EuropeAnatolia Health Sciences Journal E-ISSN: 2980-3861

RESEARCH ARTICLE
Volume:2 Issue:1 Year:2024 https://doi.org/10.5281/zenodo.11413855

Verbascum pulverulentum Vill. Ekstraktının Yetişkin İnsan Dermal Fibroblast (HDFa) Hücre Hattı Üstündeki Yara İyileştirici Etkilerinin Araştırılması

Verbascum pulverulentum Vill. Ekstraktının Yetişkin İnsan Dermal Fibroblast (HDFa) Hücre Hattı Üstündeki Yara İyileştirici Etkilerinin Araştırılması

Kemal Alp Nalcı[1], Dilara Uygun[2]

[1]Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Van, Türkiye
[2]Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Van, Türkiye

ÖZET

Kemoterapi kanserin tedavisinde sıklıkla kullanılan yöntemler arasında yer alır ve kanserli hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını önlemek amacıyla kullanılır. Kemoterapi kanserli hücrelerin çoğalmasını ve gelişmesini önlerken normal hücrelere de zarar vermektedir. Kemoterapinin bu sitotoksik zararından en fazla etkilenen oral mukoza epitel hücreleridir. Oral mukoza epitel hücreleri diğer hücrelere göre daha hızlı bölünebilme özelliğine sahip olduğu için kemoterapik ajanlar oral mukoza hücrelerinin büyüme ve olgunlaşmasını baskılayarak ağız ve boğazdaki primer mukozal bariyeri bozmaktadır. Bunun sonucu olarak gelişen oral mukozit mukoza bariyerinde bozulma, epitel hücrelerde zayıflama, eritem, ödem, kanama, sık ülserasyonlar, ses kısıklığı, konuşma güçlüğü, çiğneme ve yutma güçlüğü ile karakterizedir. Mukozit, tüm sindirim sistemini etkileyebilen, ağrı, ağız ülseri, şişkinlik, kusma, ishal ve peristaltizm bozukluklarına neden olan mukozanın inflamatuar bir değişikliğidir. Mukozit, lokal ve sistemik enfeksiyon insidansını artıran, yaşam kalitesini düşüren, radyasyon dozu ve kemoterapide sınırlayıcı bir risk faktörüdür. Mukozit hasarı nedeniyle, lokal ve sistemik enfeksiyon riskinin artar, yaşam kalitesi düşer, tedavi maliyetini artar, radyasyon dozu ve iletiminde sınırlamaya neden olur. Bu çalışmada, *Verbascum pulverulentum Vill.* ekstraktı ile geliştirilecek olan aday ilaç molekülü sayesinde öncelikli olarak kemoterapi sonucu meydana gelen bukkal mukozit yaraların iyileşmesinin hızlandırılması, yara iyileşmesi hızlandığından yaraların açık kalması sorununun azalması ve patojen mikroorganizmalar ile enfekte olma olasılıklarının azalması, bunun neticesinde de kemoterapi hastalarında mukozit prevalansının düşürülmesi amaçlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Epitel Hücresi, Hücre Kültürü, *Verbascum pulverulentum Vill.*, Yara İyileşmesi.

ABSTRACT

Chemotherapy is among the methods frequently used in the treatment of cancer and is used to prevent the development and proliferation of cancerous cells. While chemotherapy prevents the proliferation and development of cancerous cells, it also damages normal cells. Oral mucosal epithelial cells are most affected by this cytotoxic damage of chemotherapy. Since oral mucosa epithelial cells have the ability to divide faster than other cells, chemotherapeutic agents suppress the growth and maturation of oral mucosa cells and disrupt the primary mucosal barrier in the mouth and throat. Oral mucositis that develops as a result is characterized by deterioration in the mucosal barrier, weakening of epithelial cells, erythema, edema, bleeding, frequent ulcerations, hoarseness, difficulty in speaking, difficulty in chewing and swallowing. Mucositis is an inflammatory change of the mucosa that can affect the entire digestive system, causing pain, mouth ulcers, bloating, vomiting, diarrhea and peristalsis disorders. Mucositis is a risk factor that increases the incidence of local and systemic infection, reduces quality of life, and limits radiation dose and chemotherapy. Due to mucositis damage, the risk of local and systemic infection increases, the quality of life decreases, the cost of treatment increases, and it causes limitations in radiation dose and delivery. In this study, Verbascum pulverulentum Vill. thanks to the candidate drug molecule to be developed with the extract, it is primarily aimed to accelerate the healing of buccal mucositis wounds that occur as a result of chemotherapy, to reduce the problem of wounds remaining open as wound healing is accelerated, and to reduce the possibility of infection with pathogenic microorganisms, and as a result, to reduce the prevalence of mucositis in chemotherapy patients.

