZnONP'ler ile *E. coli* ve Metisiline dirençli *S. aureus*'a (MRSA) karşı iyi bir antibakteriyel potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuşlar ve sıçanlarda mükemmel yara iyileştirme potansiyeli gösterdiğini tespit etmişlerdir (440). Bu çalışmalardan anlaşıldığı üzere GS yöntemi ile sentezlenen ZnONP'lerin kimyasal yöntemlerle sentezlenen ZnONP'lere göre daha üstün antibakteriyel ve yara iyileştirici etki gösterdiği görülmektedir.

ZnONP'lerin cilt yaraları üzerine etkinliğini gösteren çalışmalar olmasına rağmen ağız yaraları üzerinde etkinliğini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Mou ve ark., periodontitis tedavisinde minosiklin ve ZnONP' içeren serum albümin mikroküreleri hazırlamış ve Carbopol 940 ile hazırlanan hidrojele dahil ederek ratlarda deneysel olarak oluşturulmuş periodontitis modelinde dişeti dokusunun tedavisinde oldukça etkili olduğunu tespit etmişlerdir (441). Her ne kadar ZnONP'lerin oral ülserlerde etkinliğini gösteren bir çalışma bulunmasa da Chaitanya ve ark., %1 çinko oksit içeren doğal kaynaklı bir orabase kremin mukozitis tedavisindeki etkinliğini ortaya koymuştur (442).

Çalışmamızda ise *M. nigra* yaprak ve meyve ekstreleri ile ZnONP yeşil sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha önce Tang ve ark., tarafından *M. nigra* yaprakları ile ZnONP yeşil sentezi yapılmıştır (443). Tang ve ark., *M. nigra* yaprakları ile yaptıkları sentez çalışmasında prekürsör olarak $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ kullanmıştır. Bu çalışmanın karakterizasyon sonuçlarının bulgularımızla uyumlu olduğu görülmektedir. Ancak literatürde *M. nigra* meyve ekstresi ile GS yöntemiyle ZnONP sentezi yapılmamıştır. Bu sebeple uygun sentez yöntemi literatürde daha önce tanımlanan GS yöntemleri modifiye edilerek geliştirilmiştir. Ali ve ark., tarafından rapor edilen çalışmada *Aloe vera* ekstresi kullanarak ZnONP oluşumunda hem konsantrasyon hem de pH varyasyonu incelenmiştir. Bu çalışma sonuçları ZnONP biyosentezi için gereken

optimum pH'ın 8.0-10.0 aralığında olması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu çalışma sonuçları daha düşük pH'ta çekirdeklenme yerine kümelenmenin baskın olduğunu göstermektedir (296). Sıcaklık, NP'lerin boyut, morfolojisi ve sentez oranını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. NP'lerin çeşitli şekilleri (üçgen, oktahedral, küresel ve çubuk benzeri), boyutu ve sentezi sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Sıcaklık arttıkça, reaksiyon hızında ve çekirdeklenme merkezlerinin oluşumunda artış olmaktadır. Reaksiyon sıcaklığının artması ile (50-70 °C), NP'lerin boyutlarının daha tutarlı ve küresel olduğu bulunmuştur (300). Bu sebeple çalışmamızda sentez reaksiyonu yüksek pH=10'da ve 60 °C'de gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan ZnONP'lerin ise karakterizasyonu ve morfolojisi tanımlanmış ve literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

Literatürde aftöz ülser modeli ağız içinde özellikle bukkal mukoza, dişeti ve dil gibi farklı bölgelerde deney hayvan modelleri üzerinde uygulanmıştır. Literatürde çoğu çalışmada ratlarda başta aftöz ülserler olmak üzere travmatik ülser ve mukozitis modellerinin yapımında özellikle bukkal mukozanın tercih edildiği görülmektedir (429). Dişetinde ülser oluşturan çalışmalar bulunsa da ratlarda labial bölgede dişetinin gerek ince ve küçük hacimli olması gerekse uygulama zorluğundan dolayı çalışmamızda aftöz ülser modelinin bukkal mukozada yapılması tercih edilmiştir. Ayrıca bukkal mukozada ülser modelinin uygun alanda rahat uygulanabilmesi ve özellikle ilaç uygulamaları esnasında bu bölgenin korunaklı ve yeterli genişlikte olması bu bölgenin tercih edilme nedenlerindendir. Bununla birlikte, bukkal uygulama yolunun, bukkal mukozal uygulama ile ilişkili düşük akış, emilim bölgesinde dozaj formunun tutulmasının yeme, içme, konuşma ve tükürük salgısı nedeniyle düşük olması gibi dezavantajları da mevcuttur (444). Dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda uygun adeziflikte geliştirilen formülasyonlar bukkal mukozada daha etkin sonuç alabilmek için oldukça önemlidir. Bu bağlamda çalışmamızda, formülasyonların adeziflik ve koheziflik analizleri neticesinde kitosan içeren ve içermeyen formülasyonların adeziflik ve koheziflik oranları arasında belirgin fark görülmemiştir. Ancak Carbopol 934 içeren formülasyonların adeziflik ve koheziflik değerleri diğer formülasyonlara göre belirgin oranda yüksek tespit edilmiştir. Elastiklik/esneklik sonuçlarında numerik değeri en düşük olan formülasyonun elastikiyet kabiliyeti en iyi olarak yorumlanmaktadır (444). Elastiklik açısından sonuçlar değerlendirildiğinde formülasyonlar arasında belirgin bir elastiklik farkı

gözlemlenmemiştir. Sakızımsılık ve çiğnenebilirlik açısından da paralel sonuçlar elde edilmiştir. Viskozite değerinin yüksek olması formülasyonun uygulama alanında kalış süresini etkileyen diğer bir önemli faktördür. Ayrıca bukkal formülasyonlar geliştirilirken asidik ve alkali pH değerine sahip formülasyonlar oral mukozada irritasyona sebebiyet verme olasılığı yüzünden hazırlanan formülasyonların daha çok nötral pH'da olması istenmektedir. Hazırlanan ekstre yüklü olmayan formülasyonlar dikkate alındığında kitosan eklenmiş formülasyonların pH değerlerinin asidik pH'da olduğu ve kitosan eklenmemiş diğer formülasyonlar dikkate alındığında ise pH değerlerinin nötral pH'ya yakın oldukları için ağız içi uygulamaya daha uygun oldukları görülmüştür. Hem pH sonuçları hem de viskozite sonuçları değerlendirildiğinde C10 numaralı formülasyon ideal olarak belirlenmiştir. Bu sebeple C10 formülasyonlarına ekstreler yüklenmiştir.

Koyun bukkal mukozası ile yapılan *ex-vivo* analizlerin sonucunda da formülasyonlarda en yüksek biyoadezif etki C10 kodlu formülasyonda bulunmuştur. Yaprak ekstresi yüklü formülasyon en yüksek biyoadezif işi göstermiş olmakla beraber nanopartikül yüklü ekstreler daha düşük biyoadezif iş göstermiştir. Her ne kadar biyoadezif iş bakımından ekstreler ve ZnONP'ler arasında farklılık olsa da terapötik etkinlik bakımından bir farklılık görülmemiştir.

Çalışmamızda deneysel metot daha önce Karavana ve ark., Vilela-Goulart ve ark., Lim ve ark., Fujisawa ve ark.'nın ve Vuletic ve ark., çalışmalarında uyguladıkları aftöz ülser oluşturma yöntemler modifiye edilerek oluşturulmuştur (427-430).

Literatürde aftöz ülserlerin herhangi bir tedavi uygulamadan yaklaşık olarak 12-17 gün arasında kendiliğinden iyileştiği belirtilmektedir (430). Bu durumda erken dönemdeki iyileşme süreci oldukça önem arz etmektedir. Karavana ve arkadaşları da tavşanlarda aftöz ülser modelinde yaptıkları çalışmalarında 3., 6., 9. ve 12. günlerdeki iyileşmeyi araştırmış ve 12. günde kontrol grubunda deney gruplarına benzer bir iyileşme olduğunu gözlemlemiştir. Ancak daha erken günlerde tedavi gruplarındaki iyileşme skorlarında belirgin farklılık bulmuşlardır (427,431). Ayrıca klinik açıdan hastalarda bir an önce şiddetli ağrılı olan sürecin hızlı iyileşmesi, hızlı semptomatik rahatlama sağlanması tedavi sürecinin başarısı açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda 3., 6. ve 9. gün uygulanan tedavilerin etkinliği incelenmiştir. Deneyde kullanılacak ratlar; kontrol grubu, jel bazı ile tedavi edilen grup, meyve

ekstresi içeren jel, yaprak ekstresi içeren jel, meyve ekstresi aracılığıyla sentezlenen ZnONP içeren jel, yaprak ekstresi aracılığıyla sentezlenen ZnONP içeren jel olmak üzere 6 ana gruba ayrılmıştır. Daha sonrasında ise bu gruplar 3., 6. ve 9.gün grupları olarak 3 alt gruba ayrılmıştır.

Çalışmamızda ilk olarak gruplardaki deneklerin sakrifikasyon günlerinde tartımları yapılarak kilo kayıpları kaydedildi. Kilo kaybı, ağız içerisinde yer alan yaralar nedeniyle deneklerin beslenemediklerini gösterdiği için önemli bir parametredir. Deneklerin beslenmeleri, hissettikleri ağrı ve oluşan yaranın şiddeti arttıkça azalmaktadır. Tüm günlerde en fazla kilo kaybı K ve B gruplarında görüldü. Tedavi gruplarında ise kilo kaybının oldukça düşük olduğu ve sayısal olarak birbiri ile benzer değerlerde olduğu görüldü.

İnsanlarda oluşan aftöz ülserlerin, oral mukozanın belirli bölgelerine karşı artan immünolojik reaksiyona yanıt olarak geliştiği bilinmektedir (102-105). Bu reaksiyon, belirli immün süreçleri aktive eden ve uygun olmayan şekilde başlatılan sitokinler dizisinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (102,104). RAS'lı hastalarda, viral/ bakteriyel antijenler, travma, stres gibi henüz tam olarak tanımlanmamış bir tür tetikleyici etkene yanıt olarak bağışıklık sisteminin işlevinin bozulduğu tespit edilmiştir. Literatürde pek çok çalışma RAS gelişiminde otoimmunizasyonun rolünü vurgulamaktadır (94,106,107). RAS patogenezinde hümoral ve hücre-aracılı her iki tip bağışıklık tepkisinin bozulduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (34). Bu nedenle, RAS hastalarında immünolojik yanıtın mekanizmasını belirlemek için bu hastalarda sitokin profilini tanımlamak gerektiği vurgulanmaktadır. IL–2 ve TNF-α proinflamatuar sitokinlerinin RAS'ın aktif basamağında rol alarak remisyon süresini azalttığı, IL-10 antienflamatuar sitokininin ise iyileşme sürecinde epitel proliferasyonunu stimüle ettiği tespit edilmiştir. Bu sebeple IL-10 seviyesinin düşmesi ve özellikle travma sonrasında daha düşük seviyede IL-10 üretimi epitelizasyonu geciktirmekte ve ülserlerin iyileşme süresinin uzamasına neden olmaktadır (110). Benzer şekilde, Albanidou-Farmaki ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, RAS hastalarının periferik kanında sağlıklı kontrollere kıyasla proinflamatuar sitokinler (IL-2, IL-12 ve IFN-c) üretebilen T lenfositlerinin sayısının arttığını ve IL-10 üreten hücre sayısının ise azaldığı tespit edilmiştir (108). Bu bağlamda aftöz ülser tedavisinde uygulanacak ajandan iyi bir antienflamatuar aktivite göstermesi ve TNF-

α, IL-1β, IL-2, IL-6 gibi proenflamatuar sitokinlerin seviyesini düşürürken; IL-10 gibi antienflamatuar sitokinlerin seviyesini ise artırması beklenmektedir.

Ayrıca çok sayıda veri, oksidatif stresin RAS'ın ilerlemesinde aktif rol oynadığını göstermekte dolayısıyla tedavi amacıyla geliştirilecek bir ajanın reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini azaltması yani iyi bir antioksidan olması gerektiğini düşündürmektedir. Aktif oral lezyonları olan hastalarda, RAS'ın remisyon aşamasındaki hastalara ve sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek pro-oksidan belirteç seviyelerinin olması bu fikri desteklemektedir (445,446). Bu nedenle, jel içinde formüle edilmiş güçlü bir antioksidan ajan olan *M. nigra* ekstrelerinin ve ZnONP'lerin oksidatif stresi azaltarak oral mukozadaki iyileşme sürecini hızlandırarak etkin bir iyileşme sağlayacağı düşünülmüştür.

Çalışmamızda da uygulanan tedavilerin antienflamatuar özelliklerini ve sitokin profilini tanımlamak amacıyla TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10 düzeyleri hem dokuda hem de serum örneklerinde incelenmiştir. Ayrıca doku örneklerinde antioksidan profilini belirlemek amacıyla TAS, TOS, GSH ve NO seviyeleri de ölçülmüştür. *M. nigra* ekstrelerinin antioksidan ve antienflamatuar etkileri pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Ancak ZnONP'lerin antienflamatuar etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Özellikle enflamatuar hastalıklarda sitokin profili üzerine etkilerini gösteren çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

Gad ve ark., romatoid artrit modelinde, ZnONP'lerin adjuvan kaynaklı artan enflamatuar mediatörlerin IL-1β, TNF-α ve toplam lökosit sayısının üretimini azalttığını göstermiştir (447). Çalışmamızda TNF-α değerleri incelendiğinde tüm tedavi gruplarında, K ve B grubuna göre seviyelerin anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir. Özellikle ilk üç gündeki kısa dönemli iyileşme incelendiğinde YNP grubunda serum TNF-α seviyesinin tüm gruplara göre anlamlı derecede daha düşük olduğu görülürken; doku örneklerinde diğer gruplar ile arada anlamlı farklılık olmasa da yine en düşük TNF-α seviyesi YNP grubunda tespit edildi. ZnONP gruplarının 3. ve 6. tedavi günlerinde serum TNF-α seviyelerinin ekstre gruplarına göre anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edildi. 3. gün ve 6. gün histoloji sonuçları da iyileşme bulgularını destekledi ve ilk günlerde en iyi iyileşme skorlarının YNP ve MNP gruplarında olduğu tespit edildi. Bu durum MNP ve YNP gruplarının ekstrelere göre daha yüksek antienflamatuar etki göstermesinden kaynaklanıyor olabilir. Y

grubunda M grubuna göre doku örneklerinde benzer sonuçlar elde edilse de serum örneklerinde tüm tedavi günlerinde daha düşük TNF-α seviyeleri gözlendi. Bu sonuçların yaprak ekstrelerinin içeriğinde daha yüksek oranda bulunan klorojenik asit ve rutin miktarından kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

TNF-α, IL-1 β, IL-2 gibi proinflamatuar sitokinlerin özellikle 3. günde hem doku hem de serum örneklerinde K ve B gruplarında oldukça yüksek tespit edilirken M, Y, MNP ve YNP gruplarında anlamlı derecede daha düşük tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar *M. nigra* ve GS yöntemi ile sentezlenen ZnONP'lerin antienflamatuar özelliklerini desteklemektedir. Mohammad ve ark., *Hyssops officinalis* L. ekstreleri ile sentezledikleri ZnONP'lerin farelerde oluşturulan pençe ödeminde IL-1β genlerinin ekspresyon seviyeleri azaltırken, IL-10 seviyelerini artırdığını tespit etmiştir (448). Le ve ark., yaraları ucuz ve etkili bir şekilde tedavi edebilecek UV filtreleme özelliği de olan ZnONP'ler ile hidrokolloidler hazırlamış ve sıçanlarda yara modeli üzerinde etkinliğini değerlendirmişlerdir. 10 günlük tedavi sonrasında ZnONP'ler ile kaplanmış hidrokolloid yara örtüsünün makroskopik ve mikroskobik olarak yara iyileşme hızını artırdığını ve enflamasyon aşamasında proinflamatuar sitokinleri (IL-8, TNF-α, MCP-1, IL-6, IL-1β ve M1) %50'ye kadar azaltarak yara iyileşmesini hızlandırdığını tespit etmişlerdir (449). Literatürdeki bu sonuçlara benzer şekilde hem doku hem de serum örneklerinde uygulanan jel tedavileri, proinflamatuar sitokinlerin (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8) seviyesini düşürürken; antienflamatuar sitokin IL-10 seviyesini artırmıştır. IL-10 antienflamatuar sitokini iyileşme sürecinde epitel proliferasyonunu stimüle etmektedir. Bu sebeple IL-10 seviyesinin dokuda ve serumda düşmesi, özellikle travma sonrasında daha düşük seviyede IL-10 üretimi epitelizasyonu geciktirir ve ülserlerin iyileşme süresinin uzamasına neden olur (110). 3. günde M, Y, MNP ve YNP gruplarında IL-10 seviyeleri hem dokuda hem de serum örneklerinde K ve B grubuna göre anlamlı derecede daha yüksekti. YNP grubunda 3.gün serum örneklerinde IL-10 seviyeleri tüm gruplara göre anlamlı derecede daha yüksekti. YNP ve MNP grubunda 6.güne kadar daha yüksek olan IL-10 seviyeleri ile ilişkili olarak bu gruplarda epitelizasyon da diğer gruplara göre daha erken tamamlanmıştır. 6.günden sonra Y, M, MNP ve YNP gruplarının hem doku hem de serum örneklerinde IL-10 seviyelerinde düşüş gözlenirken K ve B gruplarında artış gözlenmiştir. K ve B gruplarında iyileşmenin gecikmesi nedeniyle IL-10 seviyelerinin 6.günden sonra yükseldiği düşünülmektedir. 6.günde YNP ve MNP grubundaki tüm

deneklerin, Y ve M grubunda ise deneklerin çoğunun histolojik bulgularında enflamatuar reaksiyonun azaldığı ve epitelizasyonun başladığı görülmektedir. Yani histolojik bulgular da mevcut enflamasyon sonuçlarını desteklemektedir. Ekstre gruplarında enflamasyon süresinin kısalması ve iyileşmenin hızlanması içerikte bulunan klorojenik asit, rutin gibi bileşiklere atfedilebilir.

