



T.C.

BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON

ANABİLİM DALI

**FARKLI BİTKİSEL EKSTRELERİN VE UÇUCU YAĞ EMÜLSİYONLARININ
İNSAN FİBROBLAST HÜCRELERİNİN GÖÇÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İN VİTRO YARA İYİLEŞME MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. HİLAL YILDIRIM

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Harun UYSAL

TEMMUZ 2025

BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON

ANABİLİM DALI

**FARKLI BİTKİSEL EKSTRELERİN VE UÇUCU YAĞ EMÜLSİYONLARININ
İNSAN FİBROBLAST HÜCRELERİNİN GÖÇÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İN VİTRO YARA İYİLEŞME MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. HİLAL YILDIRIM

**Bu tez Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
20231206 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Harun UYSAL

TEMMUZ 2025

Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Doktor Hilal Yıldırım, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Farklı Bitkisel Ekstrelerin ve Uçucu Yağ Emülsiyonlarının İnsan Fibroblast Hücrelerinin Göçü Üzerindeki Etkilerinin İn Vitro Yara İyileşme Modelinde Araştırılması” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Harun UYSAL**
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Sedat AKBAŞ**
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Asım ESEN
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Muhittin ÇALIM
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Yedek Üyeler : **Doç. Dr. Serdar YEŞİLTAS**
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi İsmail SÜMER
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : 04/07/2025

Savunma Tarihi : 11/07/2025

BEYAN FORMU

Uzmanlık tezi olarak sunduğum “Farklı Bitkisel Ekstrelerin ve Uçucu Yağ Emülsiyonlarının İnsan Fibroblast Hücrelerinin Göçü Üzerindeki Etkilerinin İn Vitro Yara İyileşme Modelinde Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona danışmanım Doç. Dr. Harun UYSAL sorumluluğunda tamamladığımı, tezin planlamasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynakçada eksiksiz gösterdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Dr. Hilal YILDIRIM

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgi, deneyim ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen; her daim yapıcı yaklaşımı, örnek duruşu ve akademik rehberliğiyle bana yol gösteren tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Doç. Dr. Harun UYSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca gerek mesleki birikimiyle gerekse insani yaklaşımıyla bize ilham veren, her zaman güven verici liderliğiyle bizleri destekleyen Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kazım KARAASLAN'a teşekkür ederim.

Anesteziyoloji ve Reanimasyon eğitimime başladığım andan itibaren, mesleğin inceliklerini sevgiyle öğreten, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Sedat AKBAŞ, Doç. Dr. Hayrettin DAŞKAYA, Doç. Dr. Serdar YEŞİLTAS, Dr. Öğr. Üyesi Asım ESEN, Dr. Öğr. Üyesi İsmail SÜMER, Dr. Öğr. Üyesi Muhittin ÇALIM, Öğr. Gör. Dr. Sinan YILMAZ, Öğr. Gör. Dr. Ayşe KARATAŞ, Uzm. Dr. Şeyhamit ŞAHİN'e şükranlarımı sunarım.

Asistanlık yolculuğunda birlikte büyüdüğüm, mesleki ve insani dayanışmamızla bu süreci anlamlı kılan can yoldaşlarım Dr. Saadet ÖZTOP, Dr. Aylin Ceren ŞANLI ve Dr. Fatih BOZKURT'a samimi dostlukları ve güçlü destekleri için gönülden teşekkür ederim.

Meslek hayatımda birlikte yol aldığım başta Sefa SOLUGAN olmak üzere kıymetli yoğun bakım hemşirelerine, ameliyathane teknikerlerine, yardımcı sağlık personellerine ve değerli asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez yazım sürecimde değerli katkılarından ve desteklerinden dolayı Uzm. Biy. Alime SARIKAYA ve Dr. Öğr. Üyesi Şeyma ULUSOY'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, sevgileri ve dualarıyla bana güç veren anneme, babama, canım abime ve tüm aileme teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük şansım, en büyük desteğim, yoldaşım, iyi günde kötü günde elimi hiç bırakmayan, canım eşim Op. Dr. Melih YILDIRIM'a; hayatıma anlam ve neşe katan, her gülüşüyle beni yeniden motive eden kıymetli oğlum Can'a sonsuz sevgim ve minnetimle...

İÇİNDEKİLER

BEYAN FORMU	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	VIII
TABLOLARIN LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR.....	X
SUMMARY	XIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Deri.....	4
2.1.1. Derinin yapısı ve katmanları	4
2.1.1.1. Epidermis.....	5
2.1.1.2. Dermis	5
2.1.1.3. Hipodermis (subkutan doku)	6
2.1.2. Derinin fonksiyonları.....	7
2.1.3. Derinin yara iyileşmesi ile ilişkisi	8
2.2. Yara	8
2.2.1. Yara tipleri.....	8
2.3. Yara İyileşmesi.....	11
2.3.1. Yara iyileşmesinin evreleri.....	12
2.3.1.1. Hemostaz evresi	13
2.3.1.2. İnflamasyon evresi	14
2.3.1.3. Proliferasyon evresi	16
2.3.1.4. Yeniden şekillenme (remodeling) evresi.....	20
2.3.2. Yara iyileşme türleri	21
2.3.3. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler.....	22

2.4.	Yara Tedavi Yaklaşımları	29
2.4.1.	Geleneksel yara tedavisi	29
2.4.2.	Modern yara bakımı yöntemleri	29
2.4.3.	Debridman yöntemleri.....	30
2.4.4.	Negatif basınçlı yara tedavisi (NPWT)	30
2.4.5.	Sistemik tedavi yaklaşımları.....	30
2.4.6.	Biyolojik ve biyomühendislik ürünleri.....	31
2.4.7.	Fiziksel Yöntemler	31
2.4.8.	Bitkisel alternatifler	32
2.5.	Hücre Kültürü.....	43
2.5.1.	Sitotoksosite testleri	43
2.5.1.1.	MTT testi	44
2.5.2.	In vitro yara modelleri	47
3.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	48
3.1.	Deney Tasarımı ve Gruplar	48
3.1.1.	Kontrol grubu:	48
3.1.2.	Bitkisel ekstre grupları:	48
3.1.3.	Uçucu yağ emülsiyonu grupları:	49
3.2.	Çalışma Akışı.....	50
3.3.	Bitki Ekstreleri Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	51
3.3.1.	Bitkisel materyaller	51
3.3.2.	Bitki ekstrelerinin hazırlanması.....	52
3.3.3.	Papatya (<i>Matricaria recutita</i> L.) ekstresinin apigenin-7-glukozit miktar tayini	52
3.3.4.	Sarı kantaron (<i>Hypericum perforatum</i> L.) toprak üstü ekstresinin hiperisin miktar tayini	53
3.3.5.	Aynısefa (<i>Calendula officinalis</i> L.) çiçek ekstresinin toplam karotenoid miktar tayini	53
3.3.6.	Aynısefa (<i>Calendula officinalis</i> L.) çiçek ekstresinin ve Sinirotu (<i>Plantago major</i> L.) yaprak ekstresinin total fenolik madde miktar tayini yöntemi.....	54
3.3.7.	Aynısefa (<i>Calendula officinalis</i> L.) çiçek ekstresinin ve Sinirotu (<i>Plantago major</i> L.) yaprak ekstresinin total flavonoit madde miktar tayini yöntemi.....	54

3.4.	Uçucu Yağlar Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	55
3.4.1.	Uçucu yağlar.....	55
3.4.2.	GC-FID/MS ile uçucu yağ bileşenlerinin analizi	55
3.4.3.	Emülsiyonların hazırlanması	56
3.5.	Hücre Kültürü.....	56
3.5.1.	Bitkisel formülasyonlar	57
3.5.2.	Sitotoksosite deneyi (IC ₅₀ tayini)	57
3.5.3.	Yara iyileşme (Scratch) deneyi	58
3.6.	Deneyi Sonlandırma Kriterleri	59
3.7.	Verilerin Kayıtları	60
3.8.	Primer ve Sekonder Çıktılar	60
3.9.	İstatistiksel Analiz	60
4.	BULGULAR	61
4.1.	Bitki Ekstreleri ile İlgili Bulgular	61
4.1.1.	Ekstrelerin verimleri	61
4.1.2.	Papatya (<i>Matricaria recutita</i> L.) çiçek ekstresinin apigenin-7-glukozit miktar tayini bulguları.....	61
4.1.3.	Sarı kantaron (<i>Hypericum perforatum</i> L.) toprak üstü kısmı ekstresinin hiperisin miktar tayini bulguları	63
4.1.4.	Aynısefa (<i>Calendula officinalis</i> L.) çiçek ekstresinin toplam karotenoid miktar tayini bulguları.....	64
4.1.5.	Aynısefa (<i>Calendula officinalis</i> L.) çiçek ekstresinin ve Sinirotu (<i>Plantago major</i> L.) yaprak ekstresinin total fenolik madde miktar tayini bulguları... ..	65
4.1.6.	Aynısefa (<i>Calendula officinalis</i> L.) çiçek ekstresinin ve Sinirotu (<i>Plantago major</i> L.) yaprak ekstresinin total flavonoit madde miktar tayini bulguları... ..	66
4.2.	Uçucu Yağlar Üzerine Yapılan Çalışmaların Bulguları.....	67
4.2.1.	GC-FID/MS ile uçucu yağ bileşen analizi bulguları	67
4.2.1.1.	<i>Laurus nobilis</i> L. yaprak uçucu yağı bulguları.....	68
4.2.1.2.	<i>Salvia officinalis</i> L. yaprak uçucu yağı bulguları.....	69
4.2.1.3.	<i>Origanum onites</i> L. toprak üstü kısmı uçucu yağı bulguları	70
4.2.1.4.	<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don. toprak üstü kısmı uçucu yağı bulguları	71
4.3.	Hücresel Canlılığın Değerlendirilmesi.....	71

4.3.1. Ekstrelerin hücre canlılığı üzerine etkisi	72
4.3.2. Uçucu yağ emülsiyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi	74
4.4. Yara İyileşme Modeli Verilerinin Değerlendirilmesi	75
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ	98
7. KAYNAKLAR	99



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

ŞEKİL 1. DERİNİN KATMANLARI.....	4
ŞEKİL 2. YARA İYİLEŞMESİNİN EVRELERİ.....	13
ŞEKİL 3. YARA İYİLEŞMESİ EVRELERİ VE BASKIN HÜCRE GRUPLARI.....	18
ŞEKİL 4. YARA EVRELERİNDE MATRİKS BİLEŞENLERİNİN BİRİKİMİ.....	19
ŞEKİL 5. YARA İYİLEŞME TÜRLERİ.....	21
ŞEKİL 6. YARA İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	23
ŞEKİL 7. <i>MATRİCARİA RECUTİTA</i> L. [118].....	33
ŞEKİL 8. <i>HYPERİCUM PERFORATUM</i> L. [134].....	34
ŞEKİL 9. <i>CALENDULA OFFİCİNALİS</i> L. [138].....	35
ŞEKİL 10. <i>PLANTAGO MAJOR</i> L. [144].....	37
ŞEKİL 11. <i>ORİGANUM ONİTES</i> L. [151].....	38
ŞEKİL 12. <i>SALVİA OFFİCİNALİS</i> L. [160].....	39
ŞEKİL 13. <i>HELİCHRYSUM İTALİCUM</i> (ROTH) G. DON [164].....	40
ŞEKİL 14. <i>LAURUS NOBİLİS</i> L. [169].....	42
ŞEKİL 15. MTT'NİN KİMYASAL YAPISI.....	45
ŞEKİL 16. FORMAZAN KRİSTALLERİNİN OLUŞUM REAKSİYONU.....	45
ŞEKİL 17. MTT TESTİNİN UYGULANIŞI.....	46
ŞEKİL 18. DENEY GRUPLARI VE RANDOMİZASYON (N=GRUP SAYISI).....	49
ŞEKİL 19. HAZIRLANAN EKSTRELER VE UÇUCU YAĞ EMÜLSİYONLARI.....	57
ŞEKİL 20. 24 KUYUCUKLU KÜLTÜR PLAKLARINA BİTKİSEL AJANLARIN EKLENMESİ.....	58
ŞEKİL 21. UÇUCU YAĞ EMÜLSİYONLARINA AİT YARA ÇİZİK DENEYİ.....	59
ŞEKİL 22. EKSTRELERE AİT YARA ÇİZİK DENEYİ.....	59
ŞEKİL 23. (A) STANDART APİGENİN-7-GLUKOZİT KROMATOGRAMI, (B) PAPATYA EKSTRESİ KROMATOGRAMININ STANDART MADDE KROMATOGRAMI İLE ÇAKIŞTIRILMIŞ HALİ.....	61
ŞEKİL 24. APİGENİN-7-GLUKOZİDİN HPLC/PDA İLE OLUŞTURULAN KALİBRASYON EĞRİSİ.....	62
ŞEKİL 25. HİPERİSİN'İN UV-VİS SPEKTROFOTOMETRE CİHAZI İLE OLUŞTURULAN KALİBRASYON EĞRİSİ.....	63
ŞEKİL 26. B-KAROTEN'İN UV-VİS SPEKTROFOTOMETRE CİHAZI İLE OLUŞTURULAN KALİBRASYON EĞRİSİ.....	64
ŞEKİL 27. GALLİK ASİT'İN UV-VİS MİKROPLAKA SPEKTROFOTOMETRESİ İLE OLUŞTURULAN KALİBRASYON EĞRİSİ.....	65
ŞEKİL 28. KERSETİN'İN UV-VİS MİKROPLAKA SPEKTROFOTOMETRESİ İLE OLUŞTURULAN KALİBRASYON EĞRİSİ.....	66
ŞEKİL 29. EKSTRE KONSANTRASYONLARININ HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ.....	72
ŞEKİL 30. UÇUCU YAĞ EMÜLSİYON KONSANTRASYONLARININ HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ.....	74
ŞEKİL 31. 0. SAAT YARA UZUNLUKLARININ DAĞILIM GRAFİĞİ.....	76
ŞEKİL 32. 24. SAAT YARA KAPANMA UZUNLUĞU: KONTROL GRUBU İLE DENEY GRUPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ($P<0.05$).....	77
ŞEKİL 33. 48. SAAT YARA KAPANMA UZUNLUĞU: KONTROL GRUBU İLE DENEY GRUPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ($P<0.05$).....	78
ŞEKİL 34. 24 VE 48. SAAT YARA KAPANMA UZUNLUKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI ($P<0.05$).....	79

TABLÖLARIN LİSTESİ

TABLO 1. DENEY AKIŞ ŞEMASI.....	51
TABLO 2. EKSTRELERİN VE DROGUN APIGENİN-7-GLUKOZİT MİKTARLARI.....	62
TABLO 3. EKSTRELERİN VE DROGUN TOPLAM HİPERİSİN MİKTARLARI.....	63
TABLO 4. EKSTRELERİN VE BİTKİNİN TOPLAM HİPERİSİN MİKTARLARI.....	64
TABLO 5. AYNİSEFA ÇİÇEK VE SİNİROTU YAPRAK EKSTRELERİNİN TOPLAM FENOLİK MADDE MİKTARLARI.....	66
TABLO 6. AYNİSEFA ÇİÇEK VE SİNİROTU YAPRAK EKSTRELERİNİN TOPLAM FLAVONOİT MADDE MİKTARLARI.....	67
TABLO 7. <i>LAURUS NOBİLİS</i> L. YAPRAK UÇUCU YAĞININ GC/MS İLE BELİRLENEN BİLEŞİMİ.....	68
TABLO 8. <i>SALVIA OFFICINALİS</i> L. YAPRAK UÇUCU YAĞININ GC/MS İLE BELİRLENEN BİLEŞİMİ.....	69
TABLO 9. <i>ORIGANUM ONİTES</i> L. TOPRAK ÜSTÜ KİSMİ UÇUCU YAĞININ GC/MS İLE BELİRLENEN BİLEŞİMİ.....	70
TABLO 10. <i>HELİCHRYSUM İTALİCUM</i> (ROTH) G. DON. TOPRAK ÜSTÜ KİSMİ UÇUCU YAĞININ GC/MS İLE BELİRLENEN BİLEŞİMİ.....	71
TABLO 11. EKSTRE KONSANTRASYONLARINA GÖRE HÜCRE CANLILIĞI ORT ± SS (MİN –MAX) DEĞERLERİ.....	73
TABLO 12. UÇUCU YAĞ EMÜLSİYON KONSANTRASYONLARINA GÖRE HÜCRE CANLILIĞI ORT ± SS (MİN –MAX) DEĞERLERİ.....	75
TABLO 13. 24. SAATTE GRUPLARA GÖRE YARA UZUNLUĞU ORTALAMA DEĞERLERİ, STANDART SAPMALAR VE İSTATİSTİKSEL ANLAMLILIK.....	77

KISALTMALAR

A7G	: Apigenin-7-glukozit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	: Fetal Bovin Serum
FGF-2	: Fibroblast Büyüme Faktörü-8
GAG	: Glikozaminoglikan
Ig-G	: Immunoglobulin-G
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IL-1	: Interlökin-1
IL-6	: Interlökin-6
IL-8	: Interlökin-8
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MTT	: 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
TGF-β	: Transform Edici Büyüme Faktör-beta
TIMP	: Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-alfa
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

Farklı Bitkisel Ekstrelerin ve Uçucu Yağ Emülsiyonlarının İnsan Fibroblast Hücrelerinin Göçü Üzerindeki Etkilerinin İn Vitro Yara İyileşme Modelinde Araştırılması

Giriş ve Amaç: Yara iyileşmesi, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden modelleme olmak üzere üç ana fazdan oluşan dinamik bir süreçtir. Günümüzde yara tedavisinde kullanılan yöntemlerin sınırlılıkları, alternatif tedavi yaklaşımlarına olan ilgiyi artırmıştır. Bitkisel ekstreler ve uçucu yağların, yara iyileşmesi sürecinde potansiyel faydaları olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, *Matricaria recutita* L. çiçek, *Hypericum perforatum* L. toprak üstü kısmı, *Calendula officinalis* L. çiçek ve *Plantago major* L. yaprak ekstreleri ile *Laurus nobilis* L. yaprak, *Salvia officinalis* L. yaprak, *Origanum onites* L. toprak üstü kısmı ve *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. toprak üstü kısmı uçucu yağlarının, in vitro yara iyileşmesi modeli olan çizik testi üzerindeki etkilerinin insan dermal fibroblast hücrelerinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 1 kontrol ve 8 deney grubu (4 ekstre, 4 uçucu yağ emülsiyonu) oluşturulmuştur. Her madde için 8 farklı konsantrasyonda (100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 ve 0 µg/mL) MTT sitotoksosite testi uygulanmış ve hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Uygun konsantrasyonlar belirlendikten sonra, insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde çizik testi uygulanmış ve yara uzunlukları 0., 24. ve 48. saatlerde mikroskopik görüntüleme yöntemiyle ölçülmüştür. Veriler SPSS yazılımında değerlendirilmiş; normallik analizleri sonrası ANOVA ve post-hoc testler (LSD, Tukey) uygulanmıştır.

Bulgular: İn vitro yara iyileşmesini değerlendirmek amacıyla uygulanan çizik testi sonuçlarına göre, 24. saatte EM2 ve EX2 gruplarında yara kapanmasının kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde hızlı olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Buna karşılık, EX3 ve EX4 gruplarında yara kapanması anlamlı şekilde gecikmiştir.

($p<0.05$). 48. saatte yalnızca EX4 grubu yara kapanmasını istatistiksel olarak anlamlı şekilde yavaşlatmaya devam etmiştir. EM2, 24. saatte etkili iken 48. saatte bu etkisini kaybetmiştir. EM3, EM4 ve EX2 gruplarında yara kapanması hücrel olarak olumlu seyretse de bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. EM1 ve EX1 ise her iki zaman noktasında da kontrol grubu kadar canlılık yüzdeliği göstermiştir.

Sonuç: Çalışma, belirli bitkisel ekstraların ve uçucu yağların insan fibroblast hücrelerinde yara iyileşmesini in vitro ortamda destekleyebileceğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, bitkisel ürünlerin yara bakımında potansiyel yardımcı tedavi olarak değerlendirilmesini desteklemektedir. Ancak bu verilerin klinik geçerliliği için ileri düzeyde in vivo ve klinik çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bitkisel ekstre, Fibroblast, İn vitro yara iyileşmesi, MTT testi, Uçucu yağ emülsiyonu, Yara çizik testi

SUMMARY

Investigation of the Effects of Different Plant Extracts and Essential Oil Emulsions on the Migration of Human Fibroblast Cells in an In Vitro Wound Healing Model

Introduction and Objectives: Wound healing is a dynamic process consisting of three main phases: inflammation, proliferation, and remodeling. Due to the limitations of current wound treatment methods, interest in alternative therapeutic approaches has increased. Herbal extracts and essential oils are known to have potential benefits in the wound healing process. This study aimed to evaluate the effects of *Matricaria recutita* L. flower, *Hypericum perforatum* L. aerial part, *Calendula officinalis* L. flower and *Plantago major* L. leaf extracts and essential oils of *Laurus nobilis* L. leaf, *Salvia officinalis* L. leaf, *Origanum onites* L. aerial part and *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don aerial part on in vitro wound healing model, the scratch test, on human dermal fibroblast cells.

Material and Method: In this study, one control group and eight experimental groups (four extracts and four essential oil emulsions) were established. MTT cytotoxicity assays were performed at eight different concentrations (100, 80, 60, 40, 20, 10, and 5 µg/mL) for each substance, and cell viability was evaluated. Following the determination of appropriate concentrations, scratch assays were conducted on human dermal fibroblast cells, and wound lengths were measured using microscopic imaging at 0, 24, and 48 hours. Data were analyzed with SPSS software; after normality assessments, ANOVA and post-hoc tests (LSD, Tukey) were applied.

Results: According to the results of the scratch assay conducted to evaluate in vitro wound healing, wound closure was significantly faster in the EM2 and EX2 groups compared to the control group at the 24th hour ($p < 0.05$). In contrast, wound closure was significantly delayed in the EX3 and EX4 groups ($p < 0.05$). At the 48th hour, only

the EX4 group continued to show significantly slower wound healing. While EM2 was effective at the 24th hour, this effect diminished by the 48th hour. Although wound closure appeared clinically favorable in the EM3, EM4, and EX2 groups, these differences were not statistically significant. EM1 and EX1 exhibited neutral effects similar to the control group at both time points.

Conclusion: This study demonstrated that certain herbal extracts and essential oils can support wound healing in human fibroblast cells in an in vitro setting. These findings support the potential use of herbal products as adjunctive agents in wound care. However, further advanced in vivo and clinical studies are required to establish clinical relevance.

Keywords: In vitro wound healing, Scratch assay, Fibroblast, MTT assay, Herbal extract, Essential oil emulsion

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan vücudunda yüzey alanı açısından en büyük organ olan deri, iç dokuları mekanik hasar, enfeksiyon, ultraviyole ışınları ve aşırı sıcak gibi çevresel etkenlerden koruyan bir bariyer görevi görmektedir. Ancak travmaya açık bir yapıya sahip olan deri, cerrahi insizyon, majör travma, kontüzyon, hematoma, laserasyon veya aşınma gibi etkenler nedeniyle hasar görebilir. Bu tür durumlar, anatomik ve işlevsel bütünlüğün bozulmasına neden olarak yara oluşumuna yol açar. Yara iyileşmesi, travma sonrası derinin bütünlüğünü yeniden sağlamak için gelişen fizyolojik ve karmaşık bir süreçtir.

Yara iyileşme süreci dört temel aşamada ilerler. İlk aşamalar olan hemostaz ve inflamasyon evresi, trombositlerin aktive olması ve fibrinojenin pıhtılaşma sürecine katılımıyla başlar. Bunu takiben, proliferatif evre devreye girer; bu süreçte fibroblastlar ve endotel hücreleri yara bölgesine göç ederek yeni doku oluşumunu başlatır. Son aşama olan yeniden şekillenme evresinde ise, doku organizasyonu tamamlanarak yara tamamen iyileşir. Sağlıklı bireylerde bu süreçler fizyolojik olarak düzenli ilerlerken, ileri yaş, kronik hastalıklar ve bağışıklık sistemi zayıflaması gibi faktörler yara iyileşmesinde gecikmelere ve komplikasyonlara yol açabilmektedir. Örneğin, yaşlı bireylerde ve yoğun bakım hastalarında yaygın olarak görülen basınç yaralarının tedavisi uzun sürebilmekte ve yüksek maliyet gerektirmektedir.

Yara iyileşmesi sürecinde fibroblastlar dokunun onarımında kritik bir rol oynar. Bu hücreler, kolajen senteziyle birlikte yara bölgesinde yeni doku oluşumunu destekleyerek anatomik yapının ve işlevinin yeniden kazanılmasını sağlar. Kolajen, doku bütünlüğünü koruyan ve yapısal destek sağlayan temel bir protein olup, eksikliği yara iyileşmesini geciktirebilmektedir.

Günümüzde yapılan bilimsel çalışmalar, çeşitli bitkisel formülasyonların yara iyileşmesi sürecini hızlandırıcı etkiler gösterdiğini ve bu tür doğal bileşenlerin düşük

yan etki profiline sahip, uygun maliyetli alternatif hammaddeler olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Tıbbi ve aromatik bitkiler ile bunlardan elde edilen ekstraler ve uçucu yağlar, yara iyileşme sürecinin en az bir evresini etkileyerek epitelizasyonu hızlandırmakta, enfeksiyona karşı koruyucu etki sağlamakta ve yara iyileşmesi için optimal nem dengesini oluşturmaktadır. Bitkisel bileşenler, kolajen sentezini ve fibroblast yoğunluğunu arttırarak yara iyileşmesini destekleyici bir rol üstlenmektedir. Ayrıca, antimikrobiyal, antienflamatuvar ve antioksidan özellikleri sayesinde yara bölgesindeki inflamatuvar yanıtı düzenleyerek iyileşmeyi hızlandırmaktadır. Antioksidan bileşenler, serbest oksijen radikallerini nötralize ederek inflamasyon evresinde nötrofiller ve makrofajlar tarafından üretilen oksidatif stresin doku hasarına neden olan etkilerini azaltmaktadır. Özellikle kronik yaralarda görülen düzensiz bağışıklık yanıtı sonucu aşırı oksijen radikali üretiminin önlemesi, yara iyileşmesini destekleyen önemli bir faktördür.

Hücre göçü, embriyolojik gelişim, doku onarımı, bağışıklık yanıtı ve inflamasyon gibi birçok biyolojik süreçte kritik bir rol oynayan mekanizmadır. Yara iyileşmesi sürecinde hücrelerin göç yeteneği, doku bütünlüğünün yeniden sağlanması için hız belirleyici bir faktördür. Epitelizasyonun hızlanmasını sağlayarak, hasar gören deri katmanlarının yenilenmesine katkı sağlar. Hücre hareketliliğini etkileyen fiziksel, kimyasal ve moleküler faktörlerin anlaşılması, hücre göçü mekanizmalarının incelenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

İn vitro analizler, in vivo süreçlere yönelik tahmin yapmayı sağlayarak hücrel davranışları anlamada önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Hücre migrasyonunu değerlendiren yöntemlerden biri olan '*çizik yara tahlili (scratch assay)*' laboratuvar ortamında hücre göçünü gözlemlemek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, hücre bloğu üzerinde kontrollü bir çizik oluşturularak hücrelerin bu boşluğu ne kadar sürede kapattığı ölçülür. Böylece, test edilen bileşenlerin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri belirlenebilmektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde bulunan tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen ekstre ve uçucu yağların kimyasal bileşenleri analiz edilerek, yara iyileştirici aktiviteleri in vitro ortamda değerlendirilmiştir. Böylelikle, bu bitkisel bileşenlerin yara tedavisinde kullanılma potansiyelleri araştırılarak sağlık sektörüne kazandırılması

hedeflenmektedir. Çalışmanın sonucunda elde edilecek veriler, bitkisel kaynaklı ürünlerin modern tıpta kullanımına yönelik bilimsel temellerin güçlendirilmesine katkı sağlayacaktır.



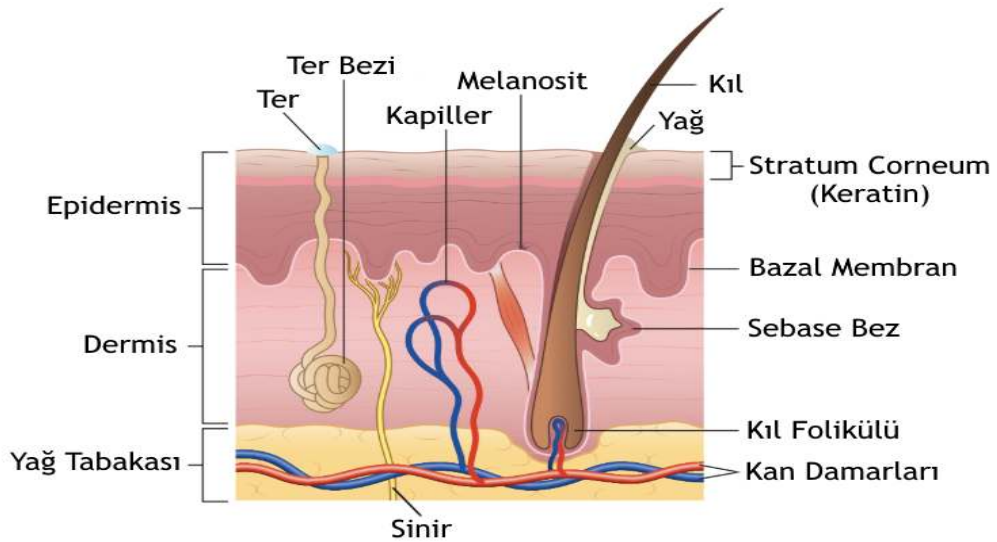
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Deri, insan vücudundaki en büyük organ olup, ortalama 4 kilogram ağırlığa sahiptir (vücut ağırlığının %16' sı) ve yaklaşık 1.8 m²'lik bir yüzey alanını kaplamaktadır [1].