Keywords: Cell Culture, Epithelial Cell, *Verbascum pulverulentum Vill.*, Wound Healing.

Corresponding Author: Kemal Alp Nalcı, e-mail: kemalalpnalci@yyu.edu.tr
Received: 18.11.2023, Accepted: 09.03.2024, Published Online: 20.04.2024
Cited: Nalcı KA, et al. *Verbascum pulverulentum Vill.* Ekstraktının Yetişkin İnsan Dermal Fibroblast (HDFa) Hücre Hattı Üstündeki Yara İyileştirici Etkilerinin Araştırılması. Europeanatolia Health Sciences Journal. 2024;2(1):13-18. https://doi.org/10.5281/zenodo.11413855

The journal is licensed under a Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

GİRİŞ

Yara, vücuda gelebilecek bir yaralanma sonucu cildin epidermisinde hasar oluşması ve derinin normal anatomisinin ve fonksiyonlarının bozulması olarak tanımlanır. Yara iyileşmesi, kazayla veya kasıtlı olarak meydana gelen travma sonrası derinin bütünlüğünü korumak için önemli bir fizyolojik süreçtir (1).

Yara iyileşme süreci dinamik bir süreçtir (2). Yara iyileşmesinde keratinositler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve inflamatuar hücreler ile sitokinler, büyüme faktörleri ve hücre dışı matriks dâhil tüm hücre tipleri yer alır. Ayrıca normal yara iyileşmesinin gerçekleşmesi için bu hücre tiplerinin, büyüme faktörlerinin ve enzimlerin etkileşiminin yüksek düzeyde entegre olması gerekir (3).

Türk geleneksel tıbbında Verbascum türlerinin yaprak, çiçek ve bütün toprak üstü kısımları yaraların tedavisinde yara kurutucu olarak kullanılmaktadır (4). Verbascumun birçok türünün toprak üstü kısımları anal fistül tedavisinde kullanılmaktadır. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş yaprakları yaralar için kurutucu olarak kullanılmış, kaynatılan yapraklar karın ağrısı ve bronşit için çay olarak içilmiştir (5). Verbascum L. türlerinin çiçekleri ürogenital organlardaki kaşıntılı durumlarda kullanılmıştır (6). *Verbascum pulverulentum vill.* türü ile ilgili yeterli çalışma olmayışı yeni çalışmaları yapılması hususunda önem arz etmektedir.

Kemoterapi, hızla bölünerek ve büyüyerek çoğalan kanser hücrelerinin büyümesini durduran veya yavaşlatan bir tedavi yöntemidir. Kanseri tedavi etmek (kür sağlamak) ve tekrar etme riskini azaltmak amacıyla kullanılabileceği gibi, ağrı veya başka şikayetlere yol açan tümörlerin küçültülmesi amacıyla da kullanılabilir (7).

Kanserin birçok çeşidinde kemoterapi kullanılmaktadır. Çoğu zaman, kanser tedavisinde kemoterapiden önce veya sonra cerrahi tedavi ve/veya ışın tedavisi (radyoterapi) yapılmaktadır. Cerrahi veya radyoterapi öncesinde, tümör boyutunu küçültmek için kemoterapi önerilebilmektedir. Kemoterapi büyüyen ve bölünen hücreleri öldürdüğünden bu tür özellikleri olan normal hücrelere de zarar verebilir. Bu tür hücreler kemik iliği, sindirim ve üreme sisteminde ve saç foliküllerinde bulunduğu için yan etkiler daha çok bu bölgelerde görülür. Bu yan etkiler; yorgunluk ve kansızlık, mikrop bulaşması, infeksiyon, kanama problemleri, bulantı ve kusma, saç dökülmesi, ağız içi ve yemek borusu yaralar, ishal, kabızlık, cilt ve tırnaklara etki, iştahsızlık, cinsel fonksiyon bozukluğu gibi birçok yan etkisi bulunmamaktadır. Oral Mukozit kanser tedavisinin yaygın ve zayıflatıcı toksisitelerinden biridir (8).