M. nigra'nın hem meyve hem de yaprak ekstrelerinin yüksek antioksidan etkisi literatürde pek çok kez kanıtlanmıştır. GS yöntemi ile sentezlenen ZnONP'lerin düşük dozlarda antioksidan etkinliklerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Abdelbaky ve ark., *Pelargonium odoratissimum* L. yaprak ekstresi aracılığı ile ZnONP sentezlemişler ve antioksidan, antibakteriyel ve antienflamatuar özelliklerini incelemişlerdir. Sonuçlar sentezlenen ZnONP'lerin antioksidan, antibakteriyel ve üstün antienflamatuar aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (450). Erfani Majd ve ark., ZnONP'lerin sisplatin kaynaklı oksidatif strese ve sıçanların hipokampüsündeki doku hasarına karşı potansiyel koruyucu ve antioksidan aktivitelerini araştırmıştır. GS ile sentezlenen ve kimyasal olarak sentezlenen ZnONP'lerin etkinliklerini karşılaştırmış ve sıçanlarda sisplatinin neden olduğu oksidatif strese ve sıçan hipokampusundaki doku hasarına karşı GS ile sentezlenen ZnONP'lerin daha fazla potansiyel koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (451). Çalışmamızda antioksidan parametreler incelendiğinde, M, Y, MNP ve YNP gruplarında TAS ve GSH seviyelerinin K ve B gruplarına göre tüm günlerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Özellikle iyileşmenin ilk günlerinde istatistiksel olarak anlamlı derece daha yüksek bulunmuştur. TOS seviyeleri ise M, Y, MNP ve YNP gruplarında 3.ve 6.günlerde K ve B grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NO seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu olup uygulanan tedavilerin antienflamatuar özelliklerinin yanı sıra antioksidan özelliklerini de ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda aftöz ülser modeli indüklendikten sonra yoğun bir enflamasyon ve oksidasyon sürecinin başladığı ve bu sürecin K ve B gruplarında diğer gruplara göre daha uzun sürdüğü görülmektedir. Enflamasyon sürecinin uzaması iyileşmeyi de geciktirmiştir. Asit ile indüklenen yara modelinde öncelikli olarak pre-ülseratif süreç oluşmaktadır. Bu süreç aslında klinik olarak hastalarda görülen eritem ve ödemin mevcut olduğu süreçtir. Henüz tam olarak ülserleşme gerçekleşmese de histolojik

olarak, lenfositler artık bazal epitel tabakalarına girmiştir ve epitel hücrelerinin ölümüne ve ülseratif aşamaya ilerlemeye yol açacak sitotoksik süreci başlatmıştır. Bu süreçte uygulanmaya başlanan tedavi aslında şiddetli ülserleşmenin önüne geçmektedir. Bu sebeple tedavi amaçlı uygulanan M, Y, MNP ve YNP gruplarında K ve B gruplarına göre iyileşme erken başladığı gibi ülserleşmenin de K ve B gruplarındaki gibi şiddetlenmesinin de önüne geçilmiştir. 3 günlük kısa süreli tedavi sürecinde bile M, Y, MNP ve YNP gruplarının histolojik açıdan iyileşme bulguları yeni kılcal damarlanmanın başladığını, enflamatuar reaksiyonun azaldığını göstermektedir. Deneklerin fotoğrafları ve histoloji bulguları incelendiğinde 9. günün sonunda özellikle MNP ve YNP gruplarında tüm deneklerde epitelizasyonun ve iyileşmenin tamamlandığı görülmektedir.

Vuletic ve ark., *Galium verum* ekstresi kullanarak mukoadezif jel formülasyonu hazırlamış ve ratlarda çalışmamıza benzer şekilde indüklenen oral ülserlerde etkinliğini değerlendirmiştir. Yazarlar çalışmalarında çalışmamıza benzer şekilde aynı histolojik skorlama ile değerlendirme yapmış ve *Galium verum* ekstresi içeren jellerin bir haftalık tedavide kontrol ve boş jel grubuna göre deney gruplarında anlamlı derecede histolojik olarak daha iyi iyileşme sağladığını belirtmiştir (429). Vuletic ve ark., *G. verum* ekstresi içeren jelin oral yara iyileşmesi üzerinde görülen etkiyi, ekstrede bulunan rutin, *p*-kumarik asit, kersetin ve klorojenik, kafeik ve gallik asit gibi bileşiklerin sinerjik aktivitesine bağlamışlardır (429). Bizim çalışmamızda da benzer bileşenlerin ekstrelerde farklı oranlarda bulunduğu tespit edilmiş ve benzer şekilde iyileşmeye katkı sağlamıştır.

Çalışmamız ile aynı histolojik değerlendirmenin yapıldığı başka bir çalışmada ise Ayoub ve ark., *M. nigra* gibi halk arasında ağız sağlığı için sıklıkla kullanılan başka bir bitki olan *Salvadora persica*'nın etil asetat ekstresi ile mukoadezif jel formülasyonu hazırlamışlardır. Ancak bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak oral ülser modeli ratların dillerinde oluşturulmuştur. Bu çalışmada dil ülseri indüksiyonunun 7. ve 14. günlerinde kontrol grubuna kıyasla üstün iyileşme gözlenmiştir. Ayrıca, IL-6 ve TNF-α ekspresyonu inhibe edilmiş güçlü antienflamatuar aktivite görülmüştür. Tez çalışmamıza benzer şekilde bu çalışmada da *Salvadora persica* tedavi alan grupta redükte GSH seviyelerinde artış görülmüştür (452). Ancak dil bölgesinde oluşturulan ülser modellerinin ilaç uygulanması ve ilacın

kalıcılığı açısından bazı dezavantajları vardır. Çünkü aftöz ülserlerin dil yüzeyinden ziyade bukkal mukoza, dudak mukozası, dilin lateral kısımları ve ağız tabanında daha çok görülmesi nedeni ile bu bölgenin aftöz ülser modeli oluşturmak için çok uygun bir bölge olmadığını düşünmekteyiz.

Literatürde *M. nigra* ekstrelerinin ya da ZnONP'lerin aftöz ülserlerde iyileşme üzerine etkinliğini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak Rezazadeh ve ark., gümüş nanopartiküllerin oral ülserler üzerine etkinliğini mukoadezif jel formülasyonu ile değerlendirmiştir. Histolojik olarak enflamasyon ve yara boyutunda 3. ve 7.günlerde yani kısa dönemli iyileşmede kontrol ve boş jel grupları ile gümüş nanopartikül grubu arasında anlamlı farklılık olmadığı ancak 14.günde iyileşmenin daha belirgin olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak bu çalışmada uygulanan ülser modeli çalışmamızdaki gibi asit ile indüklenmemiş punch ile palatinal defekt oluşturulmuştur. Her ne kadar gümüş NP'ler güçlü antimikrobiyal etkilere sahip olsalar da ağız yaralarında çalışmamız ile kıyaslandığında iyileşmenin ZnONP'ler ile uygulanan tedaviye göre daha geç gerçekleştiği görülmektedir. Ancak bu durum uygulanan deneysel metodun bir sonucu olarak da ortaya çıkmış olabilir (453).

Çalışmamız ZnONP'lerin ve ayrıca geleneksel olarak ağız hastalıklarında sıklıkla tercih edilen *M. nigra* ekstrelerinin de aftöz ülserlerde jel formunda koruyucu ve tedavi edici etkinliğini ortaya koyan ilk çalışmadır. Meyve ekstresi, yaprak ekstresi ve sentezlenen nanopartiküllerin jellerinin hepsi hem biyokimyasal hem de histolojik parametreler açısından iyileşmeyi hızlandırmıştır. Histolojik skorlama açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmasa da MNP ve YNP gruplarındaki iyileşmenin M ve Y gruplarına göre daha iyi düzeyde olduğu tespit edildi. Ayrıca enflamatuar ve antioksidan parametrelerinin tamamının genel olarak değerlendirildiğinde özellikle kısa süreli tedavi sürecinde yine MNP ve YNP gruplarında M ve Y grubuna göre daha iyi olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar GS yöntemi ile bitkisel ekstre aracılı sentezlenen NP'lerin ekstrelerden daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu durum jelin yapısı, tedavi uygulanan ratların bireysel fizyolojik özellikleri ve ekstrelerin içerikleri gibi birbirinden bağımsız pek çok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir. Formülasyonlardaki bitkilerin aktif bileşiklerinin, daha yüksek antienflamatuar, antioksidan etki gösterdiği; hücre hasarını ve ülserleşmeyi önlediğini ve iyileşmeyi

hızlandırdığını söylemek mümkündür. Görülen antienflamatuar, antioksidan ve yara iyileştirici etki meyve ekstresinde yüksek antosiyanin içeriği, rutin, klorojenik asit ve kersetine; yaprak ekstresinde ise klorojenik asit ve rutin varlığına atfedilebilir. Her iki ekstrenin majör bileşeni olarak tespit edilen klorojenik asitin yanı sıra *p*-kumarik asit ve kafeik asit gibi ekstrelerde bulunan diğer bileşenlerin seçici COX-2 inhibitörü olarak yüksek antienflamatuar özellikleri literatürde tanımlanmıştır (454). Çalışma sonuçları her iki ekstrenin de farmakolojik etkilerini doğrulamaktadır. Ayrıca ZnONP'lerin yeşil sentezi ve yüksek yara iyileştirici, antienflamatuar ve antioksidan etkileri sentezde kullanılan meyve ekstrelerindeki antosiyaninler, klorojenik asit ve rutin; yaprak ekstrelerinde ise klorojenik asit, kafeik asit ve kikorik asit bileşenlerine atfedilebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamız, *M. nigra* yaprak ve meyve ekstreleri ile geliştirilen jel formülasyonları bu ekstrelerin halk arasında geleneksel olarak aftöz ülserlerde kullanımını destelemekte ve deneysel aftöz ülser modelinde terapötik etkinliğini biyokimyasal ve histolojik olarak ortaya koymaktadır. Bu çalışma *M. nigra* ekstrelerinin jel formunda aftöz ülser modelinde antienflamatuar, antioksidan ve yara iyileştirici etkilerini ortaya koyan ilk çalışmadır. Ayrıca *M. nigra* ekstrelerinden GS yöntemiyle sentezlenen ZnONP'lerin aftöz ülserler üzerindeki etkinliği de ilk kez gösterilmiştir.

Yara iyileştirici etkileri bilinen ZnONP'lerin antienflamatuar ve antioksidan etkileri doğrulanmış ve aftöz ülserler üzerinde de oldukça iyi bir iyileşme sağladığı görülmüştür. *M. nigra* ekstrelerinden ve sentezlenen ZnONP'lerden ağız mukozasında kullanıma uygun, daha ileri çalışmalar ile desteklendiğinde klinik kullanıma uyarlanabilir mukoadezif jeller geliştirilmiş ve özellikle mevcut olarak tedavide kullanılan ilaçlara alternatif olabilecek düzeyde, çok yönlü etkinlik sağlayabileceği ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçların literatüre katkılarının yanı sıra daha ileri klinik çalışmalar ile desteklenerek doğal kaynaklı yeni terapötik ajanlar veya geleneksel ve bitkisel tıbbi ürün (GBTÜ) geliştirilmesine de katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Femiano, F., Lanza, A., Buonaiuto, C., Gombos, F., Nunziata, M., Piccolo, S., et al. (2007). Guidelines for diagnosis and management of aphthous stomatitis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 26 (8), 728-732. https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31806215f9
2. Rogers, R. S. (1997). Recurrent aphthous stomatitis: Clinical characteristics and associated systemic disorders. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 16 (4), 278-283. https://doi.org/10.1016/S1085-5629(97)80017-X
3. Scully, C., Gorsky, M., Lozada-Nur, F. (2002). Aphthous ulcerations. *Dermatologic Therapy*, 15 (3), 185-205. https://doi.org/10.1046/J.1529-8019.2002.01528.X
4. Ślebioda, Z., Krawiecka, E., Szponar, E., Dorocka-Bobkowska, B. (2018). Haematinic deficiencies and patient clinical profiles in Polish patients with recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 47 (5), 531-537. https://doi.org/10.1111/jop.12703
5. Akintoye, S. O., Greenberg, M. S. (2014). Recurrent aphthous stomatitis. *Dental clinics of North America*, 58 (2), 281–297. https://doi.org/10.1016/j.cden.2013.12.002
6. Oberoi, S. S., Dhingra, C., Sharma, G., Sardana, D. (2015). Antibiotics in dental practice: how justified are we. *International dental journal*, 65 (1), 4-10. https://doi.org/10.1111/idj.12146
7. Rodrigues, F., Lehmann, M., do Amaral, V. S., Reguly, M. L., de Andrade, H. H. (2007). Genotoxicity of three mouthwash products, Cepacol, Periogard, and Plax, in the Drosophila wing-spot test. *Environmental and molecular mutagenesis*, 48 (8), 644-649. https://doi.org/10.1002/em.20332
8. Hotwani, K., Baliga, S., Sharma, K. (2014). Phytodentistry: Use of medicinal plants. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11 (4), 233-251. https://doi.org/10.1515/jcim-2013-0015
9. Ercisli, S., Orhan, E. (2007). Chemical composition of white (Morus alba), red (Morus rubra) and black (Morus nigra) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103 (4), 1380-1384. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.054
10. Oki, T., Kobayashi, M., Nakamura, T., Okuyama, A., Masuda, M., Shiratsuchi, H., et al. (2006). Changes in radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation. *Journal of Food Science*, 71 (1), C18-C22. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb12382.x
11. Lim, S. H., Choi, C. I. (2019). Pharmacological Properties of Morus nigra L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. *Nutrients*, 11 (2), 437. https://doi.org/10.3390/nu11020437
12. Kelkar, S. M., Bapat, V. A., Ganapathi, T. R., Kaklij, G. S., Rao, P. S., Heble, M. R. (1996). Determination of hypoglycemic activity in Morus indica L. (mulberry) shoot cultures. *Current Science*, 71 (1), 71-72.
13. Andallu, B., Suryakantham, V., Lakshmi Srikanthi, B., Reddy, G. K. (2001). Effect of mulberry (Morus indica L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 314 (1-2), 47-53. https://doi.org/10.1016/s0009-8981(01)00632-5
14. Negro, C., Aprile, A., De Bellis, L., Miceli, A. (2019). Nutraceutical Properties of Mulberries Grown in Southern Italy (Apulia). *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8 (7), 223. https://doi.org/10.3390/antiox8070223
15. Chen, H., Yu, W., Chen, G., Meng, S., Xiang, Z., He, N. (2017). Antinociceptive and Antibacterial Properties of Anthocyanins and Flavonols from Fruits of Black and Non-Black Mulberries. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23 (1), 4. https://doi.org/10.3390/molecules23010004
16. Liu, X., Xiao, G., Chen, W., Xu, Y., Wu, J. (2004). Quantification and Purification of Mulberry Anthocyanins with Macroporous Resins. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2004 (5), 326-331. https://doi.org/10.1155/S1110724304403052
17. Du, Q., Zheng, J., Xu, Y. (2008). Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (5), 390-395. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.02.007.
18. Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of ethnopharmacology*, 75 (2-3), 95-115. https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00399-8
19. Azaizeh, H., Saad, B., Khalil, K., Said, O. (2006). The state of the art of traditional arab herbal medicine in the eastern region of the mediterranean: a review. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 3 (2), 229-235. https://doi.org/10.1093/ecam/nel034
20. Abdul Salam, H., Sivaraj, R., Venckatesh, R. (2014). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from Ocimum basilicum L. var. purpurascens Benth.-Lamiaceae leaf extract. *Materials*

Letters, 131, 16-18. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.05.033.
21. Yuvakkumar, R., Suresh, J., Nathanael, A. J., Sundrarajan, M., Hong, S. I. (2014). Novel green synthetic strategy to prepare ZnO nanocrystals using rambutan (Nephelium lappaceum L.) peel extract and its antibacterial applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 41, 17-27. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.025
22. Agarwal, H., Venkat Kumar, S., Rajeshkumar, S. (2017). A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach. *Resource-Efficient Technologies*, 3 (4), 406-413. https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.03.002.
23. Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M., Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Annadurai, G., et al. (2013). Fruit-mediated synthesis of silver nanoparticles using Vitis vinifera and evaluation of their antimicrobial efficacy. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3, 67. https://doi.org/10.1186/2193-8865-3-67
24. Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H. C., Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. *Chemosphere*, 71 (7), 1308-1316. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.047
25. Gunalan, S., Sivaraj, R., Rajendran, V. (2012). Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress in Natural Science: Materials International*, 22 (6), 693-700. https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2012.11.015.
26. Pulit-Prociak, J., Chwastowski, J., Kucharski, A., Banach, M. (2016). Functionalization of textiles with silver and zinc oxide nanoparticles. *Applied Surface Science*, 385, 543-553. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.05.167
27. Sangeetha, G., Rajeshwari, S., Venckatesh, R. (2011). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties. *Materials Research Bulletin*, 46 (12), 2560-2566. https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.07.046
28. Elumalai, K., Velmurugan, S., Ravi, S., Kathiravan, V., Adaikala Raj, G. (2015). Bio-approach: Plant mediated synthesis of ZnO nanoparticles and their catalytic reduction of methylene blue and antimicrobial activity. *Advanced Powder Technology*, 26 (6), 1639-1651. https://doi.org/10.1016/j.apt.2015.09.008.
29. Lin, P. H., Sermersheim, M., Li, H., Lee, P., Steinberg, S. M., Ma, J. (2017). Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients*, 10 (1), 16. https://doi.org/10.3390/nu10010016
30. Nethi, S. K., Das, S., Patra, C. R., Mukherjee, S. (2019). Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. *Biomaterials science*, 7 (7), 2652-2674. https://doi.org/10.1039/c9bm00423h
31. Rajendran, N. K., Kumar, S. S. D., Houreld, N. N., Abrahamse, H. (2018). A review on nanoparticle based treatment for wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44, 421-430. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.009.
32. Natah, S. S., Konttinen, Y. T., Enattah, N. S., Ashammakhi, N., Sharkey, K. A., Häyrinen-Immonen, R. (2004). Recurrent aphthous ulcers today: a review of the growing knowledge. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 33 (3), 221-234. https://doi.org/10.1006/IJOM.2002.0446
33. Jurge, S., Kuffer, R., Scully, C., Porter, S. R. (2006). Mucosal disease series. Number VI. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Diseases*, 12 (1), 1-21. https://doi.org/10.1111/J.1601-0825.2005.01143.X
34. Porter, S. R., Leao, J. C. (2005). Review article: oral ulcers and its relevance to systemic disorders. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 21 (4), 295-306. https://doi.org/10.1111/J.1365-2036.2005.02333.X
35. Slebioda, Z., Szponar, E., Kowalska, A. (2013). Recurrent aphthous stomatitis: genetic aspects of etiology. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 30 (2), 96-102. https://doi.org/10.5114/pdia.2013.34158
36. Ślebioda, Z., Szponar, E., Kowalska, A. (2014). Etiopathogenesis of recurrent aphthous stomatitis and the role of immunologic aspects: literature review. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62 (3), 205-215. https://doi.org/10.1007/S00005-013-0261-Y
37. Field, E. A., Allan, R. B. (2003). Review article: oral ulceration--aetiopathogenesis, clinical diagnosis and management in the gastrointestinal clinic. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 18 (10), 949-962. https://doi.org/10.1046/J.1365-2036.2003.01782.X
38. Shashy, R. G., Ridley, M. B. (2000). Aphthous ulcers: A difficult clinical entity. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, 21 (6), 389-393. https://doi.org/10.1053/ajot.2000.18872
39. Letsinger, J. A., McCarty, M. A., Jorizzo, J. L. (2005). Complex aphthosis: a large case series with evaluation algorithm and therapeutic ladder from topicals to thalidomide. Journal of the American Academy of Dermatology, 52 (3 Pt 1), 500-508. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.10.863
40. Boras, V. V., Savage, N. W. (2007). Recurrent aphthous ulcerative disease: presentation and management. *Australian Dental Journal*, 52 (1), 10-15. https://doi.org/10.1111/J.1834-