2.1.1. Derinin yapısı ve katmanları

Histolojik olarak deri, üç temel katmandan oluşur: epidermis, dermis ve hipodermis (subkutan doku) [2](Şekil 1). Epidermis katmanı, embriyolojik olarak ektoderm kökenliken; dermis ve hipodermis katmanları ise mezoderm kökenlidir. Bu farklı embriyonik kökenler, deri katmanlarının hücresel kompozisyonlarını ve işlevsel özelliklerini belirlemektedir [3].



Şekil 1. Derinin katmanları.

2.1.1.1. Epidermis

Epidermis, derinin en dış tabakasını oluşturur. Sürekli yenilenme özelliğine sahip, keratinize, çok katlı yassı epitelden oluşur. Kalınlığı anatomik bölgelere göre değişiklik gösterir; göz kapaklarında yaklaşık 0,05mm iken, avuç içi ve ayak tabanlarında 1,5-1,6 mm'ye kadar ulaşabilir [4].

Epidermis dört ana hücre tipinden oluşur: keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri. Bu hücreler arasında en baskın olanı keratinositlerdir; epidermal hücrelerin %80'inden fazlasını oluştururlar ve keratin sentezleyerek deriye mekanik dayanıklılık kazandırır [5]. Langerhans hücreleri bağışıklık yanıtında görev alırken, melanositler melanin pigmenti sentezleyerek cilt rengini belirler. Merkel hücreleri ise mekanoreseptör olarak görev alırlar [6].

Epidermis histolojik olarak beş katmandan oluşur:

- 1- Stratum bazale: Bazal membran üzerinde yer alır ve mitotik aktivitesi yüksek hücrelerden oluşur.
- 2- Stratum spinosum: Hücreler arasında desmozomlarla bağlanmış çok katlı yapıdır.
- 3- Stratum granulosum: Keratohyalin granüller içeren hücrelerin bulunduğu tabakadır.
- 4- Stratum lucidum: Sadece avuç içi ve ayak tabanı gibi kalın derili bölgelerde yer alan saydam hücre tabakasıdır.
- 5- Stratum corneum: En dış katmandır; ölü ve çekirdeksiz keratinositlerden (korneosit) oluşur ve bariyer fonksiyonu görür.

Epidermis, bazal membran aracılığıyla dermise bağlanmakta ve epidermal uzantılar olan kıl folikülleri, yağ bezleri, ekrin ve apokrin ter bezleri bu tabakadan kaynaklanmaktadır [7].

2.1.1.2. Dermis

Dermis, epidermisin hemen altında yer alan ve bağ dokusundan zengin, ortalama kalınlığı 0,5-5 mm arasında değişen, esnek ve dayanıklı deri katmanıdır. Kalınlığı anatomik bölgelere göre değişiklik gösterir; göz kapaklarında oldukça inceyken, sırt ve ayak tabanı gibi alanlarda daha kalındır [7]. Embriyonik olarak

mezodermal kökenli olan dermis, cilde mekanik dayanıklılık, elastikiyet ve gerilme mukavemeti kazandırır [5].

Dermis anatomik olarak iki katmana ayrılır:

- 1- Papiller dermis: Dermisin üst kısmında yer alır ve gevşek bağ dokusundan oluşur. Yapısındaki kolajen ve elastin lifler ince ve düzensiz yapıdadır. Zengin damar ağı sayesinde epidermisin beslenmesini sağlar. İçerdiği serbest sinir uçları ile Meissner cisimcikleri aracılığıyla dokunma duyusunun algılanmasına katkı sağlar [8].
- 2- Retiküler dermis: Papiller tabakanın altında yer alır ve hipodermise kadar uzanır. Daha kalın, sıkı bağ dokusuna sahip olup burada bulunan kolajen lifleri yoğun ve paralel olarak düzenlenmiştir. Bu tabaka, hiyalüronik asit, glikozaminoglikanlar (GAG'lar) ve dermatan sülfat açısından zengindir. Pacinian cisimcikleri ile basınç ve titreşim duyusu algılanır [4].

Dermisin yapısal bütünlüğü, büyük oranda dermal fibroblastlar tarafından sentezlenen ekstraselüler matriks (ECM) tarafından sağlanır. ECM, kolajen ve elastin lifleri ile proteoglikanlardan oluşur. Kolajen, cildin kuru ağırlığının yaklaşık %70'ini oluşturur ve iskelet matriksinin temel elemanıdır [9]. Elastin lifleri ise deriye esneklik kazandırır. Lifler arasında kalan mukopolisakkarit jel yapısındaki alan, ekstrasfibriler matriks olarak adlandırılır. Ekstrasfibriler matriks, sıvıların, moleküllerin ve inflamatuvar hücrelerin hareketini kolaylaştırarak dermise hidrojel özellik kazandırır [4].

Dermis, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, kan ve lenf damarları, sinir uçları, kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri ile immün sistem hücrelerinin yer aldığı entegre bir yapıdadır. Bu yapılar sayesinde dermis, epidermisin beslenmesi, immün yanıtın oluşması, vücut ısısının düzenlenmesi ve dış etkilere karşı mekanik koruma gibi bir çok fizyolojik işlevi yerine getirir [6].

2.1.1.3. Hipodermis (subkutan doku)

Hipodermis, derinin en alt ve en derin tabakasıdır. Dermisin hemen altında yer alır ve subkutan doku olarak da adlandırılır. Histolojik olarak büyük oranda adipositlerin oluşturduğu yağ dokusu ile gevşek bağ dokusundan meydana gelir. Bu

yapı, fibröz septalar ile birbirinden ayrılmış yağ lobülleri biçiminde düzenlenmiştir [7]. Sinirler, kan damarları ve lenfatik damarlar bu septaların içinde yer alır [10].

Hipodermis, cilt ile altta yer alan kas ve kemik yapılar arasında geçiş alanı oluşturur. Bu sayede cilt, alttaki yapılar üzerinde serbestçe hareket edebilir. Kalınlığı anatomik bölgelere, cinsiyete, yaşa, beslenme durumuna ve hormonal duruma göre değişkenlik gösterir [11].

Fonksiyonel olarak hipodermis, birçok önemli görevi yerine getirir:

- Mekanik destek: Yağ dokusu ve gevşek bağ dokusu, fiziksel travmalara karşı tampon görevi görerek cildi korur.
- Isı izolasyonu: Soğuk ortamlarda termal izolasyon sağlayarak vücut ısının korunmasına katkıda bulunur.
- Enerji deposu: Adipositler, uzun süreli enerji depolanmasında rol oynar.
- Endokrin fonksiyon: Adipositler, leptin gibi hormonları salgılayarak hipotalamus aracılığıyla iştah ve enerji dengesini düzenler. Ayrıca aromataz enzimi aracılığıyla androstenedionun östrona dönüşümünü sağlar, bu da hipodermisin bir endokrin organ gibi işlev görmesine olanak tanır [4, 11].

Hipodermiste, kıl foliküllerinin derin kısımları, duyu nöron uçları ve ter bezleri gibi bazı deri ekleri de bulunabilir [12]. Yoğun damar ağı sayesinde hipodermis hem epiderminin hem de derminin beslenmesine katkı sağlarken yara iyileşmesinde dolaylı bir rol üstlenir.

2.1.2. Derinin fonksiyonları

Metabolik olarak aktif bir yapıya sahip olan deri, homeostazın sağlanması ve organizmanın çevresel faktörlere karşı korunması için çok sayıda hayati işlev üstlenir.

Başlıca görevlerinden biri, kimyasal ve fiziksel ajanlara karşı etkili bir bariyer oluşturmak suretiyle vücudu dış etkenlerden korumaktır. Ayrıca su kaybını önleyerek sıvı dengesinin korunmasına yardımcı olur ve vücut ısının düzenlenmesinde rol oynar [13]. Deri, mekanik, termal ve kimyasal uyarıyı algılayarak önemli bir duyu

organı işlevi de görür; bu da çevresel değişikliklere hızlı ve etkili yanıt verebilme yeteneği sağlar.

Deri ayrıca ultraviyole ışınlarına maruz kalma yoluyla D vitamini sentezinde görev alır [14]. Bununla birlikte, antimikrobiyal peptitlerin üretimi sayesinde patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturarak bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni haline gelir [15].

Solunum, sindirim ve ürogenital sistemlerin mukozal yüzeyleriyle devamlılık gösteren deri; tırnak, saç ve ter bezleri gibi ek yapıları da üretir.

2.1.3. Derinin yara iyileşmesi ile ilişkisi

Derinin fizyolojisi, yara iyileşme süreci ile doğrudan ilişkilidir. Epidermis ve dermis, yara iyileşme sürecinde hücresel proliferasyon, inflamatuvar yanıt ve doku rejenerasyonu gibi mekanizmalar aracılığıyla yeniden yapılanma gösterir. Dermiste bulunan fibroblastlar ve kan damarları, yara iyileşmesinin temel bileşenleri olan kolajen sentezini ve doku onarımını sağlar. Ayrıca, epidermal kök hücreler hasarlı dokunun yenilenmesine katkıda bulunur [16].

Yara iyileşme süreci, derinin anatomik ve fizyolojik özelliklerine bağlı olarak farklı hız ve etkinlikte gerçekleşebilir. Bu nedenle deri fizyolojisinin iyi anlaşılması, yara iyileşmesini destekleyen tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir [17].

2.2. Yara

Yara, cildin veya vücut dokularının travma, cerrahi müdahale, enfeksiyon veya çeşitli patolojik süreçler sonucunda bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara oluşumu, mekanik, kimyasal, termal veya biyolojik etkenler tarafından tetiklenebilir. Yaranın boyutu, derinliği ve iyileşme süresi, yaranın türüne ve vücudun fizyolojik yanıtına bağlı olarak değişir [17].

2.2.1. Yara tipleri

Yara sınıflandırılması; yaranın süresine, oluşum nedenine (predispozan faktörler ve etiyoloji) ve kontaminasyon derecesine bağlı olarak farklılık

gösterebilmektedir [18]. Yaranın uygun şekilde sınıflandırılması, uygulanacak tedavi ve yara yönetimi stratejilerinin belirlenmesine rehberlik eder.

A. Sürelerine göre yaralar

Yaralar, sürelerine göre akut ve kronik olmak üzere iki ana grupta değerlendirilir.

Akut yaralar, travma veya cerrahi girişim gibi ani bir neden sonucunda oluşur ve normal fizyolojik yara iyileşme süreçlerine uygun şekilde, öngörülebilir bir sürede iyileşir. Bu tür yaralarda iyileşme süresi genellikle 5-10 gün arasında olup, bazı durumlarda bu süre 30 güne kadar uzayabilir [19].

Kronik yaralar ise iyileşme fizyolojisinde bozulma sonucu inflamatuvar fazda takılan, granülasyon ve epitelizasyon süreçlerinde gecikme gösteren, dört haftadan uzun süren yaralardır. Bu tür yaralar, doku onarımı için gerekli hücrel ve biyokimyasal yanıtların eksikliği veya düzensizliği nedeniyle tam iyileşme gösteremez. Metabolik hastalıklar (özellikle diyabet), periferik arter hastalığı, venöz yetmezlik, enfeksiyon, düşük bağışıklık düzeyi, bazı ilaçlar, bası gibi birçok faktör kronik yara gelişiminde etkilidir [18, 20]. Bu yaraların karakteristik özellikleri arasında; sekteye uğramış kolajen sentezi, epitelizasyonun tamamlanamaması ve enfeksiyona eğilim yer alır [20].

B. Etiyolojisine göre yaralar

Yaranın oluş mekanizması, tedavi yaklaşımının belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. Klinik pratikte en sık karşılaşılan yara türleri şunlardır:

Sıyrık yaraları (abrazyon): Genellikle künt bir cismin sürtünmesi sonucu epidermal yüzeyde meydana gelen yüzeysel hasarlardır. Kanama minimal olup, epitelizasyon süreci genellikle hızlıdır [21].

Delinme yaraları: Sivri bir cismin dokuya nüfuz etmesi ile oluşur. Yüzeyde küçük bir açıklık bulunmasına rağmen, derin dokulara kadar ilerleyebilir ve kontaminasyon riski yüksektir. Tetanoz ve anaerobik enfeksiyonlara zemin hazırlayabileceği için dikkatle değerlendirilmelidir [22].

Kesik ve laserasyonlar: Keskin veya künt travma ile deri ve yumuşak dokuların yırtılması sonucu oluşan yaralardır. Yara kenarları genellikle düzensiz olup kas, damar veya tendon gibi yapıları içerebilir [23].

Avülsiyon (soyulma) yaraları: Deri veya deri altı dokuların mekanik kuvvetlerle ayrılması sonucu gelişir. Motorlu araç kazaları gibi yüksek enerjili travmalar sonucu meydana gelir. Doku nekrozu ve enfeksiyon riski taşır [24].

Yanığa bağlı yaralar (termal, kimyasal, elektriksel): Isı, kimyasal ajanlar (asit/baz), elektrik akımı veya radyasyon gibi etkenlerle oluşur. Derinliğe göre y zeyssel (birinci derece), kısmi kalınlıkta (ikinci derece) ve tam kalınlıkta (   nc  derece) olarak sınıflandırılır. Yanık vakalarında sıvı-elektrolit dengesizliği, hipermetabolik durumlar, enfeksiyon, sepsis gibi komplikasyonlar gelişebilir [25].

Bası yaraları (dekübit ülserleri): Özellikle yatağa bağımlı, mobilizasyonu kısıtlı veya bilinç durumu bozulmuş hastalarda, kemik çıkıntıları ile dış yüzey arasında kalan yumuşak dokuların uzun süreli basın a maruz kalması sonucu gelişen iskemik doku hasarlarıdır. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda; uzamış sedasyon uygulamaları, bilinç kaybı, immobilit , kötü beslenme durumu, nemli cilt ve sistemik hastalıklar nedeniyle bası yarası gelişme riski oldukça yüksektir [26]. En sık sakrum, topuk, trokanter majör, oksiput, kulak arkası, dirsek ve topuk bölgelerinde görülür. Bası yaraları, morbidite ve mortaliteyi arttıran, enfeksiyon riski taşıyan, yoğun bakımda kalış süresini uzatan ve sağlık maliyetlerini önemli ölçüde arttıran ciddi komplikasyonlardır. Klinik olarak evre 1'den evre 4'e kadar sınıflandırılır:

Evre 1: Deride kızarıklık vardır ancak cilt bütünlüğü bozulmamıştır.

Evre 2: Epidermis veya dermiste yüzeyel kayıp görülür. Abrasyon veya yüzeyel ülser şeklindedir.

Evre 3: Tüm cilt katmanlarını kapsayan hasar mevcuttur ve deri altı dokuya kadar ilerlemiştir.

Evre 4: Kas, tendon ve kemik gibi derin dokuların da etkilendiği, ileri düzey doku kaybı içeren evredir [27].

Tedavisi multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Riskli hastalarda düzenli cilt değerlendirmesi, pozisyon değişikliği, nem kontrolü, basınç azaltıcı yataklar ve yeterli

beslenme gibi koruyucu stratejiler uygulanmalıdır. Yara oluştuğunda ise evresine uygun olarak lokal yara bakımı, enfeksiyon kontrolü, nekrotik dokuların debridmanı gibi cerrahi girişim uygulanabilir [28].

C. Kontaminasyon derecesine göre yaralar

Yaralar, mikrobiyal kontaminasyon düzeyine göre dört ana grupta sınıflandırılır:

- 1- Temiz yaralar: Steril cerrahi girişimlerde, enfeksiyon belirtisi olmadan açılan, aseptik koşullarda oluşturulan yaralardır.
- 2- Temiz-kontamine yaralar: Solunum, gastrointestinal veya genitoüriner sistemlere yapılan kontrollü cerrahi girişimlerde oluşan yaralardır. Kontaminasyon riski sınırlıdır.
- 3- Kontamine yaralar: Travmatik açık yaralar veya cerrahi sırasında asepsi kurallarının bozulduğu, gastrointestinal içeriğin sızdığı yaralardır. Enfeksiyon riski artmıştır.
- 4- Kirli/enfekte yaralar: Gecikmiş tedavi, irin, nekrotik doku veya açık enfeksiyon bulguları içeren yaralardır. Bu tür yaralar genellikle mikrobiyal kontaminasyonun yüksek olduğu ve klinik enfeksiyon bulgularının bulunduğu yaralardır [29, 30].

Bu sınıflamalar, yaranın prognozunu öngörmede ve uygun tedavi yaklaşımını belirlemede karar vericilere yol gösterici olmaktadır.

2.3. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, hücresel, biyokimyasal ve sistemik düzeylerde travma sonucu meydana gelen doku hasarının, yeni doku oluşumu yoluyla onarılarak eski haline getirilmesi sürecidir. Bu süreç, organizmanın bütünlüğü bozulmuş dokulara karşı geliştirdiği doğal ve fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanabilir. İyileşme süreci, başta bağ dokusu hücreleri olmak üzere çok sayıda hücre tipi, vasküler sistem, sitokinler ve mediatörlerin karmaşık bir etkileşimini içerir [31].

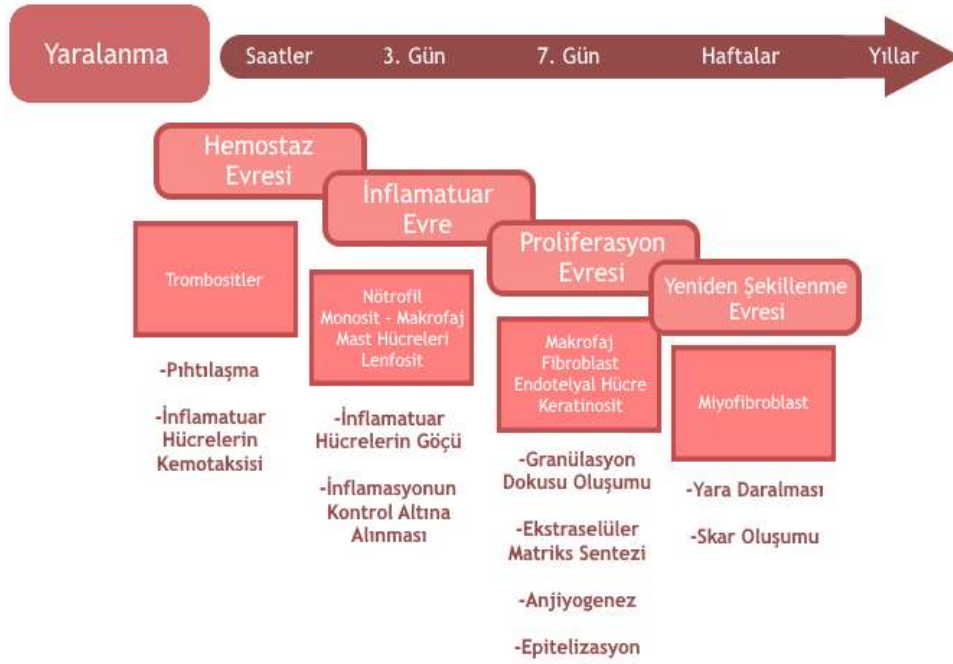
Yara iyileşmesi sırasında hücreler sadece birbirleriyle değil, aynı zamanda ECM ile de sürekli etkileşim içindedir. Bu biyolojik süreç, yalnızca hücresel olaylarla sınırlı kalmayıp, kemokinler, büyüme faktörleri, sitokinler, inhibitörler ve bunların

reseptörleri gibi birçok protein ve glikoprotein etkisi altında düzenlenir. Her iyileşme evresinde, sürecin normal fizyolojik seyriyle ilerlemesi için gerçekleşmesi gereken belirli biyolojik olaylar bulunmaktadır.

2.3.1. Yara iyileşmesinin evreleri

Yara iyileşmesi, belirli biyolojik olayların sırasıyla ve hassas bir şekilde düzenlendiği, birbirini izleyen dört evreden oluşan dinamik bir süreçtir. Bu evrelerin her birinde gerçekleşen olayların zamanlaması ve düzeni, iyileşmenin sağlıklı şekilde ilerleyebilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Süreçte meydana gelen herhangi bir aksama, gecikme veya evreler arası dengesizlik, iyileşmenin uzamasına ya da kronik yara oluşumuna neden olabilir.

Yara iyileşme süreci; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodeling (yeniden şekillenme) olmak üzere dört temel evreden oluşur [32] (Şekil 2). Süreç, yaralanma anında başlayan hemostaz evresi ile başlar. Bunu, çok kısa bir süre sonra aktive olan inflamasyon evresi izler. Yaralanmadan sonraki ilk günlerde başlayan proliferasyon evresi, iyileşmenin esas biyolojik süreçlerini kapsar ve yeni doku oluşumunu sağlar. Son olarak, haftalar veya aylar sürebilen ve yara dokusunun yeniden yapılanması ile karakterize edilen remodeling evresi gelir. Bu son evre, bazı durumlarda bir yıl veya daha uzun süre devam edebilir [33].



Şekil 2. Yara iyileşmesinin evreleri.

2.3.1.1. Hemostaz evresi

Hemostaz evresi, yara iyileşmesinin ilk evresi olup, kanamanın kontrol altına alınması amacıyla doku hasarıyla birlikte başlar [34]. Bu evrede eşzamanlı olarak üç temel olay gerçekleşir; vazokonstriksiyon, trombosit tıkaçının oluşumu ve fibrin pıhtısının gelişimi [35]. Damar hasarına bağlı olarak ortaya çıkan kanama, hem mikroorganizmaların ve antijenlerin ortamdan uzaklaştırılmasına, hem de pıhtı oluşumunun tetiklenmesine hizmet eder [36].

Refleks vazokonstriksiyon, vasküler düz kas hücrelerinin kasılmasıyla gelişir ve hasarlı damarın daralması sonucu kanama geçici olarak sınırlandırılır. Bu süreçte damar duvarında gelişen hipoksi ve asidoz, vazokonstriktif etkiyi bir süre sürdürür [37].

Hasarlı bölgede trombositler, ekspoz olmuş kolajen ve diğer ECM bileşenleri ile temas eder. Bu temas, trombosit aktivasyonunu başlatır ve koagülasyon kaskadı hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarla aktive olur [38]. Bunun sonucunda trombosit

agregasyonu ve fibrin pıhtısı oluşumu gerçekleşir. Fibrin, yarayı fiziksel olarak kapatırken, mikroorganizmalara karşı bariyer görevi de görür [39].

Pıhtı yapısı, yalnızca kanamayı durdurmakla kalmaz; aynı zamanda iyileşme sürecinde hücre göçü ve doku onarımı için geçici bir matriks görevi görür [40]. Bu nedenle bu evre, bazı kaynaklarda ‘gecikme evresi’ olarak da tanımlanır [41].

Trombositler, sitoplazmalarında bulunan alfa granüller aracılığıyla iyileşme sürecini başlatan birçok biyolojik mediatörü serbest bırakır. Bu granüllerde yer alan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi faktörler; nötrofiller, makrofajlar, fibroblastlar, endotel hücrelerinin aktivasyonunu ve yara bölgesine göçünü teşvik eder [42-44].

Fibrin pıhtısı, yalnızca hemostatik değil, aynı zamanda biyolojik yönlendirici yapı iskelesi görevi görür [45]. Fibrin ve fibronektin gibi adezyon proteinlerinden oluşan bu geçici matriks, fibroblast ve keratinositlerin migrasyonuna kılavuzluk eder. Ayrıca, kolajen liflerinin birikmesi için şablon görevi görür ve ECM kalıntılarının temizlenmesini sağlayarak makrofaj fagositozunu destekler. Ek olarak, trombosit kaynaklı trombin, interlekin-6 (IL-6) ve interlekin-8 (IL-8) gibi proinflatuar sitokinlerin salımını da tetikler. Bu sitokinler, özellikle monosit kemotaksisini desteklerken, fibrin matriks yapısı da fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), VEGF ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi büyüme faktörlerini bağlayarak anjiyogenez ve stromal hücre proliferasyonunu destekler [43, 46].

Sonuç olarak, hemostaz evresi, yalnızca kan kaybının önlenmesini değil, aynı zamanda yara iyileşmesinin sonraki evrelerinin başlatılmasını ve düzenlenmesini sağlayan temel bir basamaktır.

2.3.1.2. İnflamasyon evresi

Yara iyileşmesinin ikinci evresi olan inflamasyon evresi, hemostazın hemen ardından başlar ve temel amacı, yara bölgesine ulaşan mikroorganizmaların, nekrotik doku artıklarının ve yabancı cisimlerin ortadan kaldırılmasıdır. Bu evre, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ile karakterizedir ve genellikle erken inflamatuar ve geç inflamatuar faz olmak üzere iki alt evrede incelenir [47].

A. Erken İnflamatuar Faz (0-48 saat)

Koagülasyonun geç döneminde başlayan erken inflammatuar yanıtta, kompleman sistemi aktive olur ve bunun sonucunda nötrofillerin yara bölgesine göçünü başlatan moleküler olaylar gelişir. Nötrofiller, yaralanmadan sonraki ilk 6 saat içinde yara sahasına ulaşan ilk immün hücrelerdir ve en yoğun infiltrasyonları 24-48 saat arasında gözlenir. Eğer enfeksiyon söz konusu değilse, bu süre sonunda nötrofillerin sayısı azalır; ancak kontaminasyon devam ederse nötrofilik inflamasyon uzayabilir.

Nötrofiller; patojen eliminasyonu, fagositoz ve nekrotik doku temizliği gibi görevler üstlenir. Ayrıca proteazlar, reaktif oksijen türleri (ROT) ve antimikrobiyal peptitler salgılayarak hem mikrobiyal yükü azaltır hem de yara mikro çevresinin yeniden düzenlenmesini sağlarlar [48]. Damar endotelinde selektin ve integrin aracılı adhezyon molekülleriyle gerçekleşen rolling, adezyon ve diapedez mekanizmaları sonucunda nötrofiller, damar dışına çıkarak travma bölgesine ulaşır [42, 49].

B. Geç İnflamatuar Faz (48-72 saat ve sonrası)

Yaralanmadan yaklaşık 48-72 saat sonra, monositler yara bölgesine ulaşır ve burada fenotip değiştirerek makrofajlara dönüşürler [50]. Makrofajlar, sadece fagositoz ile değil, aynı zamanda iyileşme sürecinin düzenlenmesi ile de görevlidir. Bu hücreler; TGF- β , TGF- α , EGF, FGF gibi büyüme faktörlerini salgılayarak fibroblast proliferasyonu, anjiyogenez, epitelizasyon ve doku yeniden şekillenmesini başlatır [51]. İnflamatuar yanıtın çözülmesi ve proliferatif faza geçiş için kritik bir hücrel köprü görevi görürler [52].

Monosit ve makrofaj eksikliği, yetersiz debridman, gecikmiş fibroblast aktivasyonu ve azalmış anjiyogenez gibi komplikasyonlara neden olarak yara iyileşmesini olumsuz etkiler [53].

İnflamasyonun ilerleyen evrelerinde, genellikle 72.saatten sonra, lenfositler yara bölgesine ulaşır. IL-1, kompleman ürünleri ve immünoglobülin G (IgG) parçalanma ürünleri gibi sinyallerle bölgeye çekilen lenfositler, ECM sentezi, kolajen remodelingi ve doku onarımı sürecinde görev alırlar [54]. Bu hücrelerden salınan lenfokinler, fibroblastların migrasyonunu ve aktivasyonunu artırarak proliferatif faza geçişi destekler [55].

İnflamasyon fazında, vasküler sistem oldukça aktiftir. Araşidonik asit metabolitleri ve tromboksan A2 gibi maddeler vazokonstriksiyona, ardından mast hücrelerinden salınan histamin ve serotonin ise vazodilatasyona yol açar. Vazodilatasyonla birlikte vasküler permeabilite artar, bu da immün hücrelerin damar dışına geçişini kolaylaştırır. İnflamasyon bölgesinde görülen ödem ve ağrı da bu artmış geçirgenliğin sonucudur. Prostaglandinler, kininler ve kompleman sistemi ürünleri, bu hücrel göçü düzenleyen başlıca mediatörlerdir [55].

Yaralanmanın 1-2.gününde yara yatağında yoğun olarak bulunan fibronektin, fibrin, kolajen, proteoglikanlar ve heparin ile etkileşerek geçici matriks yapısını oluşturur [56]. Bu yapı, nötrofiller, monositler, fibroblastlar ve endotelial hücreler için migrasyon ve adezyon zemini sağlar.

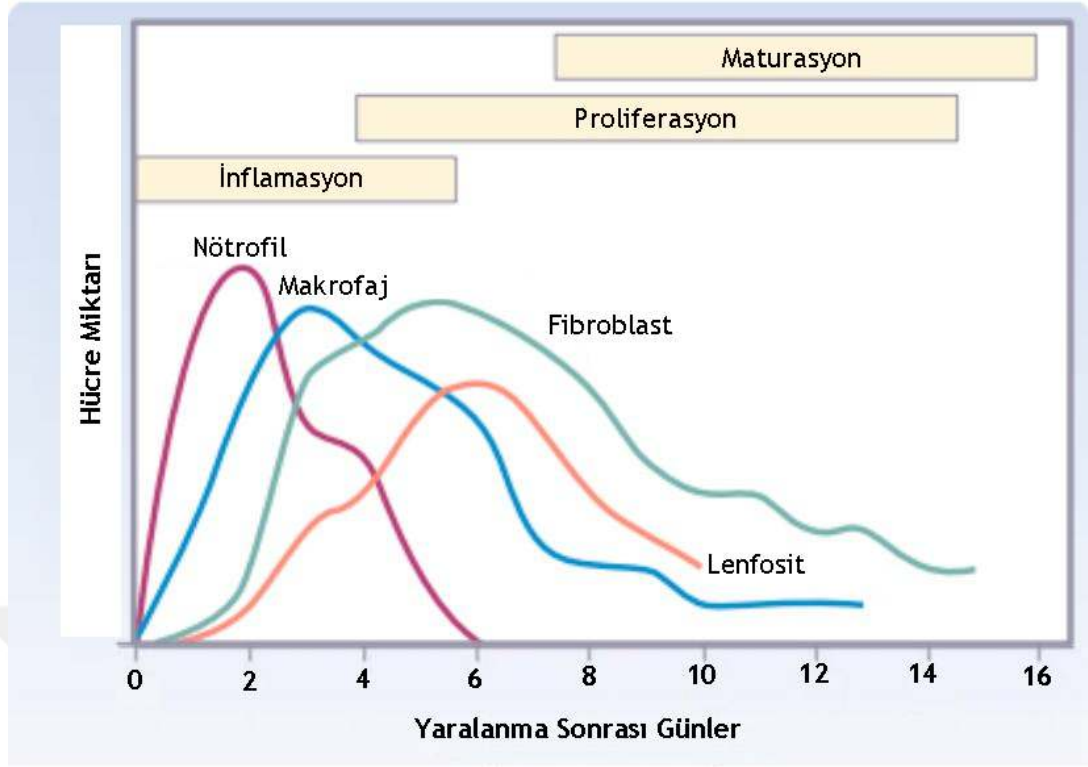
Bu dönemde meydana gelen tüm hazırlık süreçleri, yara iyileşmesinin proliferatif evresine geçişini mümkün kılar. Bu nedenle inflamasyon evresi, yalnızca savunma değil, aynı zamanda onarıma hazırlık evresi olarak da değerlendirilir. Bazı kaynaklar bu evreyi ‘substrat evresi’ ya da ‘gerilme evresi’ olarak da tanımlamaktadır [57].