Oral mukozitin klinik ve ekonomik sonuçları genellikle mukozitin ileri evrelerinde görülmektedir. Ciddi mukozit, hastaların ağız boşluğunda ve/veya boğazlarında şiddetli ağrı yaşamalarına neden olmaktadır ve bu durum bir yaradan çok daha fazla hasara sebep olabilmektedir (9).

Yeterince beslenemeyen hastalarda kilo kaybı, dehidratasyon, mukozada ülserasyon, sıvı-elektrolit dengesizliği gelişebilmekte ve total parenteral beslenme (TPB) başlanabilmektedir (10). Tedavi edilemezse, hastaların hastanede yatış süreleri uzamakta, tedavi maliyetleri artmakta ve yaşam kaliteleri bozulmaktadır (11).

Genel olarak yara iyileşmesi senkronize olmuş bir olay olmakla beraber hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme aşamalarından oluşmaktadır (12). Yara iyileşmesinde fibroblastlar, ECM proteinleri, keratinositler, TGF-β,trombosit kaynaklı büyüme faktörü-CC (PDGF-CC, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) rol alan ana yapılardır (13). Bu çalışamamızda fibroblastların yara iyileştirmesindeki etkisinden yararlanarak bukkal mukozit tedavi edilmesi ve önlenmesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilecektir.



Şekil 1.



Şekil 2.



Şekil 3.

(Şekil 1-2 de kemoterapiye, şekil 3'te radyoterapiye bağlı bukkal mukozit yaraları görülmektedir.)

Van Çaldıran sellik köyünde Yapılan bir etnobotanik çalışmada yöre halkının *Verbascum pulverulentum Vill.* (Yöre halkı deyişiyle mevujark) bitkisinin toprak üstü kısmının kurutulup toz edildikten sonra yaraların üzerine sürüp kullandıklarını ve bir hafta süreyle uygulama yaptıklarından sonra yarada gözle görülür sonuçlar alındığını ifade etmişlerdir.

Çalışmanın amacı *Verbascum pulverulentum Vill.* ekstraktının yara iyileştirici etkilerinin hücre kültürü ortamında araştırılmasıdır. Elde edilen veriler doğrultusunda da ileride bukkal mukozitte kullanılabilecek bir aday ilaç molekülü elde edebilmektir. Elde edilecek bu aday ilaç molekülünün etkileri sayesinde de hastaların refah seviyeleri artabilecek, kemoterapi veya radyoterapi gören hastalarda ağız ve boğazda oluşan yaraların iyileşmesi hızlanabilecek ve yara iyileşmelerinin hızlanması halinde bukkal mukozit görülme durumu azalabilecektir.

YÖNTEM

Verbascum pulverulentum Vill. Bitkisinin Toplanması ve Kurutulması

Verbascum pulverulentum Vill. Mayıs 2022'de Van Çaldıran Sellik Köyü civarı 2050m rakımda (39.127641,43.898286) toplandı ve teşhis edildi. Güneş görmeyen, oda sıcaklığında kurutuldu.

Verbascum pulverulentum Vill. Bitki Ekstresinin Hazırlanması

Gölgede kurutulan bitki örneği çiçekli gövdesi öğütücü ile toz haline getirildi. 150 g toz edilmiş *Verbascum pulverulentum Vill.* soxhlet apareyinde etanol ile tüketildi. Elde edilen ekstre rotavaporda alçak basınç altında yoğunlaştırılıp etanol ekstresi hazırlandı.

HDFa Kültürü

Bu hücre hattının kültüre edilmesinde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (Fetal Bovine Serum), Penisilin – Streptomisin, amphotricin B (Life 26 Technology Gibco 15240-062), %1 L-Glutamine (Life Technology 25030-081) maddeleri kullanıldı.