7819.2007.TB00459.X
41. Stanley, H. R. (1972). Aphthous lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 33 (3), 407-416. https://doi.org/10.1016/0030-4220(72)90470-7
42. Chiang, C. P., Yu-Fong Chang, J., Wang, Y. P., Wu, Y. H., Wu, Y. C., Sun, A. (2019). Recurrent aphthous stomatitis – Etiology, serum autoantibodies, anemia, hematinic deficiencies, and management. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118 (9), 1279-1289. https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.10.023
43. Hernández-Olivos, R., Muñoz, M., Núñez, E., Camargo-Ayala, P. A., Garcia-Huidobro, J., Pereira, A., et al. (2021). Salivary proteome of aphthous stomatitis reveals the participation of vitamin metabolism, nutrients, and bacteria. *Scientific reports*, 11 (1), 15646. https://doi.org/10.1038/s41598-021-95228-8
44. Aynali, G., Ozkan, M., Aynali, A., Ceyhan, B., Armağan, H., Yarıktaş, M., et al. (2013). The evaluation of serum vitamin B12, folic acid and hemoglobin levels in patients with recurrent minor aphthous stomatitis. *Kulak Burun Boğaz Ihtisas Dergisi : KBB = Journal of Ear, Nose, and Throat*, 23 (3), 148-152. https://doi.org/10.5606/kbbihtisas.2013.64426
45. Compilato, D., Carroccio, A., Calvino, F., Di Fede, G., Campisi, G. (2010). Haematological deficiencies in patients with recurrent aphthosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 24 (6), 667-673. https://doi.org/10.1111/J.1468-3083.2009.03482.X
46. Lopez-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Martos, N. (2014). Hematological study of patients with aphthous stomatitis. *International Journal of Dermatology*, 53 (2), 159-163. https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05751.x
47. Xu, K., Zhou, C., Huang, F., Duan, N., Wang, Y., Zheng, L., et al. (2021). Relationship between dietary factors and recurrent aphthous stomatitis in China: a cross-sectional study. *The Journal of international medical research*, 49 (5), 3000605211017724. https://doi.org/10.1177/03000605211017724
48. Piskin, S., Sayan, C., Durukan, N., Senol, M. (2002). Serum iron, ferritin, folic acid, and vitamin B12 levels in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 16 (1), 66-67. https://doi.org/10.1046/J.1468-3083.2002.00369.X
49. Bao, Z. X., Yang, X. W., Shi, J., Liu, L. X. (2016). Serum zinc levels in 368 patients with oral mucosal diseases: A preliminary study. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 21 (3), e335-e340. https://doi.org/10.4317/MEDORAL.21079
50. Ozturk, P., Belge Kurutas, E., Ataseven, A. (2013). Copper/zinc and copper/selenium ratios, and oxidative stress as biochemical markers in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 27 (4), 312-316. https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2013.04.002
51. Namrata, M., Abilasha, R. (2017). Recurrent aphthous stomatitis. *International Journal of Orofacial Biology*, 1 (2), 43-47. https://doi.org/10.4103/IJOFB.IJOFB_14_17
52. Wray, D., Graykowski, E. A., Notkins, A. L. (1981). Role of mucosal injury in initiating recurrent aphthous stomatitis. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 283 (6306), 1569-1570. https://doi.org/10.1136/BMJ.283.6306.1569
53. Tohidinik, H. R., Rodríguez, A., Regueira-Méndez, C., Takkouche, B. (2021). Sleep quality and risk of recurrent aphthous ulcers: A Spanish cohort study. *Oral diseases*, Advance online publication. https://doi.org/10.1111/odi.13955
54. Al-Omiri, M. K., Karasneh, J., Alhijawi, M. M., Zwiri, A. M. A., Scully, C., Lynch, E. (2015). Recurrent aphthous stomatitis (RAS): A preliminary within-subject study of quality of life, oral health impacts and personality profiles. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 44 (4), 278-283. https://doi.org/10.1111/jop.12232
55. Gallo, C. de B., Mimura, M. A. M., Sugaya, N. N. (2009). Psychological stress and recurrent aphthous stomatitis. *Clinics*, 64 (7), 645-648. https://doi.org/10.1590/S1807-59322009000700007
56. Gavic, L., Cigic, L., Biocina Lukenda, D., Gruden, V., Gruden Pokupec, J. S. (2014). The role of anxiety, depression, and psychological stress on the clinical status of recurrent aphthous stomatitis and oral lichen planus. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 43 (6), 410-417. https://doi.org/10.1111/jop.12148
57. Polat, C., Düzer, S., Ayyıldız, H., Seç, S., Aksoy, N., Sakallıoğlu, Ö., et al. (2018). Association Between Anxiety, Depression, and Salivary Cortisol Levels in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. *Turkish Archives of Otorhinolaryngology*, 56 (3), 166-169. https://doi.org/10.5152/tao.2018.3242
58. Andrews, V. H., Hall, H. R. (1990). The effects of relaxation/imagery training on recurrent aphthous stomatitis: a preliminary study. *Psychosomatic Medicine*, 52 (5), 526-535. https://doi.org/10.1097/00006842-199009000-00005
59. Yaacob, H. B., Ab Hamid, J. (1985). Use of antidepressants in aphthous ulceration--a clinical experience. *Dental Journal of Malaysia*, 8 (1), 33-38. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3916996/
60. Albanidou-Farmaki, E., Poulopoulos, A. K., Epivatianos, A., Farmakis, K., Karamouzis, M.,

Antoniades, D. (2008). Increased anxiety level and high salivary and serum cortisol concentrations in patients with recurrent aphthous stomatitis. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 214 (4), 291-296. https://doi.org/10.1620/tjem.214.291
61. McCartan, B. E., Lamey, P. J., Wallace, A. M. (1996). Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 25 (7), 357-359. https://doi.org/10.1111/J.1600-0714.1996.TB00278.X
62. Preeti, L., Magesh, K. T., Rajkumar, K., Karthik, R. (2011). Recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 15 (3), 252-256. https://doi.org/10.4103/0973-029X.86669
63. Miller, M. F., Garfunkel, A. A., Ram, C., Ship, I. I. (1977). Inheritance patterns in recurrent aphthous ulcers: twin and pedigree data. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 43 (6), 886-891. https://doi.org/10.1016/0030-4220(77)90081-0
64. Nsamba, C., Kaluskar, S. K. (1986). Inheritance of recurrent aphthous ulceration of the mouth. *Journal of Laryngology and Otology*, 100 (3), 361-362. https://doi.org/10.1017/S0022215100099291
65. Wardhana, Datau, E. A. (2010). Recurrent aphthous stomatitis caused by food allergy. *Acta Medica Indonesiana*, 42 (4), 236-240. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21063045/
66. Tarakji, B., Baroudi, K., Kharma, Y. (2012). The effect of dietary habits on the development of the recurrent aphthous stomatitis. *Nigerian Medical Journal : Journal of the Nigeria Medical Association*, 53 (1), 9-11. https://doi.org/10.4103/0300-1652.99822
67. Hay, K. D., Reade, P. C. (1984). The use of an elimination diet in the treatment of recurrent aphthous ulceration of the oral cavity. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 57 (5), 504-507. https://doi.org/10.1016/0030-4220(84)90308-6
68. Nolan, A., Lamey, P. -J, Milligan, K. A., Forsyth, A. (1991). Recurrent aphthous ulceration and food sensitivity. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 20 (10), 473-475. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1991.tb00406.x
69. Thomas, H. C., Ferguson, A., McLennan, J. G., Mason, D. K. (1973). Food antibodies in oral disease: a study of serum antibodies to food proteins in aphthous ulceration and other oral diseases. *Journal of Clinical Pathology*, 26 (5), 371-374. https://doi.org/10.1136/JCP.26.5.371
70. Wray, D. (1981). Gluten-sensitive recurrent aphthous stomatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 26 (8), 737-740. https://doi.org/10.1007/BF01316864
71. Eversole, Lewis R., Shopper, T. P., Chambers, D. W. (1982). Effects of suspected foodstuff challenging agents in the etiology of recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 54 (1), 33-38. https://doi.org/10.1016/0030-4220(82)90414-5
72. Erdoğan, F. G., Çakır, G. A., Gürler, A., Elhan, A. (2009). Evaluation of Relationship of Oral Aphtae with Nutrition and Some Personal Variables. *TURKDERM-Turkish Archives of Dermatology and Venereology*, 43 (3), 107-111.
73. Alli, B. Y., Erinoso, O. A., Olawuyi, A. B. (2019). Effect of sodium lauryl sulfate on recurrent aphthous stomatitis: A systematic review. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 48 (5), 358-364. https://doi.org/10.1111/JOP.12845
74. Chahine, L., Sempson, N., Wagoner, C. (1997). The effect of sodium lauryl sulfate on recurrent aphthous ulcers: a clinical study. *Compendium of Continuing Education in Dentistry (Jamesburg, N.J. : 1995)*, 18 (12), 1238-1240.
75. Herlofson, B. B., Barkvoll, P. (1994). Sodium lauryl sulfate and recurrent aphthous ulcers. A preliminary study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 52 (5), 257-259. https://doi.org/10.3109/00016359409029036
76. Shim, Y. J., Choi, J. H., Ahn, H. J., Kwon, J. S. (2012). Effect of sodium lauryl sulfate on recurrent aphthous stomatitis: a randomized controlled clinical trial. *Oral Diseases*, 18 (7), 655-660. https://doi.org/10.1111/J.1601-0825.2012.01920.X
77. Tarakji, B., Gazal, G., Al-Maweri, S. A., Azzeghaiby, S. N., Alaizari, N. (2015). Guideline for the diagnosis and treatment of recurrent aphthous stomatitis for dental practitioners. *Journal of international oral health : JIOH*, 7 (5), 74-80. https://doi.org/10.37506/ijfmt.v14i4.11657
78. Atılganoğlu, U., Su, Ö., Turgut Erdemir, A., Şeremet Erdoğan, S., Ufacık, H. (2006). Systemic drugs in the etiology of recurrent aphthous stomatitis. *TURKDERM - Turkish Archives of Dermatology and Venereology*, 40 (2), 60-62.
79. Birek, C., Grandhi, R., McNeill, K., Singer, D., Ficarra, G., Bowden, G. (1999). Detection of Helicobacter pylori in oral aphthous ulcers. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 28 (5), 197-203. https://doi.org/10.1111/J.1600-0714.1999.TB02024.X

80. Gomes, C. C., Gomez, R. S., Zina, L. G., Amaral, F. R. (2016). Recurrent aphthous stomatitis and Helicobacter pylori. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 21 (2), e187-e191. https://doi.org/10.4317/medoral.20872
81. Netto Victória, J. M., Kalapothakis, E., De Fátima, C. S. J., Santiago Gomez, R. (2003). Helicobacter pylori DNA in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 32 (4), 219-223. https://doi.org/10.1034/J.1600-0714.2003.00136.X
82. Albanidou-Farmaki, E., Giannoulis, L., Markopoulos, A., Fotiades, S., Aggouridaki, X., Farmakis, K., et al. (2005). Outcome following treatment for Helicobacter pylori in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Diseases*, 11 (1), 22-26. https://doi.org/10.1111/J.1601-0825.2004.01053.X
83. Karaca, S., Seyhan, M., Senol, M., Harputluoglu, M. M., Ozcan, A. (2008). The effect of gastric Helicobacter pylori eradication on recurrent aphthous stomatitis. *International Journal of Dermatology*, 47 (6), 615-617. https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2008.03667.x
84. Ghodratnama, F., Wray, D., Bagg, J. (1999). Detection of serum antibodies against cytomegalovirus, varicella zoster virus and human herpesvirus 6 in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 28 (1), 12-15. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1999.tb01987.x
85. Pedersen, A., Hornsleth, A. (1993). Recurrent aphthous ulceration: a possible clinical manifestation of reactivation of varicella zoster or cytomegalovirus infection. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 22 (2), 64-68. https://doi.org/10.1111/J.1600-0714.1993.TB00045.X
86. Cağlayan F, Yılmaz A. B. (2009). Rekurrent aftoz stomatitis. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi,* 19, 47-54.
87. McCartan, Bernard E., Sullivan, A. (1992). The association of menstrual cycle, pregnancy, and menopause with recurrent oral aphthous stomatitis: a review and critique. *Obstetrics and Gynecology*, *80* (3 Pt 1), 455-458. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1495706/
88. Donald, P. M., George, R., Sriram, G., Kavitha, B., Sivapathasundharam, B. (2013). Hormonal changes in exfoliated normal buccal mucosal cells. *Journal of Cytology*, 30 (4), 252-256. https://doi.org/10.4103/0970-9371.126655
89. Natah, S. S., Häyrinen-Immonen, R., Hietanen, J., Patinen, P., Malmström, M., Savilahti, E., et al. (2000). Increased density of lymphocytes bearing gamma/delta T-cell receptors in recurrent aphthous ulceration (RAU). *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 29 (5), 375-380. https://doi.org/10.1016/s0901-5027(00)80057-0
90. Winn, D. M. (2001). Tobacco use and oral disease. *Journal of Dental Education*, 65 (4), 306-312. https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2001.65.4.tb03400.x
91. Bittoun, R. (1991). Recurrent aphthous ulcers and nicotine. *The Medical Journal of Australia*, 154 (7), 471-472. https://doi.org/10.5694/J.1326-5377.1991.TB121180.X
92. Sawair, F. A. (2010). Does smoking really protect from recurrent aphthous stomatitis? *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 6, 573. https://doi.org/10.2147/TCRM.S15145
93. Di Meo, N., Bergamo, S., Vidimari, P., Bonin, S., Trevisan, G. (2013). Analysis of diagnostic criteria in adamantiades-behçet disease: a retrospective study. *Indian Journal of Dermatology*, 58 (4), 275-277. https://doi.org/10.4103/0019-5154.113936
94. Lehner, T. (1978). Immunological aspects of recurrent oral ulceration and Behçet's syndrome. *Journal of Oral Pathology*, 7 (6), 424-430. https://doi.org/10.1111/J.1600-0714.1978.TB01613.X
95. Krause, I., Rosen, Y., Kaplan, I., Milo, G., Guedj, D., Molad, Y., et al. (1999). Recurrent aphthous stomatitis in Behçet's disease: clinical features and correlation with systemic disease expression and severity. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 28 (5), 193-196. https://doi.org/10.1111/J.1600-0714.1999.TB02023.X
96. Ferguson, M. M., Wray, D., Carmichael, H. A., Russell, R. I., Lee, F. D. (1980). Coeliac disease associated with recurrent aphthae. *Gut*, 21 (3), 223-226. https://doi.org/10.1136/gut.21.3.223
97. Rutgeerts, P. J. (2011). From aphthous ulcer to full-blown Crohn's disease. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 29 (2), 211-214. https://doi.org/10.1159/000323922
98. Imai, H., Motegi, M., Mizuki, N., Ohtani, H., Komatsuda, A., Hamai, K., et al. (1997). Mouth and genital ulcers with inflamed cartilage (MAGIC syndrome): a case report and literature review. *The American Journal of the Medical Sciences*, 314 (5), 330-332. https://doi.org/10.1097/00000441-199711000-00010
99. Vanoni, F., Theodoropoulou, K., Hofer, M. (2016). PFAPA syndrome: a review on treatment and outcome. *Pediatric rheumatology online journal*, 14 (1), 38. https://doi.org/10.1186/s12969-016-0101-9
100. Nofal, A., Abdelmaksoud, A., Amer, H., Nofal, E., Yosef, A., Gharib, K., et al. (2017). Sweet's