2.3.1.3. Proliferasyon evresi

Proliferasyon evresi, yara iyileşmesinin üçüncü aşamasıdır ve genellikle yaralanmadan sonraki 48-72 saat içerisinde başlar, yaklaşık 10-14 gün boyunca sürer [58, 59]. Bu evrede temel amaç, hasarlı dokunun yeniden yapılandırılması, doku bütünlüğünün sağlanması ve yaranın fiziksel olarak kapatılmasıdır. Süreç; fibroblast proliferasyonu, anjiyogenez, granülasyon dokusu oluşumu, ECM yeniden yapılanması, reepitelizasyon ve yara kontraksiyonu gibi olayları içerir.

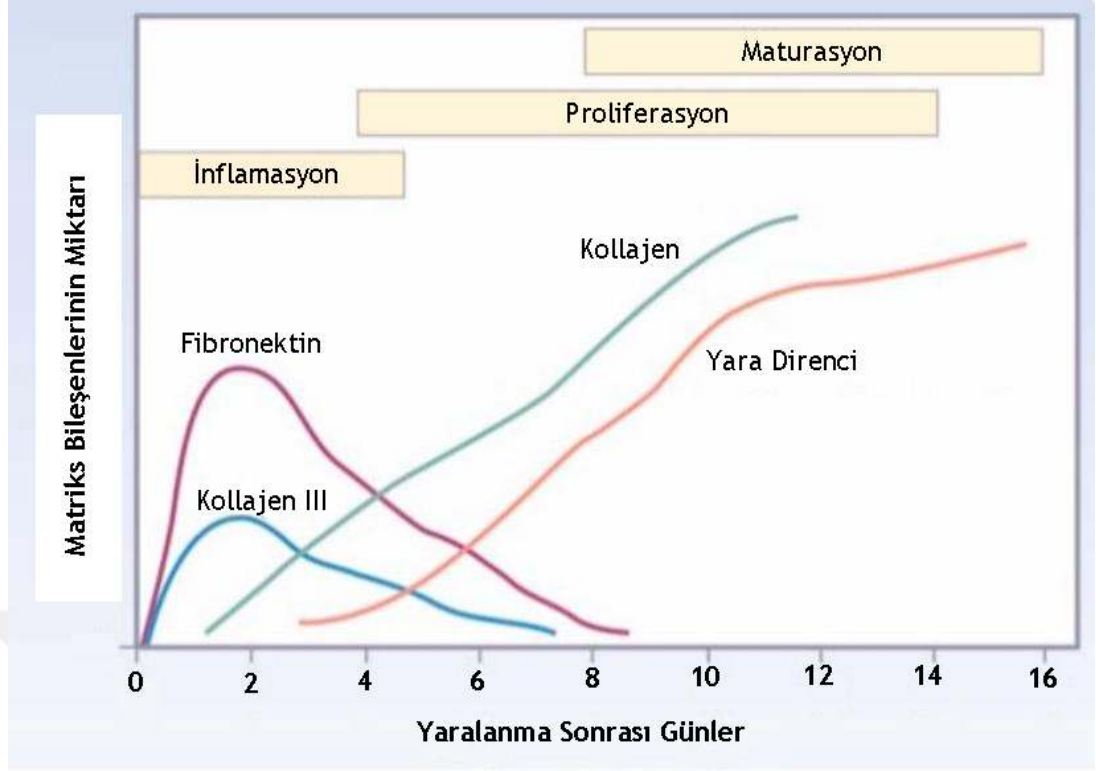
Fibroblastların rolü ve matriks sentezi: Fibroblastlar, yara iyileşmesinde temel hücrel aktörler arasında yer alır ve özellikle proliferasyon evresinde çok sayıda kritik işlev üstlenirler. Bu hücreler, yaralanmayı izleyen 48-72 saat içerisinde makrofajlardan salınan TGF- α , PDGF ve benzeri büyüme faktörlerinin etkisiyle kemotaktik olarak yara bölgesine göç eder [58]. Göç eden fibroblastlar, genellikle yara çevresindeki yerleşik bağ dokusundan kaynaklanır ve mekanotravmaya yanıt olarak aktive olurlar. Aktivasyon sonrasında hücreler, migrasyon, proliferasyon, ECM sentezi, büyüme faktörü üretimi ve yara kontraksiyonu gibi bir dizi fonksiyonu yerine

getirir. Fibroblast proliferasyonu, yara bölgesinde doku hacmini yeniden kazandırma ve iyileşme ortamını yapılandırma açısından büyük önem taşır. Travmadan sonra 5-7.günlerde fibroblast sayısı maksimum seviyeye ulaşır [60, 61] (Şekil 3). Ancak bu süreç, lokal oksijen basıncı ve besin düzeylerinden doğrudan etkilenir; özellikle hipoksi fibroblast göçü ve aktivitesini belirgin ölçüde inhibe eder. Fibroblastlar, ECM'nin başlıca yapısal bileşenlerinden olan kolajen (özellikle tip 3 ve tip 1), GAG'lar, proteoglikanlar ve fibronektin gibi molekülleri sentezleyerek granülasyon dokusunun temelini oluşturur. Bu matriks, hem yapısal destek sağlar hem de diğer hücre tiplerinin adezyonu, migrasyonu ve farklılaşmasını yönlendirici bir mikro çevre sunar [62]. Özellikle hiyalüronik asit, proliferasyon fazında ilk sentezlenen ve ECM organizasyonunun temelini oluşturan GAG'tır. Bu bileşik, fibroblastların göçü ve kolajen fibril organizasyonu için uygun bir zemin hazırlar. Fibroblastlar ayrıca yara ortamında çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri de üretir. Bunlar arasında FGF, VEGF ve IGF gibi moleküller yer alır. Bu faktörler, anjiyogenez, keratinosit aktivasyonu, epitelizasyon ve doku remodeling sürecini doğrudan veya dolaylı yollarla destekler. Fibroblastlar, zamanla miyofibroblastlara dönüşerek alfa-düz kas aktini (α -SMA) ekspresyonu kazanır. Bu farklılaşma, yara kontraksiyonu için gereklidir. Miyofibroblastlar, yara kenarlarını birbirine yaklaştırarak iyileşmenin hızlanmasını sağlar ve sonuçta skar dokusunun boyutu azalır [63]. Sonuç olarak, fibroblastlar; yalnızca ECM sentezleyici ve destekleyici hücreler değil, aynı zamanda yara onarım sürecinin tüm fazlarını düzenleyen aktif sinyal merkezleri olarak da görev yaparlar. Bu çok yönlü rolleri, proliferatif fazın başarısı ve genel yara iyileşme kalitesi üzerinde belirleyici niteliktedir.



Şekil 3. Yara iyileşmesi evreleri ve baskın hücre grupları.

Kolajen sentezi ve organizasyonu: Kolajen, iyileşen dokunun mekanik direncini sağlayan temel yapısal proteindir ve vücut proteinlerinin yaklaşık %30'unu oluşturur [64]. Kolajen sentezi, fibroblastların endoplazmik retikulumunda başlar. Prolin ve lizin amino asitlerinin hidroksilasyonu ile prokolajen oluşur, ardından polimerize olarak tropokolajene dönüşür. Tropokolajen zincirleri, hücre dışı ortama salındıktan sonra prokolajen peptidazlar tarafından uç peptid zincirleri ayrılır ve olgun kolajen fibrilleri oluşur [65]. Kolajen üretimi, yaralanmayı izleyen 7.ve 14.günlerde hızla artar ve 14-21.günlerde en yüksek düzeye ulaşır. Bu süreçte başlangıçta tip 3 kolajen baskındır; ilerleyen günlerde ise daha dayanıklı olan tip 1 kolajen ile yer değiştirir [60, 66] (Şekil 4). Perfüzyon ve oksijen basıncı, kolajen sentezinin düzenlenmesinde önemli rol oynar [64].



Şekil 4. Yara evrelerinde matriks bileşenlerinin birikimi.

Anjiyogenez (yeni damar oluşumu): Genellikle yara oluşumunun 4.gününde başlar. Makrofajlar tarafından salınan VEGF ve benzeri büyüme faktörleri; endotel hücrelerinin aktivasyonunu, bazal membran yıkımını, hücre proliferasyonunu ve tübül yapısının oluşumunu uyararak yeni damar ağlarının gelişmesini sağlar [67]. Vaskülarizasyon, endotel hücrelerinin yara bölgesine yönlendirilmiş göçü, tomurcuklanması ve bağ kurması yoluyla ilerler [68]. Oksijen basıncını düşük olması, laktik asit birikimi ve biyolojik aminler de bu süreci destekleyen diğer etmenlerdir [69]. Anjiyogenezin sonucunda oluşan kılcıl damar ağı, yaranın oksijen ve besin ihtiyacını karşılayarak granülasyon dokusunun devamlılığını sağlar.

Reepitelizasyon ve yara kapanması: Reepitelizasyon, epidermisin bütünlüğünün yeniden sağlandığı süreçtir. Komşu epidermal keratinositler, yara kenarından göç ederek yeni bir neoepidermis oluşturur. Bu yapı, zamanla stratifiye epidermise farklılaşır ve bazal membranın yeniden senteziyle birlikte epidermis ile dermis arasındaki bütünlük yeniden kurulur [70]. Bu süreç, keratinosit aktivasyonu ve göçü, epitel hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu ile ilerler.

2.3.1.4. Yeniden şekillenme (remodeling) evresi

Yeniden şekillenme evresi, yara iyileşmesinin dördüncü ve son evresi olup genellikle yaralanmadan sonraki 2-3. haftada başlar ve süreci 6-12 ay, bazı durumlarda ise daha uzun süre boyunca devam eder [58, 59]. Bu fazın temel amacı, ECM yeniden yapılandırılması yoluyla maksimum mekanik dayanıklılığın sağlanması ve onarılan dokunun fonksiyonel bütünlüğünün yeniden kazanılmasıdır.

İlk olarak proliferasyon fazında üretilen granülasyon dokusu, bu evrede olgunlaşarak daha az hücreli ve daha az vaskülarize bir yapıya dönüşür. Tip 3 kolajen, bu aşamada yerini daha güçlü ve organize tip 1 kolajene bırakır [71].

Yara iyileşmesinin başında düzensiz şekilde yerleşmiş kolajen lifleri, remodeling evresinde fibroblastlar ve matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) aracılığıyla yeniden düzenlenir. Bu süreçte kolajen lifleri çapraz bağlanarak üçlü helikal yapı kazanır ve yaranın mekanik dayanımı artar [62]. Bu yeniden yapılanma ile, kolajen miktarı sabit kalırken, kolajen organizasyonu yara bölgesindeki gerilme direncini belirleyici faktör haline gelir.

Yaranın mekanik gücü, genellikle 12. haftada en yüksek seviyeye ulaşır. Ancak olgun skar dokusu hiçbir zaman orijinal dokunun yapısal özelliklerini tam olarak geri kazanamaz; genellikle normal derinin %80'i kadar gerilme dayanıklılığı gösterir [45, 59].

Bu dönemde ayrıca anjiyogenez ve fibroblast proliferasyonu azalır; inflamatuvar hücreler temizlenir, ödem geriler ve granülasyon dokusu avasküler, aselüler ve yoğun ECM içeriğine sahip olgun bir skar dokusuna dönüşür [66].

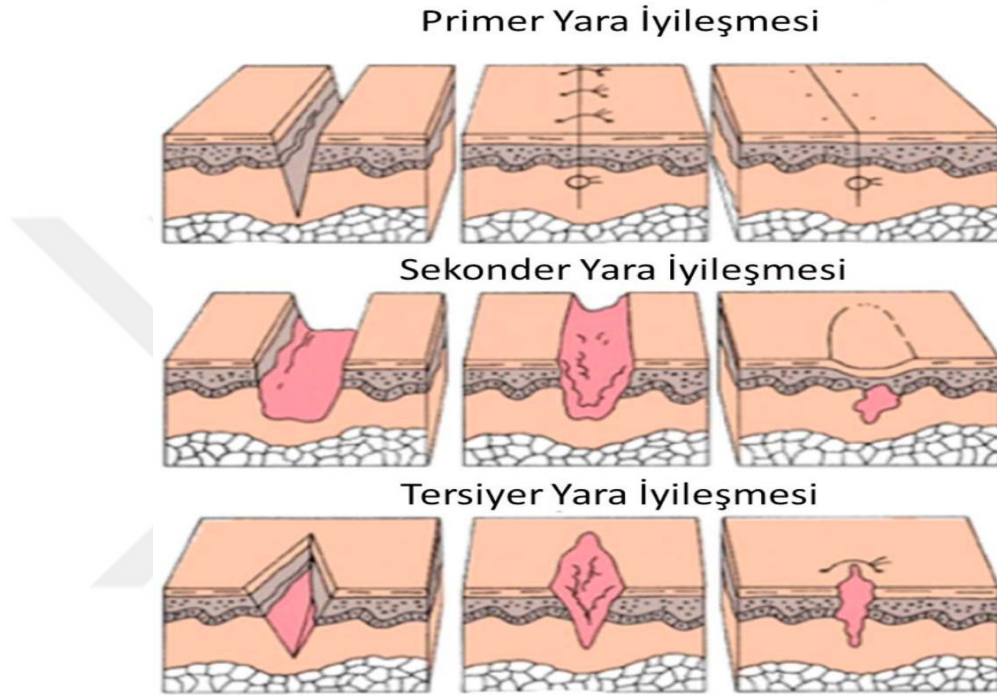
Remodeling sürecinde yalnızca kolajen değil, aynı zamanda fibronektin, proteoglikanlar ve GAG'lar da yeniden yapılandırılır. Fibrin ve hiyalüronik asit düzeyleri azalırken, tip 1 kolajen üretimi artar [72]. Elastin öncüsü tropoelastin, remodeling sürecinin geç evrelerinde görünür hale gelir ve elastik liflerin oluşumu aylar süren bir süreç içinde tamamlanır [73].

Remodeling sonunda yara yüzeyi, keratinositler tarafından tek katlı bir epitelle kaplanır. Epidermal göç tamamlandığında bazal lamina yeniden oluşturulur ve epidermal katman ile dermis arasında bütünlük sağlanır [45].

Bu aşamada gerçekleştirilen kolajen organizasyonu ve ECM yeniden yapılanması, yaranın fonksiyonel dayanıklılığı ve estetik sonucu açısından öneme sahiptir.

2.3.2. Yara iyileşme türleri

Yara iyileşmesi primer iyileşme, sekonder iyileşme ve üçüncül iyileşme olmak üzere üç temel şekilde gerçekleşir [74] (Şekil 5):



Şekil 5. Yara iyileşme türleri.

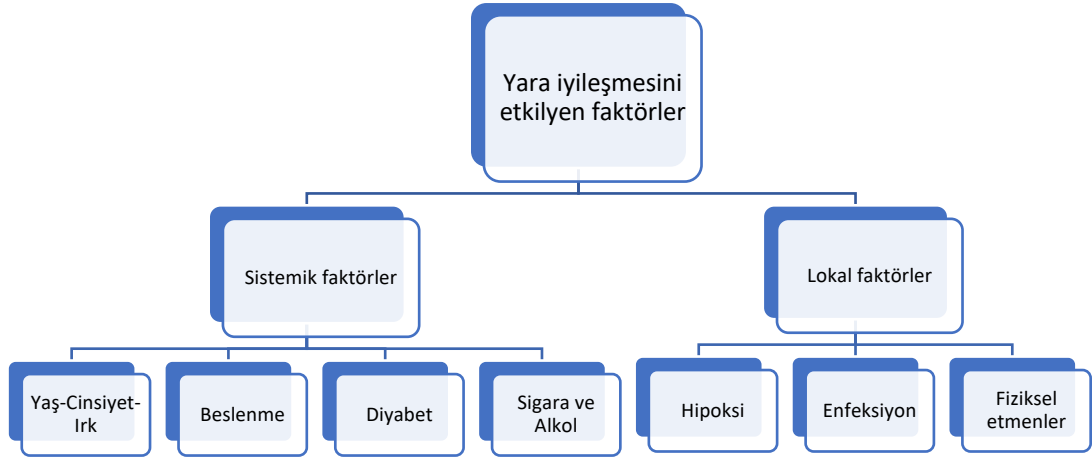
Primer İyileşme: Yara kenarlarının düzgün, temiz ve birbirine yakın olduğu durumlarda, genellikle cerrahi insizyonlar sonrası gözlenen, hızlı ve minimal skar dokusu ile tamamlanan iyileşme sürecidir [17]. Bu iyileşme biçimi, yara kenarlarının cerrahi dikiş, stapler veya benzeri tekniklerle bir araya getirilmesi sonucu, minimum doku kaybıyla gerçekleşir ve genellikle enfekte olmayan, düzgün sınırlı yaralarda görülür [75]. Primer iyileşme sürecinde inflamasyon kısadır, enfeksiyon riski düşüktür ve epitelizasyon daha hızlı gerçekleşir [76]. Doku bütünlüğünün kısa sürede yeniden sağlanması, komplikasyon oranını azaltırken, iyileşme süresini de önemli ölçüde kısaltır.

Sekonder İyileşme: Yara kenarlarının karşı karşıya getirilemediği veya belirgin doku kaybının bulunduğu durumlarda gelişen bir iyileşme biçimidir. Bu süreçte, yaranın kapanması; granülasyon dokusunun oluşumu, epitelizasyon ve bağ dokusunun yeniden yapılanması ile sağlanır. Bu tip iyileşme, özellikle bası yaraları, yanıklar ve geniş yüzeysel travmalar gibi lezyonlarda yaygın olarak görülür [77]. Sekonder iyileşmede enfeksiyon riski daha yüksektir, iyileşme süresi daha uzundur ve estetik sonuçlar genellikle daha zayıftır [78]. Ayrıca bu süreç, parankimal hücre kayıplarının rejenerasyonla telafi edilemediği durumlarda ortaya çıkar. Oluşan doku defekti, erken evrede granülasyon dokusu, ilerleyen evrelerde ise skar dokusu ile doldurularak kapanır. Primer iyileşmeye kıyasla, sekonder iyileşme sürecinde inflamatuvar yanıt daha belirgindir, granülasyon dokusu miktarı daha fazladır ve yara kontraksiyonu daha yoğun şekilde gerçekleşir. Bu faktörler, iyileşmenin fizyolojik sürecini uzatmakla birlikte, doku bütünlüğünün yeniden sağlanmasını mümkün kılar.

Tersiyer İyileşme (Gecikmiş Primer İyileşme): Başlangıçta açık bırakılan ve enfeksiyon riski azaldığında cerrahi olarak kapatılan yaralarda gözlenen bir iyileşme biçimidir. Bu yöntem, özellikle kontamine ya da enfekte yaraların yönetiminde tercih edilir [79]. İyileşme süreci, yaranın ilk etapta kapatılmamasıyla başlar; bu durum, bağışıklık sistemine enfeksiyonla mücadele edebilmesi için zaman tanır. Yara, bu süreçte kontaminasyon düzeyi azaldığında ve enfeksiyon kontrol altına alındığında, cerrahi olarak primer kapatma yöntemiyle kapatılır [80].

2.3.3. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Yara iyileşme süreci, çeşitli sistemik ve lokal faktörler tarafından etkilenebilir (Şekil 6). Bu faktörler birbiriyle yakından ilişkilidir ve sistemik faktörlerin yara iyileşmesi üzerine etkileri lokal etkiler ile gerçekleşir [81].



Şekil 6. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler.

A. Sistemik faktörler:

Yaş-Cinsiyet-Irk: Yara iyileşme süreci; yaş, cinsiyet, ırk ve genetik faktörler gibi bireysel değişkenlerden etkilenmektedir. Özellikle yaşla birlikte meydana gelen yapısal ve fizyolojik değişiklikler, cilt bütünlüğünün bozulmasına karşı duyarlılığı arttırmakta ve yara iyileşme sürecinin çeşitli evrelerinde gecikmelere yol açabilmektedir. Hücresel ve moleküler düzeyde yapılan klinik ve deneysel çalışmalar, yaşlanmanın yara iyileşmesi üzerinde olumsuz etkisi olduğunu ortaya koymuştur [82]. Sağlıklı yaşlı bireylerde, yaşlanmanın iyileşme sürecinde genellikle yalnızca gecikmeye neden olduğu, ancak iyileşme kalitesinde ciddi bir bozulmaya yol açmadığı genel kabul gören bir görüştür [83]. Yaşa bağlı olarak yara iyileşmesinde gözlenen biyolojik değişiklikler; trombosit agregasyonunda bozulma, inflamatuvar mediatörlerin salınımında azalma, makrofaj ve lenfosit infiltrasyonunda gecikme, makrofaj fonksiyonlarında yetersizlik, büyüme faktörlerinin üretiminde azalma, yeniden epitelizasyonun gecikmesi, yetersiz anjiyogenez, kolajen sentezinin ve yeniden şekillenmesinin azalması ve nihayetinde yaranın mekanik dayanıklılığında düşüş olarak özetlenebilir [82]. Hücresel döngülerin yavaşlaması, ekstraselüler matriksin doku protein üretimindeki azalma ve eşlik eden komorbiditeler, ileri yaş hastalarda yara iyileşmesini daha da zorlaştırmaktadır. Bu nedenle senil bireylerde yara yerinde herniasyon ve evisserasyon gibi komplikasyonlar daha sık gözlenmektedir. Yara iyileşmesinde cinsiyet farkı büyük ölçüde belirgin değildir. Yapılan çalışmalar, erkek ve kadın bireyler arasında yara iyileşme hızı ve kalitesi açısından anlamlı bir fark

olmadığını göstermektedir. Ancak hormonal düzeylerin yara iyileşmesindeki dolaylı etkileri araştırılmaya devam etmektedir. Irkın yara iyileşmesi üzerindeki etkisi özellikle keloid ve hipertrofik skar oluşumu bağlamında değerlidir. Koyu tenli bireylerde, fibroblastların aşırı aktivitesine bağlı olarak hipertrofik skar ve keloid gelişimine daha sık rastlanmaktadır [84]. Bu durum, genetik yatkınlık ve melanin yoğunluğuyla ilişkili bulunmuştur [85].

Beslenme: Yara iyileşmesi, yeni doku oluşumunu kapsayan oldukça karmaşık, metabolik açıdan aktif ve enerji gerektiren biyolojik süreçtir. Bu süreçte, hücresel düzeyde onarım mekanizmalarının etkin biçimde çalışabilmesi; hücre motilitesi, bölünme ve farklılaşmanın sağlanması; kemotaktik yanıtların (büyüme faktörleri ve sitokin sinyalleri) oluşturabilmesi için yeterli düzeyde enerji üretimi zorunludur [86]. İyileşme sürecinin başarıyla tamamlanabilmesi için hem sistemik (makro çevre) hem de lokal (mikro çevre) faktörlerin bütüncül olarak değerlendirilmesi gerekir. Makro çevre kapsamında değerlendirildiğinde, yarası iyileşmeyen hastalarda malnütrisyon oldukça yaygın bir durumdur. Yetersiz ve dengesiz beslenen bireylerde yara iyileşmesi yavaşlamakta, kronik yara gelişme riski artmakta ve yaranın enfekte olma olasılığı belirgin şekilde yükselmektedir [87]. Malnütrisyon, immün sistem yanıtlarında zayıflama, hücresel onarım mekanizmalarında bozulma ve kolajen sentezinde yetersizlik gibi çeşitli mekanizmalarla yara iyileşmesini olumsuz etkilemektedir. C vitamini, kolajen sentezinde görevli prolin ve lizin aminoasitlerinin hidroksilasyonunda kofaktör olarak görev yapar. Eksikliğinde kolajen üretimi azalır, yeni oluşan kapiller damarların duvarları zayıflar ve bu durum kapiller kanamalara, hematomlara ve sekonder enfeksiyonlara neden olabilir. Ayrıca C vitamini, nötrofillerin myeloperoksidaz enziminde yer alarak ilk 48 saatte fagositoz ve inflamasyonun kontrolünde görev alır. Bu nedenle eksikliğinde yara bölgesinde erken immün yanıt etkisiz hale gelir [86]. K vitamini, koagülasyon faktörlerinin sentezinde görev aldığı için eksikliğinde yeterli hemostaz sağlanamaz. Sonuç olarak yara bölgesinde uzamış ve kontrolsüz kanamalar görülür, bu da hematoma gelişimini kolaylaştırarak enfeksiyon riskini artırır. Protein ve albümin eksikliği, başta kolajen olmak üzere, birçok yapısal ve fonksiyonel proteinin sentezini azaltır. Total protein düzeyindeki azalma, yara matriksinin zayıflamasına ve fibroblast fonksiyonlarının yetersizliğine neden olur. Cerrahi işlem öncesi 6 ay içinde vücut ağırlığının

%10'undan fazlasının kaybı, özellikle protein kaybı yönünden, yara iyileşmesini belirgin şekilde bozar. A, C, E vitaminleri ile demir ve çinko eksiklikleri, antioksidan savunma sistemini zayıflatır, hücre yenilenmesini engeller ve oksidatif stresin artmasına neden olarak yara iyileşme sürecini sekteye uğratar [88]. Çinko, magnezyum ve bakır gibi mineraller birçok enzim sisteminin kofaktörüdür. Eksikliklerinde epitelizasyon gecikir, bağ dokusu sentezi yetersiz kalır ve lenfosit, monosit ve nötrofil fonksiyonlarında bozulma meydana gelir. Yara iyileşmesi sürecinde dengeli ve yeterli beslenme vazgeçilmez bir unsurdur. Özellikle protein, vitamin ve mineral desteği, yara komplikasyonlarının azaltılmasında ve iyileşme süresinin kısaltılmasında önemli rol oynamaktadır.

Diyabet: Sistemik etkileri nedeniyle yara iyileşmesini belirgin şekilde olumsuz etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Diyabetik bireylerde yara iyileşmesinin bozulması; hipoksi, fibroblast ve keratinosit disfonksiyonu, bozulmuş anjiyogenez, artmış MMP aktivitesi, ROT artış, azalmış konakçı immün yanıt ve diyabetik nöropati gibi çok sayıda mekanizmanın sonucudur [89, 90]. Hiperglisemi, yara iyileşmesinin tüm evrelerini etkileyerek süreci sekteye uğratar. İnflamasyon evresinde, yüksek glikoz düzeyleri nötrofil ve makrofajların fagositik aktivitesini bozar, sitokin salınımını azaltır ve enfeksiyon riskini artırır. Aynı zamanda hiperglisemi, proinflatuar bir ortam oluşturarak kronik inflamasyonu tetikler. Proliferasyon evresinde, fibroblast migrasyonu ve proliferasyonu azalır, kolajen sentezi inhibe olur ve anjiyogenez zayıflar. Sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumu yetersiz kalır ve epitelizasyon süreci gecikir [79, 91]. Diyabetik anjiyopati, özellikle alt ekstremitte yaralarında, yara yatağına oksijen ve besin taşınmasını azaltarak hipoksiye neden olur. Damar duvarındaki yapısal değişiklikler ve perfüzyon azlığı, dokularda rejeneratif yanıtı engeller. Aynı zamanda, diyabetik nöropati, ağrı duyusunun azalmasıyla minör travmaların fark edilmemesine neden olarak, kronik yara oluşum riskini artırır [92]. Kan şekeri regülasyonu sağlanamayan hastalarda, yara iyileşmesinde görevli olan bağışıklık hücrelerinin aktivitesi azalır, kolajen sentezi bozulur, anjiyogenez yetersiz kalır ve tüm bu süreçler neticesinde yara iyileşmesi gecikir. Bu nedenle diyabetli bireylerde yara takibi, metabolik kontrol ve glisemik regülasyonla entegre olarak değerlendirilmelidir. İyi düzenlenmiş glisemik kontrol, sadece iyileşme sürecini

hızlandırmakla kalmaz, aynı zamanda yara komplikasyonlarını ve amputasyon riskini de azaltır [93].