MTT sitotoksisite Testi

MTT [3- (4,5- Dimethyldiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid] tozu: Sigma Aldrich, No: MKBR4419V Toz halinde MTT ürününden solüsyon hazırlama işlemi için öncelikle 5 mg toz halinde MTT tartıldı. Akabinde 1 ml arındırılmış PBS ilavesi yapıldı. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra 0.22 µm çapında porlara sahip filtreler kullanılarak sterilize edildi. MTT çözeltisi olarak kullanılan DMSO (dimethyl sulfoxide) W29A01596 numaralı Sigma Aldrich ürünüdür.

Verbascum Pulverulentum Vill. Ekstraktlarının oluşturduğu sitotoksisite düzeyini ölçme amacıyla MTT testi yapıldı. (Çizelge 3.1). Ekim sonrasında plate tabanına yapışan hücrelerin üzerinde yer alan besi ortamı alındı. *Verbascum Pulverulentum Vill.* ekstraktlarını içeren besi ortamları flasklara ilave edildi. Etken maddelerini içeren ortamlarda hücrelerin 24 saat süreyle maruz kalmaları sağlandı.

İn-vitro deneyde kullanılan dozlar

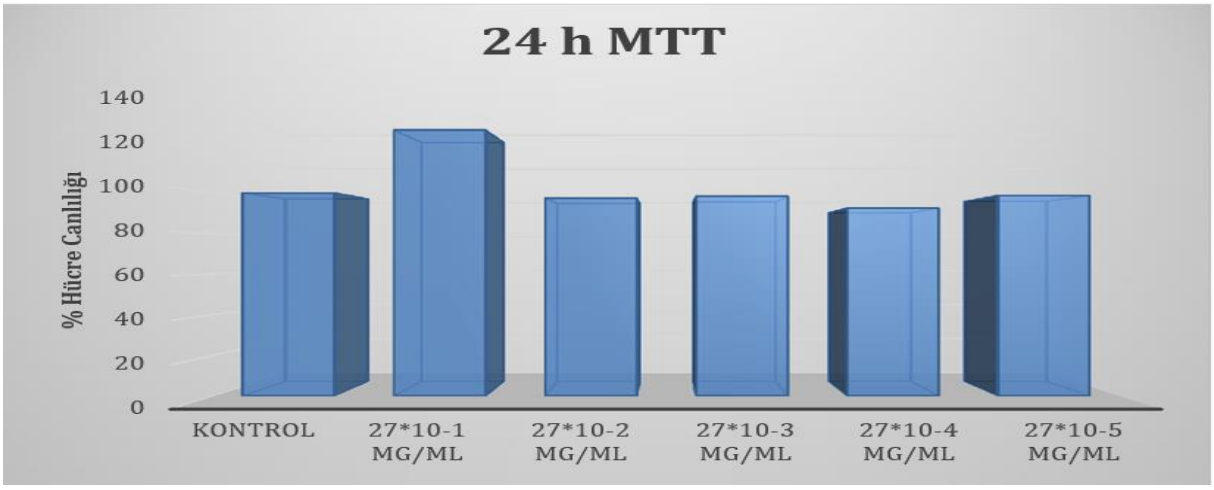
Deney grupları	Dozlar
Kontrol	-
Verbascum Pulverulentum Vill. Ekstraktı	$27*10^{-1}$ mg/ml
Verbascum Pulverulentum Vill. Ekstraktı	$27*10^{-2}$ mg/ml
Verbascum Pulverulentum Vill. Ekstraktı	$27*10^{-3}$ mg/ml
Verbascum Pulverulentum Vill. Ekstraktı	$27*10^{-4}$ mg/ml
Verbascum Pulverulentum Vill. Ekstraktı	$27*10^{-5}$ mg/ml