syndrome: diagnostic criteria revisited. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 15 (11), 1081-1088. https://doi.org/10.1111/DDG.13350
101. Dale, D. C., Bolyard, A. A., Aprikyan, A. (2002). Cyclic neutropenia. *Seminars in Hematology*, 39 (2), 89-94. https://doi.org/10.1053/SHEM.2002.31917
102. Borra, R. C., Andrade, P. M., Silva, I. D. C. G., Morgun, A., Weckx, L. L. M., Smirnova, A. S., et al. (2004). The Th1 /Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 33 (3), 140-146. https://doi.org/10.1111/J.0904-2512.2004.00089.X
103. Eversole, L. R. (1994). Immunopathology of oral mucosal ulcerative, desquamative, and bullous diseases. Selective review of the literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 77 (6), 555-571. https://doi.org/10.1016/0030-4220(94)90312-3
104. Lewkowicz, N., Lewkowicz, P., Banasik, M., Kurnatowska, A., Tchórzewski, H. (2005). Predominance of Type 1 cytokines and decreased number of CD4(+)CD25(+high) T regulatory cells in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcerations. *Immunology Letters*, 99 (1), 57-62. https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2005.01.002
105. Lewkowicz, N., Lewkowicz, P., Dzitko, K., Kur, B., Tarkowski, M., Kurnatowska, A., et al. (2008). Dysfunction of CD4+CD25high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 37 (8), 454-461. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00661.x
106. Hietanen, J., Häyrinen-Immonen, R., Al-Samadi, A., Trokovic, N., Koskenpato, K., Konttinen, Y. T. (2012). Recurrent aphthous ulcers--a Toll-like receptor-mediated disease? *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 41 (2), 158-164. https://doi.org/10.1111/J.1600-0714.2011.01064.X
107. Malmström, M., Salo, O. P., Fyhrquist, F. (1983). Immunogenetic markers and immune response in patients with recurrent oral ulceration. *International journal of oral surgery*, 12 (1), 23-30. https://doi.org/10.1016/s0300-9785(83)80076-3
108. Albanidou-Farmaki, E., Markopoulos, A. K., Kalogerakou, F., Antoniades, D. Z. (2007). Detection, enumeration and characterization of T helper cells secreting type 1 and type 2 cytokines in patients with recurrent aphthous stomatitis. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 212 (2), 101-105. https://doi.org/10.1620/tjem.212.101
109. Buño, I. J., Huff, J. C., Weston, W. L., Cook, D. T., Brice, S. L. (1998). Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Archives of dermatology*, 134 (7), 827-831. https://doi.org/10.1001/archderm.134.7.827
110. Bazrafshani, M. R., Hajeer, A. H., Ollier, W. E. R., Thornhill, M. H. (2003). Polymorphisms in the IL-10 and IL-12 gene cluster and risk of developing recurrent aphthous stomatitis. *Oral Diseases*, 9 (6), 287-291. https://doi.org/10.1034/J.1601-0825.2003.00965.X
111. Bazrafshani, M. R., Hajeer, A. H., Ollier, W. E. R., Thornhill, M. H. (2002). IL-1B and IL-6 gene polymorphisms encode significant risk for the development of recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Genes and Immunity*, 3 (5), 302-305. https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363882
112. Pekiner, F. N., Aytugar, E., Demirel, G. Y., Borahan, M. O. (2012). Interleukin-2, interleukin-6 and T regulatory cells in peripheral blood of patients with Behçet's disease and recurrent aphthous ulcerations. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 41 (1), 73-79. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2011.01061.x
113. Taylor, L. J., Bagg, J., Walker, D. M., Peters, T. J. (1992). Increased production of tumour necrosis factor by peripheral blood leukocytes in patients with recurrent oral aphthous ulceration. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 21 (1), 21-25. https://doi.org/10.1111/J.1600-0714.1992.TB00963.X
114. Santis, H. R. (1991). Aphthous stomatitis and its management. *Current Opinion in Dentistry*, 1 (6), 763-768. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1807480/
115. MacPhail, L. (1997). Topical and systemic therapy for recurrent aphthous stomatitis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 16 (4), 301-307. https://doi.org/10.1016/S1085-5629(97)80020-X
116. Manfredini, M., Guida, S., Giovani, M., Lippolis, N., Spinas, E., Farnetani, F., et al. (2021). Recurrent Aphthous Stomatitis: Treatment and Management. *Dermatology practical & conceptual*, 11 (4), e2021099. https://doi.org/10.5826/dpc.1104a99
117. Lau, C. B., Smith, G. P. (2022). Recurrent aphthous stomatitis: A comprehensive review and recommendations on therapeutic options. *Dermatologic therapy*, 35 (6), e15500. https://doi.org/10.1111/dth.15500
118. Al-Na'mah, Z. M., Carson, R., Thanoon, I. A. J. (2009). Dexamucobase: a novel treatment for oral

aphthous ulceration. *Quintessence International (Berlin, Germany : 1985)*, 40 (5), 399–404.
119. Belenguer-Guallar, I., Jiménez-Soriano, Y., Claramunt-Lozano, A. (2014). Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A literature review. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 6 (2), e168-e174. https://doi.org/10.4317/jced.51401
120. Eisen, D., Lynch, D. (2001). Selecting topical and systemic agents for recurrent aphthous stomatitis. *Cutis*, 68 (3), 201-206. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11579786/
121. Sveinsson, S. J., Peter Holbrook, W. (1993). Oral mucosal adhesive ointment containing liposomal corticosteroid. *International Journal of Pharmaceutics*, 95 (1), 105-109. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90396-W
122. Gorsky, M., Epstein, J., Raviv, A., Yaniv, R., Truelove, E. (2008). Topical minocycline for managing symptoms of recurrent aphthous stomatitis. *Special Care in Dentistry*, 28 (1), 27-31. https://doi.org/10.1111/j.1754-4505.2008.00006.x
123. Piacentini, M., Borghetti, R. L., Zancanaro de Figueiredo, M. A., Cherubini, K., Gonçalves Salum, F. (2019). Doxycycline: An option in the treatment of ulcerated oral lesions? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 44 (6), 838-843. https://doi.org/10.1111/JCPT.13022
124. Yarom, N., Zelig, K., Epstein, J. B., Gorsky, M. (2017). The efficacy of minocycline mouth rinses on the symptoms associated with recurrent aphthous stomatitis: a randomized, double-blind, crossover study assessing different doses of oral rinse. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 123 (6), 675-679. https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.02.013
125. Zur, E. (2012). Recurrent aphthous stomatitis: topical treatment with minocycline and other evidence-based agents. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 16 (6), 462-469.
126. Saxen, M. A., Ambrosius, W. T., Rehemtula, A. K. F., Russell, A. L., Eckert, G. J. (1997). Sustained relief of oral aphthous ulcer pain from topical diclofenac in hyaluronan: a randomized, double-blind clinical trial. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 84 (4), 356-361. https://doi.org/10.1016/S1079-2104(97)90031-7
127. Matthews, R. W., Scully, C. M., Levers, B. G. H., Hislop, W. S. (1987). Clinical evaluation of benzydamine, chlorhexidine, and placebo mouthwashes in the management of recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 63 (2), 189-191. https://doi.org/10.1016/0030-4220(87)90310-0
128. Skaare, A., Herlofson, B., Barkvoll, P. (1996). Mouthrinses containing triclosan reduce the incidence of recurrent aphthous ulcers (RAU). *Journal of Clinical Periodontology*, 23 (8), 778-781. https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.1996.TB00609.X
129. Liu, J., Zeng, X., Chen, Q., Cai, Y., Chen, F., Wang, Y., et al. (2006). An evaluation on the efficacy and safety of amlexanox oral adhesive tablets in the treatment of recurrent minor aphthous ulceration in a Chinese cohort: a randomized, double-blind, vehicle-controlled, unparallel multicenter clinical trial. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 102 (4), 475-481. https://doi.org/10.1016/J.TRIPLEO.2005.12.014
130. Altenburg, A., Abdel-naser, M. B., Seeber, H., Abdallah, M., Zouboulis, C. C. (2007). Practical aspects of management of recurrent aphthous stomatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 21 (8), 1019-1026. https://doi.org/10.1111/J.1468-3083.2007.02393.X
131. Prathoshini, M., Jayanth Kumar, V., Ramanathan, V. (2020). Management of recurrent apthous ulcer using Corticosteroids, Local anesthetics and nutritional supplements. *Bioinformation*, 16 (12), 992-998. https://doi.org/10.6026/97320630016992
132. Scully, C., Gorsky, M., Lozada-Nur, F. (2003). The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis: a consensus approach. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 134 (2), 200-207. https://doi.org/10.14219/JADA.ARCHIVE.2003.0134
133. Pakfetrat, A., Mansourian, A., Momen-Heravi, F., Delavarian, Z., Momen-Beitollahi, J., Khalilzadeh, O., et al. (2010). Comparison of colchicine versus prednisolone in recurrent aphthous stomatitis: A double-blind randomized clinical trial. Clinical and investigative medicine. *Medecine clinique et experimentale*, 33 (3), E189-E195. https://doi.org/10.25011/cim.v33i3.13725
134. Sharquie, K. E., Najim, R. A., Abu-Raghif, A. R. (2002). Dapsone in Behçet's disease: a double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *The Journal of Dermatology*, 29 (5), 267-279. https://doi.org/10.1111/J.1346-8138.2002.TB00263.X
135. Altenburg, A., Zouboulis, C. C. (2008). Current concepts in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Skin Therapy Letter*, 13 (7), 1–4. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18839042/
136. Zhou, Y., Chen, Q., Meng, W., Jiang, L., Wang, Z., Liu, J., et al. (2010). Evaluation of penicillin G potassium troches in the treatment of minor recurrent aphthous ulceration in a Chinese cohort: a randomized, double-blinded, placebo and no-treatment-controlled, multicenter clinical trial. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 109 (4), 561-566.

https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.11.006
137. Scully, C., Porter, S. (2008). Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 46 (3), 198-206. https://doi.org/10.1016/J.BJOMS.2007.07.201
138. Chandrasekhar, J., Liem, A. A., Cox, N. H., Paterson, A. W. (1999). Oxypentifylline in the management of recurrent aphthous oral ulcers: an open clinical trial. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 87 (5), 564-567. https://doi.org/10.1016/S1079-2104(99)70134-4
139. Thornhill, M. H., Baccaglini, L., Theaker, E., Pemberton, M. N. (2007). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pentoxifylline for the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Archives of dermatology*, 143 (4), 463-470. https://doi.org/10.1001/archderm.143.4.463
140. Chamani, G., Rad, M., Zarei, M. R., Hashemimanesh, S. R., Abbaszadeh, E., Sadeghi, M. (2016). Effect of levamisole on treatment of recurrent aphthous stomatitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Oral Health and Oral Epidemiology*, 5 (2), 70-77. https://johoe.kmu.ac.ir/article_84839.html
141. Prajapat, J., Prajapat, R., Khanagar, S. B., Vishwanathaiah, S., Naik, S., Jhugroo, C., et al. (2021). Combination of Levamisole with Prednisone in Treating Recurrent Major Aphthous Ulcer in a Young Boy: A Case Report. *Clinics and Practice*, 11 (2), 250-256. https://doi.org/10.3390/CLINPRACT11020038
142. Sharda, N., Shashikanth, M. C., Kant, P., Jain, M. (2014). Levamisole and low-dose prednisolone in the treatment of reccurent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 43 (4), 309-316. https://doi.org/10.1111/JOP.12126
143. Haugeberg, G., Velken, M., Johnsen, V. (2004). Successful treatment of genital ulcers with infliximab in Behcet's disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63 (6), 744-745. https://doi.org/10.1136/ARD.2003.010975
144. Melikoglu, M., Fresko, I., Mat, C., Ozyazgan, Y., Gogus, F., Yurdakul, S., et al. (2005). Short-term trial of etanercept in Behçet's disease: a double blind, placebo controlled study. *The Journal of Rheumatology*, 32 (1), 98-105.
145. Robinson, N. D., Guitart, J. (2003). Recalcitrant, recurrent aphthous stomatitis treated with etanercept. *Archives of dermatology*, 139 (10), 1259-1262. https://doi.org/10.1001/archderm.139.10.1259
146. Erdurak Kılıç, C. S. (2011). Morus nigra L. (Karadut). In Ö. Demirezer (Ed.), *FFD Monografları Tedavide Kullanılan Bitkiler*. Ankara: MN Medikal& Nobel Tıp Kitapevi; 417-421.
147. Budiman, A., Sulastri, A., Qoriah, T. (2018). Chemical Compounds and Pharmacological Activity of Morus Nigra as a Potential Product af Drug: A Review. *International Research Journal of Pharmacy*, 9 (6), 76-81. https://doi.org/10.7897/2230-8407.09693
148. Rodrigues, E. L., Marcelino, G., Silva, G. T., Figueiredo, P. S., Garcez, W. S., Corsino, J., et al. (2019). Nutraceutical and Medicinal Potential of the Morus Species in Metabolic Dysfunctions. *International journal of molecular sciences*, 20 (2), 301. https://doi.org/10.3390/ijms20020301
149. Sánchez-Salcedo, E. M., Mena, P., García-Viguera, C., Martínez, J. J., Hernández, F. (2015). Phytochemical evaluation of white (Morus alba L.) and black (Morus nigra L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. *Journal of Functional Foods*, 12, 399-408. https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.12.010
150. Koyu, H., Kazan, A., Demir, S., Haznedaroglu, M. Z., Yesil-Celiktas, O. (2018). Optimization of microwave assisted extraction of Morus nigra L. fruits maximizing tyrosinase inhibitory activity with isolation of bioactive constituents. *Food Chemistry*, 248, 183-191. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.12.049
151. Maqsood, M., Khan, M. I., Sharif, M. K., Faisal, M. N. (2022). Phytochemical characterization of Morus nigra fruit ultrasound-assisted ethanolic extract for its cardioprotective potential. *Journal of food biochemistry*, e14335. Advance online publication. https://doi.org/10.1111/jfbc.14335
152. Nastić, N., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Švarc-Gajić, J., Segura-Carretero, A. (2018). Optimization of the extraction of phytochemicals from black mulberry (Morus nigra L.) leaves. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 68, 282-292. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.07.055
153. Abbas, G. M., Abdel Bar, F. M., Baraka, H. N., Gohar, A. A., Lahloub, M. F. (2014). A new antioxidant stilbene and other constituents from the stem bark of Morus nigra L. *Natural product research*, 28 (13), 952-959. https://doi.org/10.1080/14786419.2014.900770
154. Abd El-Mawla, A. M., Mohamed, K. M., Mostafa, A. M. (2011). Induction of Biologically Active Flavonoids in Cell Cultures of Morus nigra and Testing their Hypoglycemic Efficacy. *Scientia pharmaceutica*, 79 (4), 951-961. https://doi.org/10.3797/scipharm.1101-15
155. Dai, S. J., Lu, Z. M., Chen, R. Y., Yu, D. Q. (2005). Structure and spectral characteristics of Diels-Alder type adducts from Morus. *Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica*, 40 (10), 876-881.

156. Ferlinahayati, F., Syah, Y., Juliawaty, L., Hakim, E. (2013). Flavanones from the wood of Morus nigra with cytotoxic activity. *Indonesian Journal of Chemistry*, *13*, 205-208. https://doi.org/10.22146/ijc.21277
157. Wang, L., Cui, X. Q., Gong, T., Yan, R. Y., Tan, Y. X., Chen, R. Y. (2008). Three new compounds from the barks of Morus nigra. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10 (9-10), 897-902. https://doi.org/10.1080/10286020802181117
158. Wang, L., Yang, Y., Liu, C., Chen, R. Y. (2010). Three new compounds from Morus nigra L. *Journal of Asian Natural Products Research*, 12 (6), 431-437. https://doi.org/10.1080/10286020.2010.489824
159. Zelová, H., Hanáková, Z., Čermáková, Z., Šmejkal, K., DalÍ Acqua, S., Babula, P., et al. (2014). Evaluation of anti-inflammatory activity of prenylated substances isolated from Morus alba and Morus nigra. *Journal of natural products*, 77 (6), 1297-1303. https://doi.org/10.1021/np401025f
160. Zhang, Q. J., Ni, G., Wang, Y. H., Chen, R. Y., Yu, D. Q. (2009). Three new diels-alder type adducts from the stem bark of morus cathayana. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11 (3), 267-273. https://doi.org/10.1080/10286020902767690
161. Zheng, Z. P., Cheng, K. W., Zhu, Q., Wang, X. C., Lin, Z. X., Wang, M. (2010). Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of Morus nigra: a structure-activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (9), 5368-5373. https://doi.org/10.1021/JF1003607
162. Collins, C. A., Fry, F. H., Holme, A. L., Yiakouvaki, A., Al-Qenaei, A., Pourzand, C., et al. (2005). Towards multifunctional antioxidants: synthesis, electrochemistry, in vitro and cell culture evaluation of compounds with ligand/catalytic properties. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3 (8), 1541-1546. https://doi.org/10.1039/B503282M
163. Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82 (1), 47-95. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001
164. Huyut, Z., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. (2017). Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry research international*, 2017, 7616791. https://doi.org/10.1155/2017/7616791
165. Kumar, S., Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. TheScientificWorldJournal, 2013, 162750. https://doi.org/10.1155/2013/162750
166. Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., Li, H. Bin. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6 (12), 6020-6047. https://doi.org/10.3390/NU6126020
167. Lee, Y. M., Yoon, Y., Yoon, H., Park, H. M., Song, S., Yeum, K. J. (2017). Dietary Anthocyanins against Obesity and Inflammation. *Nutrients*, 9 (10), 1089. https://doi.org/10.3390/NU9101089
168. Özgen, M., Serçe, S., Kaya, C. (2009). Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich Morus nigra and Morus rubra fruits. *Scientia Horticulturae*, 119 (3), 275-279. https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2008.08.007
169. Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A., Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (6), 675-683. https://doi.org/10.1002/MNFR.200700002
170. Dalmagro, A. P., Camargo, A., Zeni, A. L. B. (2017). Morus nigra and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. *Metabolic Brain Disease*, 32 (6), 1963-1973. https://doi.org/10.1007/S11011-017-0089-Y/FIGURES/6
171. Jiang, Y., Dai, M., Nie, W. J., Yang, X. R., Zeng, X. C. (2017). Effects of the ethanol extract of black mulberry (Morus nigra L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 228-235. https://doi.org/10.1016/J.JEP.2017.02.037
172. Mahmoud, M. Y. (2013). Natural antioxidants effect of mulberry fruits (Morus nigra and Morus alba L.) on lipids profile and oxidative stress in hypercholestrolemic rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12 (7), 665-672. https://doi.org/10.3923/PJN.2013.665.672
173. Araujo, C. M., Lúcio, K., Silva, M. E., Isoldi, M. C., de Souza, G. H., Brandão, G. C., et al. (2015). Morus nigra leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. *Food & function*, 6 (11), 3490-3499. https://doi.org/10.1039/c5fo00474h
174. Turgut, N. H., Mert, D. G., Kara, H., Egilmez, H. R., Arslanbas, E., Tepe, B., et al. (2016). Effect of black mulberry (Morus nigra) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of D-galactose-induced aging mice. *Pharmaceutical Biology*, 54 (6), 1052-1064. https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1101476
175. Volpato, G. T., Calderon, I. M., Sinzato, S., Campos, K. E., Rudge, M. V., Damasceno, D. C. (2011). Effect of Morus nigra aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 138 (3), 691-696. https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.044