Sigara ve Alkol Kullanımı: Yara iyileşme sürecini olumsuz etkileyen önemli çevresel faktörler arasında yer almaktadır. Her iki alışkanlık da kan akışı, oksijen taşınımı, bağışıklık yanıtı ve hücre yenilenmesi gibi iyileşmenin temel fizyolojik süreçlerini bozar. Sigara dumanında bulunan nikotin, sempatik sinir sistemi üzerinde stimülatör etkiye sahiptir. Bu durum, kapiller damar yatağında vazokonstriksiyona yol açarak lokal doku perfüzyonunu azaltır ve yara bölgesine yeterli oksijen taşınmasını engeller [94]. Bununla birlikte, sigara kullanımına bağlı olarak parsiyel oksijen basıncı (pO_2) azalır ve yara mikro çevresinde rölatif hipoksi meydana gelir. Bu hipoksik ortam, fibroblast fonksiyonlarını ve kolajen sentezini inhibe eder, anjiyogenezi baskılar ve epitelizasyon sürecini geciktirir. Sigara, karboksihemoglobin oluşumunu tetikler. Bu durum, oksijen-hemoglobin disosiyasyon eğrisini sola kaydırır, yani oksijenin hemoglobine bağlanması kolaylaşırken dokulara bırakılması zorlaşır. Sonuç olarak, yara bölgesine yeterli düzeyde oksijen taşınmaz bu da yara iyileşmesini önemli ölçüde geciktirir [95]. Ayrıca sigara kullanımı, nötrofil ve makrofaj fonksiyonlarını da baskılayarak enfeksiyon riskini artırır. Kronik alkol kullanımı, yara iyileşmesinde görev alan hücresel süreçleri baskılamaktadır. Alkol; fibroblast proliferasyonu, kolajen sentezi ve reepitelizasyon üzerinde doğrudan inhibitör etkilere sahiptir. Ayrıca, immün yanıtı baskılayarak enfeksiyonlara yatkınlığı artırır. Alkolün neden olduğu karaciğer disfonksiyonu, protein sentezinde bozulmaya neden olarak yapısal protein eksikliklerine ve hücresel onarımın gecikmesine yol açar [96].

B. Lokal faktörler:

Hipoksi: Oksijen, hücresel metabolizma ve enerji üretimi açısından temel bir gereksinim olup, yara iyileşmesinin tüm aşamalarında bir rol oynamaktadır. Özellikle proliferasyon ve remodeling evrelerinde hücrelerin artan enerji ihtiyacı nedeniyle, yara dokusunun oksijen gereksinimi sağlıklı dokulara kıyasla daha fazladır. Yara bölgesinde oksijen, fibroblast aktivitesi, kolajen sentezi, epitel hücre migrasyonu, anjiyogenez ve immün hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi açısından vazgeçilmez bir elementtir [97]. Travmatik bir yaralanma sonrasında, yara alanındaki kılcal damarların hasar görmesi nedeniyle lokal oksijenasyon düzeyi düşer ve hipoksik bir mikro çevre oluşur. Hipoksi, yara iyileşmesinin erken fazlarında sınırlı düzeyde

olduğunda anjiyogenez, sitokin salınımı, hücre migrasyonu ve proliferasyon gibi süreçleri uyarabilir. Ancak hipoksinin uzun süreli ve şiddetli olması, endotel hücrelerde apoptozise, fibroblast disfonksiyonuna ve kolajen sentezinin azalmasına yol açarak iyileşmeyi bozar ve kronik yara gelişimine zemin hazırlar [98, 99]. Oksijenin yara iyileşmesindeki önemli rollerinden biri de ROT üretimi üzerindeki etkisidir. Süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROT'lar, hücre sinyalleri, migrasyon ve sitokin yanıtlarında düzenleyici rol oynar. Hem hipoksi hem de hiperoksi durumlarında ROT üretimi artar. Ancak ROT düzeyinin aşırı yükselmesi DNA, protein ve hücre membranlarında hasara neden olarak ilave doku yıkımına yol açabilir [97]. Hipoksiye bağlı olarak azalan kolajen üretimi, skar dokusunun yetersiz gelişmesi ile sonuçlanabilir. Bu durum, yaranın yeniden yapılanma sürecini aksatır ve doku bütünlüğünün sağlanmasını geciktirir [98]. Bu nedenle hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT), özellikle kronik yaralarda oksijenasyonun artırılması yoluyla kolajen üretimini destekler, fibroblast aktivitesini artırır ve doku perfüzyonunu iyileştirerek yara iyileşmesine olumlu katkı sağlar [99]. Yara iyileşmesinin her aşamasında yeterli oksijen düzeyinin sağlanması, iyileşme sürecinin kalitesini ve hızını belirleyen temel faktörlerden biridir. Yetersiz oksijenasyon hem hücresel işlevlerde bozulmaya hem de enfeksiyon riskinde artışa neden olabileceği için yara bakımında sistemik ve lokal oksijen desteği stratejileri mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

Enfeksiyon: İnflamasyon, yara iyileşme sürecinin fizyolojik bir evresidir ve normal koşullarda iyileşmeyi başlatıcı bir rol üstlenir. Ancak yara bölgesinde mikrobiyal kontaminasyonun meydana gelmesi, bu sürecin patolojik bir hal almasına neden olur. Özellikle patojen mikroorganizmaların ve bunlara ait endotoksinlerin yara ortamında yüksek konsantrasyonlara ulaşması, proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 ve TNF- α salınımını artırarak inflamatuvar fazın uzamasına ve normal iyileşme sürecinin aksamasına yol açar [100]. Kronik inflamasyonun devam etmesi, ECM'yi parçalayan proteolitik enzimler olan MMP'lerin düzeyinin artmasına neden olur. Bununla birlikte, bu enzimlerin doğal inhibitörleri olan doku inhibitörleri (TIMP'ler) azalır. Bu dengesizlik, kolajen yıkımını hızlandırır ve granülasyon dokusunun oluşumunu olumsuz etkiler. Sonuç olarak, iyileşme süreci kronikleşebilir ve iyileşmeyen yaralar ortaya çıkabilir [81, 100]. Yara bölgesinde enfeksiyondan söz edebilmek için, dokunun her gramında bakteri sayısının genellikle 10^5 (100.000) koloni oluşturan birim

(CFU/gr) seviyesini aşması gerekmektedir. Bu eşik değerin üzerindeki bakteri yükü, yara iyileşmesini doğrudan inhibe eder. Enfeksiyon, doku oksijenasyonunu bozar, inflamatuvar fazın süresini ve şiddetini artırır, fibroblast aktivitesini azaltarak kolajen sentezini baskılar [101]. Ayrıca, bakteriyel toksin ve metabolitlerin etkisiyle epitelizasyon gecikir ve yara kontraksiyonu yetersiz kalır. Enfekte yaralarda granülasyon dokusu, steril yaralara kıyasla daha ödemli, kanamalı ve kırılğan bir yapı gösterir. Bu durum, vaskülarizasyonun bozulması, artmış proteolitik aktivite ve hücresel yanıtın düzensizliği ile ilişkilidir [102]. Ayrıca enfeksiyon, fibroblast migrasyonunu ve diferansiyasyonunu engelleyerek yeniden epitelizasyonu yavaşlatır. Kolajen yıkımının artması ve yeni kolajen sentezinin baskılanması nedeniyle, yara dokusunun mekanik dayanıklılığı da azalır [81]. Cerrahi yaralarda enfeksiyon gelişmesinde, bakteriyel kontaminasyonun yanı sıra dokunun aşırı travmatize edilmesi, hematoma varlığı, nekrotik doku artıkları, yabancı cisimler ve yetersiz sterilizasyon gibi faktörler de önemli rol oynar [41, 103]. Mikrobiyal kolonizasyonun inflamatuvar yanıtı arttırması, bu sürecin uzamasına ve iyileşmenin gecikmesine neden olur [104].

Fiziksel Etmenler: Yara iyileşme sürecinde fiziksel çevre koşulları, özellikle nem ve sıcaklık, epitelizasyonun sağlıklı ilerleyebilmesi açısından önemlidir. Optimal yara iyileşmesi için yara yatağında yaklaşık 30 °C'lik 30 bir sıcaklığın korunması idealdir. Bu sıcaklık düzeyi fibroblast aktivitesi, kolajen sentezi ve keratinosit migrasyonu için elverişli bir mikro çevre sağlar. Ancak 30 °C'nin üzerindeki sıcaklıklar, yaranın gerilim direncini azaltarak doku bütünlüğünü olumsuz etkileyebilir [58]. Nem dengesi, yara iyileşmesinin temel bileşenlerinden biridir. Yara yatağında optimal nem düzeyinin sağlanması, keratinositlerin migrasyonunu kolaylaştırarak epitelizasyon sürecini hızlandırır. Bununla birlikte, aşırı nem, dokunun yumuşayıp bozulmasına neden olarak hücresel bütünlüğü bozabilirken, yetersiz nem de hücre hareketliliğini ve doku yenilenmesini yavaşlatabilir [105]. Bu nedenle, nem dengesinin dikkatli bir şekilde yönetilmesi gerekmektedir. Mekanik stres de yara iyileşmesini doğrudan etkileyen bir diğer fiziksel faktördür. Kontrollü düzeyde uygulanan mekanik stres, hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi uyarak iyileşmeyi destekleyebilir. Ancak sürekli basınç, sürtünme veya hareket gibi yüksek düzeydeki mekanik kuvvetler, yaranın kapanmasını geciktirerek iyileşmeyi sekteye uğratabilir

[106]. Özellikle basınç ülserlerinde görüldüğü gibi, mekanik yüklenmenin azaltılması iyileşme sürecinde önem taşır. Yara bakımında fiziksel çevrenin dikkatle izlenmesi ve uygun sıcaklık, nem ile mekanik yüklenmenin dengeli bir şekilde sağlanması, optimal doku iyileşmesini desteklemektedir.

2.4. Yara Tedavi Yaklaşımları

Yara tedavi yöntemleri; yaranın tipine, derinliğine, lokalizasyonuna, eşlik eden sistemik hastalıklara ve enfeksiyon durumuna göre planlanan, multidisipliner ve bireyselleştirilmiş bir yaklaşım gerektirir. Modern yara tedavisinin amacı, yalnızca yaranın kapatılmasını sağlamak değil, aynı zamanda fonksiyonel ve estetik bütünlüğü koruyarak komplikasyonları önlemektir. Bu bağlamda yara tedavisinde kullanılan yöntemler, geleneksel uygulamalardan ileri teknoloji ürünlerine kadar geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır.

2.4.1. Geleneksel yara tedavisi

Geleneksel tedavi yöntemleri arasında steril gazlı bezlerle kapama, antiseptik solüsyonlar (örneğin povidon iyot, hidrojen peroksit) ve sistemik antibiyotik uygulamaları yer alır. Ancak bu yaklaşımlar genellikle yara yatağının kurumasına neden olarak epitelizasyonu geciktirmekte ve skar dokusu oluşumunu arttırmaktadır [107]. Bu nedenle, modern yara bakımında yerini daha fizyolojik yaklaşımlara bırakmıştır.

2.4.2. Modern yara bakımı yöntemleri

Modern yara bakımının temel ilkelerinden biri, nemli bir iyileşme ortamının korunmasıdır. Bu, epitel hücrelerinin göçünü kolaylaştırır ve fibrin oluşumunu önleyerek skar dokusunun azalmasına yardımcı olur.

- Hidrojel pansumanlar: Kurumuş ve nekrotik dokuların yumuşatılmasında kullanılır. Yüksek su içerikleri sayesinde otolitik debridmanı destekler.
- Hidrokolloid pansumanlar: Hafif-orta eksüdalı yaralarda tercih edilir. Yara yatağında nemli ortam sağlar ve dış çevreden koruma sunar.
- Alginat ve köpük pansumanlar: Yüksek eksüdalı yaralarda sıvıyı absorbe ederek yara çevresinin maserasyonunu önler.

- Film pansumanlar: Düşük eksüdalı yüzeyel yaralarda kullanılır. Transparan yapıları sayesinde yara gözlemi mümkündür [108].

2.4.3. Debridman yöntemleri

Yara yüzeyindeki nekrotik dokuların uzaklaştırılması amacıyla yapılan debridman işlemi, iyileşmeyi geciktiren mikro ortamı ortadan kaldırarak sağlıklı granülasyon dokusunun gelişimine zemin hazırlar. Debridman seçimi, yaranın durumu ve hastanın genel sağlığına göre yapılır [109].

- Cerrahi debridman: En hızlı ve etkili yöntem olup, özellikle enfekte ve ağır nekrotik yaralarda tercih edilir.
- Enzimatik debridman: Proteolitik enzimler (örn: kolagenaz) kullanılarak devital dokuların seçici olarak uzaklaştırılmasını sağlar.
- Otolitik debridman: Vücudun kendi lizozomal enzimleriyle yapılan, yavaş ancak ağrısız bir yöntemdir.
- Mekanik ve biyolojik debridman: Nemli gazlı bezler veya larva tedavisi ile gerçekleştirilir [109].

2.4.4. Negatif basınçlı yara tedavisi (NPWT)

Vakum destekli yara tedavisi olarak da bilinen bu yöntem, yara üzerine uygulanan kontrollü negatif basınç sayesinde; ödemi azaltır, eksüdayı uzaklaştırır, anjiyogenezisi ve granülasyon dokusu oluşumunu destekler. Diyabetik ayak yaraları, bası ülserleri ve postoperatif dehisanslarda etkilidir [110].

2.4.5. Sistemik tedavi yaklaşımları

Enfeksiyon kontrolü: Yaranın kontaminasyonu ve enfeksiyonu, iyileşme sürecini ciddi biçimde aksatabilir. Bu nedenle yara kültürü alınmalı ve gerekirse topikal veya sistemik antibiyotik tedavisi planlanmalıdır. Antimikrobiyal ajanlar içeren pansumanlar (gümüş, iyot, vb.) enfeksiyon yükünü azaltmada etkili olabilir [103].

Altta yatan nedenlerin kontrolü: Her yara tedavisi planında sistemik faktörlerin (diyabet, malnütrisyon, venöz yetmezlik, sigara kullanımı vb.) kontrol altına alınması esastır.

2.4.6. Biyolojik ve biyomühendislik ürünleri

İnatçı kronik yaralarda iyileşmeyi desteklemek amacıyla ileri tedavi modelleri devreye girer. Bunlar:

- Kök Hücre ve Gen Terapisi: Kronik yaraların tedavisinde, kök hücre enjeksiyonları ve genetik düzenlemeler ile hücresel rejenerasyon sağlanmaktadır [80]. Gen terapisi ise, yara iyileşmesini geciktiren genetik faktörleri düzenlemeye yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır.
- Biyoaktif Moleküller ve Nanoteknolojik Yaklaşımlar: Antibakteriyel peptitler, gümüş nanopartiküller ve biyoaktif polimerler içeren yara örtüleri, enfeksiyon riskini azaltarak iyileşmeyi hızlandırmaktadır [105]. Özellikle antimikrobiyal dirençli patojenlerin neden olduğu yara enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır.
- Büyüme faktörleri (PDGF, VEGF, EGF): Yara iyileşmesini hücresel düzeyde uyarır.
- Trombositten zengin plazma (PRP): Otolog kökenli büyüme faktörlerinden zengin bir üründür.
- Yapay deri greftleri ve hücre bazlı ürünler: Hücre proliferasyonu ve doku bütünlüğü için destek sağlar.

2.4.7. Fiziksel yöntemler

Oksijen Terapisi: Hipobarik ve hiperbarik oksijen tedavileri, yara iyileşmesini hızlandırmak için oksijen difüzyonunu artırarak fibroblast ve kolajen sentezini destekler. Diyabetik ayak yaralarda ve hipoksik dokularda etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir [81].

Lazer ve Fotobiyomodülasyon Tedavisi: Düşük seviyeli lazer terapisi (LLLT), hücresel enerji üretimini artırarak fibroblast proliferasyonunu destekler ve inflamasyonu azaltır. Işık yayan diyot (LED) bazlı fotobiyomodülasyon tedavileri de yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılmaktadır [111].

Elektroterapi ve Bioelektrik Yara Tedavisi: Düşük voltajlı elektrik stimülasyonu, hücre proliferasyonunu artırarak fibroblast aktivitesini düzenler ve yara iyileşmesini hızlandırır [112].

Plazma Tedavisi: Soğuk atmosferik plazma (CAP) uygulamaları, bakterisidal etkileri nedeniyle enfekte yaralarda etkili bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir [113]. Plazma terapisi, serbest radikal üretimi yoluyla hücrel proliferasyonu destekleyerek iyileşme sürecini hızlandırabilir.

2.4.8. Bitkisel alternatifler

Geleneksel tıbbi uygulamalarda, yerel bitkilerin terapötik etkileri uzun yıllardır tanımlanmakta ve kullanılmaktadır. Son yirmi yılda etnofarmakolojik uygulamalara yönelik bakış açısında önemli değişimler yaşanmış; bitkilerde bulunan çeşitli biyolojik olarak aktif bileşenlerin varlığı, bu bitkilerin yara iyileştirici potansiyellerinin araştırılmasına zemin hazırlamıştır [114].

Bitkisel bileşenlerin yara iyileşme sürecine olan katkıları dört ana mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir:

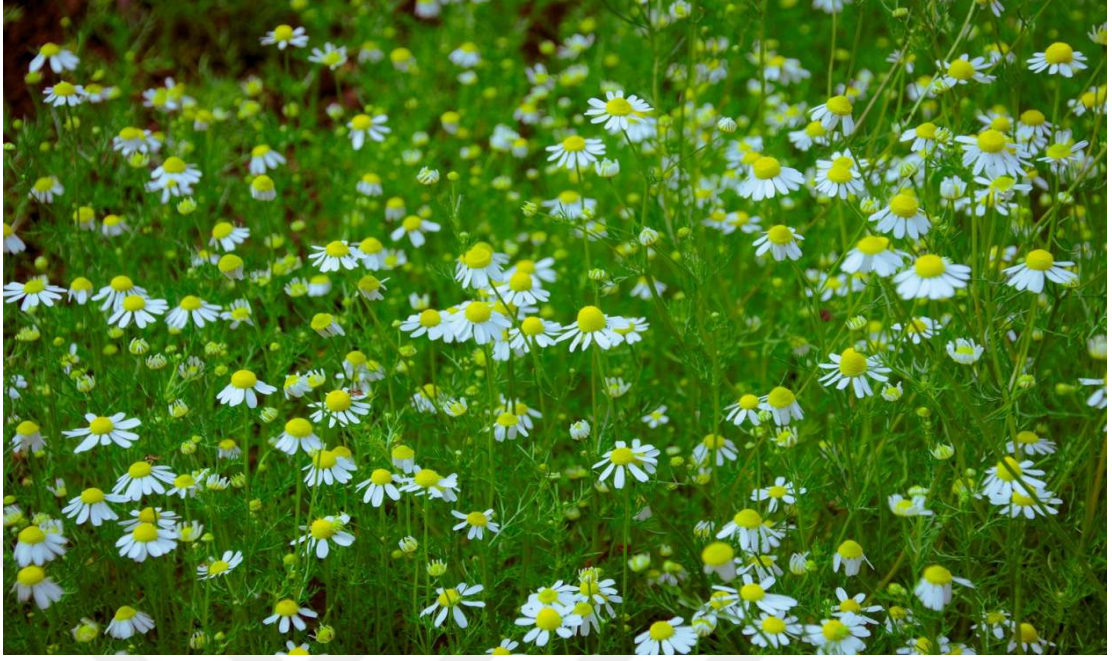
Antiinflatuar Etki: Yaralanma sonrası oluşan inflamasyon, iyileşme sürecinde kritik bir aşamadır. Ancak, aşırı inflamasyon doku hasarını artırabilir ve iyileşmeyi geciktirebilir. Birçok bitkisel bileşen, inflamasyonu kontrol altına alarak yara bölgesinde doku yenilenmesini hızlandırır [115]. Örneğin aynısefa (*Calendula officinalis* L.) ve papatya (*Matricaria recutita* L.) inflamatuar süreçleri baskılayarak granülasyon dokusunun oluşumunu destekler.

Antibakteriyel ve Antimikrobiyal Etki: Açık yaralar, bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı hassastır. Sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.), kekik (*Origanum onites* L.) ve çay ağacı yağı (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) gibi bitkiler, doğal antibakteriyel bileşenler içerir ve yara enfeksiyonlarının önlenmesine yardımcı olur [116].

Hücrel Yenilenmeyi Destekleme: *Aloe vera* (L.) Burm.f. ve sinirotu (*Plantago major* L.) gibi bitkiler, fibroblast proliferasyonunu arttırarak kolajen sentezini destekler ve epitelizasyon sürecini hızlandırır [117].

Antioksidan Aktivite: Oksidatif stres, yara iyileşmesini olumsuz etkileyebilir. Ölmez çiçek (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) ve defne (*Laurus nobilis* L.) gibi bitkiler, serbest radikalleri temizleyerek hücrel hasarı önler ve dokunun yenilenmesini kolaylaştırır [117].

A- Papatya (*Matricaria recutita* L.)



Şekil 7. *Matricaria recutita* L. [118].

Matricaria recutita L., (syn. *Matricaria chamomilla* L.) yaygın olarak Alman papatyası, mayıs papatyası ve tıbbi papatya olarak da bilinir (Şekil 7). Güney ve doğu Avrupa’da doğal olarak yetişen ve kültürü yapılan, ülkemizde de yetişen, Asteraceae familyasına mensup önemli bir tıbbi bitkidir.

Çiçekleri %0,2-1,9 uçucu yağ taşır. Çiçekler ayrıca flavonoid ve kumarinler bulundurulur. Bitkinin flavonoidleri farmakolojik aktiviteleri açısından önem taşımakta olup en önemlisi apigenin-7-glikozittir. Antiinflamatuar, antiseptik ve antispazmodik etkilidir [119].

Yüzyıllardır gastrointestinal rahatsızlıklar ve cilt lezyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır [120]. Ayrıca, papatya uçucu yağı ile yapılan aromaterapi uygulamalarının epizyotomi yaralarının iyileşmesinde etkili olduğu ortaya konmuştur [121].

Papatya ekstresinin menopoz semptomları üzerindeki etkisi östrojenik aktivitesini işaret etmektedir [122]. Östrojen reseptörlerinin cilt dokusunda varlığı bilinmektedir [123]. Östrojen, proinflamatuar özellikleri nedeniyle yara iyileşmesini destekleyen bir hormondur [124].

Aftöz stomatit ve metotreksat kaynaklı oral ülserler üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir; bu durum muhtemelen immünmodülatör veya immünstimülan etkilerinden kaynaklanmaktadır [125, 126]. Papatyanın antipruritik etkisi, histamin ve serotonin reseptörlerine karşı gösterdiği antagonist etkiye ya da H₂ reseptörleri üzerindeki antiülserojenik aktivitesine bağlı olabilir [127, 128]. Histamin reseptör antagonistleri cilt bariyerinin onarımını hızlandırmakta, 5HT₂ reseptör antagonisti ketanserinin ise yara iyileşmesini desteklemektedir [129, 130].

Literatürde, papatyanın opioid-benzeri özellikler taşıdığı da rapor edilmiştir [131]. Topikal olarak uygulanan opioidlerin yara iyileşmesini hızlandırdığı ve trombosit agregasyonunu arttırdığı bilinmektedir [132, 133]. Trombosit aktivasyonu, yara iyileşme sürecinin başlangıcını oluşturur.

B- Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.)



Şekil 8. *Hypericum perforatum* L. [134].

Hypericum perforatum L., Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika gibi bölgelerde yaygın olarak yetişen, tıbbi özellikleriyle bilinen, Hypericaceae familyasına ait çok yıllık bir bitkidir (Şekil 8). Geleneksel tıpta uzun süredir cilt hastalıkları, yanıklar, kesikler, ülserler ve iltihaplı durumların tedavisinde kullanılmaktadır [135].

Hypericum perforatum'un biyolojik etkileri, içinde bulunan çeşitli aktif bileşenlere bağlanmaktadır. Bu bileşenler arasında hiperisidin, hiperforin, flavonoidler, tanenler, fenolik asitler ve uçucu yağlar sayılabilir. Hiperisidin ve hiperforin özellikle antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antidepresan özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. Flavonoidler ve tanenler ise antioksidan ve damar koruyucu etkileriyle bilinmektedir. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, sarı kantaronun yara iyileşmesi sürecinin farklı aşamalarına müdahale edebileceğini göstermektedir. Bu müdahaleler arasında inflamatuvar cevabın düzenlenmesi, fibroblast proliferasyonu ve kolajen sentezinin artırılması, epitel hücrelerinin yenilenmesi ve yeni kan damarlarının oluşumunun desteklenmesi bulunmaktadır. Ayrıca, *Hypericum perforatum*'un topikal uygulamalarında deri üzerinde gösterdiği antiinflamatuvar etki ve antioksidan kapasite, oksidatif stresin azaltılması ve doku onarımının hızlandırılması açısından önemlidir. Bunun yanı sıra, bitkinin sahip olduğu antimikrobiyal özellikler, yaraların enfekte olma riskini azaltabilir, komplikasyonları önleyebilir [136].

Hypericum perforatum'un, epitel rekonstrüksiyonundaki artış sonucunda sezaryen doğumlardan kaynaklanan cerrahi yaraların iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir [137].

C- Aynısefa (*Calendula officinalis* L.)



Şekil 9. *Calendula officinalis* L. [138].

Calendula officinalis L., (Asteraceae) tıbbi özellikleri nedeniyle dünya genelinde yaygın olarak kullanılan bir Akdeniz bitkisidir (Şekil 9). Farklı bölgelerde aynısefa, adi kadife çiçeği, saksı kadife çiçeği, Zergul (Hindistan), Butterblume (Almanya), Chin Chan Ts'ao (Çin), Galbinele (Romanya), Ringblomma (İsveç) gibi çeşitli adlarla bilinmektedir [139].

Bitkinin büyük ve parlak turuncu/sarı çiçekleri, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan ve epitelizan özellikler taşıyan çeşitli fitokimyasal bileşikler içerir. Başlıca bileşikler; triterpenoidler, flavonoidler, kumarinler, kinonlar, uçucu yağlar, karotenoidler ve amino asitlerdir [139]. Özellikle triterpenoidler ve flavonoidler, yara iyileşmesini destekleyen antiinflamatuvar ve fibroblast aktivitesini artırıcı etkilere sahiptir [140]. Ayrıca, 5-lipoksijenaz, siklooksijenaz-2 ve kompleman sistemine ait C3-konvertaz enzimlerinin inhibisyonu gibi mekanizmalarla inflamasyonu düzenleyici etki gösterdiği düşünülmektedir [141].

Calendula ekstresinin, fibroblast proliferasyonu ve migrasyonu, anjiyogenez, kolajen üretimi ve oksidatif stresin azaltılması gibi etkilerle yara iyileşmesine katkı sağladığı çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir [142, 143]. Bununla birlikte, henüz bitkinin etki mekanizmasına dair kesin bir farmakodinamik model ya da tek bir aktif bileşen tanımlanmamıştır. Tüm bu biyolojik etkiler, bitkinin yara iyileşmesini kolaylaştırma potansiyelini desteklemektedir.

D- Sinirotu (*Plantago major* L.)



Şekil 10. *Plantago major* L. [144].

Plantago major L. (geniş yapraklı sinirotu), Plantaginaceae familyasına ait çok yıllık tıbbi bir bitkidir (Şekil 10). 185 kabul edilmiş türü bulunmaktadır [145]. Dünya çapında farklı kültürlerde geleneksel ve tamamlayıcı tıpta önemli bir yer tutmakta ve sindirim sistemi, dolaşım sistemi, üriner sistem ve deri lezyonları başta olmak üzere çeşitli sistemlere yönelik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [146].

Plantago major'un farmakolojik etkileri büyük ölçüde yaprak ve tohumlarında yoğunlaşan biyoaktif bileşiklere bağlıdır. Analjezik, antiinflamatuvar, antioksidan, immunomodülatör, antifungal, antikanser ve yara iyileştirici etkiler göstermektedir. Bu etkiler: flavonoidler, alkaloidler, terpenoidler, fenolik bileşikler, iridoid

glikozidler, yağ asitleri, polisakkaritler ve vitaminler gibi içerdği çeşitli fitokimyasallar sayesinde ortaya çıkmaktadır [147].

Zubair ve arkadaşları, çizik (scratch) testi kullanarak İsveç'teki beş farklı bölgeden toplanan *P.major* popülasyonlarını inceledikleri çalışmada, en baskın fenolik bileşik olarak Plantamajoside'ı tespit etmiş ve buna ek olarak PLMA 1-4 adını verdikleri dört yeni bileşik tanımlamışlardır [12]. Plantamajoside ve iridoid glikozidler gibi bileşiklerin antiinflamatuvar ve antioksidan etkiler taşıdığı ve bu yolla deri yaralarının iyileşmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir [148]. Diğer in vitro, in vivo ve ex vivo çalışmalar, *Plantago* türlerinin nükleer faktör-κ, nikrik oksit, siklooksijenaz-2 ve lökotrien B4 gibi inflamatuvar mediatörleri baskılama kapasitesine sahip olduğunu ve yara iyileşmesini olumlu etkilediğini göstermektedir [149, 150].

P.major, halk arasında cilt, solunum, sindirim ve üreme sistemi hastalıklarının yanı sıra enfeksiyonların tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır. Ancak yara iyileştirme potansiyeli, bugüne dek yalnızca prelinik çalışmalar ile değerlendirilmiştir [12].

E- Kekik (*Origanum onites* L.)



Şekil 11. *Origanum onites* L. [151].

Origanum onites L., *Origanum* cinsine ait bir bitkidir (Şekil 11). Genel olarak *Origanum* türleri, başlıca karvakrol ve timol içeren uçucu yağlar bakımından zengindir [152]. *O.onites*, öncelikle aromatik yaprakları için yetiştirilen ve mutfaklarda baharat olarak kullanılan bir bitkidir. Ticari adı ‘Türk kekiği’ olarak bilinir. Ülkemizin en çok ihraç edilen tıbbi aromatik bitkisidir. Doğal yayılım alanı, Yunanistan’ın güneyi, Sicilya’nın küçük bir bölgesi ve ülkemizin güneybatı kıyılarında sınırlıdır [153].

O.onites’ten elde edilen uçucu yağ, çok çeşitli biyolojik aktiviteler göstermesi nedeniyle bilimsel ilgi uyandırmıştır [154]. Bu aktiviteler arasında antifungal, antimikrobiyal, antioksidan, insektisidal, hepatoprotektif ve sitotoksik etkiler yer almaktadır [155, 156]. Ayrıca, bitkiden elde edilen çeşitli ekstraktların, in vitro ortamda kanser hücrelerine karşı antiproliferatif özellikler gösterdiği bildirilmiştir [157, 158].