Tüm bu konsantrasyonlarda yapılan uygulama işleminin yanı sıra, kontrol olarak hazırlanan kuyucuklara kullanılan maddelerin hazırlanmasında kullanılan çözücüden de aynı oranda uygulandı. Kullanılan her bir etken maddenin farklı konsantrasyonlarda uygulama işlemi kapsamında her bir madde için en az 6 kuyucuk kullanıldı. Maruziyet süresi sonunda hücreler üzerinde yer alan besiyeri 90 µl'ye tamamlandı. Akabinde daha önceden hazırlanmış olan MTT solüsyonu (5mg/ml) kuyucukların her birine 10 µl ilave edilerek kuyucukların hacimleri 100 µl'ye tamamlandı. Bunun ardından hazırlanan plateler 37°C'de, %5 CO2 'li inkübatörde 4 saat bekletildi. Bu işlemin sonundan kuyucuklarda yer alan sıvı boşaltılarak yerine 100 µl DMSO ilave edildi. DMSO ilavesi ardından spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda okuma işlemine geçildi.

BULGULAR

Hücre Kültürü MTT Testi

24 saat ilaç maruziyetinden sonra kültür kaplarına MTT solüsyonu eklenerek hücre canlılığı incelenmiştir. Elde edilen veriler analiz edildikten sonra aşağıda sunulmuştur.



Şekil 1. HDFa hücreleri için % canlılık oranları- MTT test grafiği

Şekil 1'de HDFa hücrelerinin 24 saatlik ilaç maruziyeti sonrası canlılık oranı MTT testi yardımıyla hesaplandı. Bu amaçla verbascum pulverulentum'un 27*10-1 mg/ml, 27*10-2 mg/ml, 27*10-3 mg/ml, 27*10-4 mg/ml, 27*10-5 mg/ml ve bu dozların kombinasyonları HDFa hücrelerine uygulandı. Tüm grupların anlamlılık sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Alınan sonuçlarımıza göre 27*10-1 grubu en yüksek canlılığı gösterdi. Elde edilen verilere göre *verbascum pulverulentum vill.* ektraktının 27*10-1 mg/ml dozunun ilave edildiği grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman %130,8693631 oranında bir çoğalma gerçekleştiği görülmüştür.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kemoterapi, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan etkili bir yöntemdir. Bununla birlikte, kemoterapi tedavisine bağlı olarak bir dizi yan etki ortaya çıkabilir ve bunların arasında mukozit de bulunur. Mukozit, mukozal dokunun iltihaplanmasıyla karakterize olan bir durumdur (14). Mukozit gelişiminde, kemoterapi ilaçlarından kaynaklanan toksik etkiler, mukozal dokuda hücre ölümüne ve iltihaplanmaya neden olur. Kemoterapi ilaçları, hızla bölünen hücreleri hedef alırken, sağlıklı hücrelere de zarar verebilir (15).

Mukozitin semptomları genellikle kemoterapi tedavisi başladıktan sonra birkaç hafta içinde ortaya çıkar. Ağız ve mukozal bölgelerde görülen inflamasyon ve ülserasyonlar, teşhis için önemli bulgulardır. Ayrıca, bazı ilaçlar ve tedavi protokollerinde mukozit önleyici ilaçların kullanılması da yaygın bir uygulamadır (16).

Mukozitin yönetimi, semptomların hafifletilmesini, yaraların iyileştirilmesini ve hasta konforunun sağlanmasını hedefler. Bu amaçla, ağrı yönetimi için analjezik ilaçlar, topikal anestezikler ve oral hijyen ürünleri kullanılmaktadır. Yaraların iyileştirilmesi için topikal ajanlar ve ağız çalkalama solüsyonları kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlar mukozitin iyileştirilmesinde yeterli düzeyde değildir (17).

Bu çalışmada amacımız mukozitin en kısa sürede iyileşmesini sağlayacak bize yeni ilaç geliştirilmesine öncü olmaktır. Çalışmamız esnasında hücre canlılığını takip etmek için MTT analizi yöntemini kullandık. Biz çalışmamızda ucuz, hızlı, etkili, kolay kullanımlı, güvenilirliği oldukça yeterli ve dünya çapında yaygın kullanıma sahip olduğu için MTT analizi yöntemini kullandık. MTT analiz sonuçlarımıza göre hücrelerin canlılık düzeylerinin arttığı bulunmuştur. Buna göre *Verbascum pulverulentum vill.* 27*10-1 mg/ml verilen grupta kontrole göre anlamlı bir biçimde hücre çoğalmasında artma gözlenmiştir

AÇIKLAMALAR

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bap Koordinatörlüğü TLO-2023-10443 kodlu, 10443 proje numarası ile desteklenmiştir.