176. Souza, G. R., Oliveira-Junior, R. G., Diniz, T. C., Branco, A., Lima-Saraiva, S. R. G., Guimarães, A. L., et al. (2018). Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of Morus nigra L. (Moraceae). *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasleira de Biologia*, 78 (2), 248-254. https://doi.org/10.1590/1519-6984.05316
177. Iqbal, S., Younas, U., Sirajuddin, Chan, K. W., Sarfraz, R. A., Md. Kamal Uddin. (2012). Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of Mulberry (Morus sp.): a comparative study. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (6), 6651-6664. https://doi.org/10.3390/IJMS13066651
178. Kamiloglu, S., Serali, O., Unal, N., Capanoglu, E. (2013). Antioxidant activity and polyphenol composition of black mulberry (Morus nigra L.) products. *Journal of Berry Research*, *3*, 41-51. https://doi.org/10.3233/JBR-130045
179. Nesello, L., Beleza, M., Mariot, M., Mariano, L., de Souza, P., Campos, A., et al. (2017). Gastroprotective Value of Berries: Evidences from Methanolic Extracts of Morus nigra and Rubus niveus Fruits. *Gastroenterology research and practice*, 2017, 7089697. https://doi.org/10.1155/2017/7089697
180. Naderi, G. A., Asgary, S., Sarraf-Zadegan, N., Oroojy, H., Afshin-Nia, F. (2004). Antioxidant activity of three extracts of Morus nigra. *Phytotherapy Research*, 18 (5), 365-369. https://doi.org/10.1002/PTR.1400
181. Wang, W., Li, X., Bao, X., Gao, L., Tao, Y. (2018). Extraction of polysaccharides from black mulberry fruit and their effect on enhancing antioxidant activity. *International journal of biological macromolecules*, 120 (Pt B), 1420-1429. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.132
182. Montenote, M. C., Wajsman, V. Z., Konno, Y. T., Ferreira, P. C., Silva, R., Therezo, A., et al. (2017). Antioxidant effect of Morus nigra on Chagas disease progression. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59, e73. https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759073
183. El-Khawaga, O. Y., Abou-Seif, M. A. M. (2010). Biochemical studies on antioxidant and oxidant activities of some plant extracts. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 14 (9), 731-738.
184. Celep, E., Charehsaz, M., Akyüz, S., Acar, E. T., Yesilada, E. (2015). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 78, 209-215. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.009
185. Tomas, M., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Hall, R., Beekwilder, J., Capanoglu, E. (2015). The effects of juice processing on black mulberry antioxidants. *Food chemistry*, 186, 277-284. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.151
186. Issa, N. K., Abd-Aljabar, R. S. (2013). Evaluation of Antioxidant Properties of Morus nigra L. Fruit Extracts (II). *Jordan Journal of Biological Sciences*, 147 (916), 1-8. https://doi.org/10.12816/0001623
187. Li, Y., Bao, T., Chen, W. (2018). Comparison of the protective effect of black and white mulberry against ethyl carbamate-induced cytotoxicity and oxidative damage. *Food Chemistry*, 243, 65-73. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.09.106
188. Arfan, M., Khan, R., Rybarczyk, A., Amarowicz, R. (2012). Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (2), 2472-2480. https://doi.org/10.3390/IJMS13022472
189. de Pádua Lúcio, K., Rabelo, A., Araújo, C. M., Brandão, G. C., de Souza, G., da Silva, R. G., et al. (2018). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Black Mulberry (Morus nigra L.) in a Model of LPS-Induced Sepsis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 5048031. https://doi.org/10.1155/2018/5048031
190. Chen, H., Pu, J., Liu, D., Yu, W., Shao, Y., Yang, G., et al. (2016). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (Morus nigra L.). *PloS one*, 11 (4), e0153080. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153080
191. Kostić, D. A., Dimitrijević, D. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Stojanović, G. S., Živanović, A. V. (2013). Phenolic Content and Antioxidant Activities of Fruit Extracts of *Morus nigra* L (Moraceae) from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (1), 105-110. https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i1.17
192. Chalons, P., Amor, S., Courtaut, F., Cantos-Villar, E., Richard, T., Auger, C., et al. (2018). Study of Potential Anti-Inflammatory Effects of Red Wine Extract and Resveratrol through a Modulation of Interleukin-1-Beta in Macrophages. *Nutrients*, 10 (12), 1856. https://doi.org/10.3390/nu10121856
193. Padilha, M. M., Vilela, F. C., Rocha, C. Q., Dias, M. J., Soncini, R., Dos Santos, M. H., et al. (2010). Antiinflammatory properties of Morus nigra leaves. *Phytotherapy Research*, 24 (10), 1496-1500. https://doi.org/10.1002/PTR.3134
194. Ribeiro, A. E. A. S., Soares, J. M. D., Silva, H. A. L., Wanderley, C. W. de S., Moura, C. A., de

Oliveira-Junior, R. G., et al. (2019). Inhibitory effects of Morus nigra L. (Moraceae) against local paw edema and mechanical hypernociception induced by Bothrops jararacussu snake venom in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 111, 1046-1056. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.01.011
195. de Souza, M. M., Bittar, M., Cechinel-Filho, V., Yunes, R. A., Messana, I., Delle Monache, F., et al. (2000). Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from Morus nigra root bark. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 55 (3-4), 256-260. https://doi.org/10.1515/znc-2000-3-418
196. Tahir, L., Aslam, A., Ahmed, S. (2017). Antibacterial activities of Diospyros blancoi, Phoenix dactylifera and Morus nigra against dental caries causing pathogens: An in vitro study. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30 (1), 163-169.
197. Khalid, N., Fawad, S. A., Ahmed, I. (2011). Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus Nigra* L.) fresh juice. *Pakistan Journal of Botany*, *43*, 91-96.
198. Minhas, M., Begum, A., Hamid, S., Babar, M., Ilyas, R., Ali, S., et al. (2016). Evaluation of Antibiotic and Antioxidant Activity of Morus nigra (Black Mulberry) Extracts Against Soil Borne, Food Borne and Clinical Human Pathogens. *Pakistan Journal of Zoology*, *48*, 1381-1388.
199. Budiman, A., Aulifa, D. L., Kusuma, A. S. W., Sulastri, A. (2017). Antibacterial and Antioxidant Activity of Black Mulberry (Morus nigra L.) Extract for Acne Treatment. *Pharmacognosy Journal*, 9 (5), 611-614. https://doi.org/10.5530/pj.2017.5.97
200. Aulifa, D. L., Fitriansyah, S. N., Ardiansyah, S. A., Wibowo, D. P., Julata, Y. A., Christy, D. S. (2018). Phytochemical Screening, Antibacterial Activity, and Mode of Action on Morus nigra. *Pharmacognosy Journal*, 10 (1), 167-171. https://doi.org/10.5530/pj.2018.1.28
201. Yiğit, N., Yiğit, D., Özgen, U., Aktaş, A. E. (2007). Kara dut (Morus nigra L.)'un antikandidal aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37 (3), 169-173. http://search/yayin/detay/80724
202. Mazimba, O., Majinda, R. R. T., Motlhanka, D. (2011). Antioxidant and antibacterial constituents from Morus nigra. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 (6), 751-754. https://doi.org/10.5897/AJPP11.260
203. Mascarello, A., Orbem Menegatti, A. C., Calcaterra, A., Martins, P. G. A., Chiaradia-Delatorre, L. D., D'Acquarica, I., et al. (2018). Naturally occurring Diels-Alder-type adducts from Morus nigra as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, 277-288. https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2017.11.087
204. Brown, J. M., Attardi, L. D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews. Cancer*, 5 (3), 231-237. https://doi.org/10.1038/NRC1560
205. Fisher, D. E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell*, 78 (4), 539-542. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90518-5
206. Hsu, P. P., Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134 (5), 703-707. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.08.021
207. Cakıroğlu, E., Uysal, T., Koçal, G. Ç., Aygenli, F., Baran, G., Baskın, Y. (2017). The Role of Morus Nigra Extract and Its Active Compounds as Drug Candidate on Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line HT-29. *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research*, 2 (1), 10-14. https://doi.org/10.11648/J.IJCOCR.20170201.13
208. Qadir, M. I., Ali, M., Ibrahim, Z. (2014). Anticancer activity of Morus nigra leaves extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 9 (4), 496-497. https://doi.org/10.3329/BJP.V9I4.19783
209. Ahmed, A., Ali, M., El-Kholie, E., Sherif, N., El-Garawani, I. (2016). Anticancer activity of Morus nigra on human breast cancer cell line (MCF-7) the role of fresh and dry fruit extracts. *Journal of Bioscience and Applied Research*, *2* (6), 352-361. https://doi.org/10.21608/JBAAR.2016.108382
210. Turan, I., Demir, S., Kilinc, K., Burnaz, N. A., Yaman, S. O., Akbulut, K., et al. (2017). Antiproliferative and apoptotic effect of Morus nigra extract on human prostate cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ : The Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 25 *(*2), 241-248. https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2016.06.002
211. Baynes, J. W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40 (4), 405-412. https://doi.org/10.2337/DIAB.40.4.405
212. AbouZid, S. F., Ahmed, O. M., Ahmed, R. R., Mahmoud, A., Abdella, E., Ashour, M. B. (2014). Antihyperglycemic effect of crude extracts of some Egyptian plants and algae. *Journal of medicinal food*, 17 (3), 400-406. https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0068
213. Kłysik, A. B., Naduk-Kik, J., Hrabec, Z., Goś, R., Hrabec, E. (2010). Intraocular matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with diabetes mellitus with and without diabetic retinopathy. *Archives of Medical Science : AMS*, 6 (3), 375-381. https://doi.org/10.5114/AOMS.2010.14258
214. Xu, L. J., Yu, M. H., Huang, C. Y., Niu, L. X., Wang, Y. F., Wu, C. Z., et al. (2018). Isoprenylated

flavonoids from Morus nigra and their PPAR γ agonistic activities. *Fitoterapia*, 127, 109-114. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.004
215. Xu, L., Yu, M., Niu, L., Huang, C., Wang, Y., Wu, C., et al. (2020). Phenolic compounds isolated from Morus nigra and their α-glucosidase inhibitory activities. *Natural product research*, 34 (5), 605-612. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1491041
216. Silva, D., Barbosa, H. M., Silva, J., Moura, C. A., Gomes, D. A., Almeida, J., et al. (2021). Antidiabetic properties of oral treatment of hexane and chloroform fractions of Morus nigra leaves in streptozotocin-induced rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 93 (suppl 4), e20210744. https://doi.org/10.1590/0001-3765202120210744
217. Silva, D., Barbosa, H. M., Beltrão, R., Silva, C., Moura, C. A., Castro, R. N., et al. (2021). Hexane fraction from Brazilian Morus nigra leaves improved oral carbohydrate tolerance and inhibits α-amylase and α-glucosidase activities in diabetic mice. *Natural product research*, 35 (22), 4785-4788. https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1723087
218. Júnior, I., Barbosa, H. M., Carvalho, D., Barros, R. A., Albuquerque, F. P., da Silva, D., et al. (2017). Brazilian Morus nigra Attenuated Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Prooxidant Status in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *TheScientificWorldJournal*, 2017, 5275813. https://doi.org/10.1155/2017/5275813
219. Assmann, G., Nofer, J. R. (2003). Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annual review of medicine*, 54, 321-341. https://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152409
220. Kannel, W. B., Castelli, W. P., Gordon, T. (1979). Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Annals of Internal Medicine*, 90 (1), 85-91. https://doi.org/10.7326/0003-4819-90-1-85
221. Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature, 407* (6801), 233-241. https://doi.org/10.1038/35025203
222. Zeni, A. L. B., Moreira, T. D., Dalmagro, A. P., Camargo, A., Bini, L. A., Simionatto, E. L., et al. (2017). Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89 (4), 2805-2815. https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160660
223. Gu, X., Manautou, J. E. (2012). Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert reviews in molecular medicine*, 14, e4. https://doi.org/10.1017/S1462399411002110
224. Tag H. M. (2015). Hepatoprotective effect of mulberry (Morus nigra) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *BMC complementary and alternative medicine*, 15, 252. https://doi.org/10.1186/s12906-015-0744-y
225. Deniz, G. Y., Laloglu, E., Koc, K., Nadaroglu, H., Geyikoglu, F. (2018). The effect of black mulberry (Morus nigra) extract on carbon tetrachloride-induced liver damage. *Archives of Biological Sciences*, 70 (2), 371-378. https://doi.org/10.2298/ABS171009055D
226. Mnaa, S., Aniess, W., Olwy, Y., Shaker, E. (2015). Antioxidant Activity of White (Morus alba L.) and Black (Morus nigra L.) Berries against CCl4 Hepatotoxic Agent. *Advanced Techniques in Biology & Medicine*, 3 (1), 121. doi: 10.4172/2379-1764.1000121
227. Hinson, J. A., Roberts, D. W., James, L. P. (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 196 (196), 369-405. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0_12
228. Mallhi, T. H., Qadir, M. I., Khan, Y. H. (2018). Determination of phytoconstituents of *n*-hexane extract of leaves of *Morus nigra* and evaluation of their effects on biochemical and histopathological parameters in paracetamol intoxicated mice liver. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54 (3), 18101. https://doi.org/10.1590/S2175-97902018000318101
229. Mallhi, T. H., Qadir, M. I., Khan, Y. H., Ali, M. (2014). Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of Morus nigra against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 9 (1), 60-66. https://doi.org/10.3329/BJP.V9I1.17337
230. Song, H., Lai, J., Tang, Q., Zheng, X. (2016). Mulberry ethanol extract attenuates hepatic steatosis and insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 36 (7), 710-718. https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2016.01.011
231. Yang, D. K., Jo, D. G. (2018). Mulberry Fruit Extract Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) through Inhibition of Mitochondrial Oxidative Stress in Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2018, 8165716. https://doi.org/10.1155/2018/8165716
232. Hago, S., Mahrous, E. A., Moawad, M., Abdel-Wahab, S., Abdel-Sattar, E. (2021). Evaluation of antidiabetic activity of Morus nigra L. and Bauhinia variegata L. leaves as Egyptian remedies used for the treatment of diabetes. *Natural Product Research*, 35 (5), 829-835. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1601094
233. Hooshmand, S., Mahdinezhad, M. R., Taraz Jamshidi, S., Soukhtanloo, M., Mirzavi, F., Iranshahi, M., et al. (2021). Morus nigra L. extract prolongs survival of rats with hepatocellular carcinoma. *Phytotherapy Research : PTR*, 35 (6), 3365-3376. https://doi.org/10.1002/PTR.7056