Origanum cinsinin farklı türlerinin uçucu yağlarında yara iyileştirici etkisi saptanmıştır ancak yaptığımız literatür araştırmaları sonucunda Türk kekiği türünün uçucu yağında yara iyileştirici etki üzerinde bilimsel çalışmalara rastlanmamıştır [159].

F- Tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.)



Şekil 12. *Salvia officinalis* L. [160].

Salvia officinalis L., Lamiaceae familyasına ait, Güney Avrupa’da yetişen ve yetiştirilen, yaygın adıyla ‘adaçayı’ olarak bilinen tıbbi ve aromatik bir bitkidir (Şekil 12). Türkiye’de de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Avrupa Farmokopesi’nde bütün haldeki yapraklarının minimum 15 mL/kg, parçalanmış olanların ise minimum 10 mL/kg uçucu yağ taşıması gerektiği belirtilmiştir. Uçucu yağ kompozisyonunu oluşturan önemli bileşikler arasında tuyon, borneol, 1,8-sineol, tuyol ve kafur vardır [161].

Antiviral, antiseptik, antioksidan ve antienflamuar etkilidir [162]. Yara iyileştirici özelliklerine ilişkin literatür kısıtlıdır. Farahpour ve arkadaşları tarafından yürütölüp 2020 yılında yayınlanan bir in vivo çalışmada *S. Officinalis* uçucu yağı içeren bir merhemde enfekte yara modeli üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bulgular, tıbbi adaçayı uçucu yağlı merhemde topikal uygulanmasının, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında inflamatuvar fazı kısaltabildiğini ve hücresel proliferasyonu, yeniden vaskülarizasyonu, kolajen birikimini, yeniden epitelizasyonu hızlandırabildiğini göstermiştir [163].

G- Ölmez çiçek (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)



Şekil 13. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don [164].

Helichrysum italicum (Roth) G. Don, Asteraceae ailesine ait, ölmez çiçek veya altın otu adıyla da bilinen tıbbi ve aromatik bir bitkidir (Şekil 13). Ülkemizde Güney Marmara ve Ege Bölgelerinde doğal olarak yayılış göstermektedir ve yetiştiriciliği de yapılmaktadır.

H.italicum, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özellikleriyle tanınmaktadır [165]. *Helichrysum* cinsindeki bitki türleri; farklı biyolojik aktiviteleri olan fenolik bileşikler, oligomerler ve flavonoid glikozidleri gibi biyoaktif sekonder metabolitler açısından zengindir [166].

Günümüzde *H. İtalicum* uçucu yağı, antiproliferatif ve dokularda yeniden yapılanma etkileri sergileyerek yara iyileşme sürecine yardımcı olduğundan, kozmetik ürünlerde, özellikle de cilt bakım ürünlerinde en popüler içeriklerden biridir. Ayrıca bu uçucu yağ ciltte kan dolaşımını uyardığından cildin yenilenmesini sağlar ve yaşlanma önleyici etkileri vardır. Uçucu yağın bileşimi rakıma, iklim koşullarına, gelişim aşamasına, ekolojiye, alınan bitki kısmına, uçucu yağ elde etme yöntemine bağlı olarak değişiklik gösterir [167].

Andjic ve arkadaşları tarafından 2021 yılında gerçekleştirilen bir in vivo çalışmada sıçanlarda streptozotosin ile oluşturulan diyabetik yara modellerinde *H. İtalicum* uçucu yağıyla merhem ve jel formunda topikal formülasyonlar hazırlanmış ve yara iyileştirme potansiyelleri incelenmiştir. Her iki formülasyonda da (jel ve merhem) *H. İtalicum* uçucu yağının, insizyon modelinde yara kontraktörü oranında ve granülasyon dokusundaki hidroksiprolin oranında önemli bir artış ile doğrulanan dikkate değer bir yara onarıcı etki sergilediği belirlenmiştir [168].

H- Defne (*Laurus nobilis* L.)



Şekil 14. *Laurus nobilis* L. [169].

Laurus nobilis L., Lauraceae familyasına ait, Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere dünyanın birçok sıcak bölgesinde yetişen, kültür ya da yabani şekilde yetişebilen dayanıklı, yaprak dökmeyen bir ağaçtır (Şekil 14). Defne yaprakları Türkiye'nin önemli ihraç ürünlerindendir. Kurutulmuş yapraklarında %1,5-3 verimle uçucu yağ elde edilir. Bu yağın bileşimindeki majör madde 1,8-sineoldür. Buna ek olarak alfa-terpinil asetat ve sabinen gibi monoterpenleri de kayda değer miktarda içerir [170].

Defne meyvelerinin ve yapraklarının sulu ekstreleri geleneksel olarak kontraktif etkisiyle ve çeşitli nörolojik, dermatolojik ve ürolojik bozuklukların tedavisinde kullanılmıştır. Ayrıca, defne uçucu yağı halihazırda halk arasında romatizma ve dermatit gibi farklı sağlık sorunlarının tedavisinde kullanılmaktadır [171].

Laurus nobilis'in uçucu yağı ve yaprak ekstrelerinin, yara iyileşmesine katkı sağladığı gösterilmiştir [172]. Bu bileşiklerin antiinflamatuvar etkileri, analjezik özellikleri, immün sistem uyarıcı, antibakteriyel etkileri ve antikanser potansiyeli bulunduğu rapor edilmiştir [173, 174].

Süntar ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir in vivo çalışmada *L.nobilis* uçucu yağının lineer insizyon ve dairesel eksizyon yara modelleri üzerindeki yara iyileştirici aktivitesi incelenmiş ve çalışma sonucunda *L.nobilis* uçucu yağının kayda değer yara iyileştirici etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır [175].

2.5. Hücre Kültürü

Temel bilimsel araştırmalar için önemli bir araç olan hücre kültürü, fizyolojik koşullarda ökaryotik veya prokaryotik hücrelerin büyümesini sağlayan laboratuvar yöntemidir. Canlı organizmalardan elde edilen hücrelerin belirli yöntemlerle ayrıştırılarak; amino asitler, vitaminler, inorganik tuzlar, glukoz ve serum gibi temel besin maddelerini içeren kaplarda; belirli sıcaklık, nem, karbondioksit seviyelerinin kontrol edildiği ortamlarda büyütülmesi ve bu şekilde hücrelerin in vivo koşullarda (canlı ortamda) bulundukları mikro çevrenin taklit edilmesi olarak tanımlanır [176]. Kullanılan hücre çeşidine ve büyüme ortamlarına bağlı olarak değişiklik gösteren in vitro hücre kültürleri, hücre davranışlarının altında yatan mekanizmaların anlaşılmasını sağlamak ve ileri tedavi yöntemleri geliştirmek için sıklıkla kullanılmaktadır [177]. Bu davranışlar, biyokimyasal ve biyomekanik mikro çevresinden etkilenen hücre farklılaşmasını, göçünü, büyümesini ve mekaniğini içerir. Uygun hücre kültürü yöntemlerinin seçimi yeni tedavi stratejileri oluşturmada, mevcut radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin optimize edilmesinde etkili olabilir [178]. Aynı zamanda in vitro hücre kültürü, doku ve organların oluşumu ve işlevleri ile ilgili süreçleri anlamak açısından da önem taşımaktadır [179].

2.5.1. Sitotoksikite testleri

Hücrelerin canlılık düzeyleri ve proliferasyon hızları, hücresel sağlığın önemli biyomarkerları olarak kabul edilmektedir. Kimyasal ve fiziksel ajanlar, hücre sağlığını ve metabolizmasını çeşitli mekanizmalar aracılığıyla etkileyebilmekte; hücre membranının hasar görmesi, protein sentezinin inhibisyonu, reseptörlere irreversibl bağlanma, polideoksinükleotid zincirinin uzamasının engellenmesi ve enzimatik reaksiyonların bozulması gibi yollarla hücresel toksisiteye neden olabilmektedir [180]. Bu tür mekanizmalar sonucu hücre ölümünün tespiti için güvenilir, tekrarlanabilir, düşük maliyetli olması nedeniyle sitotoksikite testleri kullanılmaktadır.

In vitro sitotoksosite testleri, bir test bileşiminin hücre kültüründeki hücelere zarar verip vermediğini ölçmeyi amaçlar. Bu testler, belirli bir inkübasyon süresinin ardından kalan canlı hücre sayısının belirlenmesine dayanır. Hücre kültüründeki canlı hücrelerin sayısı genellikle hücrelerin metabolik aktivitelerini belirleyen yöntemlerle ölçülür. Bu amaçla hücrelerin metabolik aktivitelerini değerlendirmek için belirli kimyasal maddelerin ölçülebilir formlarına dönüştürülmesine dayanan çeşitli yöntemler geliştirilmiştir [181].

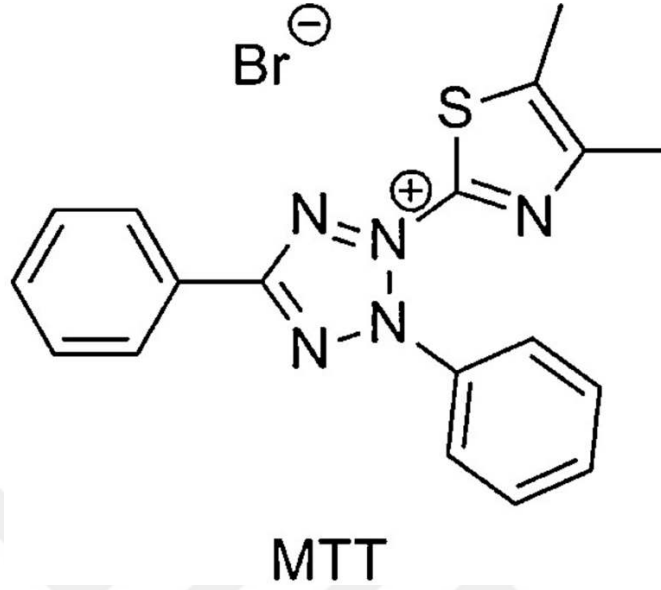
Hücre canlılığı ve sitotoksitesinin değerlendirilmesinde kullanılan testler genel olarak dört grupta incelenmektedir:

- 1- Boyama Yöntemleri: Bu yöntem hücrelerin membran bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla uygulanır. Boyama yöntemleri arasında Tripan mavisi, Kongo kırmızısı, Eozin ve Eritrosin B yer alır. Canlı hücreler bu boyaları dışarıda tutarken, ölü hücreler boyayı absorbe eder. Bu yöntemle canlı ve ölü hücrelerin oranı belirlenir ve hücre canlılığı yüzdesi hesaplanır [182].
- 2- Kolorimetrik Testler: Kolorimetrik testlerde, test bileşiminin hücrelerde oluşturduğu reaksiyon sonucunda ortaya çıkan renk değişimi spektral olarak ölçülür. Bu testler, UV absorpsiyonu veya görünür alandaki renk değişimi esasına dayanır. MTT testi (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), MTS testi (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum), XTT testi (2-3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid), WST-1 ve WST-8 testleri, Laktat dehidrogenaz (LDH) testi, Sulforhodamin B (SRB) testi, Neutral Red Uptake testleri kolorimetrik testler arasında yer almaktadır [181].
- 3- Florometrik Testler: Florometrik testler, floresans özellik gösteren belirteçler kullanılarak hücrelerin canlılık durumunu ve metabolik aktivitelerini ölçer.
- 4- Luminometrik Testler: Bu yöntem, hücrelerin canlılık durumunu belirlemek için luminesans sinyallerinin şiddetinin ölçülmesine dayanır.

2.5.1.1. MTT testi

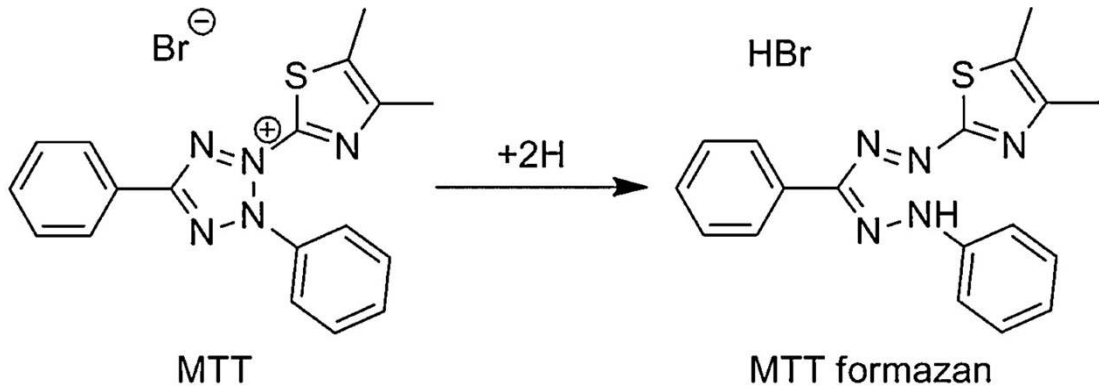
Hücresel canlılık, proliferasyon ve sitotoksosite değerlendirmelerinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, kolorimetrik bir analiz olan MTT testi (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemidir. MTT, dört azot

atomu içeren pozitif yüklü bir tetrazol halkası çekirdeğine sahip mono-tetrazolium tuzu olup, hücrel metabolik aktiviteyi değerlendirmek amacıyla kullanılan bir indikatördür [183, 184] (Şekil 15).



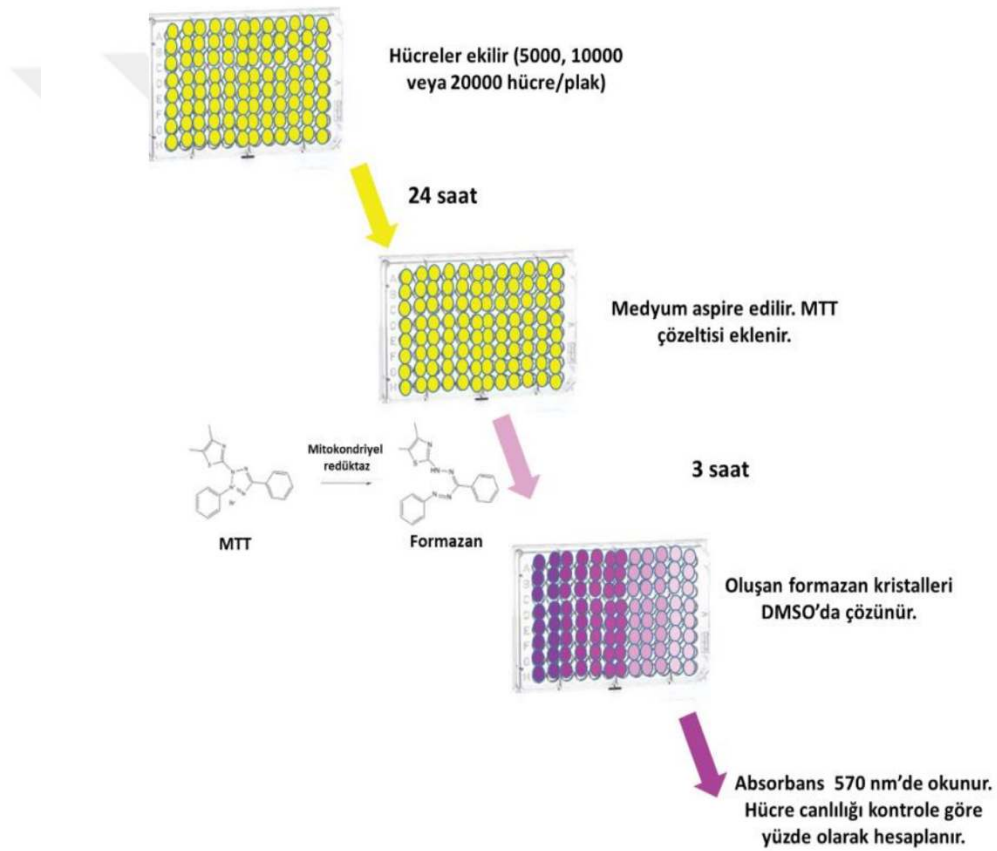
Şekil 15. MTT'nin kimyasal yapısı.

MTT'nin hücre zarından ve mitokondri iç zarından geçebilmesi, pozitif yüklü ve lipofilik yapısı sayesinde mümkün olur. Hücre içerisine girdikten sonra, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından metabolik olarak aktif formazan kristallerine indirgenir. Bu reaksiyonun sonucunda, suda çözünmeyen mor-mavi renkli formazan kristalleri oluşur [183, 185] (Şekil 16).



Şekil 16. Formazan kristallerinin oluşum reaksiyonu.

MTT testinin temel prensibi, canlı hücrelerdeki mitokondriyal enzim aktivitesine dayanmaktadır. Bu testte, proliferasyona uğrayan hücrelerin artan mitokondriyal aktivitesi, MTT'nin formazana indirgenme oranını doğrudan etkiler. Bu süreçte oluşan formazan kristalleri, izopropil alkol veya dimetilsülfoksit (DMSO) gibi organik çözücülerde çözünür ve elde edilen çözeltinin optik yoğunluğu, 540 nm veya 720 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçülür [186]. Kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilir ve uygulanan test bileşiklerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi yüzdesel olarak hesaplanır [187] (Şekil 17).



Şekil 17. MTT testinin uygulanışı.

MTT testi, hücresel canlılığı yüksek verimlilikle belirlemek amacıyla geliştirilmiş olup, karmaşık hücre sayımlarına gerek kalmadan sitotoksite değerlendirilmesini sağlar. Bu nedenle, özellikle farklı konsantrasyonlardaki ilaçların hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin kantitatif olarak belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Testin prensibi, hücre sayısındaki artış veya azalmanın

mitokondriyal aktivite ile doğru orantılı olmasıdır. Dolayısıyla, hücre sayısındaki azalma veya artış, oluşan formazan kristallerinin yoğunluğuna bağlı olarak spektrofotometrik olarak ölçülmektedir [184, 186].

2.5.2. In vitro yara modelleri

İn vitro yara modelleri, hücresel migrasyon ve proliferasyon süreçlerinin analiz edilmesinde yaygın olarak kullanılmakta olup, tek katmanlı hücre kültürü, ko-kültürlü hücre kültürü ve deri eksplantları olmak üzere üç ana kategoriye ayrılmaktadır [188]. Bu modeller arasında en yaygın tercih edilen yöntem olan tek katmanlı hücre kültürü, düşük maliyeti, hızlı sonuç alınabilmesi ve uygulama kolaylığı ile öne çıkar. Bu modelde, hücreler cam veya plastik yüzeylerde monolayer olarak büyütülür ve belirli bir yoğunluğa ulaştıklarında yarananma işlemi uygulanır.

Tek katmanlı hücre kültüründe uygulanan en yaygın yöntemlerden biri çizik testi (*Scratch Assay*) olup, hücre tabakasında steril bir pipet ucu veya benzer bir malzeme ile yapay bir yara oluşturulması esasına dayanır. Bu yapay yara oluşturulduktan sonra hücrelerin bu boşluğu kapatma süreci izlenir ve hücresel migrasyon ile proliferasyon oranları değerlendirilir [189]. Bu yöntem, hücrelerin iyileşme sürecindeki davranışlarının kantitatif olarak ölçülmesine olanak tanır.

Çizik testi, özellikle fibroblastlar, keratinositler ve endotel hücreleri gibi hücre tiplerinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu hücrelerin migrasyon hızı, kolajen sentezi ve kontraksiyon yeteneği gibi parametreler, yara iyileşme süreçlerinin değerlendirilmesinde kritik göstergeler olarak kabul edilmektedir [190]. Hücrelerin çizik alanını kapatma süresi, hücresel proliferasyon ve migrasyon kapasitelerinin belirlenmesinde temel bir ölçüt olarak kullanılır. Çizik testi ayrıca kanser araştırmalarında hücresel göç ve metastaz süreçlerinin değerlendirilmesinde de etkin bir yöntem olarak öne çıkmaktadır [191].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışma için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul’undan etik kurul onayı alındı (Tarih: 06.12.2023, dosya numarası: 2023/347). Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 20231206 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Bitkisel materyaller Bezmialem Fitoterapi Eğitim, Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (FİTOMER) hazırlandı. İnsan dermal fibroblast hücre hattı CCD-986Sk (ATCC® CRL-1947™) üzerindeki deneyler Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkez’inde yapıldı.

3.1. Deney Tasarımı ve Gruplar

Bu çalışma, bitkisel ekstrakter ve uçucu yağ emülsiyonlarının insan dermal fibroblast hücrelerinde sitotoksikite ve yara iyileşmesi üzerine etkilerini in vitro ortamda değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır. Deney, toplam dokuz deney grupta yürütülmüştür. Gruplar; kontrol, bitkisel ekstrakter ve uçucu yağ emülsiyonları şeklinde aşağıdaki gibi tanımlanmıştır (Şekil 18):

3.1.1. Kontrol grubu:

Hiçbir bitkisel ürün uygulanmamış, yalnızca standart hücre kültür ortamı eklenmiştir. Hücre canlılığı ve yara kapanması için referans değerler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

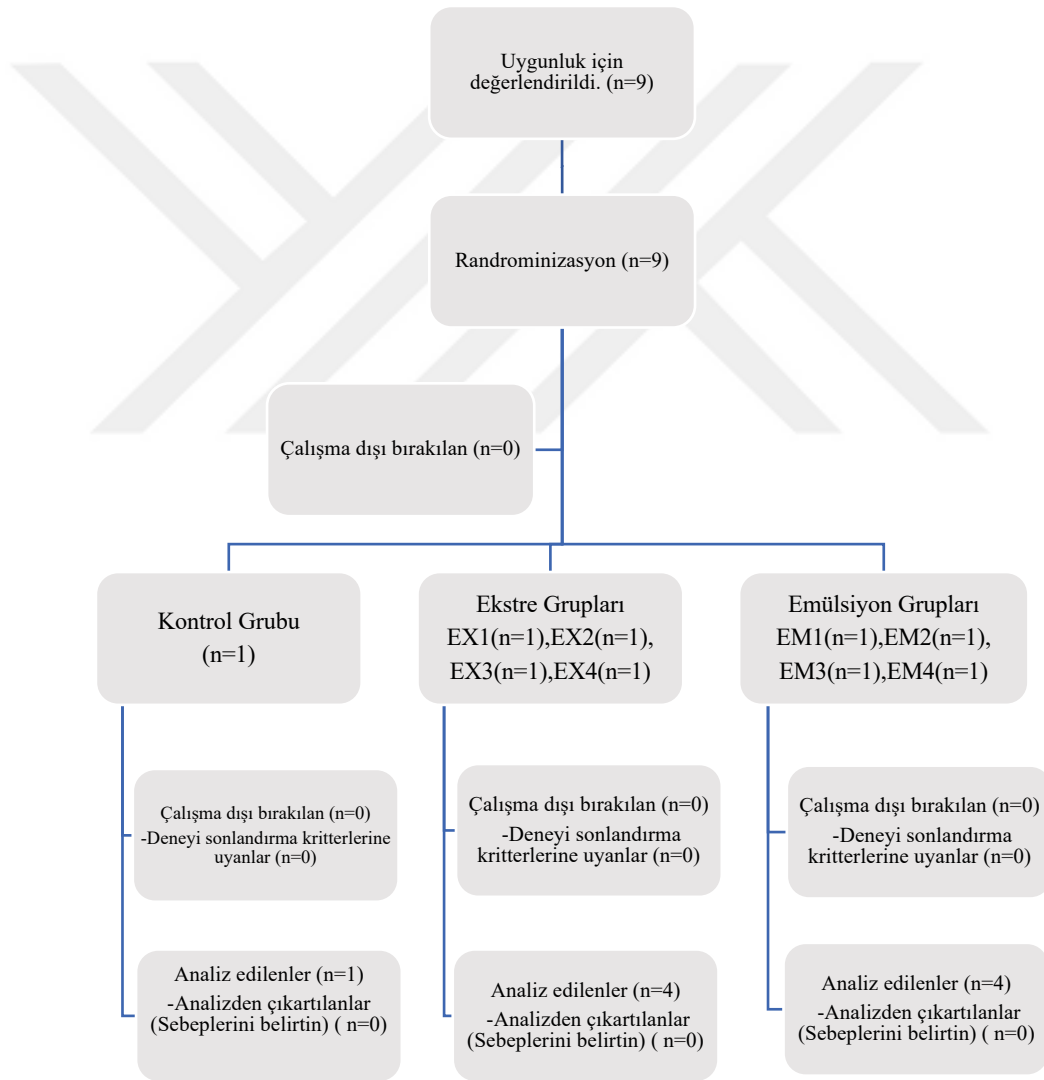
3.1.2. Bitkisel ekstre grupları:

- **EX1 Grubu:** *Plantago major* L. ekstresi uygulanan grup.
- **EX2 Grubu:** *Calendula officinalis* L. ekstresi uygulanan grup.
- **EX3 Grubu:** *Hypericum perforatum* L. ekstresi uygulanan grup.
- **EX4 Grubu:** *Matricaria recutita* L. ekstresi uygulanan grup.

3.1.3. Uçucu yağ emülsiyonu grupları:

- **EM1 Grubu:** *Helichrysum italicum* uçucu yağ emülsiyonu uygulanan grup.
- **EM2 Grubu:** *Laurus nobilis* uçucu yağ emülsiyonu uygulanan grup.
- **EM3 Grubu:** *Salvia officinalis* uçucu yağ emülsiyonu uygulanan grup.
- **EM4 Grubu:** *Origanum onites* uçucu yağ emülsiyonu uygulanan grup.

Her grup için sitotoksisite testleri (MTT) farklı konsantrasyonlarda (100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 ve 0 µg/mL) gerçekleştirilmiş; çizik testi deneyleri ise seçilen uygun konsantrasyonlarda yürütülmüştür.



Şekil 18. Deney grupları ve randomizasyon (n=grup sayısı).

Her uygulama grubu üç bağımsız kuyucukta yürütülmüştür. Çizik testi ölçümleri her kuyucukta üç farklı bölgeden alınmış, elde edilen değerlerin ortalamaları analiz edilmiştir. İşlem sırası randomizasyonla belirlenerek uygulama zamanına bağlı olası varyasyonlar azaltılmıştır. Böylece her grup için toplam dokuz ölçüm yapılmış ve istatistiksel değerlendirmeler bu ölçümlerin ortalama sonuçları esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Çalışma Akışı

Bu çalışmada, bitkisel ekstraler ve uçucu yağ emülsiyonlarının insan dermal fibroblast hücrelerinde sitotoksosite ve yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla çok aşamalı bir deneysel tasarım uygulanmıştır. Deney akış şeması Tablo 1’de gösterilmiştir. İlk olarak, dört farklı bitkisel ekstre (*Plantago major* L., *Calendula officinalis* L., *Hypericum perforatum* L. ve *Matricaria recutita* L.) ve dört farklı uçucu yağ (*Laurus nobilis* L., *Salvia officinalis* L., *Origanum onites* L. ve *Helichrysum italicum* L.) kontrollü koşullarda hazırlanmış, emülsiyon formülasyonları stabilize edilerek standart konsantrasyonlarda seyreltilmiştir. Hücre kültürü deneylerinde CCD-986Sk insan dermal fibroblast hücre hattı kullanılmış, hücreler %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM besiyerinde çoğaltılmıştır. Sitotoksosite değerlendirmesi için 96 kuyucuklu plaklara hücreler ekilmiş ve test maddeleri artan dozlarda (100, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 0 µg/mL) uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sitotoksosite sonuçlarına dayanarak, yara iyileşmesi (scratch) deneyinde kullanılacak uygun konsantrasyonlar seçilmiştir. Scratch deneyinde %70–80 konfluens sağlanan hücre tabakalarına steril pipet ucu ile çizik oluşturulmuş, taze besiyeri ve test maddeleri eklenmiştir. Tüm gruplar 3’er kuyucuk şeklinde tekrarlanmış, her kuyucuktan üç ayrı bölgeden mikroskopik görüntüler alınarak toplam 9 ölçüm gerçekleştirilmiştir. Yara kapanma oranları 0., 24. ve 48. saatlerde faz kontrast mikroskobu ile kaydedilmiş ve ImageJ yazılımı kullanılarak kantitatif ölçümler yapılmıştır.

Tablo 1. Deney akış şeması.

Bitkisel ürün hazırlama
Bitki materyallerinin temini Ekstraksiyon (etanol ile) Uçucu yağ emülsiyonu hazırlanması Kimyasal analizler (HPLC, UV-Vis, GC-FID/MS)
Hücre kültürü
CCD-986Sk fibroblast hücre hattı 37°C , %5 CO ₂ ve %95 nem %70–80 konfluens sağlanması
MTT Sitotoksosite Testi
8 konsantrasyonda (100–0 µg/mL) uygulama Her konsantrasyon için 3 kuyucuk tekrarı 24 saat inkübasyon MTT çözeltisi, 3 saat inkübasyon Mikroplaka okuyucu ile formazan ölçümü Hücre canlılığı yüzdesi hesaplama
Yara Çizik (Scratch) Testi
Çizik oluşturma 0. saat fotoğraf çekimi (her kuyucuktan 3 alan) 3 kuyucuk × 3 ölçüm = 9 veri/grup Ajan uygulama
İnkübasyon
24 ve 48 saat inkübasyon 24. ve 48.saat fotoğraf çekimi (her kuyucuktan 3 alan) 3 kuyucuk × 3 ölçüm = 9 veri/grup
Veri Toplama
Yara uzunluğu ölçümü (ImageJ) Ortalama değer hesaplama

3.3. Bitki Ekstreleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

3.3.1. Bitkisel materyaller

Papatya (*Matricaria recutita* L.) çiçekleri, sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.) toprak üstü kısmı, aynısefa (*Calendula*

officinalis L.) çiçekleri ve plantago (*Plantago major* L.) yaprakları Fitovizyon Doğal ve Sağlıklı Yaşam San. Tic. Ltd. Şti.'den satın alınarak temin edilmiştir.