Çıkar çatışması yoktur .

KAYNAKLAR

1. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. Advances in therapy. Mar 2017;34(3):599-610. doi:10.1007/s12325-017-0478-y

2. Shi C, Wang C, Liu H, et al. Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2020;8:182. doi:10.3389/fbioe.2020.00182

3. Blakytny R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association. Jun 2006;23(6):594-608. doi:10.1111/j.1464-5491.2006.01773.x

4. Süntar I, Tatlı II, Küpeli Akkol E, Keleş H, Kahraman Ç, Akdemir Z. An ethnopharmacological study on Verbascum species: From conventional wound healing use to scientific verification. Journal of Ethnopharmacology. 2010/11/11/ 2010;132(2):408-413. doi:https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.004

5. Donn P, Barciela P, Perez-Vazquez A, Cassani L, Simal-Gandara J, Prieto MA. Bioactive Compounds of Verbascum sinuatum L.: Health Benefits and Potential as New Ingredients for Industrial Applications. Biomolecules. Feb 24 2023;13(3)doi:10.3390/biom13030427

6. Diker NY, Kahraman C, Kupeli Akkol E, et al. The evaluation of sterile solutions of Ilwensisaponin A and C from Verbascum pterocalycinum var. mutense Hub.-Mor. on antiviral, antinociceptive and anti-inflammatory activities. Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society. Mar 2019;27(3):432-436. doi:10.1016/j.jsps.2019.01.004

7. Çıtlak K, Kapucu S. Kemoterapi Alan Hastalarda Görülen Oral Mukozitin Önlemesi ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar: Kanıta Dayalı Uygulamalar. Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi. November 2015;2(1):70-77.

8. Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T. Radiation-Induced Oral Mucositis. Frontiers in oncology. 2017;7:89. doi:10.3389/fonc.2017.00089

9. Sakellari I, Angelopoulou M, Tsopra O, et al. A prospective study of incidence, clinical and quality of life consequences of oral mucositis post palifermin prophylaxis in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic cell transplantation. Annals of hematology. Oct 2015;94(10):1733-40. doi:10.1007/s00277-015-2437-5

10. Eduardo FP, Bezinelli LM, Gobbi MF, et al. Impact of Oral and Gastrointestinal Mucositis on Body Weight Alterations during Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Nutrition and cancer. Feb-Mar 2018;70(2):241-248. doi:10.1080/01635581.2018.1412476

11. Staudenmaier T, Cenzer I, Crispin A, Ostermann H, Berger K. Burden of oral mucositis in stem cell transplant patients-the patients' perspective. Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer. May 2018;26(5):1577-1584. doi:10.1007/s00520-017-4000-5

12. Tepebaşı MY, Şahin Calapoğlu N. Yara İyileşmesinin Hücresel ve Moleküler Mekanizması (Cellular and Molecular Mechanism of Wound Healing). Medical Journal of Süleyman Demirel University. December 2016;23(4):0-0.

13. Suh S, Kim KW. Diabetes and cancer: is diabetes causally related to cancer? Diabetes & metabolism journal. Jun 2011;35(3):193-8. doi:10.4093/dmj.2011.35.3.193

14. Kusiak A, Jereczek-Fossa BA, Cichońska D, Alterio D. Oncological-Therapy Related Oral Mucositis as an Interdisciplinary Problem-Literature Review. International journal of environmental research and public health. Apr 3 2020;17(7)doi:10.3390/ijerph17072464

15. Hong BY, Sobue T, Choquette L, et al. Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. Microbiome. Apr 25 2019;7(1):66. doi:10.1186/s40168-019-0679-5

16. Bell A, Kasi A. Oral Mucositis. StatPearls. StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

17. Singh V, Singh AK. Oral mucositis. National journal of maxillofacial surgery. Jul-Dec 2020;11(2):159-168. doi:10.4103/njms.NJMS_10_20