234. Rahimi-Madiseh, M., Naimi, A., Heydarian, E., Rafieian-Kopaei, M. (2016). Renal biochemical and histopathological alterations of diabetic rats under treatment with hydro alcoholic Morus nigra extrac. *Journal of Renal Injury Prevention*, 6 (1), 56-60. https://doi.org/10.15171/JRIP.2017.10
235. Hassanalilou, T., Payahoo, L., Shahabi, P., Abbasi, M. M., Asghari, M. H., Jafar-abadi, et al. (2017). The protective effects of Morus nigra L. leaves on the kidney function tests and kidney and liver histological structures in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedical Research*, 28 (14), 6113-6118.
236. Abouzed, T. K., Sadek, K. M., Ghazy, E. W., Abdo, W., Kassab, M. A., Hago, S., et al. (2020). Black mulberry fruit extract alleviates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: targeting TNF-α inflammatory pathway. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 72 (11), 1615-1628. https://doi.org/10.1111/jphp.13338
237. Briganti, S., Camera, E., Picardo, M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, 16 (2), 101-110. https://doi.org/10.1034/J.1600-0749.2003.00029.X
238. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, 84 (4), 1155-1228. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00044.2003
239. Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Research*, 19 (6), 550-571. https://doi.org/10.1111/J.1600-0749.2006.00334.X
240. Zhang, X., Hu, X., Hou, A., Wang, H. (2009). Inhibitory Effect of 2,4,2′,4′-Tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on Tyrosinase Activity and Melanin Biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32 (1), 86-90. https://doi.org/10.1248/BPB.32.86
241. de Freitas, M. M., Fontes, P. R., Souza, P. M., William Fagg, C., Neves Silva Guerra, E., de Medeiros Nóbrega, Y. K., et al. (2016). Extracts of Morus nigra L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity. *PloS one*, 11 (9), e0163130. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163130
242. Dogan, D.M., Can, G., Meral, R. (2017). Effectiveness of Black Mulberry Molasses in Prevention of Radiotherapy-Induced Oral Mucositis: A Randomized Controlled Study in Head and Neck Cancer Patients. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 23 (12), 971-979. doi: 10.1089/acm.2016.0425.
243. Talo Yildirim, T., Ozan, G., Dundar, S., Bozoglan, A., Karaman, T., Dildes, N., et al. (2019). The effects of morus nigra on the alveolar bone loss in experimentally-induced periodontitis. *European oral research*, 53 (3), 99-105. https://doi.org/10.26650/eor.20190021
244. Mirjalili, M. M., Faramarzi, S., Esmaeilidehaj, M., Zare Mehrjardi, F., Ebrahim Rezvani, M. (2017). Effect of aqueous extract of Morus nigra on skin wound healing in type 1 diabetic rats. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 25 (4), 264-270. http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-3875-en.html
245. Akkol, E. K., Suntar, I., Keleş, H., Sezik, E., Gürler, G. (2015). Bioassay-Guided Isolation and Characterization of Wound Healer Compounds from Morus nigra L. (Moraceae). *Records of Natural Products*, 9 (4), 484-495.
246. Zhou, R., Li, D., Kou, Q., Jiao, Z., Ning, Z. (2019). Evaluation of anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing activity of Morus nigra. *South African Journal of Botany*, *124*, 540-545. https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2019.06.021
247. Yilmaz, S., Uçar, A., Göktaş, B. (2019). Genotoxic and Genoprotective Potential of Black Mulberry (Morus nigra) Fruit. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 91 (4), e20190337. https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190337
248. Hemati, A. A., Jalali, M. T., Rashidi, I., Kalantar Hormozi, T. (2010). Impact Of Aqueous Extract Of Black Mulberry (Morus Nigra) On Liver And Kidney Funcion Of Diabetic Mice. *Jundishapur Journal Of Natural Pharmaceutical Products*, 5 (1), 18-25. https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=277273
249. Figueredo, K. C., Guex, C. G., Reginato, F. Z., Haas da Silva, A. R., Cassanego, G. B., Lhamas, C. L., et al. (2018). Safety assessment of Morus nigra L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 290-296. https://doi.org/10.1016/J.JEP.2018.05.013
250. Almeida, J. R. G. d. S., Guimarães, A. L., de Oliveira, A. P., Araújo, E. C. d. C., Silva, F. S., Neves, L. F., et al. (2011). Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of Morus nigra L. (Moraceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 30 (1), 96-100.
251. Bharti, S., Singh, S. (2009). Metal Based Drugs: Current Use and Future Potential. *Der Pharmacia Lettre*, 1 (2), 39-51.
252. Das, S., Mitra, S., Khurana, S. M. P., Debnath, N. (2013). Nanomaterials for biomedical applications. *Frontiers in Life Science*, 7 (3–4), 90-98. https://doi.org/10.1080/21553769.2013.869510

253. Martínez-Carmona, M., Gun'Ko, Y., Vallet-Regí, M. (2018). ZnO Nanostructures for Drug Delivery and Theranostic Applications. *Nanomaterials*, 8 (4), 268. https://doi.org/10.3390/NANO8040268
254. Xiong H. M. (2013). ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 25 (37), 5329-5335. https://doi.org/10.1002/adma.201301732
255. Jin, S. E., Jin, H. E. (2019). Synthesis, Characterization, and Three-Dimensional Structure Generation of Zinc Oxide-Based Nanomedicine for Biomedical Applications. *Pharmaceutics*, 11 (11), 575. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110575
256. Qu, J., Yuan, X., Wang, X., Shao, P. (2011). Zinc accumulation and synthesis of ZnO nanoparticles using Physalis alkekengi L. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 159 (7), 1783-1788. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.016
257. Wodka, D., Bielańska, E., Socha, R. P., Elzbieciak-Wodka, M., Gurgul, J., Nowak, P., et al. (2010). Photocatalytic activity of titanium dioxide modified by silver nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*, 2 (7), 1945-1953. https://doi.org/10.1021/am1002684
258. Sangani, M. H., Moghaddam, M. N., Forghanifard, M. M. (2015). Inhibitory effect of zinc oxide nanoparticles on pseudomonas aeruginosa biofilm formation Inhibition of biofilm formation by zinc oxide nanoparticles. *Nanomedicine Journal*, 2 (2), 121-128. https://doi.org/ 10.7508/NMJ.2015.02.004
259. Siddiqi, K. S., Ur Rahman, A., Tajuddin, Husen, A. (2018). Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. *Nanoscale research letters*, 13 (1), 141. https://doi.org/10.1186/s11671-018-2532-3
260. Sabura Begum, P. M., Mohammed Yusuff, K. K., Joseph, R. (2008). Preparation and Use of Nano Zinc Oxide in Neoprene Rubber. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 57 (12), 1083–1094. https://doi.org/10.1080/00914030802341646
261. Krupiński, P., Kornowicz, A., Sokołowski, K., Cieślak, A. M., Lewiński, J. (2016). Applying Mechanochemistry for Bottom-Up Synthesis and Host–Guest Surface Modification of Semiconducting Nanocrystals: A Case of Water-Soluble β-Cyclodextrin-Coated Zinc Oxide. *Chemistry–A European Journal*, 22 (23), 7817-7823. https://doi.org/10.1002/CHEM.201600182
262. Malfatti, L., Pinna, A., Enzo, S., Falcaro, P., Marmiroli, B., Innocenzi, P. (2015). Tuning the phase transition of ZnO thin films through lithography: An integrated bottom-up and top-down processing. *Journal of Synchrotron Radiation*, 22 (1), 165-171. https://doi.org/10.1107/S1600577514024047/CO5056SUP1.PDF
263. Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., Singh, H., Singh, S. C. (2016). Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology Letters*, 38 (4), 545-560. https://doi.org/10.1007/S10529-015-2026-7/FIGURES/3
264. Ahmad, R., Tripathy, N., Park, J. H., Hahn, Y. B. (2015). A comprehensive biosensor integrated with a ZnO nanorod FET array for selective detection of glucose, cholesterol and urea. *Chemical Communications*, 51 (60), 11968-11971. https://doi.org/10.1039/C5CC03656A
265. Khan, W., Ajmal, H., Khan, F., Huda, N. U., Kim, S. D. (2018). Induced Photonic Response of ZnO Nanorods Grown on Oxygen Plasma-Treated Seed Crystallites. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 8 (6), 371. https://doi.org/10.3390/nano8060371
266. Sharifalhoseini, Z., Entezari, M. H., Shahidi, M. (2018). Synergistic effect of low and high intensity ultrasonic irradiation on the direct growth of ZnO nanostructures on the galvanized steel surface: investigation of the corrosion behavior. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 380-389. https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2018.02.046
267. Zeng, H., Cai, W., Li, Y., Hu, J., Liu, P. (2005). Composition/structural evolution and optical properties of ZnO/Zn nanoparticles by laser ablation in liquid media. *The journal of physical chemistry. B*, 109 (39), 18260-18266. https://doi.org/10.1021/jp052258n
268. Chang Dr, I. (2013). Plasma synthesis of metal nanopowders. *Advances in Powder Metallurgy: Properties, Processing and Applications*. Woodhead Publishing; 69-85.
269. Brayner, R., Dahoumane, S. A., Yéprémian, C., Djediat, C., Meyer, M., Couté, A., et al. (2010). ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 26 (9), 6522-6528. https://doi.org/10.1021/la100293s
270. Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., Buszewski, B. (2017). Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 37-52. https://doi.org/10.1016/J.CIS.2017.07.033
271. Naveed Ul Haq, A., Nadhman, A., Ullah, I., Mustafa, G., Yasinzai, M., Khan, I. (2017). Synthesis Approaches of Zinc Oxide Nanoparticles: The Dilemma of Ecotoxicity. *Journal of Nanomaterials*, 2017, https://doi.org/10.1155/2017/8510342
272. Mao, Y., Park, T. J., Zhang, F., Zhou, H., Wong, S. S. (2007). Environmentally Friendly Methodologies of Nanostructure Synthesis. *Small*, 3 (7), 1122-1139.

https://doi.org/10.1002/SMLL.200700048
273. Mohanpuria, P., Rana, N. K., Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 10 (3), 507-517. https://doi.org/10.1007/S11051-007-9275-X/TABLES/1
274. Qu, J., Luo, C., Hou, J. (2011). Synthesis of ZnO nanoparticles from Zn-hyperaccumulator (Sedum alfredii Hance) plants. *Micro and Nano Letters*, 6 (3), 174-176. https://doi.org/10.1049/MNL.2011.0004/CITE/REFWORKS
275. Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Vanaja, M., Annadurai, G. (2016). Anticancer and enhanced antimicrobial activity of biosynthesizd silver nanoparticles against clinical pathogens. *Journal of Molecular Structure*, 1116, 165-173. https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2016.03.044
276. Basnet, P., Inakhunbi Chanu, T., Samanta, D., Chatterjee, S. (2018). A review on bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using plant extracts as reductants and stabilizing agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183, 201-221. https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2018.04.036
277. Otari, S. V., Patil, R. M., Nadaf, N. H., Ghosh, S. J., Pawar, S. H. (2012). Green biosynthesis of silver nanoparticles from an actinobacteria Rhodococcus sp. *Materials Letters*, 72, 92-94. https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2011.12.109
278. Raliya, R., Tarafdar, J. C. (2013). ZnO Nanoparticle Biosynthesis and Its Effect on Phosphorous-Mobilizing Enzyme Secretion and Gum Contents in Clusterbean (Cyamopsis tetragonoloba L.). *Agricultural Research*, 2 (1), 48-57. https://doi.org/10.1007/S40003-012-0049-Z/FIGURES/9
279. Tripathi, R. M., Bhadwal, A. S., Gupta, R. K., Singh, P., Shrivastav, A., Shrivastav, B. R. (2014). ZnO nanoflowers: novel biogenic synthesis and enhanced photocatalytic activity. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 141, 288-295. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.10.001
280. Azizi, S., Ahmad, M. B., Namvar, F., Mohamad, R. (2014). Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using brown marine macroalga Sargassum muticum aqueous extract. *Materials Letters*, 116, 275-277. https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2013.11.038
281. Nagarajan, S., Arumugam Kuppusamy, K. (2013). Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of gulf of Mannar, India. *Journal of Nanobiotechnology*, 11 (1), 1-11. https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-39/FIGURES/15
282. Pavani, K. V, Kumar, N. S., Sangameswaran, B. B. (2012). Synthesis of Lead Nanoparticles by Aspergillus species. *Polish Journal of Microbiology*, 61 (1), 61-63.
283. Hoffmann, M. R., Martin, S. T., Choi, W., Bahnemann, D. W. (1995). Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis. *Chemical Reviews*, 95 (1), 69-96. https://doi.org/10.1021/CR00033A004/ASSET/CR00033A004.FP.PNG_V03
284. Shamsuzzaman, Mashrai, A., Khanam, H., Aljawfi, R. N. (2017). Biological synthesis of ZnO nanoparticles using C. albicans and studying their catalytic performance in the synthesis of steroidal pyrazolines. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1530-S1536. https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2013.05.004
285. Ambika, S., Sundrarajan, M. (2015). Green biosynthesis of ZnO nanoparticles using Vitex negundo L. extract: Spectroscopic investigation of interaction between ZnO nanoparticles and human serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149 (1), 143-148. https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2015.05.004
286. Asokan, A., Ramachandran, T., Ramaswamy, R., Koushik, C. V, Muthusamy, M. (2010). Preparation and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles and a Study of the Anti-microbial Property of Cotton Fabric Treated with the Particles. *Journal of Textile and Apparel Technology and Management*, 6 (4).
287. Gharagozlou, M., Baradaran, Z., Bayati, R. (2015). A green chemical method for synthesis of ZnO nanoparticles from solid-state decomposition of Schiff-bases derived from amino acid alanine complexes. *Ceramics International*, 41 (7), 8382-8387. https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2015.03.029
288. Wang, J., Song, Y. (2017). Microfluidic Synthesis of Nanohybrids. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 13 (18). https://doi.org/10.1002/smll.201604084
289. Xing, Y., Dittrich, P. S. (2018). One-Dimensional Nanostructures: Microfluidic-Based Synthesis, Alignment and Integration towards Functional Sensing Devices. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18 (1), 134. https://doi.org/10.3390/s18010134
290. DeMello A. J. (2006). Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 442 (7101), 394-402. https://doi.org/10.1038/nature05062
291. Janasek, D., Franzke, J., Manz, A. (2006). Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, 442 (7101), 374-380. https://doi.org/10.1038/nature05059
292. Elvira, K. S., I Solvas, X. C., Wootton, R. C. R., Demello, A. J. (2013). The past, present and

potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis. *Nature Chemistry*, 5 (11), 905-915. https://doi.org/10.1038/NCHEM.1753
293. Li, L. L., Li, X., Wang, H. (2017). Microfluidic Synthesis of Nanomaterials for Biomedical Applications. *Small Methods*, 1 (8), 1700140. https://doi.org/10.1002/SMTD.201700140
294. Azzouz, I., Habba, Y. G., Capochichi-Gnambodoe, M., Marty, F., Vial, J., Leprince-Wang, Y., et al. (2018). Zinc oxide nano-enabled microfluidic reactor for water purification and its applicability to volatile organic compounds. *Microsystems & Nanoengineering*, 4 (1), 1-7. https://doi.org/10.1038/micronano.2017.93
295. Joo, J., Chow, B. Y., Prakash, M., Boyden, E. S., Jacobson, J. M. (2011). Face-selective electrostatic control of hydrothermal zinc oxide nanowire synthesis. *Nature Materials*, 10 (8), 596-601. https://doi.org/10.1038/NMAT3069
296. Ali, K., Dwivedi, S., Azam, A., Saquib, Q., Al-Said, M. S., Alkhedhairy, A. A., et al. (2016). Aloe vera extract functionalized zinc oxide nanoparticles as nanoantibiotics against multi-drug resistant clinical bacterial isolates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 472, 145-156. https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2016.03.021
297. Rajiv, P., Rajeshwari, S., Venckatesh, R. (2013). Bio-fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of Parthenium hysterophorus L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 112, 384-387. https://doi.org/10.1016/J.SAA.2013.04.072
298. Madan, H. R., Sharma, S. C., Udayabhanu, Suresh, D., Vidya, Y. S., Nagabhushana, H., Rajanaik, H., et al. (2016). Facile green fabrication of nanostructure ZnO plates, bullets, flower, prismatic tip, closed pine cone: Their antibacterial, antioxidant, photoluminescent and photocatalytic properties. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 152, 404-416. https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.067
299. Pholnak, C., Sirisathitkul, C., Suwanboon, S., Harding, D. J. (2014). Effects of precursor concentration and reaction time on sonochemically synthesized ZnO nanoparticles. *Materials Research*, 17 (2), 405-411. https://doi.org/10.1590/S1516-14392013005000192
300. Sneha, K., Sathishkumar, M., Kim, S., Yun, Y. S. (2010). Counter ions and temperature incorporated tailoring of biogenic gold nanoparticles. *Process Biochemistry*, 45 (9), 1450-1458. https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2010.05.019
301. Azizi, S., Mohamad, R., Bahadoran, A., Bayat, S., Rahim, R. A., Ariff, A., et al. (2016). Effect of annealing temperature on antimicrobial and structural properties of bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using flower extract of Anchusa italica. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 161, 441-449. https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2016.06.007
302. Rasmussen, K., Rauscher, H., Mech, A., Riego Sintes, J., Gilliland, D., González, M., et al. (2018). Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials - Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 92, 8-28. https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2017.10.019
303. Noh, H. W., Jeong, S. M., Cho, J., Hong, J. Il. (2018). Ultrahigh photosensitivity of the polar surfaces of single crystalline ZnO nanoplates. *Nanoscale*, 10 (15), 6801-6805. https://doi.org/10.1039/C8NR00569A
304. Wang, X., Ahmad, M., Sun, H. (2017). Three-Dimensional ZnO Hierarchical Nanostructures: Solution Phase Synthesis and Applications. *Materials*, 10 (11), 1304. https://doi.org/10.3390/MA10111304
305. Ramesh, M., Anbuvannan, M., Viruthagiri, G. (2015). Green synthesis of ZnO nanoparticles using Solanum nigrum leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 136 Pt B, 864-870. https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.105
306. Matinise, N., Fuku, X. G., Kaviyarasu, K., Mayedwa, N., Maaza, M. (2017). ZnO nanoparticles via Moringa oleifera green synthesis: Physical properties & mechanism of formation. *Applied Surface Science*, 406, 339-347. https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2017.01.219
307. Bindu, P., Thomas, S. (2014). Estimation of lattice strain in ZnO nanoparticles: X-ray peak profile analysis. *Journal of Theoretical and Applied Physics*, 8 (4), 123-134. https://doi.org/10.1007/S40094-014-0141-9/FIGURES/9
308. Khalafi, T., Buazar, F., Ghanemi, K. (2019). Phycosynthesis and Enhanced Photocatalytic Activity of Zinc Oxide Nanoparticles Toward Organosulfur Pollutants. *Scientific reports*, 9 (1), 6866. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43368-3
309. Abdullayeva, N., Altaf, C. T., Mintas, M., Ozer, A., Sankir, M., Kurt, H., et al. (2019). Investigation of Strain Effects on Photoelectrochemical Performance of Flexible ZnO Electrodes. *Scientific reports*, 9 (1), 11006. https://doi.org/10.1038/s41598-019-47546-1
310. Jin, S. E., Hwang, W., Lee, H. J., Jin, H. E. (2017). Dual UV irradiation-based metal oxide