3.3.2. Bitki ekstralarının hazırlanması

Papatya (*Matricaria recutita* L.) çiçekleri, sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.) topraküstü kısmı, aynısefa (*Calendula officinalis* L.) çiçekleri ve sinirotu (*Plantago major* L.) yaprakları öğütülmüştür. Her bir öğütülmüş drog kısmının 100 gramı 1 L %50 etanol ile 60 rpm/dk'da manyetik karıştırıcı (LABTron EVO HS1-M3, Kore) kullanılarak 50 °C sıcaklıkta 3 saat boyunca karıştırılarak ekstre edilmiştir. Oluşan ekstralar filtre kağıdıyla süzölmüştür. Ekstrelerin çözücöleri döner buharlaştırıcı (Heidolph Rotary Evaporator, Almanya) ile 50°C'yi geçmeyen sıcaklıkta kuruluğa kadar uzaklaştırılmıştır.

3.3.3. Papatya (*Matricaria recutita* L.) ekstrelerinin apigenin-7-glukozit miktar tayini

Hazırlanan papatya çiçek ekstreindeki apigenin-7-glukozit miktar tayini analizleri Çiçek ve ark.'ın yayınlamış olduğu metot kullanılarak PDA (Photodiode Array) dedektörlü HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) cihazıyla (Shimadzu LC 5020) yapılmıştır. Kolon olarak GL Sciences Inc. InertSustain C-18, Serial No:22E0328078 (5 µm, 250x4.6 mm) kullanılmıştır. Mobil faz olarak %0.5 fosforik asit ile asitlendirilmiş saf su (mobil faz A) ve yine %0.5 fosforik asit içeren asetonitril (mobil faz B) kullanılmıştır. Ayrılma işlemi, gradyan elüsyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizin başlangıcında (0-9. dakika) mobil fazın %25'i mobil faz B'den oluşmaktaydı. 9 ile 19. dakikalar arasında mobil faz B'nin konsantrasyonu doğrusal olarak %25'ten %75'e çıkarılmıştır. Bu oran, 19-24. dakikalar arasında izokratik olarak sabit tutulmuştur. Ardından, 24 ile 25. dakikalar arasında mobil fazB oranı yeniden %75'ten %25'e düşürölerek başlangıç koşullarına dönmüştür. Analizin kalan süresinde (25-50. dakika) bu başlangıç kompozisyonu korunarak çalışma tamamlanmıştır. Kolon 40 °C sıcaklıkta sabit tutulmuştur ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Farklı konsantrasyonlarda standart apigenin-7-glukozit çözeltileri (0,038; 0,190; 0,380; 0,722 mg/mL) cihaza enjekte edilmiştir. 340 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramlarda, apigenin-7-glukozit standartlarına ait alan

değerleri kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve bu eğrinin denklemi ile ekstrelerdeki apigenin-7-glukozit miktarları hesaplanmıştır [192].

3.3.4. Sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.) toprak üstü ekstresinin hiperisin miktar tayini

Hazırlanan sarı kantaron toprak üstü ekstresindeki hiperisin miktarı bir dizi hiperisin konsantrasyonu hazırlanarak ve kalibrasyon eğrisi çizilerek tayin edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için 0,005; 0,01; 0,02 ve 0,03 mg/mL konsantrasyonlarında hiperisin çözeltileri hazırlanmıştır. *H. perforatum* ekstresinin test çözeltilerinin hazırlanması için 30 mg ekstre 5 mL metanolde ultrasonik banyo yardımıyla çözülüp bir balon jodede metanol ile 10 mL'lik hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan tüm örnekler şırıngalı filtre ile (0,45 µm) süzülüş ve 590nm dalga boyunda kör (metanol) ile karşılaştırılarak UV-VIS spektrofotometre cihazı ile (UV-Vis Agilent Technologies Cary 60) absorbansları ölçülmüştür. Toplam hiperisin madde miktarı, hiperisin kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile hiperisin cinsinden hesaplanmıştır. 3 tekrarlı çalışılmıştır [193].

3.3.5. Aynısefa (*Calendula officinalis* L.) çiçek ekstresinin toplam karotenoid miktar tayini

Hazırlanan aynı sefa çiçek ekstresindeki karotenoid miktarı bir dizi β -karoten konsantrasyonu hazırlanarak ve kalibrasyon eğrisi çizilerek tayin edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için 0,006; 0,012; 0,025; 0,050 ve 0,075 mg/mL konsantrasyonlarında β -karoten çözeltileri hazırlanmıştır. *C. officinalis* çiçek ekstresinin test çözeltilerinin hazırlanması için 30 mg ekstre 5 mL hekzanda ultrasonik banyo yardımıyla çözülüp bir balon jodede hekzan ile 10 mL'lik hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan tüm örnekler şırıngalı filtre ile (0,45 µm) süzülüş ve 450 nm dalga boyunda kör (hekzan) ile karşılaştırılarak UV-VIS spektrofotometre cihazı ile (UV-Vis Agilent Technologies Cary 60) absorbansları ölçülmüştür. Toplam karotenoidmadde miktarı, β -karoten kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile β -karoten cinsinden hesaplanmıştır. 3 tekrarlı çalışılmıştır [194].

3.3.6. Aynısefa (*Calendula officinalis* L.) çiçek ekstresinin ve Sinirotu (*Plantago major* L.) yaprak ekstresinin total fenolik madde miktar tayini yöntemi

Aynısefa (*Calendula officinalis* L.) çiçek ve sinirotu (*Plantago major* L.) yaprak ekstrelerinin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenmiştir [195]. Hazırlanan aynı sefa çiçek ve sinirotu yaprak ekstrelerindeki total fenolik madde miktarı bir dizi gallik asit konsantrasyonu hazırlanarak ve kalibrasyon eğrisi çizilerek tayin edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için 0,042; 0,067; 0,089; 0,136; 0,181; 0,228; 0,272 ve 0,627 µg/mL konsantrasyonlarında gallik asit çözeltileri hazırlanmıştır. Test çözeltileri 104 µL distile su, 8 µL numune, 8 µL FCR ve 80 µL %7 Na₂CO₃ ile hazırlanmıştır. Test çözeltileri 90 dakika boyunca karanlıkta tutulduktan sonra 765 nm dalga boyunda absorbanları UV-Vis mikrolaka spektrofotometre cihazı (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, ABD) ile tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı, gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verilmiştir. 3 tekrarlı çalışılmıştır.

3.3.7. Aynısefa (*Calendula officinalis* L.) çiçek ekstresinin ve Sinirotu (*Plantago major* L.) yaprak ekstresinin total flavonoit madde miktar tayini yöntemi

Aynısefa (*Calendula officinalis* L.) çiçek ve sinirotu (*Plantago major* L.) yaprak ekstrelerinin toplam flavonoit içerikleri alüminyum klorür kolorimetrik yöntemiyle hesaplanmıştır [196]. Hazırlanan aynı sefa çiçek ve sinirotu yaprak ekstrelerindeki total flavonoit miktarı bir dizi kersetin konsantrasyonu hazırlanarak ve kalibrasyon eğrisi çizilerek tayin edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için 0,051; 0,081; 0,122; 0,190; 0,258; 0,335; 0,404; 0,834 ve 1,522 µg/mL konsantrasyonlarında kersetin çözeltileri hazırlanmıştır. Test çözeltileri 134 µL damıtılmış su, 20 µL numune, 6 µL %10 AlCl₃ ve 40 µL CH₃COONH₄ ile hazırlanmıştır. Test çözeltileri karanlıkta 10 dakika bekletildikten sonra 415 nm dalga boyunda absorbanları UV-Vis mikrolaka spektrofotometre cihazı (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, ABD) ile tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı, kersetin kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile kersetin eşdeğeri (KE) olarak verilmiştir. 3 tekrarlı çalışılmıştır.

3.4. Uçucu Yağlar Üzerine Yapılan Çalışmalar

3.4.1. Uçucu yağlar

Defne (*Laurus nobilis* L.) yaprak, adaçayı (*Salvia officinalis* L.) yaprak, İzmir kekiği (*Origanum onites* L.) toprak üstü kısmı ve ölmez çiçek (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) toprak üstü kısmı uçucu yağları FitoBio markalı (Fitovizyon Doğal ve Sağlıklı Yaşam San. Tic. Ltd. Şti.) olarak kullanılmıştır.

3.4.2. GC-FID/MS ile uçucu yağ bileşenlerinin analizi

Uçucu yağların bileşim analizi, gaz kromatografi ve kütle spektrometrisi (GC-FID/MS) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, Agilent 7890B gaz kromatografisi ve Agilent 5977E kütle dedektöründen oluşan sistem (Santa Clara, CA, ABD), çift yönlü kapiler ayırıcıya bağlı olarak kullanılmıştır. Numunelerin enjeksiyonu, Agilent G4513A otomatik enjektör ile sağlanmış ve her bir analizde 1 µL hacminde örnek enjekte edilmiştir. Ayrım işlemi için kullanılan kolon, 60 m uzunluğunda, 0,25 mm iç çapında ve 0,25 µm film kalınlığına sahip DB-WAX kolonudur. Sıcaklık programı şu şekilde uygulanmıştır: Başlangıç sıcaklığı 70 °C’de 15 dakika tutulmuş, ardından sıcaklık 2 °C/dk hızla 180 °C’ye yükseltilmiş ve bu sıcaklıkta 5 dakika sabitlenmiştir. Devamında, sıcaklık 5 °C/dk hızla 230 °C’ye çıkarılmış ve burada 15 dakika izotermal olarak tutulmuştur. Bu sıcaklık programıyla toplam analiz süresi 100 dakikayı bulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak sabit 1,5 mL/dk akış hızında helyum kullanılmıştır. Split oranı 1:50 olarak belirlenmiştir. Enjektör portu, kuadropol, transfer hattı, iyon kaynağı ve FID dedektör sıcaklıkları sırasıyla 220 °C, 150 °C, 250 °C, 230 °C ve 220 °C olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrumları 70 eV iyonizasyon enerjisi ile elde edilmiş ve tarama aralığı 45–450 m/z olarak belirlenmiştir. FID dedektöründe hidrojen akışı 30 mL/dk, hava akışı ise 400 mL/dk olarak ayarlanmıştır.

Uçucu yağ bileşenlerinin tanımlanmasında, Wiley Mass Spectral Data Registry (9. baskı, 2011) ve NIST 23 (2023) Mass Spectral Library (NIST23/2023/EPA/NIH) veri tabanları referans olarak kullanılmıştır. Kimyasal tanımlamalar, DB-WAX kolonu üzerindeki bileşiklerin relatif alıkonma indisleri (RRI) esas alınarak yapılmıştır. RRI değerleri, C7–C40 arasında değişen düz zincirli n-alkan standartları aracılığıyla hesaplanmıştır. Aynı analiz koşulları altında üç teknik tekrarla oto-enjeksiyon

gerçekleştirilmiştir. Nicel değerlendirmede, FID dedektörü ile elde edilen sinyaller ve temsili bileşiklere ait kalibrasyon eğrileri kullanılarak relatif yüzde değerler belirlenmiştir. Sonuçların yorumlanmasında literatürde yer alan veriler ve NIST çevrimiçi kütüphanesi dikkate alınmıştır [197].

3.4.3. Emülsiyonların hazırlanması

Emülsiyonlar A, B, C olmak üzere 3 fazda hazırlanmaktadır:

Faz A:

- 73 ml su
- 6 gram Kolliphor RH 40

Faz B:

- 5 ml uçucu yağı

Faz C:

- 20 mg ksantan zımkı
- 16 ml su

A fazı 1 saat karıştırılmıştır. Ardından B fazı, A fazına damla damla eklenmiştir. Bu karışıma en son C fazı ilave edilmiştir. 1 saat karıştırılmıştır. Defne (*Laurus nobilis* L.) yaprak, adaçayı (*Salvia officinalis* L.) yaprak, İzmir kekiğı (*Origanum onites* L.) toprak üstü ve ölmez çiçek (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) toprak üstü kısmı uçucu yağları için bu metot ile emülsiyonlar hazırlanmıştır.

3.5. Hücre Kültürü

Bu çalışmada, insan dermal fibroblast hücre hattı olan CCD-986Sk (ATCC® CRL-1947™) kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal bovin serumu (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), %1 penicillin-streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, USA) içerisinde kültüre edilmiştir. Hücreler, 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve %95 nem içeren hücre kültürü etüvünde inkübe edilmiştir. Hücreler T25 kültür flasklarında (Corning®, USA) büyütölmüş ve %80–90 konfluens sağlandığında %0.25 tripsin-EDTA (Gibco, USA) ile tripsinize edilerek 96 kuyucuklu hücre flaskına pasajlanmıştır.

3.5.1. Bitkisel formülasyonlar

Deneysel uygulamalar için 4 farklı bitkisel içerikli uçucu yağ emülsiyonu ve 4 farklı bitkisel ekstre kullanılmıştır (Şekil 19). Emülsiyonlar laboratuvar ortamında formüle edilmiş, ekstraler ise bitkisel materyalin çözücülü ekstraksiyonu sonrası steril filtrelenerek hazırlanmıştır. Tüm formülasyonlar uygulama öncesi DMEM ile uygun konsantrasyonlara seyreltilmiştir [198]. Emülsiyonlar DMEM ile 1/100 oranında dilue edilerek 100-80-60-40-20-10-5-0 μ L konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Ekstreler viskoz ve daha yoğun bir akışkanlığa sahip olduğu için pipetle ölçüm alınamamıştır. Ekstrelerin dilüsyon işlemi hassas terazi yardımıyla 10 mg tartılarak DMEM içerisinde 1/100 olacak oranda hazırlanmıştır. Aynı şekilde 100-80-60-40-20-10-5 ve 0 μ L konsantrasyon serisi yapılmıştır. Tüm ajanlar DMEM içerisinde 24 saat etüv ortamında inkübe edilmiştir. Emülsiyon ve ekstraler için öncelikle ICD 50 tayini yapılarak hücre canlılığı ve konsantrasyon taraması yapılmıştır.



Şekil 19. Hazırlanan ekstraler ve uçucu yağ emülsiyonları.

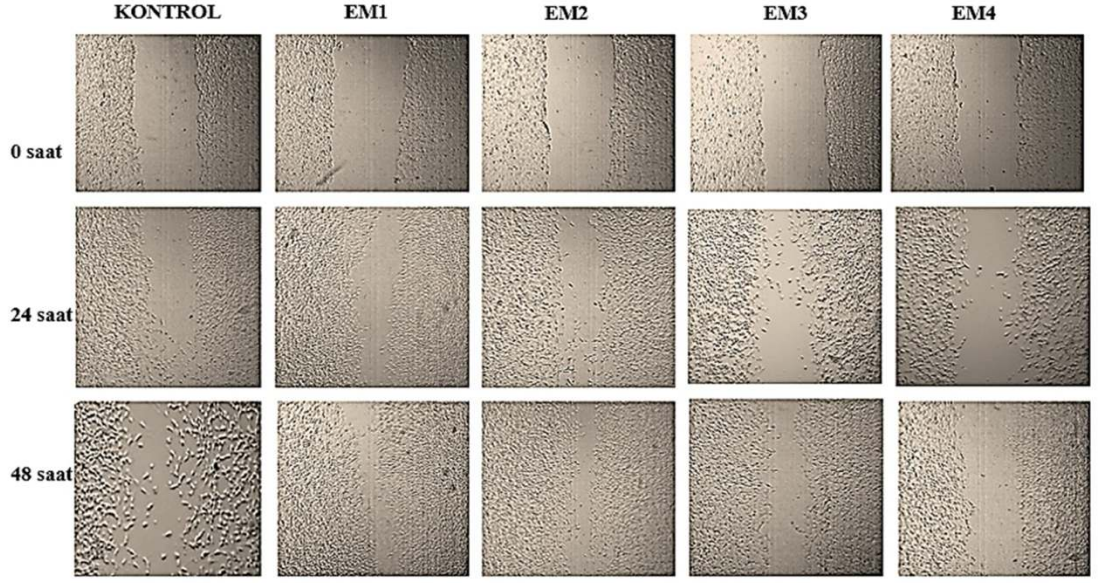
3.5.2. Sitotoksite deneyi (IC₅₀ tayini)

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla sitotoksite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. CCD-986sk hücreleri, 96 kuyucuklu plaklara (Corning®, USA) 1×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekilmiş ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından her kuyucuğa test edilecek bitkisel içerikler belirlenmiş olan konsantrasyonlarda uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından MTT (Sigma-Aldrich, USA) çözeltisi (5 mg/mL) her kuyucuğa 20 μ L eklenmiş ve yaklaşık 3 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda DMEM ve MTT içeren ortam uzaklaştırılmış, oluşan

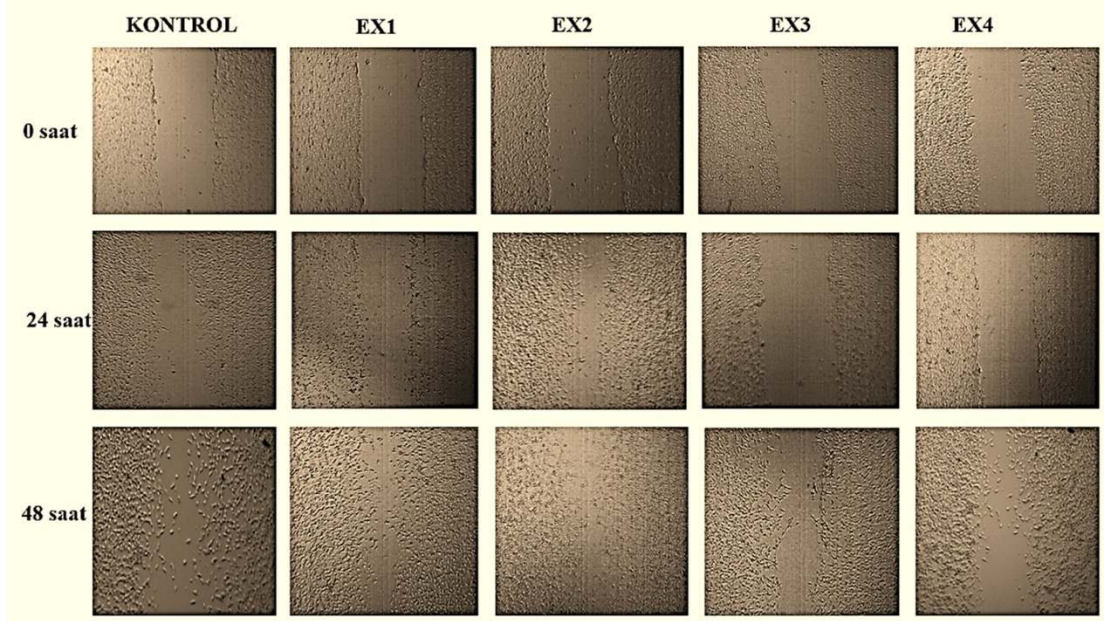
3.5.3. Yara iyileşme (Scratch) deneyi

A black 96-well microplate rack is shown, containing several small vials with colored liquids (pink, blue, orange) and two clear plastic trays with handwritten labels "Do Hiral 15/01/25" and "CED-9806 15/1/25".

58



Şekil 21. Uçucu yağ emülsiyonlarına ait yara çizik deneyi.



Şekil 22. Ekstrelelere ait yara çizik deneyi.

3.6. Deneyi Sonlandırma Kriterleri

Hücre kültürlerinde kontaminasyon (mikrobiyal veya fungal üreme), hücre canlılığının %20'nin altına düşmesi, çizik testi sırasında hücre tabakasının bütünlüğünü bozacak derecede mekanik hasar oluşması, cihaz arızası veya ölçüm

hatası tespit edilmesi deney sonlandırma kriterleri olarak belirlendi. Deneyde hiçbir basamakta belirtilen bulgulara rastlanılmadığından sonlandırma yapılmadı.

3.7. Verilerin Kayıtları

Hücre canlılığına ilişkin MTT testi absorbans değerleri, mikropilaka okuyucu cihazdan elektronik ortamda alınmış ve Excel formatında kaydedilmiştir. Yara kapanma uzunluğu ölçümleri, mikroskop görüntülerinin ImageJ yazılımıyla analizi sonucu elde edilmiş ve ölçüm tablolarında belgelenmiştir. Her grup için 0., 24. ve 48. saatlerde kaydedilen görüntüler ayrı klasörlerde tarih ve grup kodu belirtilerek arşivlenmiştir.

3.8. Primer ve Sekonder Çıktılar

Bu çalışmanın primer çıktısı, çizik yara modeli kullanılarak gerçekleştirilen in vitro yara iyileşme deneylerinde 0., 24. ve 48. saatlerde ölçülen ortalama yara kapanma uzunluklarının (μm) belirlenmesidir. Sekonder çıktılar ise MTT sitotoksosite testi sonuçlarına göre hesaplanan hücre canlılığı oranları (%), bitkisel ekstraktlar ve uçucu yağ emülsiyonlarının farklı konsantrasyonlarda gösterdiği doz-yanıt profilleri, konsantrasyona bağlı hücre proliferasyonu eğilimleri ve biyoyumrluluk düzeylerinin değerlendirilmesinden oluşmaktadır.

3.9. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS Statistics (versiyon 29) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) uygulanmıştır. Gruplar arası farkın belirlenmesinin ardından, anlamlı farklılık gösteren gruplar arasında detaylı karşılaştırmalar yapmak amacıyla Tukey HSD ve/veya LSD post-hoc testleri kullanılmıştır.

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (Ort $\pm$ SS) şeklinde ifade edilmiştir. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

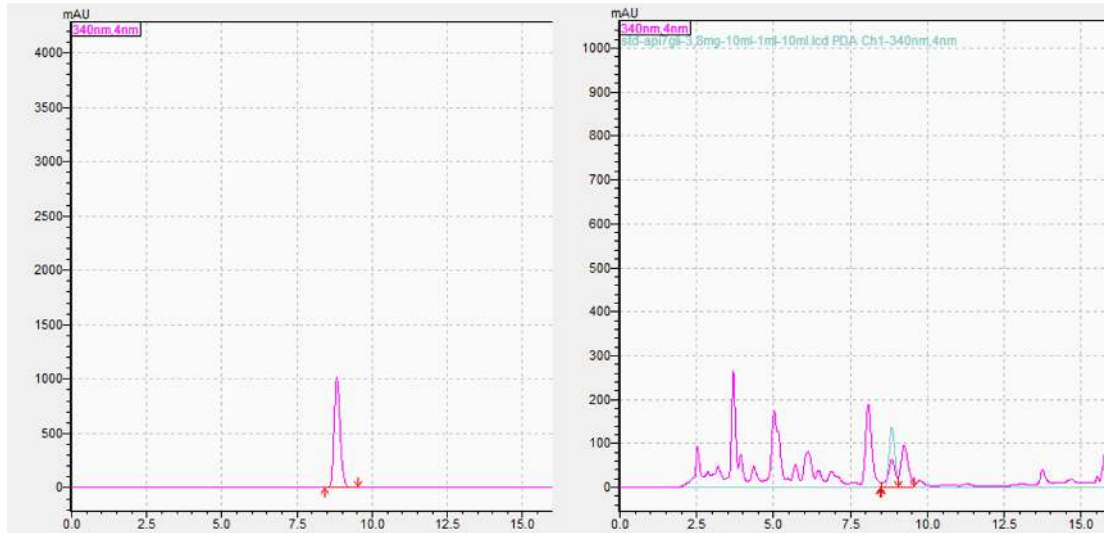
4.1. Bitki Ekstreleri ile İlgili Bulgular

4.1.1. Ekstrelerin verimleri

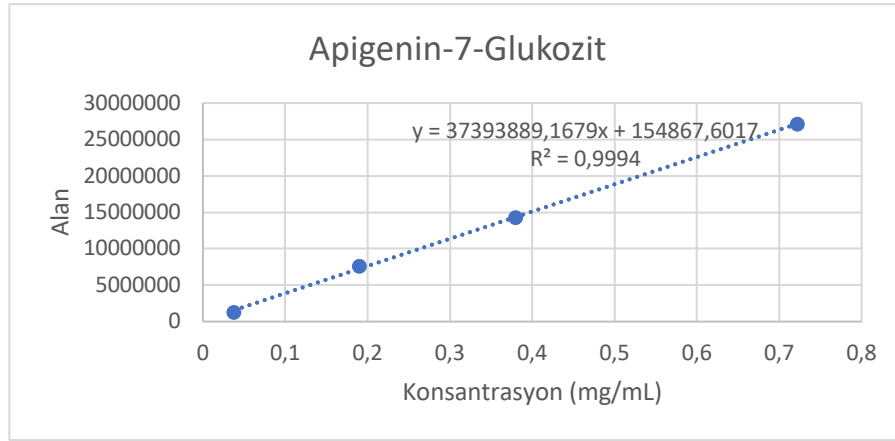
100 gram bitkiden elde edilen kuru ekstre miktarlarına göre papatya (*Matricaria recutita* L.) ekstresinin verimi %15,573; sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.) ekstresinin verimi %18,786; aynısefa (*Calendula officinalis* L.) ekstresinin verimi %39,623 ve plantago (*Plantago major* L.) ekstresinin verimi %23,217 olarak hesaplanmıştır.

4.1.2. Papatya (*Matricaria recutita* L.) çiçek ekstresinin apigenin-7-glukozit miktar tayini bulguları

Apigenin-7-glukozit standardının 340 nm'deki kromatogramı ve standart kromatogramının ekstre kromatogramı ile karşılaştırılmış hali Şekil 23'te verilmiştir. Madde miktar tayini için farklı konsantrasyonlarda saf apigenin-7-glukozit çözeltileri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi ise Şekil 24'te verilmiştir.



Şekil 23. (a) Standart apigenin-7-glukozit kromatogramı, (b) Papatya ekstresi kromatogramının standart madde kromatogramı ile karşılaştırılmış hali.



Şekil 24. Apigenin-7-glukoze HPLC/PDA ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Papatya çiçek ekstresinden 80 mg alınıp 10 mL başlangıç mobil fazında (%75 mobil faz A ve %25'i mobil faz B) çözündürülmesiyle elde edilen örnekler 0,45 µm filtrelerden süzülüp cihaza enjekte edilmiştir. Papatya çiçek ekstralarının ve ekstralardan hareketle bitkinin hesaplanan apigenin-7-glukoze (A7G) miktarları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Ekstrelerin ve drogun apigenin-7-glukoze miktarları.

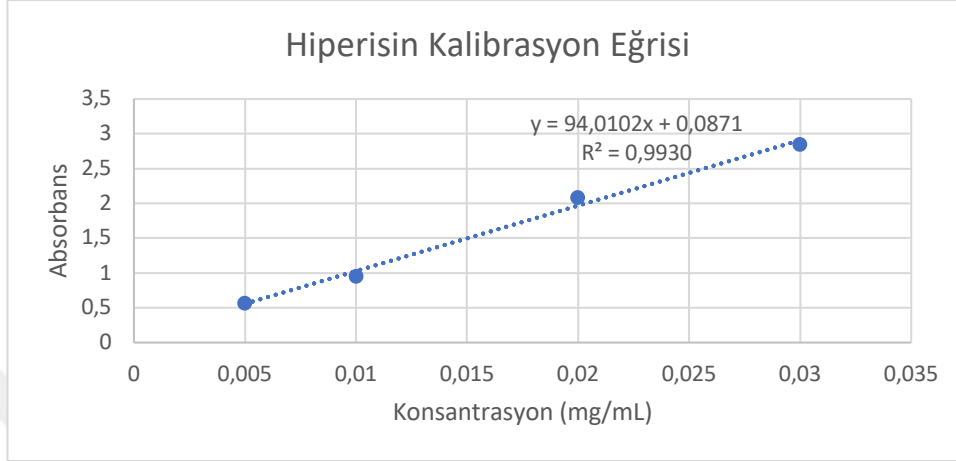
Ekstre	Alan	Ekstredeki A7G	Ekstredeki A7G (Ort. ± S.S.)	Drogdaki A7G (Ort. ± S.S.)
PE-1	5166850	1,675 mg/100 mg kuru ekstre		
PE-2	5137390	1,666 mg/100 mg kuru ekstre	1,674 ± 0,008 mg/100 mg kuru ekstre	260,728 ± 1,270 mg/100 g kuru bitki
PE-3	5185785	1,682 mg/100 mg kuru ekstre	(%1,674 ± 0,008)	(%0,261 ± 0,001)

PE: Papatya çiçek ekstresi, Ort.: Ortalama, S.S.: Standart sapma.

Türk Farmakopesi'ne göre papatya çiçeği kuru drogu (Matricariae flos) en az %0,250 apigenin-7-glukoze içermelidir [200]. Analiz sonucuna göre ekstre yapımında kullanılan bitki materyali %0,261± 0,001 oranında apigenin-7-glukoze içerdiğinden bu kriteri sağlamaktadır.

4.1.3. Sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.) toprak üstü kısmı ekstresinin hiperisin miktar tayini bulguları

Toplam hiperisin madde miktar tayini için hiperisin kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 25'te verilmiştir.



Şekil 25. Hiperisin'in UV-Vis spektrofotometre cihazı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Sarı kantaron toprak üstü kısmı ekstresinin ve ekstreden hareketle bitkinin hesaplanan toplam hiperisin miktarları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Ekstrelerin ve drogun toplam hiperisin miktarları.

Ekstre	Absorbans	Ekstredeki Toplam Hiperisinler	Ekstredeki Toplam Hiperisinler (Ort. ± S.S.)	Drogdaki Toplam Hiperisinler (Ort. ± S.S.)
SKE-1	1,6240	0,545 mg/100 mg kuru ekstre	0,545 ± 0,001	102,477 ± 0,093 mg/100 g kuru bitki
SKE-2	1,6264	0,546 mg/100 mg kuru ekstre	(%0,545 ± 0,001)	(%0,102 ± 0,001)
SKE-3	1,6260	0,546 mg/100 mg kuru ekstre		

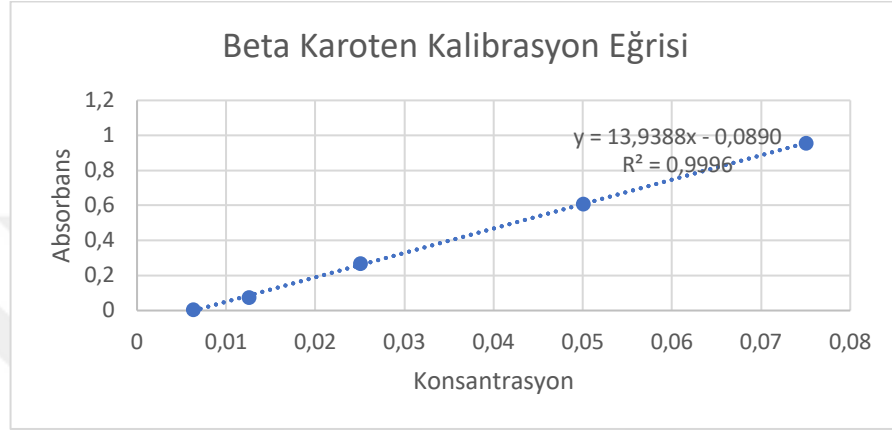
SKE: Sarı kantaron toprak üstü kısmı ekstresi, Ort.: Ortalama, S.S.: Standart sapma.

Türk Farmakopesi'ne göre sarı kantaron kuru drogu (Hyperici herba) hiperisin üzerinden hesaplanan toplam hiperisinleri en az %0,080 oranında içermelidir [201].

Analiz sonucuna göre ekstre yapımında kullanılan bitki materyali $0,102 \pm 0,001$ oranında toplam hiperisinleri içerdiğinden bu kriteri sağlamaktadır.

4.1.4. Aynısefa (*Calendula officinalis* L.) çiçek ekstresinin toplam karotenoid miktar tayini bulguları

Toplam karotenoid madde miktar tayini için β -karoten kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 26’da verilmiştir.



Şekil 26. β -karoten’in UV-Vis spektrofotometre cihazı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Aynısefa çiçek ekstrelerinin ve ekstrelerden hareketle drogda hesaplanan toplam karotenoid miktarları Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Ekstrelerin ve bitkinin toplam hiperisin miktarları.

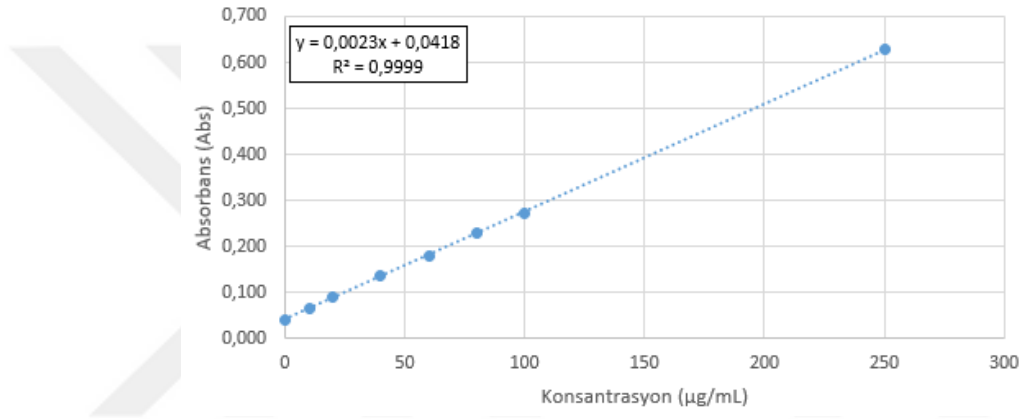
Ekstre	Absorbans	Ekstredeki Toplam Karotenoid	Ekstredeki Toplam Karotenoid (Ort. $\pm$ S.S.)	Drogdaki Toplam Karotenoid (Ort. $\pm$ S.S.)
AE-1	0,0488	0,330 mg/100 mg kuru ekstre	0,329 $\pm$ 0,001 mg/100 mg kuru ekstre (%0,329 $\pm$ 0,001)	130,509 $\pm$ 0,055 mg/100 g kuru bitki (%0,131 $\pm$ 0,001)
AE-2	0,0487	0,329 mg/100 mg kuru ekstre		
AE-3	0,0487	0,329 mg/100 mg kuru ekstre		

AE: Aynısefa çiçek ekstresi, Ort.: Ortalama, S.S.: Standart sapma.

Daha önce yayınlanmış farklı çalışmalar *Calendula officinalis* L. çiçeklerinin toplam karotenoid içeriğini %0,099 ile %3,510 arasında yer alan farklı değerler olarak rapor etmiştir [202-204]. Yapılan analiz sonucunda β -karoten cinsinden %0,131 $\pm$ 0,001 olarak belirlenen bitki materyalindeki toplam karotenoid miktarı, literatürdeki çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

4.1.5. Aynısefa (*Calendula officinalis* L.) çiçek ekstresinin ve Sinirotu (*Plantago major* L.) yaprak ekstresinin total fenolik madde miktar tayini bulguları

Toplam fenolik madde miktar tayini için gallik asit kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 27’de verilmiştir.



Şekil 27. Gallik asit'in UV-Vis mikrolakla spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Ekstrelerin spektrofotometrik yöntemle tayin edilen toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri olarak Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. Aynısefa çiçek ve sinirotu yaprak ekstralarının toplam fenolik madde miktarları.

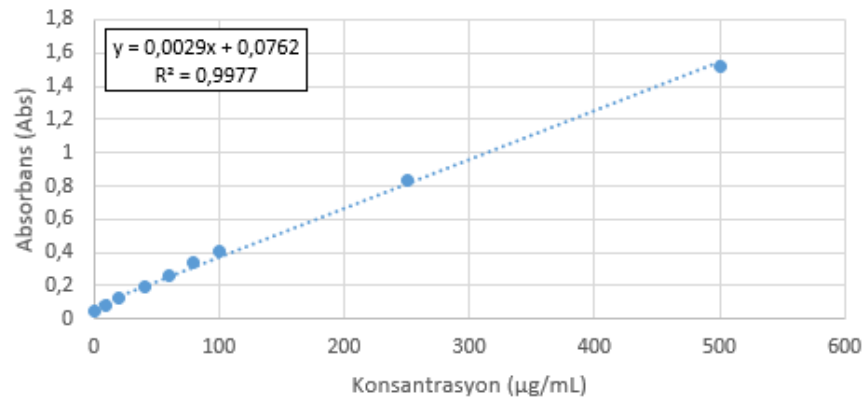
Ekstre	Ekstredeki % Fenolik Madde	Ekstredeki % Fenolik Madde (Ort. $\pm$ S.S.)	Drogdaki % Fenolik Madde (Ort. $\pm$ S.S.)
Aynısefa çiçek ekstresi-1	%3,791		
Aynısefa çiçek ekstresi-2	%3,617	%3,704 $\pm$ 0,087	%1,468 $\pm$ 0,034
Aynısefa çiçek ekstresi-3	%3,704		
Sinirotu yaprak ekstresi-1	%7,878		
Sinirotu yaprak ekstresi-2	%7,965	%7,893 $\pm$ 0,066	%1,832 $\pm$ 0,015
Sinirotu yaprak ekstresi-3	%7,835		

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart sapma.

Çalışmada kullanılan aynı sefa çiçeklerinin %1,468 $\pm$ 0,034, sinirotu yapraklarının %1,832 $\pm$ 0,015 total fenolik madde içerdiği tespit edilmiştir.

4.1.6. Aynısefa (*Calendula officinalis* L.) çiçek ekstresinin ve Sinirotu (*Plantago major* L.) yaprak ekstresinin total flavonoit madde miktar tayini bulguları

Toplam flavonoit madde miktar tayini için kersetin kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 28’de verilmiştir.



Şekil 28. Kersetin'in UV-Vis mikropilaka spektrofotometresi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Ekstrelerin spektrofotometrik yöntemle tayin edilen toplam flavonoit miktarları kersetin eşdeğeri olarak Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Aynısefa çiçek ve sinirotu yaprak ekstralarının toplam flavonoit madde miktarları.

Ekstre	Ekstredeki % Flavonoit	Ekstredeki % Flavonoit (Ort. $\pm$ S.S.)	Drogdaki % Flavonoit (Ort. $\pm$ S.S.)
Aynısefa çiçek ekstresi-1	%0,837		
Aynısefa çiçek ekstresi-2	%0,823	%0,827 $\pm$ 0,009	%0,328 $\pm$ 0,004
Aynısefa çiçek ekstresi-3	%0,820		
Sinirotu yaprak ekstresi-1	%1,948		
Sinirotu yaprak ekstresi-2	%1,961	%1,956 $\pm$ 0,007	%0,454 $\pm$ 0,002
Sinirotu yaprak ekstresi-3	%1,958		

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart sapma.

Çalışmada kullanılan aynı sefa çiçeklerinin %0,328 $\pm$ 0,004, sinirotu yapraklarının %0,454 $\pm$ 0,002 total flavonoit içerdiği tespit edilmiştir.

4.2. Uçucu Yağlar Üzerine Yapılan Çalışmaların Bulguları

4.2.1. GC-FID/MS ile uçucu yağ bileşen analizi bulguları

4.2.1.1. *Laurus nobilis* L. yaprak uçucu yağı bulguları

Tablo 7. *Laurus nobilis* L. yaprak uçucu yağının GC/MS ile belirlenen bileşimi.

No	Bileşik	KI	RAI	Rölatif %
1	<u>α-Pinene</u>	1018–1032	1023	5,6 $\pm$ 0,1
2	<u>Camphene</u>	1060–1076	1067	0,9 $\pm$ 0,1
3	<u>β-Pinene</u>	1102–1118	1110	4,0 $\pm$ 0,1
4	<u>Sabinene</u>	1115–1132	1119	3,0 $\pm$ 0,1
5	<u>Myrcene</u>	1155–1169	1155	0,4 $\pm$ 0,1
6	<u>α-Terpinene</u>	1170–1188	1175	0,7 $\pm$ 0,1
7	<u>Limonene</u>	1190–1204	1197	1,5 $\pm$ 0,1
8	1,8-Cineole	1203–1220	1212	50,3 $\pm$ 0,2
9	<u>γ-Terpinene</u>	1238–1255	1241	1,0 $\pm$ 0,1
10	<u>β-Ocimene</u>	1228–1246	1246	0,9 $\pm$ 0,1
11	<u>p-Cymene</u>	1264–1280	1266	0,5 $\pm$ 0,1
12	<u>Linalool</u>	1537–1553	1540	1,5 $\pm$ 0,1
13	<u>Bornyl acetate</u>	1570–1592	1571	0,7 $\pm$ 0,1
14	<u>Carvophyllene, (E)-</u>	1585–1612	1586	0,9 $\pm$ 0,1
15	Terpinen-4-ol	1592–1611	1594	4,2 $\pm$ 0,1
16	<u>α-Humulene</u>	1655–1682	1657	0,2 $\pm$ 0,1
17	<u>α-Terpinyl acetate</u>	1685–1709	1685	9,1 $\pm$ 0,1
18	<u>α-Terpineol</u>	1682–1706	1687	1,9 $\pm$ 0,1
19	<u>α-Bisabolene</u>	1702–1772	1760	0,4 $\pm$ 0,1
20	<u>Methyl eugenol</u>	1986–2029	1997	2,9 $\pm$ 0,1
21	<u>Eugenol</u>	2151–2185	2155	1,9 $\pm$ 0,1
Toplam tespit edilen				92,5
<u>Monoterpen hidrokarbonlar (1-7, 9-11)</u>				18,5
<u>Oksijenize monoterpenler (8, 12, 13, 15, 17, 18)</u>				67,7
<u>Seskiterpen hidrokarbonlar (14, 16, 19)</u>				1,5
<u>Fenilpropanoitler (20, 21)</u>				4,8

KI: Kovats İndisi. Genellikle her bileşik için alıkonma indisi veri aralıklarının %50 güven aralığı ile literatürden verilmiştir [1], RAI: Rölatif Alıkonma İndisi, n-alkan serisine göre % değerleri FID verilerinden hesaplanmıştır.

Laurus nobilis L. yaprak uçucu yağında toplam 21 bileşik belirlenmiştir. Uçucu yağın kimyasal bileşenlerinin %92,5'i başarıyla tespit edilmiştir. Oksijenize monoterpenler (%67,7), *L. nobilis* uçucu yağının baskın kimyasal bileşik grubu olarak analiz edilmiştir. *L. nobilis* uçucu yağının başlıca majör bileşenleri 1,8-cineole (%50,3 $\pm$ 0,1), α -terpinyl acetate (%9,1 $\pm$ 0,1), α -pinene (%5,6 $\pm$ 0,1) ve terpinen-4-ol (%4,2 $\pm$ 0,1) olarak belirlenmiştir (Tablo 7).

4.2.1.2. *Salvia officinalis* L. yaprak uçucu yağı bulguları

Tablo 8. *Salvia officinalis* L. yaprak uçucu yağının GC/MS ile belirlenen bileşimi.

No	Bileşik	KI	RAI	Rölatif %
1	<u>α-Pinene</u>	1018–1032	1024	4,4±0,1
2	<u>Camphene</u>	1060–1076	1068	2,3±0,1
3	<u>β-Pinene</u>	1102–1118	1111	2,5±0,1
4	<u>Sabinene</u>	1115–1132	1119	0,2±0,1
5	<u>Myrcene</u>	1155–1169	1156	1,2±0,1
6	<u>α-Terpinene</u>	1170–1188	1176	0,5±0,1
7	<u>Limonene</u>	1190–1204	1197	1,7±0,1
8	1,8-Cineole	1203–1220	1211	12,6±0,1
9	<u>γ-Terpinene</u>	1238–1255	1242	1,0±0,1
10	<u>p-Cymene</u>	1264–1280	1266	1,4±0,1
11	<u>Terpinolene</u>	1277–1290	1279	0,3±0,1
12	<u>cis-Thujone</u>	1417–1434	1418	23,3±0,1
13	<u>trans-Thujone</u>	1436–1451	1437	5,1±0,1
14	1-Octen-3-ol	1437–1454	1446	0,2±0,1
15	<u>Camphor</u>	1507–1532	1508	13,5±0,1
16	<u>Linalool</u>	1537–1553	1540	0,4±0,1
17	<u>Bornyl acetate</u>	1570–1592	1572	1,3±0,1
18	<u>Caryophyllene, (E)-</u>	1585–1612	1589	15,1±0,1
19	<u>α-Humulene</u>	1655–1682	1658	4,2±0,1
20	<u>Borneol</u>	1690–1719	1692	0,9±0,1
Toplam tespit edilen				92,1
<u>Monoterpen hidrokarbonlar (1-7, 9-11)</u>				15,5
<u>Oksijenize monoterpenler (8, 12, 13, 15-17, 20)</u>				57,1
<u>Seskiterpen hidrokarbonlar (18, 19)</u>				19,3
<u>Oksijenize hidrokarbonlar (14)</u>				0,2

KI: Kovats İndisi. Genellikle her bileşik için alıkönma indisi veri aralıklarının %50 güven aralığı ile literatürden verilmiştir [1], RAI: Rölatif Alıkönma İndisi, n-alkan serisine göre % değerleri FID verilerinden hesaplanmıştır.

Salvia officinalis L. yaprak uçucu yağında toplam 20 bileşik tanımlanmış olup, bu bileşikler toplam kompozisyonun %92,1'ini oluşturmaktadır. Kimyasal sınıflar arasında, %57,1 ile oksijenize monoterpenler en baskın grup olarak belirlenmiştir. Ana bileşenler cis-thujone (%23,3), camphor (%13,5), 1,8-cineole (%12,6) ve caryophyllene (%15,1) olarak tespit edilmiştir (Tablo 8).

4.2.1.3. *Origanum onites* L. toprak üstü kısmı uçucu yağı bulguları

Tablo 9. *Origanum onites* L. toprak üstü kısmı uçucu yağının GC/MS ile belirlenen bileşimi.

No	Bileşik	KI	RAI	Rölatif %
1	<u>α-Pinene</u>	1018–1032	1024	0,3±0,1
2	<u>Myrcene</u>	1155–1169	1156	0,6±0,1
3	<u>α-Terpinene</u>	1170–1188	1175	0,5±0,1
4	<u>γ-Terpinene</u>	1238–1255	1242	1,8±0,1
5	<u>p-Cymene</u>	1264–1280	1266	2,4±0,1
6	<u>Linalool</u>	1537–1553	1541	5,6±0,1
7	<u>Carvophyllene, (E)-</u>	1585–1612	1586	0,9±0,1
8	<u>Borneol</u>	1690–1719	1692	0,8±0,1
9	<u>α-Bisabolene</u>	1702–1772	1713	2,8±0,1
10	<u>Carvone</u>	1720–1751	1722	0,2±0,1
11	<u>Thymol</u>	2130–2198	2173	1,4±0,1
12	<u>Carvacrol</u>	2186–2239	2200	80,6±0,3
Toplam tespit edilen				97,9
<u>Monoterpen hidrokarbonlar (1-5)</u>				5,6
<u>Oksijenize monotерpenler (6, 8, 10-12)</u>				88,6
<u>Seskitерpen hidrokarbonlar (7, 9)</u>				3,7

KI: Kovats İndisi. Genellikle her bileşik için alıkonma indisi veri aralıklarının %50 güven aralığı ile literatürden verilmiştir [1], RAI: Rölatif Alıkonma İndisi, n-alkan serisine göre % değerleri FID verilerinden hesaplanmıştır.

Origanum onites L. toprak üstü kısmı uçucu yağında toplam 12 bileşik tanımlanmış olup, bu bileşikler toplam kompozisyonun %97,9'unu oluşturmaktadır. Kimyasal kategoriler arasında, oksijenize monotерpenler %88,6 ile en baskın grubu oluşturmuştur. Uçucu yağ, özellikle yüksek orandaki carvacrol (%80,6) içeriğiyle karakterize edilmiştir; buna ek olarak orta düzeyde linalool (%5,6), p-cymene (%2,4) ve α -bisabolene (%2,8) tespit edilmiştir (Tablo 9).

4.2.1.4. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. toprak üstü kısmı uçucu yağ bulguları

Tablo 10. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. toprak üstü kısmı uçucu yağının GC/MS ile belirlenen bileşimi.

No	Components	KI	RRI	Relative %
1	<u>α-Pinene</u>	1018–1032	1026	4,2 $\pm$ 0,1
2	<u>Limonene</u>	1190–1204	1199	1,7 $\pm$ 0,1
3	<u>p-Cymene</u>	1264–1280	1267	0,5 $\pm$ 0,1
4	<u>Terpinolene</u>	1277–1290	1280	0,5 $\pm$ 0,1
5	<u>Linalool</u>	1537–1553	1541	1,7 $\pm$ 0,1
6	<u>α-Bergamotene, trans-</u>	1568–1583	1581	1,0 $\pm$ 0,1
7	<u>Caryophyllene, (E)-</u>	1585–1612	1593	23,3 $\pm$ 0,2
8	<u>α-Himachalene</u>	1632–1723	1637	5,1 $\pm$ 0,1
9	<u>α-Humulene</u>	1655–1682	1663	2,9 $\pm$ 0,1
10	<u>β-Selinene</u>	1686–1743	1687	3,6 $\pm$ 0,1
11	<u>γ-Curcumene</u>	1685–1704	1703	12,6 $\pm$ 0,1
12	<u>Neryl acetate</u>	1706–1726	1717	20,7 $\pm$ 0,2
13	<u>α-Selinene</u>	1716–1740	1740	3,3 $\pm$ 0,1
14	<u>α-Bisabolene</u>	1702–1772	1765	0,9 $\pm$ 0,1
15	<u>Nerol</u>	1782–1808	1790	5,0 $\pm$ 0,1
16	<u>Caryophyllene oxide</u>	1970–2008	1975	1,1 $\pm$ 0,1
Toplam tespit edilen				88,1
<u>Monoterpen hidrokarbonlar (1-4)</u>				6,9
<u>Oksijenize monoterenler (5, 12, 15)</u>				27,4
<u>Seskiterpen hidrokarbonlar (6-11, 13, 14)</u>				52,7
<u>Oksijenize seskiterpenler (16)</u>				1,1

KI: Kovats İndisi. Genellikle her bileşik için alıkonma indisi veri aralıklarının %50 güven aralığı ile literatürden verilmiştir [1], RAI: Rölatif Alıkonma İndisi, n-alkan serisine göre % değerleri FID verilerinden hesaplanmıştır.

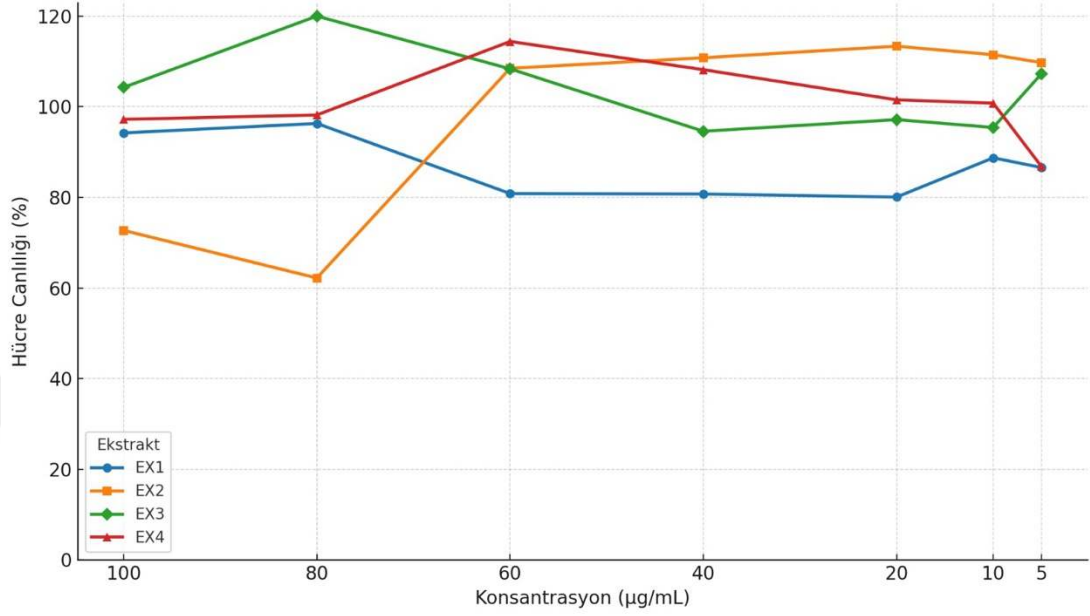
Helichrysum italicum (Roth) G. Don bitkisinin çiçekli toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağda toplam 16 bileşen tanımlanmış olup, yağın toplam bileşiminin %88,1'i başarıyla karakterize edilmiştir. Seskiterpen hidrokarbonlar, %52,7 oranıyla yağda en bol bulunan kimyasal grup olarak belirlenmiştir. Uçucu yağın başlıca bileşenleri caryophyllene (%23,3 $\pm$ 0,1), neryl acetate (%20,7 $\pm$ 0,1), γ -curcumene (%12,6 $\pm$ 0,1) ve nerol (%5,0 $\pm$ 0,1) olarak tespit edilmiştir (Tablo 10).

4.3. Hücresel Canlılığın Değerlendirilmesi

Bu çalışmada dört farklı bitki ekstresi (EX1–EX4) ve dört farklı uçucu yağ emülsiyonu (EM1–EM4) olmak üzere toplam sekiz farklı grubun insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Her bir grup için 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 ve 0 μ g/mL olmak üzere sekiz farklı konsantrasyonda uygulamalar yapılmıştır.

4.3.1. Ekstrelerin hücre canlılığı üzerine etkisi

Bitki ekstrelerine ait hücre canlılığı sonuçları Şekil 29 ve Tablo 11’de sunulmuştur. Tüm ekstrelerde, düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığının yüksek düzeyde korunduğu görülmüştür.



Şekil 29. Ekstre konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi.

Tablo 11. Ekstre konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı Ort $\pm$ SS (Min –Max) değerleri.

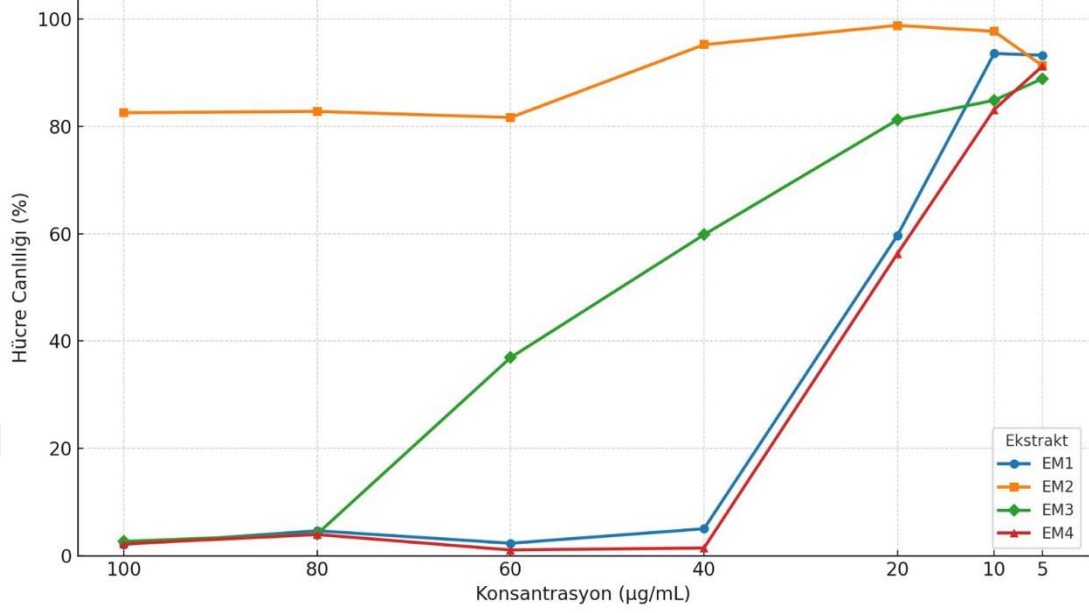
Konsant- rasyon	EX1	EX2	EX3	EX4
	Ort $\pm$ SS (Min –Max)	Ort $\pm$ SS (Min –Max)	Ort $\pm$ SS (Min –Max)	Ort $\pm$ SS (Min –Max)
100	94.23 $\pm$ 6.82 (86.48 – 99.31)	72.71 $\pm$ 62.36 (1.95 – 119.63)	104.28 $\pm$ 13.67 (88.5 – 112.24)	97.22 $\pm$ 23.1 (81.92 – 123.8)
80	96.32 $\pm$ 4.5 (91.24 – 99.83)	62.2 $\pm$ 56.63 (1.83 – 114.15)	120.01 $\pm$ 20.4 (103.72 – 142.89)	98.19 $\pm$ 27.53 (76.1 – 129.04)
60	80.84 $\pm$ 6.49 (73.37 – 85.14)	108.49 $\pm$ 2.35 (106.52 – 111.08)	108.37 $\pm$ 10.34 (97.28 – 117.75)	114.41 $\pm$ 6.51 (109.07 – 121.65)
40	80.74 $\pm$ 14.36 (64.22 – 90.16)	110.81 $\pm$ 13.43 (96.83 – 123.62)	94.6 $\pm$ 3.8 (90.21 – 96.91)	108.18 $\pm$ 8.56 (101.13 – 117.71)
20	80.06 $\pm$ 7.98 (73.12 – 88.78)	113.37 $\pm$ 9.49 (105.66 – 123.97)	97.16 $\pm$ 4.83 (92.13 – 101.76)	101.53 $\pm$ 7.9 (92.51 – 107.25)
10	88.73 $\pm$ 7.23 (81.69 – 96.14)	111.49 $\pm$ 58.18 (50.86 – 166.87)	95.43 $\pm$ 6.42 (89.15 – 101.98)	100.79 $\pm$ 8.91 (91.18 – 108.78)
5	86.58 $\pm$ 7.42 (79.86 – 94.55)	109.74 $\pm$ 8.27 (101.23 – 117.75)	107.3 $\pm$ 23.82 (84.57 – 132.08)	86.79 $\pm$ 24.41 (61.76 – 110.52)

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart sapma.

Özellikle EX3, 80 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda %120,01 $\pm$ 20,4 ile en yüksek hücre canlılığına ulaşırken, EX4 60 $\mu\text{g/mL}$ 'de %114,41 $\pm$ 6,51 ile en etkili ikinci grup olmuştur. EX2 grubu 100 ve 80 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında belirgin sitotoksosite göstermiş (%72,71 $\pm$ 62,36 ve %62,2 $\pm$ 56,63), ancak 60 $\mu\text{g/mL}$ 'de %108,49 $\pm$ 2,35'e ulaşarak olumlu etki göstermiştir. EX1 grubu ise genel olarak düşük varyansla daha stabil bir canlılık profili sunmuştur.

4.3.2. Uçucu yağ emülsiyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi

Uçucu yağ emülsiyonlarına ait hücre canlılığı değerleri Şekil 30 ve Tablo 12’de gösterilmiştir.



Şekil 30. Uçucu yağ emülsiyon konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi.

Tablo 12. Uçucu yağ emülsiyon konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı Ort $\pm$ SS (Min –Max) değerleri.