nanoparticles for enhanced antimicrobial activity in Escherichia coli and M13 bacteriophage. *International journal of nanomedicine*, 12, 8057-8070. https://doi.org/10.2147/IJN.S144236
311. Zhao, Z., Lei, W., Zhang, X., Wang, B., Jiang, H. (2010). ZnO-Based Amperometric Enzyme Biosensors. *Sensors*, 10 (2), 1216-1231. https://doi.org/10.3390/S100201216
312. Li, X., Cheng, S., Deng, S., Wei, X., Zhu, J., Chen, Q. (2017). Direct Observation of the Layer-by-Layer Growth of ZnO Nanopillar by In situ High Resolution Transmission Electron Microscopy. *Scientific Reports*, 7 (1), 1-8. https://doi.org/10.1038/srep40911
313. Ludi, B., Niederberger, M. (2013). Zinc oxide nanoparticles: chemical mechanisms and classical and non-classical crystallization. *Dalton Transactions*, 42 (35), 12554-12568. https://doi.org/10.1039/C3DT50610J
314. Wang, Z., Li, H., Tang, F., Ma, J., Zhou, X. (2018). A Facile Approach for the Preparation of Nano-size Zinc Oxide in Water/Glycerol with Extremely Concentrated Zinc Sources. *Nanoscale research letters*, 13 (1), 202. https://doi.org/10.1186/s11671-018-2616-0
315. Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10 (27), 12871-12934. https://doi.org/10.1039/C8NR02278J
316. Jiang, J., Pi, J., Cai, J. (2018). The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2018, 1062562. https://doi.org/10.1155/2018/1062562
317. Jin, S. E., Jin, J. E., Hwang, W., Hong, S. W. (2019). Photocatalytic antibacterial application of zinc oxide nanoparticles and self-assembled networks under dual UV irradiation for enhanced disinfection. *International journal of nanomedicine*, 14, 1737-1751. https://doi.org/10.2147/IJN.S192277
318. Jamdagni, P., Khatri, P., Rana, J. S. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of Nyctanthes arbor-tristis and their antifungal activity. *Journal of King Saud University-Science*, 30 (2), 168-175. https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2016.10.002
319. Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. T., Manna, A. C. (2008). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 279 (1), 71-76. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2007.01012.X
320. Kahru, A., Dubourguier, H. C., Blinova, I., Ivask, A., Kasemets, K. (2008). Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles: A Minireview. *Sensors*, 8 (8), 5153-5170. https://doi.org/10.3390/S8085153
321. Song, W., Zhang, J., Guo, J., Zhang, J., Ding, F., Li, L., Sun, Z. (2010). Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicology letters*, 199 (3), 389-397. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.10.003
322. Vielkind, M., Kampen, I., Kwade, A., Vielkind, M., Kampen, I., Kwade, A. (2013). Zinc Oxide Nanoparticles in Bacterial Growth Medium: Optimized Dispersion and Growth Inhibition of Pseudomonas putida. *Advances in Nanoparticles*, 2 (4), 287-293. https://doi.org/10.4236/ANP.2013.24039
323. Patil, B. N., Taranath, T. C. (2016). *Limonia acidissima* L. leaf mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles: A potent tool against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Mycobacteriology*, 5 (2), 197. https://doi.org/10.1016/J.IJMYCO.2016.03.004
324. Bhuyan, T., Mishra, K., Khanuja, M., Prasad, R., Varma, A. (2015). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles from Azadirachta indica for antibacterial and photocatalytic applications. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 32, 55-61. https://doi.org/10.1016/J.MSSP.2014.12.053
325. Bisht, G., Rayamajhi, S. (2016). ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine*, 3, 9. https://doi.org/10.5772/63437
326. Hackenberg, S., Scherzed, A., Harnisch, W., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., et al. (2012). Antitumor activity of photo-stimulated zinc oxide nanoparticles combined with paclitaxel or cisplatin in HNSCC cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 114, 87-93. https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2012.05.014
327. Elshama, S. S., Abdallah, M. E., Abdel-Karim, R. I. (2018). Zinc Oxide Nanoparticles: Therapeutic Benefits and Toxicological Hazards. *The Open Nanomedicine Journal*, 5 (1), 16-22. https://doi.org/10.2174/1875933501805010016
328. Peng, H., Cui, B., Li, G., Wang, Y., Li, N., Chang, Z., et al. (2015). A multifunctional β-CD-modified Fe3O4@ZnO:Er(3+),Yb(3+) nanocarrier for antitumor drug delivery and microwave-triggered drug release. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 46, 253-263. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2014.10.022
329. Sharma, H., Kumar, K., Choudhary, C., Mishra, P. K., Vaidya, B. (2016). Development and characterization of metal oxide nanoparticles for the delivery of anticancer drug. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44 (2), 672-679. https://doi.org/10.3109/21691401.2014.978980

330. Tripathy, N., Ahmad, R., Ko, H. A., Khang, G., Hahn, Y. B. (2015). Enhanced anticancer potency using an acid-responsive ZnO-incorporated liposomal drug-delivery system. *Nanoscale*, 7 (9), 4088-4096. https://doi.org/10.1039/C4NR06979J
331. Guo, D., Wu, C., Jiang, H., Li, Q., Wang, X., Chen, B. (2008). Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 93 (3), 119-126. https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2008.07.009
332. Agarwal, H., Nakara, A., Shanmugam, V. K. (2019). Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 109, 2561-2572. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.116
333. Nagajyothi, P. C., Cha, S. J., Yang, I. J., Sreekanth, T. V. M., Kim, K. J., Shin, H. M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using Polygala tenuifolia root extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 146, 10-17. https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2015.02.008
334. Wiegand, C., Hipler, U. C., Boldt, S., Strehle, J., Wollina, U. (2013). Skin-protective effects of a zinc oxide-functionalized textile and its relevance for atopic dermatitis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6, 115-121. https://doi.org/10.2147/CCID.S44865
335. Yao, S., Feng, X., Lu, J., Zheng, Y., Wang, X., Volinsky, A. A., et al. (2018). Antibacterial activity and inflammation inhibition of ZnO nanoparticles embedded TiO2 nanotubes. *Nanotechnology*, 29 (24), 244003. https://doi.org/10.1088/1361-6528/aabac1
336. Agren, M. S., Chvapil, M., Franzén, L. (1991). Enhancement of re-epithelialization with topical zinc oxide in porcine partial-thickness wounds. *The Journal of surgical research*, 50 (2), 101-105. https://doi.org/10.1016/0022-4804(91)90230-j
337. Gao, Y., Han, Y., Cui, M., Tey, H. L., Wang, L., Xu, C., (2017). ZnO nanoparticles as an antimicrobial tissue adhesive for skin wound closure. *Journal of materials chemistry. B*, 5 (23), 4535-4541. https://doi.org/10.1039/c7tb00664k
338. Jin, S. E., Ahn, H. S., Kim, J. H., Arai, Y., Lee, S. H., Yoon, T. J., et al. (2016). Boiling Method-Based Zinc Oxide Nanorods for Enhancement of Adipose-Derived Stem Cell Proliferation. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 22 (9), 847-855. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2015.0528
339. Kietzmann, M., Braun, M. (2006). Effekte der Zinkoxid/Lebertran-Salbe Zincojecol auf das Wundheilungsgeschehen im Tiermodell [Effects of the zinc oxide and cod liver oil containing ointment Zincojecol in an animal model of wound healing]. *DTW. Deutsche tierarztliche Wochenschrift*, 113 (9), 331-334.
340. El-Gharbawy, R. M., Emara, A. M., Abu-Risha, S. E. S. (2016). Zinc oxide nanoparticles and a standard antidiabetic drug restore the function and structure of beta cells in Type-2 diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 84, 810-820. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.09.068
341. Umrani, R. D., Paknikar, K. M. (2014). Zinc oxide nanoparticles show antidiabetic activity in streptozotocin-induced Type 1 and 2 diabetic rats. *Nanomedicine (London, England)*, 9 (1), 89-104. https://doi.org/10.2217/NNM.12.205
342. Chausmer, A. B. (1998). Zinc, insulin and diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, 17 (2), 109-115. https://doi.org/10.1080/07315724.1998.10718735
343. Ghantani, V. C., Dongare, M. K., Umbarkar, S. B. (2014). Nonstoichiometric calcium pyrophosphate: a highly efficient and selective catalyst for dehydration of lactic acid to acrylic acid. *RSC Advances*, 4 (63), 33319-33326. https://doi.org/10.1039/C4RA06429A
344. Stan, M., Popa, A., Toloman, D., Dehelean, A., Lung, I., Katona, G. (2015). Enhanced photocatalytic degradation properties of zinc oxide nanoparticles synthesized by using plant extracts. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 39, 23-29. https://doi.org/10.1016/J.MSSP.2015.04.038
345. Sharma, S. C. (2016). Degradation of Alizarin Red-S dye and antibacterial activity against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 16 (127), 6498-6512. https://doi.org/10.1016/J.IJLEO.2016.04.036
346. Ahuja, A., Khar, R. K., Ali, J. (2008). Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23 (5), 489-515. https://doi.org/10.3109/03639049709148498
347. Shaikh, R., Raj Singh, T. R., Garland, M. J., Woolfson, A. D., Donnelly, R. F. (2011). Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 3 (1), 89-100. https://doi.org/10.4103/0975-7406.76478
348. Punitha, S., Girish, Y. (2010). Polymers in mucoadhesive buccal drug delivery system: A review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 1 (2), 170-186.

349. Andrews, G. P., Laverty, T. P., Jones, D. S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 71 (3), 505-518. https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2008.09.028
350. Hägerström, H., Edsman, K., Strømme, M. (2003). Low-frequency dielectric spectroscopy as a tool for studying the compatibility between pharmaceutical gels and mucous tissue. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92 (9), 1869-1881. https://doi.org/10.1002/JPS.10451
351. Smart, J. D. (2005). The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (11), 1556-1568. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.07.001
352. Serra, L., Doménech, J., Peppas, N. A. (2009). Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 71 (3), 519-528. https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2008.09.022
353. Dodou, D., Breedveld, P., Wieringa, P. A. (2005). Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 60 (1), 1-16. https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2005.01.007
354. Kinloch, A. J. (1980). The science of adhesion. *Journal of Materials Science*, 15 (9), 2141-2166.
355. Jiménez-castellanos, M. R., Zia, H., Rhodes, C. T. (1993). Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 19 (1-2), 143-194.
356. Peppas, N. A., Sahlin, J. J. (1996). Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials*, 17 (16), 1553-1561. https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)00307-X
357. Huang, Y., Leobandung, W., Foss, A., Peppas, N. A. (2000). Molecular aspects of muco- and bioadhesion: tethered structures and site-specific surfaces. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 65 (1–2), 63-71. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00233-3
358. Gu, J. M., Robinson, J. R., Leung, S. H. (1988). Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: structure-property relationships. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 5 (1), 21-67.
359. Peppas, N. A., Buri, P. A. (1985). Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *Journal of Controlled Release*, *2*, 257-275.
360. Park, H., Amiji, M., Park, K. (1989). Mucoadhesive hydrogels effective at neutral pH. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater*, 16 (1989) 217-218.
361. Lehr, C.-M., Bouwstra, J. A., Schacht, E. H., Junginger, H. E. (1992). In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 78 (1-3), 43-48.
362. Boddupalli, B. M., Mohammed, Z. N., Nath, R. A., Banji, D. (2010). Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1 (4), 381-387. https://doi.org/10.4103/0110-5558.76436
363. Solomonidou, D., Cremer, K., Krumme, M., Kreuter, J. (2001). Effect of carbomer concentration and degree of neutralization on the mucoadhesive properties of polymer films. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 12 (11), 1191-1205. https://doi.org/10.1163/156856201753395743
364. Salamat-Miller, N., Chittchang, M., Johnston, T. P. (2005). The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (11), 1666-1691. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.07.003
365. Singh, I., Rana, V. (2012). Techniques for the assessment of mucoadhesion in drug delivery systems: An overview. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 26 (18-19), 2251-2267. https://doi.org/10.1163/156856111X610171
366. Yu, T., Andrews, G. P., Jones, D. S. (2014). *Mucoadhesion and Characterization of Mucoadhesive Properties.* New York: Springer.
367. Shojaei, A. H. (1998). Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 1 (1), 15-30.
368. Remuñán-López, C., Portero, A., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J. (1998). Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 55 (2-3), 143-152. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00044-3
369. Jiang, L., Gao, L., Wang, X., Tang, L., Ma, J. (2010). The application of mucoadhesive polymers in nasal drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36 (3), 323-336. https://doi.org/10.1080/03639040903170750

370. Singh, R. M., Kumar, A., Pathak, K. (2013). Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10 (1), 115-130. https://doi.org/10.1517/17425247.2013.746659
371. Ugwoke, M. I., Agu, R. U., Verbeke, N., Kinget, R. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (11), 1640-1665. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.07.009
372. Hornof, M., Weyenberg, W., Ludwig, A., Bernkop-Schnürch, A. (2003). Mucoadhesive ocular insert based on thiolated poly(acrylic acid): development and in vivo evaluation in humans. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 89 (3), 419-428. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00135-4
373. Sultana, Y., Aqil, M., Ali, A. (2005). Ocular inserts for controlled delivery of pefloxacin mesylate: preparation and evaluation. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 55 (3), 305-314.
374. Wagh, V. D., Inamdar, B., Samanta, M. K. (2008). Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, 2 (1), 12-17.
375. Abd Elhady, S. S., Mortada, N. D., Awad, G. A. S., Zaki, N. M. (2003). Development of in situ gelling and muco adhesive mebeverine hydrochloride solution for rectal administration. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 11 (4), 159-171.
376. Choi, H.G., Oh, Y.K., Kim, C.K. (1998). In situ gelling and mucoadhesive liquid suppository containing acetaminophen: enhanced bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, 165 (1), 23-32.
377. Asane, G. S., Rao, Y. M., Bhosale, A. V, Nirmal, S. A. (2007). Mucoadhesive gastro intestinal drug delivery system: an overview. *Pharmainfo. Net*, 5 (6), 1-5.
378. Okur, N. Ü., Bülbül, E. Ö., Yağcılar, A. P., Siafaka, P. I. (2021). Current Status of Mucoadhesive Gel Systems for Buccal Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 27 (17), 2015-2025. https://doi.org/10.2174/1381612824666210316101528
379. Bernkop-Schnürch, A. (2005). Mucoadhesive systems in oral drug delivery. *Drug Discovery Today. Technologies*, 2 (1), 83-87. https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2005.05.001
380. Dias, R., Sakhare, S., Mali, K. (2010). In-vitro absorption studies of mucoadhesive tablets of acyclovir. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 44 (2), 183-188.
381. Rajput, G. C., Majmudar, F. D., Patel, J. K., Patel, K. N., Thakor, R. S., Patel, B. P., et al. (2010). Stomach specific mucoadhesive tablets as controlled drug delivery system–A review work. *International Jourdnal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1, 30-41.
382. Rathbone, M. J., Drummond, B. K., Tucker, I. G. (1994). The oral cavity as a site for systemic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 13 (1-2), 1-22.
383. Alaei, S., Omidian, H. (2021). Mucoadhesion and Mechanical Assessment of Oral Films. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 159, 105727. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105727
384. Morales, J. O., McConville, J. T. (2011). Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 77 (2), 187-199. https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2010.11.023
385. Shah, D., Gaud, R. S., Misra, A. N., Parikh, R. (2010). Formulation of a water soluble mucoadhesive film of lycopene for treatment of leukoplakia. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2 (1), 6-10.
386. Biswajit, B., Kevin, G., Thimmasetty, J. (2010). Formulation and Evaluation of Pimozide Buccal Mucoadhesive Patches. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology (IJPSN)*, 2 (4), 739-747. https://doi.org/10.37285/ijpsn.2009.2.4.8
387. Wong, C. F., Yuen, K. H., Peh, K. K. (1999). Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches. *International Journal of Pharmaceutics*, 178 (1), 11-22. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00342-1
388. Gurny, R., Ryser, J. E., Tabatabay, C., Martenet, M., Edman, P., Camber, O. (1990). Precorneal residence time in humans of sodium hyaluronate as measured by gamma scintigraphy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 228 (6), 510-512. https://doi.org/10.1007/BF00918481
389. Ishida, M., Nambu, N., Nagai, T. (1983). Highly viscous gel ointment containing carbopol for application to the oral mucosa. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 31 (12), 4561-4564. https://doi.org/10.1248/CPB.31.4561
390. Kumar, S., Haglund, B. O., Himmelstein, K. J. (1994). In situ-forming gels for ophthalmic drug delivery. *Journal of ocular pharmacology*, 10 (1), 47-56. https://doi.org/10.1089/jop.1994.10.47
391. Martin, L., Wilson, C. G., Koosha, F., Uchegbu, I. F. (2003). Sustained buccal delivery of the

hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 55 (1), 35-45. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00118-2
392. Ikinci, G., Şenel, S., Akincibay, H., Kaş, S., Erciş, S., Wilson, C. G., et al. (2002). Effect of chitosan on a periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. *International Journal of Pharmaceutics*, 235 (1–2), 121-127. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00974-7
393. Jones, D. S., Woolfson, A. D., Brown, A. F., Coulter, W. A., McClelland, C., Irwin, C. R. (2000). Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 67 (2-3), 357-368. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00231-5
394. Vinholis, A. H., Figueiredo, L. C., Marcantonio Júnior, E., Marcantonio, R. A., Salvador, S. L., Goissis, G. (2001). Subgingival utilization of a 1% chlorhexidine collagen gel for the treatment of periodontal pockets. A clinical and microbiological study. *Brazilian Dental Journal*, 12 (3), 209-213.
395. Aher, S. D., Banerjee, S. K., Gadhave, M. V, Gaikawad, D. D. (2013). Emulgel: a new dosage form for topical drug delivery. *IJIPLS*, *3* (3), 1-10.
396. Ansel, H. C., Popovich, N. G., Allen, L. V. (1995). *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. Lippincott Williams & Wilkins.
397. Panwar, A., Upadhyay, N., Bairagi, M., Gujar, S., Darwhekar, G., Jain, D. (2011). Emulgel: a review. *Asian Journal of Pharmacy & Life Science*, 1 (3), 333-343.
398. Talat, M., Zaman, M., Khan, R., Jamshaid, M., Akhtar, M., Mirza, A. Z. (2021). Emulgel: an effective drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 47 (8), 1193-1199. https://doi.org/10.1080/03639045.2021.1993889
399. Singh, R. P., Parpani, S., Narke, R., Chavan, R. (2014). Emulgel: A recent approach for topical drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 2 (2), 112-123.
400. Mortazavı, S. A., Aboufazeli, R. (2003). An investigation into the effect of various penetration enhancers on percutaneous absorption of piroxicam. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 135-140.
401. Murthy, S. N., Hiremath, S. R. R. (2001). Physical and chemical permeation enhancers in transdermal delivery of terbutaline sulphate. *AAPS PharmSciTech*, 2 (1), 1-5. https://doi.org/10.1208/PT0201_TN1
402. Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B. P., S.Duraivel, Kumar, K. P. S. (2012). Recent Advances In Novel Topical Drug Delivery System. *The Pharma Innovation Journal*, 1 (9), 12-31.
403. N'Da, D. D. (2014). Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19 (12), 20780-20807. https://doi.org/10.3390/MOLECULES191220780
404. Joshi, B., Singh, G., Rana, A. C., Saini, S., Singla, V. (2011). Emulgel: a comprehensive review on the recent advances in topical drug delivery. *International Research Journal of Pharmacy*, 2 (11), 66-70.
405. Stanos S. P. (2007). Topical agents for the management of musculoskeletal pain. *Journal of pain and symptom management*, 33 (3), 342-355. https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2006.11.005
406. Eswaraiah, S., Swetha, K., Lohita, M., Preethi, P. J., Priyanka, B., Reddy, K. K. (2014). Emulgel: review on novel approach to topical drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 4 (1), 4-11.
407. Pathan, I. B., Setty, C. M. (2009). Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (2), 173-179. https://doi.org/10.4314/tjpr.v8i2.44527
408. Rieger, M. M., Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L. (1986). *The theory and practice of industrial pharmacy.* Philadelphia: PA Lea and Febiger.
409. Gibson, M. (2001). Pharmaceutical preformulation and formulation. *Drugs Pharm Sci*, *199*, 199.
410. Montenegro, L., Carbone, C., Condorelli, G., Drago, R., Puglisi, G. (2006). Effect of oil phase lipophilicity on in vitro drug release from o/w microemulsions with low surfactant content. *Drug development and industrial pharmacy*, 32 (5), 539-548. https://doi.org/10.1080/03639040600599806
411. Mohamed, M. I. (2004). Topical emulsion gel composition comprising diclofenac sodium. *AAPS Journal*, 6 (3), 26.
412. Ashara, K., Soniwala, M., Shah, K. (2016). Emulgel: A novel drug delivery system. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, 26 (3), 244-249.
413. Gupta, A., Mishra, A. K., Singh, A. K., Gupta, V., Bansal, P. (2010). Formulation and evaluation of topical gel of diclofenac sodium using different polymers. *Drug Invention Today*, 2 (5), 250-253.
414. Jain, A., Deveda, P., Vyas, N., Chauhan, J., Khambete, H., Jain, S. (2011). Development of antifungal emulsion based gel for topical fungal infection (s). *IJPRD*, 2 (12), 18-22.
415. Ayub, A. C., Gomes, A. D., Lima, M. V., Vianna-Soares, C. D., Ferreira, L. A. (2007). Topical

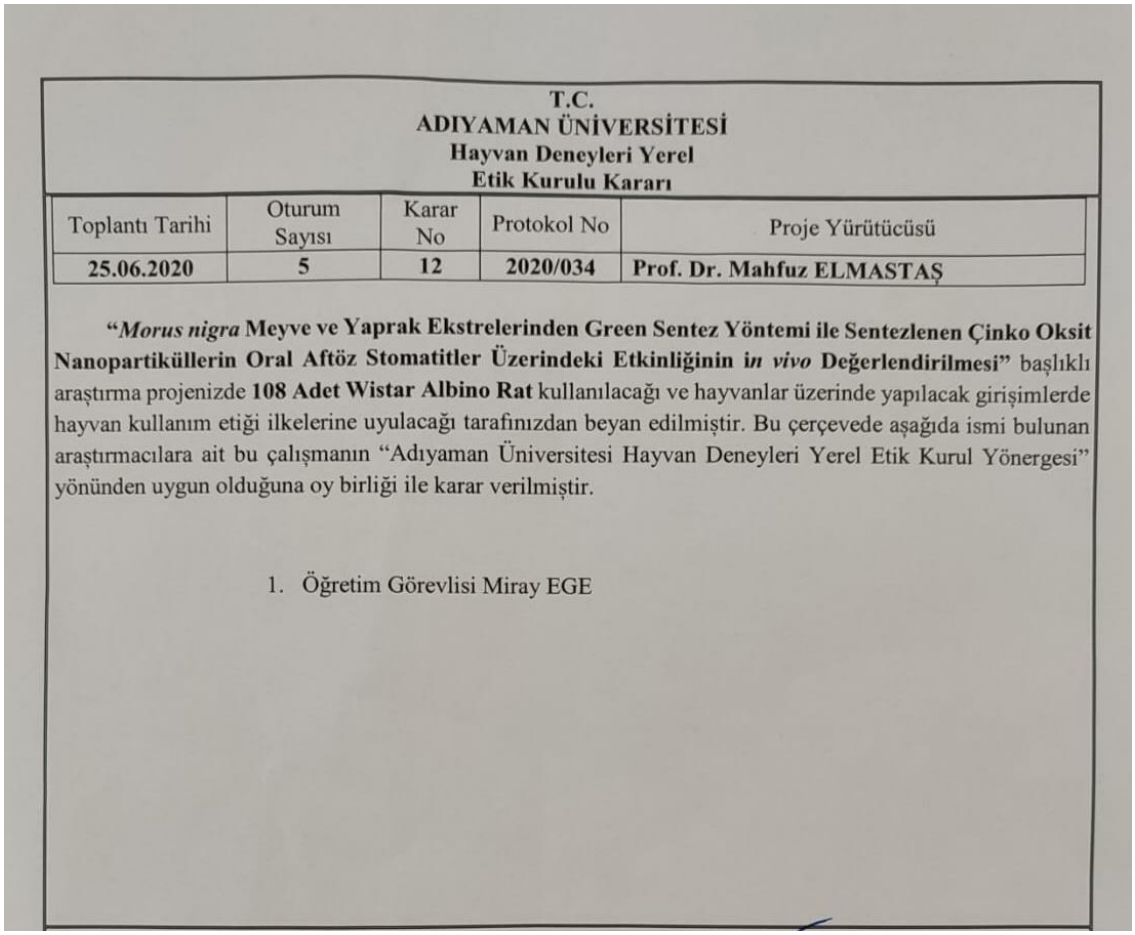
delivery of fluconazole: in vitro skin penetration and permeation using emulsions as dosage forms. *Drug development and industrial pharmacy*, 33 (3), 273-280. https://doi.org/10.1080/03639040600829989
416. Arora, P., Mukherjee, B. (2002). Design, development, physicochemical, and in vitro and in vivo evaluation of transdermal patches containing diclofenac diethylammonium salt. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91 (9), 2076-2089. https://doi.org/10.1002/jps.10200
417. Panchal, B., Rathi, S. (2018). Topical Emulgel: A Review on State of Art. *Pharma Science Monitor*, *9* (1), 253-264.
418. Pfister, W. R., Hsieh, D. S. (1990). Permeation enhancers compatible with transdermal drug delivery systems. Part I: selection and formulation considerations. *Medical Device Technology*, 1 (5), 48-55.
419. Vats, S., Saxena, C., Easwari, T. S., Shukla, V. K. (2014). Emulsion based gel technique: Novel approach for enhancing topical drug delivery of hydrophobic drugs. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*, 3 (2), 649-660.
420. Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88 (5), 1269-1278.
421. Gupta, M., Tomar, R. S., Kaushik, S., Mishra, R. K., Sharma, D. (2018). Effective Antimicrobial Activity of Green ZnO Nano Particles of Catharanthus roseus. *Frontiers in microbiology*, 9, 2030. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02030
422. Oliveira, M. B., Calixto, G., Graminha, M., Cerecetto, H., González, M., Chorilli, M. (2015). Development, characterization, and in vitro biological performance of fluconazole-loaded microemulsions for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *BioMed research international*, 2015, 396894. https://doi.org/10.1155/2015/396894
423. Mirani, A., Kundaikar, H., Velhal, S., Patel, V., Bandivdekar, A., Degani, M., et al. (2019). Tetrahydrocurcumin-loaded vaginal nanomicrobicide for prophylaxis of HIV/AIDS: in silico study, formulation development, and in vitro evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*, 9 (4), 828-847. https://doi.org/10.1007/s13346-019-00633-2
424. Kaewbanjong, J., Wan Sia Heng, P., Boonme, P. (2017). Clotrimazole microemulsion and microemulsion-based gel: evaluation of buccal drug delivery and irritancy using chick chorioallantoic membrane as the model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69 *(*12), 1716-1723. https://doi.org/10.1111/jphp.12809
425. Akhter, S., Anwar, M., Siddiqui, M. A., Ahmad, I., Ahmad, J., Ahmad, M. Z., et al. (2016). Improving the topical ocular pharmacokinetics of an immunosuppressant agent with mucoadhesive nanoemulsions: Formulation development, in-vitro and in-vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 19-29. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.048
426. Lorenzo-Veiga, B., Diaz-Rodriguez, P., Alvarez-Lorenzo, C., Loftsson, T., Sigurdsson, H. H. (2020). In Vitro and Ex Vivo Evaluation of Nepafenac-Based Cyclodextrin Microparticles for Treatment of Eye Inflammation. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10 (4), 709. https://doi.org/10.3390/nano10040709
427. Karavana, S. Y., Gökçe, E. H., Rençber, S., Özbal, S., Pekçetin, C., Güneri, P., et al. (2012). A new approach to the treatment of recurrent aphthous stomatitis with bioadhesive gels containing cyclosporine A solid lipid nanoparticles: in vivo/in vitro examinations. *International journal of nanomedicine*, 7, 5693-5704. https://doi.org/10.2147/IJN.S36883
428. Vilela-Goulart, M. d., Teixeira, R. T., Rangel, D. C., Niccoli-Filho, W., Gomes, M. F. (2008). Homogenous amniotic membrane as a biological dressing for oral mucositis in rats: histomorphometric analysis. *Archives of oral biology*, 53 (12), 1163-1171. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.07.003
429. Vuletic, M., Jakovljevic, V., Zivanovic, S., Papic, M., Papic, M., Mladenovic, R., et al. (2022). The Evaluation of Healing Properties of Galium verum-Based Oral Gel in Aphthous Stomatitis in Rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27 (15), 4680. https://doi.org/10.3390/molecules27154680
430. Fujisawa, K., Miyamoto, Y., Nagayama, M. (2003). Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 32 (6), 358-366. https://doi.org/10.1034/J.1600-0714.2003.T01-1-00111.X
431. Karavana, S. Y., Sezer, B., Güneri, P., Veral, A., Boyacioğlu, H., Ertan, G., et al. (2011). Efficacy of topical benzydamine hydrochloride gel on oral mucosal ulcers: an in vivo animal study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 40 (9), 973-978. https://doi.org/10.1016/J.IJOM.2011.02.034
432. Ogawa, K., Sakakibara, H., Iwata, R., Ishii, T., Sato, T., Goda, T., et al. (2008). Anthocyanin composition and antioxidant activity of the Crowberry (Empetrum nigrum) and other berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56* (12), 4457-4462. https://doi.org/10.1021/JF800406V
433. Wang, R.S., Dong, P.H., Shuai, X.X., Chen, M.S. (2022). Evaluation of Different Black Mulberry

Fruits (Morus nigra L.) Based on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity. *Foods*, 11 (9), 1252. doi: 10.3390/foods11091252.
434. Osmanoglu Yurdakul, Z., Esenay, F. I. (2019). Complementary and integrative health methods used for the treatment of oral mucositis in children with cancer in Turkey. *Journal for specialists in pediatric nursing : JSPN*, 24 (3), e12260. https://doi.org/10.1111/jspn.12260
435. Mihai, M. M., Dima, M. B., Dima, B., Holban, A. M. (2019). Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12 (13), 2176. https://doi.org/10.3390/ma12132176
436. Vijayakumar, V., Samal, S. K., Mohanty, S., Nayak, S. K. (2019). Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 137-148. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.120
437. Balaure, P. C., Holban, A. M., Grumezescu, A. M., Mogoşanu, G. D., Bălşeanu, T. A., Stan, M. S., et al. (2019). In vitro and in vivo studies of novel fabricated bioactive dressings based on collagen and zinc oxide 3D scaffolds. *International Journal of Pharmaceutics*, *557*, 199-207. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2018.12.063
438. Sonia, S. S., Linda Jeeva Kumari, L. J. K. H., Ruckmani, R. K., Sivakumar, S. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant potentials of biosynthesized colloidal zinc oxide nanoparticles for a fortified cold cream formulation: A potent nanocosmeceutical application. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 79, 581-589. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.05.059
439. Metwally, A. A., Abdel-Hady, A. N. A. A., Haridy, M. A. M., Ebnalwaled, K., Saied, A. R. A., Soliman, A. S. (2022). Wound healing properties of green (using Lawsonia inermis leaf extract) and chemically synthesized ZnO nanoparticles in albino rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29 (16), 23975-23987. https://doi.org/10.1007/S11356-021-17670-5
440. Irfan, M., Munir, H., Ismail, H. (2022). Characterization and fabrication of zinc oxide nanoparticles by gum Acacia modesta through green chemistry and impregnation on surgical sutures to boost up the wound healing process. *International Journal of Biological Macromolecules*, *204*, 466-475. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.02.043
441. Mou, J., Liu, Z., Liu, J., Lu, J., Zhu, W., Pei, D. (2019). Hydrogel containing minocycline and zinc oxide-loaded serum albumin nanopartical for periodontitis application: preparation, characterization and evaluation. *Drug Delivery*, 26 (1), 179. https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1571121
442. Chaitanya, N., Badam, R., Aryasri, A. S., Pallarla, S., Garlpati, K., Akhila, M., et al. (2020). Efficacy of Improvised Topical Zinc (1%) Ora-Base on Oral Mucositis during Cancer Chemo-Radiation-A Randomized Study. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 66 (2), 93-97. https://doi.org/10.3177/JNSV.66.93
443. Tang, Q., Xia, H., Liang, W., Huo, X., Wei, X. (2020). Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from Morus nigra and its anticancer activity of AGS gastric cancer cells. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 202, 111698. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111698
444. Amasya, G., Karavana, S. Y., Şen, T., Baloğlu, E., Tarimci, N. (2012). Bioadhesive and mechanical properties of triamcinolone acetonide buccal gels. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9 (1), 1-12.
445. Bagan, J., Saez, G., Tormos, C., Gavalda, C., Sanchis, J. M., Bagan, L., et al. (2014). Oxidative stress and recurrent aphthous stomatitis. *Clinical Oral Investigations*, 18 (8), 1919-1923. https://doi.org/10.1007/S00784-013-1181-2
446. Zhang, Z., Li, S., Fang, H. (2017). Enzymatic antioxidants status in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 46 (9), 817-820. https://doi.org/10.1111/JOP.12547
447. Gad, S. S., Fayez, A. M., Abdelaziz, M., Abou El-ezz, D. (2021). Amelioration of autoimmunity and inflammation by zinc oxide nanoparticles in experimental rheumatoid arthritis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394 (9), 1975-1981. https://doi.org/10.1007/S00210-021-02105-2
448. Mohammad, G., Tabrizi, M. H., Ardalan, T., Yadamani, S., Safavi, E. (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles and evaluation of anti-angiogenesis, anti-inflammatory and cytotoxicity properties. *Journal of biosciences*, 44 (2), 30.
449. Le, V., Trinh, T. X., Chien, P. N., Giang, N. N., Zhang, X. R., Nam, S. Y., et al. (2022). Evaluation of the Performance of a ZnO-Nanoparticle-Coated Hydrocolloid Patch in Wound Healing. *Polymers*, 14 (5), 919. https://doi.org/10.3390/polym14050919
450. Abdelbaky, A. S., Abd El-Mageed, T. A., Babalghith, A. O., Selim, S., Mohamed, A. (2022). Green Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles Using Pelargonium odoratissimum (L.) Aqueous Leaf

Extract and Their Antioxidant, Antibacterial and Anti-inflammatory Activities. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11 (8), 1444. https://doi.org/10.3390/antiox11081444
451. Erfani Majd, N., Tabandeh, M.R., Hosseinifar, S., Rahimi, Z.S. (2021). Chemical and Green ZnO nanoparticles ameliorated adverse effects of cisplatin on histological structure, antioxidant defense system and neurotrophins expression in rat hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 116, 101990. doi: 10.1016/j.jchemneu.2021.101990.
452. Ayoub, N., Badr, N., Al-Ghamdi, S. S., Alsanosi, S., Alzahrani, A. R., Abdel-Naim, A. B., et al. (2021). HPLC/MSn Profiling and Healing Activity of a Muco-Adhesive Formula of Salvadora persica against Acetic Acid-Induced Oral Ulcer in Rats. *Nutrients*, 14 (1), 28. https://doi.org/10.3390/nu14010028
453. Rezazadeh, F., Nazhvani, A. D., Abolmaali, S. S., Nazhvani, F. D., Bonyani, A. (2021). Efficacy of silver nanoparticle gel on healing of traumatic oral ulcers compared with triamcinolone oral paste: An experimental study on rats. *Dental Research Journal*, 18 (33), 1-7. Retrieved from /pmc/articles/PMC8314979/
454. Liang, N., Kitts, D. D. (2015). Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients*, 8 (1), 16. https://doi.org/10.3390/nu8010016

EK

Etik Kurul Onayı



T.C.
ADIYAMAN ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Kararı

Toplantı Tarihi	Oturum Sayısı	Karar No	Protokol No	Proje Yürütücüsü
25.06.2020	**5**	**12**	**2020/034**	**Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ**

"*Morus nigra* Meyve ve Yaprak Ekstrelerinden Green Sentez Yöntemi ile Sentezlenen Çinko Oksit Nanopartiküllerin Oral Aftöz Stomatitler Üzerindeki Etkinliğinin *in vivo* Değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projenizde **108 Adet Wistar Albino Rat** kullanılacağı ve hayvanlar üzerinde yapılacak girişimlerde hayvan kullanım etiği ilkelerine uyulacağı tarafınızdan beyan edilmiştir. Bu çerçevede aşağıda ismi bulunan araştırmacılara ait bu çalışmanın "Adıyaman Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi" yönünden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

1. Öğretim Görevlisi Miray EGE