Konsantra syon	EM1	EM2	EM3	EM4
	Ort $\pm$ SS (Min –Max)	Ort $\pm$ SS (Min –Max)	Ort $\pm$ SS (Min –Max)	Ort $\pm$ SS (Min –Max)
100	2.11 $\pm$ 0.14 (1.95 – 2.22)	82.54 $\pm$ 12.53 (71.91 – 96.35)	2.68 $\pm$ 0.17 (2.49 – 2.82)	2.23 $\pm$ 0.9 (1.31 – 3.11)
80	4.66 $\pm$ 2.74 (1.53 – 6.68)	82.77 $\pm$ 8.54 (77.7 – 92.63)	4.05 $\pm$ 0.33 (3.74 – 4.41)	3.96 $\pm$ 2.13 (1.66 – 5.85)
60	2.34 $\pm$ 0.82 (1.39 – 2.83)	81.64 $\pm$ 10.01 (72.89 – 92.55)	36.92 $\pm$ 14.85 (20.81 – 50.06)	1.08 $\pm$ 0.17 (0.92 – 1.26)
40	5.04 $\pm$ 1.04 (3.84 – 5.76)	95.21 $\pm$ 14.93 (78.61 – 107.53)	59.81 $\pm$ 5.41 (55.41 – 65.86)	1.46 $\pm$ 0.47 (0.92 – 1.81)
20	59.67 $\pm$ 6.21 (53.45 – 65.88)	98.8 $\pm$ 15.28 (86.28 – 115.83)	81.2 $\pm$ 7.68 (75.56 – 89.95)	56.27 $\pm$ 4.5 (51.13 – 59.51)
10	93.57 $\pm$ 21.23 (70.6 – 112.47)	97.69 $\pm$ 9.35 (86.93 – 103.88)	84.84 $\pm$ 4.74 (80.08 – 89.56)	83.11 $\pm$ 2.45 (80.58 – 85.47)
5	93.24 $\pm$ 6.02 (86.99 – 98.99)	91.29 $\pm$ 8.26 (81.81 – 96.94)	88.88 $\pm$ 2.66 (86.97 – 91.92)	91.22 $\pm$ 9.31 (82.98 – 101.33)

Ort.: Ortalama, S.S.: Standart sapma.

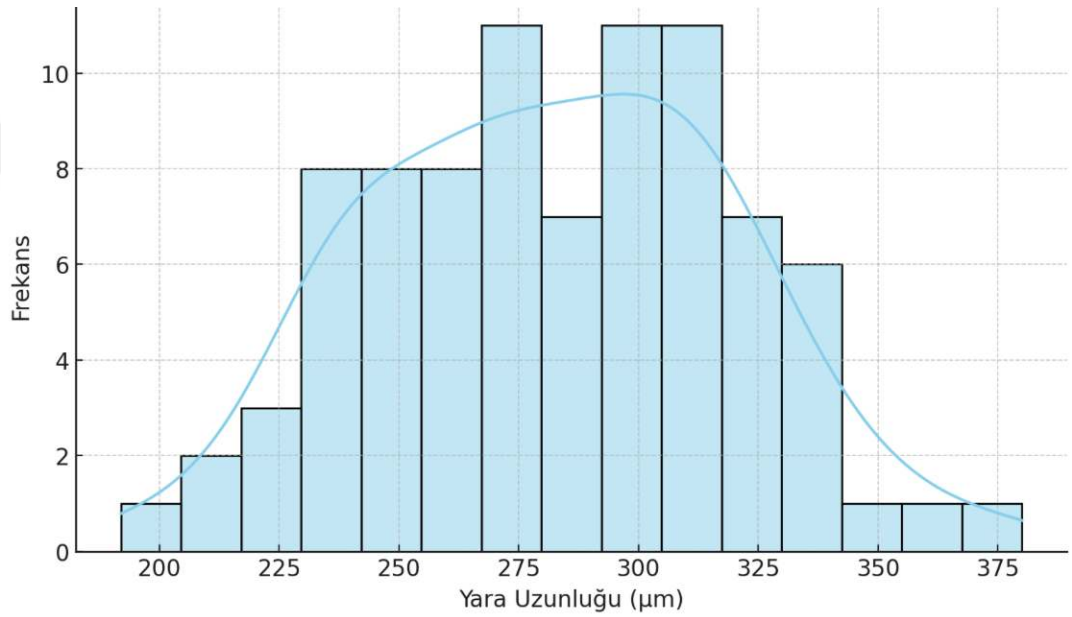
EM1, EM3 ve EM4 gruplarında 100, 80 ve 60 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında hücre canlılığı %5'in altında kalmış ve yüksek düzeyde sitotoksosite gözlenmiştir. EM2 grubu ise istisnai olarak, tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığını %70'in üzerinde koruyarak dikkat çekmiştir.

En yüksek hücre canlılığı EM2 grubunda 10 $\mu\text{g/mL}$ 'de %97,69 $\pm$ 9,35 ve 5 $\mu\text{g/mL}$ 'de %91,29 $\pm$ 8,26 olarak ölçülmüştür. Bu bulgular, EM2 grubunun fibroblast hücreleri üzerinde en biyoyumlu emülsiyon olduğunu göstermektedir.

4.4. Yara İyileşme Modeli Verilerinin Değerlendirilmesi

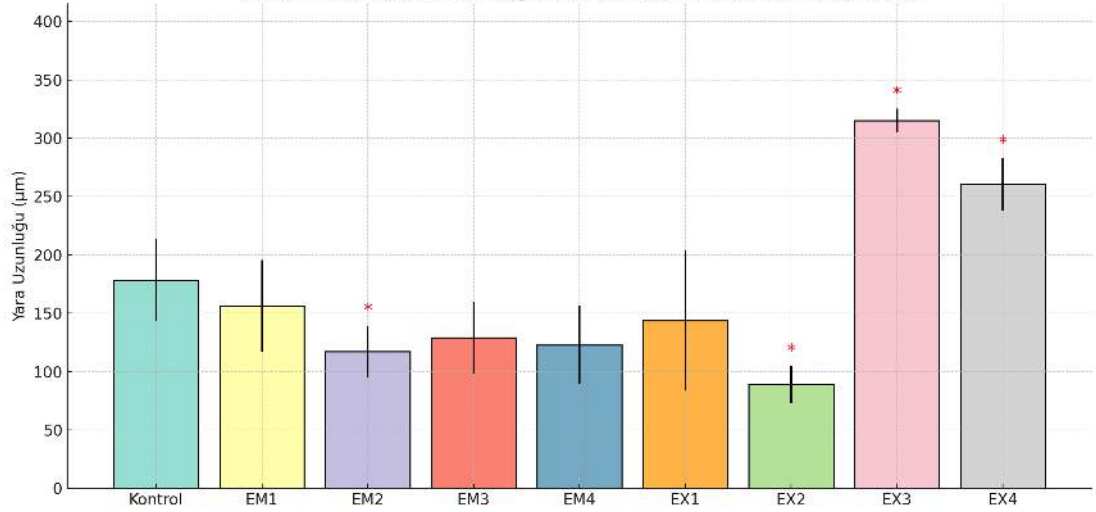
İn vitro yara iyileşmesini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen çizik testi sonuçlarına göre, kontrol grubu ile bitki ekstraları (EX1–EX4) ve uçucu yağ emülsiyonları (EM1–EM4) grupları arasındaki yara uzunluk farkları istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Çalışmada uygulanan çizik yara modeli sonrasında elde edilen 0. saat yara uzunluğu ölçümleri, tüm gruplar birleştirilerek değerlendirilmiştir. Verilerin dağılım özelliklerini incelemek amacıyla Shapiro-Wilk normal dağılım testi uygulanmıştır. Yapılan analiz sonucunda 0. saat yara uzunluğu ölçümlerinin normal dağılım gösterdiği saptanmıştır ($W=0.9905$, $p=0.7907$). Bu bulgu, deney başlangıcında oluşturulan çiziklerin uzunluk bakımından homojen bir dağılım sergilediğini ve yara modellemesinin deney grupları arasında sistematik bir fark yaratmayacak şekilde standartlaştırıldığını göstermektedir. 0. saat yara uzunluklarının dağılım grafiği Şekil 31’de gösterilmiştir.



Şekil 31. 0. saat yara uzunluklarının dağılım grafiği

24. saatte ölçülen yara uzunluklarına ilişkin varyans analizi (ANOVA), gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile deney grupları arasında yapılan post-hoc 24.saat karşılaştırmaları Şekil 32 ve Tablo 13’te gösterilmiştir.



Şekil 32. 24. saat yara kapanma uzunluğu: kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılması ($p < 0.05$)

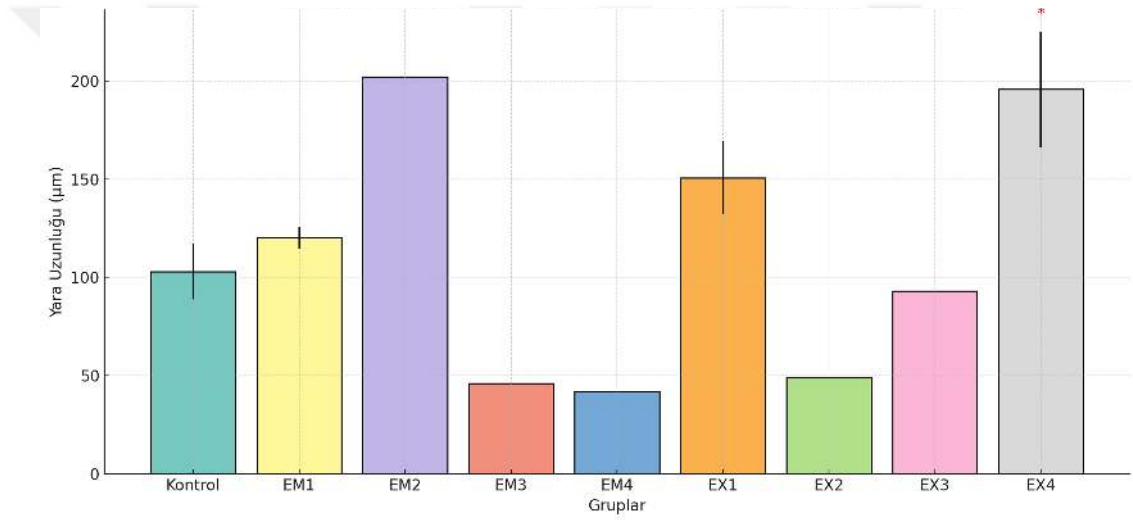
Tablo 13. 24. saatte gruplara göre yara uzunluğu ortalama değerleri, standart sapmalar ve istatistiksel anlamlılık

Grup	Ortalama±SS (µm)	p Değeri	Anlamlılık
Kontrol	179,4 ± 26,1	—	—
EM1	161,7 ± 34,2	0.069	—
EM2	121,9 ± 25,7	< 0.001	*
EM3	126,9 ± 28,5	0.087	—
EM4	135,5 ± 29,3	0.239	—
EX1	144,2 ± 34,9	0.445	—
EX2	90,9 ± 21,2	< 0.001	*
EX3	324,1 ± 32,7	< 0.001	*
EX4	259,2 ± 33,6	< 0.001	*

- EX3 ve EX4 gruplarında yara uzunlukları, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha uzun bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu durum, bu gruplarda yara kapanmasının daha yavaş gerçekleştiğini göstermektedir.

- EM2 ve EX2 gruplarında ise yara uzunlukları, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha kısa saptanmıştır ($p < 0.05$). Bu sonuç, bu gruplarda yara iyileşmesinin daha hızlı olduğunu düşündürmektedir.
- EM1, EM3, EM4 ve EX1 gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla yara uzunluğu açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

48.saatte gruplar arası yara kapanma uzunlukları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı (Tek yönlü ANOVA, $p < 0.05$). 48.saat Tukey post-hoc testi sonuçları Şekil 33'te gösterilmiştir.

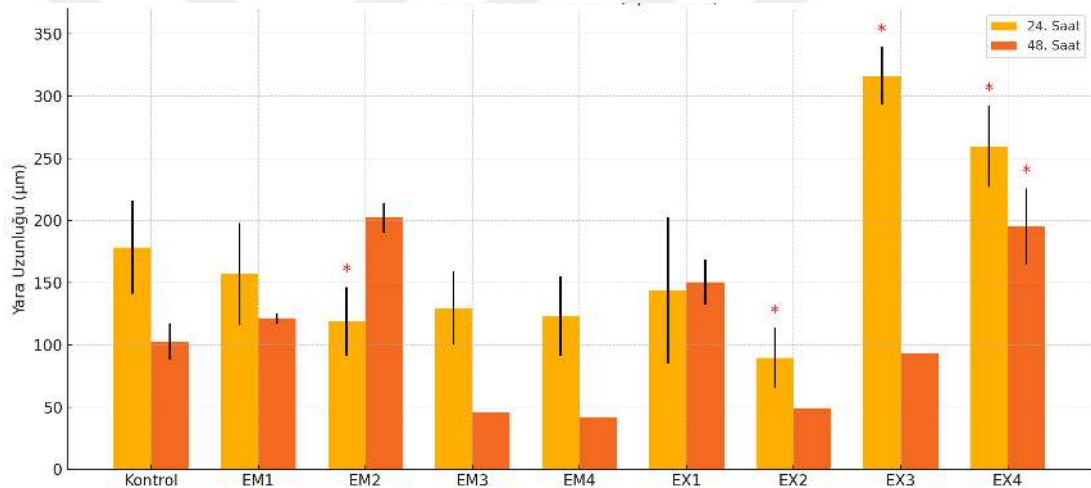


Şekil 33. 48. saat yara kapanma uzunluğu: kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılması ($p < 0.05$)

- EX4 grubundaki ortalama yara uzunluğu, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksekti ($p < 0.05$). Bu durum, EX4 grubunda yara iyileşmesinin kontrol grubuna göre belirgin şekilde daha yavaş olduğunu göstermektedir.
- EM2 grubunda yara uzunluğu kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). Bu nedenle EM2 grubundaki iyileşmenin kontrol grubuna göre daha yavaş olduğu gözlemlense de anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır.

- EM3, EM4, EX2 ve EX3 gruplarında yara uzunlukları kontrol grubuna göre daha düşük seyretmiş, bu da daha iyi yara iyileşmesini düşündürmektedir. Ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir ($p>0.05$).
- EM1 ve EX1 gruplarında yara uzunluğu kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen, bu artışlar da anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır ($p>0.05$).
- Yalnızca EX4 grubunda kontrol grubuna göre yara kapanmasının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğu saptanmıştır ($p<0.05$), bu da bu grupta yara iyileşmesinin geciktiğini göstermektedir.

Gruplar arasındaki 24 ve 48. saat yara uzunluklarının karşılaştırılması Şekil 34'te gösterilmiştir.



Şekil 34. 24 ve 48. saat yara kapanma uzunluklarının karşılaştırılması ($p<0.05$)

Yara açıklığında azalma gösteren gruplar (iyileşme açısından olumlu):

EM2 grubu: 24. saatte kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha kısa yara uzunluğu gösterdi ($*p<0.05$). 48. saatte ise yara uzunluğu belirgin şekilde artmış ve kontrol grubuna göre daha uzun hale gelmiştir (anlamlı farklılık yoktur). Bu durum EM2 grubunun iyileştirici etkinin 24. saatte belirgin olduğunu, ancak 48. saatte bu etkinin sürdürülemediğini düşündürmektedir.

EX2 grubu: 24. saatte yara uzunluğu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşüktü ($*p<0.05$). 48. saatte de yara uzunluğu düşük kalmaya devam etti,

ancak istatistiksel anlamlılık taşımadı. EX2, 24. saatte etkili olup, 48. saatte de iyileşmeyi sürdüren gruplardan biridir.

EM3 ve EM4 grupları: Her iki zaman noktasında da yara uzunluğu düşük seviyelerde gözlemlenmiştir. Ancak bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu gruplarda yara kapanmasının zamanla sürdüğü, ancak varyasyon nedeniyle istatistiksel anlamlılığa ulaşamadığı söylenebilir.

Yara açıklığında artış gösteren gruplar (iyileşme açısından olumsuz):

EX3 ve EX4 grupları: 24. saatte kontrol grubuna göre yara uzunlukları anlamlı derecede daha fazlaydı (* $p<0.05$). 48. saatte de bu durum devam etti, özellikle EX4 grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yara uzunluğu daha fazlaydı (* $p<0.05$). EX3 ve EX4 grupları, yara kapanmasını belirgin şekilde yavaşlatan etkiler göstermiştir.

EM2 grubu (48. saat): 24. saate göre ciddi bir geri dönüş gösterdi. 48. saatte yara uzunluğu anlamlılık düzeyine ulaşmasa da kontrol grubuna göre daha kötüydü. EM2'nin etkisi zamana bağlı olarak zayıflamış olabilir.

Nötr gruplar

EM1 ve EX1 grupları: Her iki zaman noktasında da kontrol grubuna göre yara uzunluğunda anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu gruplar nötr etkili olup yara kapanma sürecini anlamlı şekilde hızlandırmamış veya yavaşlatmamıştır.

- En başarılı yara iyileştirici etkiler 24. saatte EM2 ve EX2 gruplarında gözlenmiş olup, bunlar kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yara kapanmasını hızlandırmıştır.
- 48. saatte bu etkiyi yalnızca EX2 bir miktar sürdürmüştür, EM2 etkisini kaybetmiştir.
- EX4 grubu her iki zaman diliminde de yara kapanmasını belirgin şekilde yavaşlatmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, farklı bitkisel ekstrakter (*Matricaria recutita* L. çiçek, *Hypericum perforatum* L. toprak üstü kısmı, *Calendula officinalis* L. çiçek ve *Plantago major* L. yaprak) ve uçucu yağ emülsiyonlarının (*Laurus nobilis* L. yaprak, *Salvia officinalis* L. yaprak, *Origanum onites* L. toprak üstü kısmı ve *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. toprak üstü kısmı) in vitro yara iyileşmesi üzerindeki etkileri, çizik testi modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, bazı ekstre ve emülsiyonlar yara kapanmasını hızlandırırken, bazıları iyileşme sürecini geciktirmiştir. Bu araştırma bize 24. Saatte yara kapanmasını *Calendula officinalis* L. (EX2) ve *Laurus nobilis* L. (EM2)'in daha hızlı gerçekleştirdiğini gösterirken; *Hypericum perforatum* L. (EX3) ve *Matricaria recutita* L. (EX4)'in ise daha yavaş gerçekleştirdiğini göstermiştir. EX4 grubunda bu gecikme 48.saatte de devam etmiştir.

1- Bitki Analizleri

Çalışmada kullanılan bitkisel ürünlerin fitokimyasal analizleri, bu etkilerin biyolojik temellerini anlamada önemli bilgiler sunmuştur.

Matricaria recutita L. çiçeklerinden elde edilen ekstrenin apigenin-7-glukozit (A7G) içeriği, PDA dedektörlü HPLC yöntemiyle başarılı bir şekilde tayin edilmiştir. Yöntem, Çiçek ve ark. [192] tarafından bildirilen validasyon parametreleri esas alınarak uygulanmış ve oluşturulan kalibrasyon eğrisinin yüksek korelasyon katsayısı ($R^2 = 0,9994$), kantitatif ölçümlerin doğruluğunu desteklemiştir. Elde edilen kromatogramlarda, ekstrenin A7G piki ile standart maddenin piki çakışmış, bu da analizde yeterli özgüllüğün sağlandığını göstermiştir. Üç farklı örnekten elde edilen ortalama A7G miktarı, $1,674 \pm 0,008$ mg/100 mg kuru ekstre olarak belirlenmiştir. Drog bazlı hesaplamalarda ise A7G içeriği $\%0,261 \pm 0,001$ bulunmuştur ve bu oran, Türk Farmakopesi tarafından papatya çiçeği için belirlenen $\%0,250$ 'lik minimum sınırın üzerinde olup, kullanılan bitki materyalinin farmakope kriterlerini karşıladığını

göstermektedir [200]. Bu bulgular, literatürde yer alan çeşitli çalışmalarla da uyum göstermektedir. Örneğin, Sarikurcu ve ark. [205], farklı coğrafi bölgelerden toplanan *M. recutita* örneklerinde apigenin-7-glukozit oranını %0,22–0,30 aralığında raporlamıştır. Benzer şekilde, Raal ve ark. [206], Estonya menşeli papatya örneklerinde bu oranı ortalama %0,28 olarak tespit etmiş ve bu bileşiğin kalite kontrol açısından güvenilir bir marker olduğunu vurgulamıştır. Bununla birlikte, bazı çalışmalar ekstraksiyon yöntemi, bitki kaynağı ve hasat zamanı gibi değişkenlerin A7G miktarını etkileyebileceğini bildirmiştir [207, 208]. Bu bağlamda, çalışmamızda elde edilen yüksek oranlar hem ekstraksiyon protokolünün etkinliğini hem de kullanılan ham maddenin kalitesini ortaya koymaktadır.

Hypericum perforatum L. (sarı kantaron) toprak üstü kısmından elde edilen ekstrelere ait toplam hiperisin miktarı, UV-VIS spektrofotometrik yöntem kullanılarak başarıyla tayin edilmiştir. Analiz, 590 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş olup, hiperisin kalibrasyon eğrisinin doğrusal yapısı ($R^2 = 0,9930$) yöntem duyarlılığını ve kantitatif analiz güvenilirliğini desteklemiştir. Elde edilen verilere göre, üç ayrı ekstrenin ortalama hiperisin içeriği $0,545 \pm 0,001$ mg/100 mg kuru ekstre, drogdaki karşılığı ise $\%0,102 \pm 0,001$ olarak bulunmuştur. Bu oran, Türk Farmakopesi tarafından *Hypericum perforatum* L. için belirlenen minimum toplam hiperisin içeriği olan $\%0,080$ sınırının üzerinde yer almakta olup, kullanılan bitki materyalinin farmakope standartlarını karşıladığını göstermektedir [201]. Literatürde, sarı kantaronun terapötik etkilerinden sorumlu başlıca bileşenlerden biri olan hiperisin miktarının; bitkinin türü, yetiştiği bölge, toplama zamanı ve ekstraksiyon yöntemi gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir [193, 209]. Örneğin, Cirak ve ark. [209], Türkiye'deki farklı ekolojik bölgelerden toplanan sarı kantaron örneklerinde hiperisin içeriğini $\%0,058$ ile $\%0,159$ arasında bildirmiştir. Benzer şekilde, Barnes ve ark. [210], ticari ürünlerde bu oranın bazen farmakope limitlerinin altında kaldığını ve kalite kontrolün kritik önemde olduğunu vurgulamıştır. Bu bağlamda, çalışmamızda elde edilen $\%0,102$ oranı hem güvenilir ekstraksiyon protokolü hem de kaliteli ham madde kullanıldığını göstermektedir. Ek olarak, Skalkos ve arkadaşlarının [193] vurguladığı gibi, hiperisin hem antioksidan hem de fotodinamik etkileri nedeniyle topikal ve sistemik farmasötik ürünlerde potansiyel bir biyoaktif ajan olarak öne çıkmaktadır. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, sarı

kantaron ekstrelerinin farmasötik formülasyonlarda kullanılabilirliğini desteklemekte ve hiperisin miktarının tayinine yönelik spektrofotometrik yöntemin kalite kontrol süreçlerinde etkinliğini ortaya koymaktadır.

Calendula officinalis L. (aynısefa) çiçeklerinden elde edilen ekstrele ait toplam karotenoid, fenolik madde ve flavonoit içerikleri spektrofotometrik yöntemlerle kantitatif olarak analiz edilmiştir. Beta-karoten standardı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinin yüksek korelasyon katsayısı ($R^2 = 0,9996$), karotenoid tayininde kullanılan yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini göstermiştir. Analizler sonucunda, bitki materyalindeki toplam karotenoid içeriği $0,131 \pm 0,001$ olarak saptanmış olup, bu değer daha önce yayınlanmış literatürle paralellik göstermektedir. Örneğin, Toiu ve ark. [202], farklı *Calendula officinalis* varyetelerinde karotenoid içeriğini $0,099$ ile $3,510$ arasında rapor etmiştir. Benzer şekilde, Pintea ve ark. [203] Estonya'da yetiştirilen aynısefa örneklerinde benzer aralıklarda sonuçlar bildirmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan ham maddenin karotenoid içeriği fitoterapötik kalite açısından yeterli düzeydedir. Toplam fenolik madde miktarı gallik asit standardı ile tayin edilmiş ve bitkisel drogda $1,468 \pm 0,034$ olarak hesaplanmıştır. Bu oran, Chroho ve ark. [211] ile Ak ve ark. [212] gibi çalışmalarda bildirilen $0,5$ – 6 aralığı ile uyumludur. Benzer şekilde, toplam flavonoit içeriği ise kersetin standardı kullanılarak hesaplanmış ve $0,328 \pm 0,004$ olarak bulunmuştur. Bu değer de literatürde aynısefa için bildirilen $0,2$ – $0,9$ aralığına uygundur [213, 214]. Analitik yöntemlerin yüksek korelasyon katsayıları ($R^2 > 0,99$) ve düşük standart sapmalarla elde edilen sonuçlar, spektrofotometrik ölçüm protokollerinin güvenilirliğini göstermektedir. Aynısefa çiçeği ekstrelerinin karotenoid, fenolik ve flavonoit içeriklerinin hem ulusal hem de uluslararası çalışmalarda bildirilen değerlerle uyumlu olması, kullanılan bitki materyalinin kalitesini ve ekstraksiyon yönteminin etkinliğini teyit etmektedir.

Plantago türlerine ait yapraklardan elde edilen ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit içerikleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Gallik asit ve kersetin standartlarına dayalı kalibrasyon eğrilerinin yüksek korelasyon katsayıları ($R^2 > 0,997$) kullanılan analiz yönteminin doğruluğunu ve kantitatif analizlerde güvenilirliğini desteklemektedir. Analiz sonuçlarına göre sinirotu yaprak ekstresinin ortalama toplam fenolik madde içeriği $7,893 \pm 0,066$ ve flavonoit içeriği ise $1,956 \pm 0,007$ olarak

tespit edilmiştir. Bu oranlar, sinirotu yapraklarının polifenolik bileşikler yönünden zengin bir kaynak olduğunu göstermektedir. Drog bazında hesaplanan fenolik madde oranı $1,832 \pm 0,015$ ve flavonoit oranı $0,454 \pm 0,002$ olarak bulunmuştur. Bu değerler, daha önce yayınlanmış literatürde bildirilen aralıklarla uyumludur. Örneğin, Gözcü ve Atmaca [215] ile Beara ve ark. [216] tarafından yapılan çalışmalarda *Plantago major* ve *Plantago lanceolata* türlerinin fenolik madde içerikleri %1,5 ile %7,1, flavonoit içerikleri ise %0,4 ile %7,1 aralığında bildirilmiştir. Ayrıca, Teğin ve ark. [217] tarafından Türkiye'de doğal yayılış gösteren *Plantago coronopus* türünde yapılan çalışmada da benzer fenolik zenginlik vurgulanmıştır. Bitkinin çevresel koşullar, tür farklılığı, gelişim dönemi ve ekstraksiyon protokolü gibi değişkenlere bağlı olarak içerdiği sekonder metabolit profili farklılık gösterebilmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan örneklerin oldukça yüksek polifenolik içeriğe sahip olması, kalite yönünden uygun bitki materyali kullanıldığını ve ekstraksiyon verimliliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu fitokimyasal profiller, sinirotunun farmasötik potansiyele sahip doğal antioksidan kaynağı olabileceğini düşündürmekte ve geleneksel kullanım alanlarını desteklemektedir.

Laurus nobilis L. yapraklarından elde edilen uçucu yağın kimyasal profili GC-FID/MS yöntemi ile analiz edilmiş ve toplam 21 bileşik tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, uçucu yağın %92,5'lik kısmı başarıyla karakterize edilmiştir. Tanımlanan bileşikler arasında, oksijenize monoterpenler %67,7 ile en baskın grubu oluşturmuş ve bu oran, *L. nobilis* uçucu yağının kimyasal yapısında bu bileşiklerin belirleyici olduğunu göstermiştir. Uçucu yağın majör bileşenleri sırasıyla 1,8-cineole ($50,3 \pm 0,2$), α -terpinyl asetat ($9,1 \pm 0,1$), α -pinene ($5,6 \pm 0,1$) ve terpinen-4-ol ($4,2 \pm 0,1$) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, literatürde *L. nobilis* uçucu yağlarının bileşenleri üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda bildirilen verilerle yüksek düzeyde örtüşmektedir. Örneğin, Kıvrak ve ark. [218], *L. nobilis* uçucu yağında 1,8-cineole'ü baskın bileşen olarak belirtmiş ve α -terpinyl asetat ile terpinen-4-ol'ün de yüksek oranlarda bulunduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, Yalçın ve ark. [219] tarafından Kuzey Kıbrıs'ta yetiştirilen *L. nobilis* örnekleri üzerinde yapılan GC/MS analizlerinde de aynı majör bileşiklerin varlığı doğrulanmıştır. Bu durum, tür içi kimyasal varyasyonun sınırlı olduğu ve çalışmamızda kullanılan bitki materyalinin literatürle

uyumlu fitokimyasal profile sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle 1,8-cineole gibi oksijenize monoterpenlerin yüksek oranlarda bulunması, *L. nobilis* uçucu yağının antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve mukolitik etkilerinden sorumlu olabilir [220]. Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan uçucu yağın hem kalite hem de terapötik potansiyel açısından farmakope düzeyinde bileşik profiline sahip olduğu değerlendirilmiştir.

Salvia officinalis L. yapraklarından elde edilen uçucu yağın kimyasal profili GC-FID/MS yöntemiyle analiz edilmiş ve toplam 20 bileşen tespit edilmiştir. Tanımlanan bileşikler, toplam kompozisyonun %92,1'ini oluşturarak uçucu yağın büyük bir kısmının doğru şekilde karakterize edildiğini göstermektedir. En baskın kimyasal sınıf olarak oksijenize monoterpenler (%57,1) belirlenmiş ve bu grup, adaçayı uçucu yağının biyolojik aktivitesinden sorumlu majör fraksiyonu oluşturmuştur. Uçucu yağın majör bileşenleri cis-thujone (%23,3 $\pm$ 0,1), camphor (%13,5 $\pm$ 0,1), 1,8-cineole (%12,6 $\pm$ 0,1) ve (E)-caryophyllene (%15,1 $\pm$ 0,1) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, daha önce *S. officinalis* türleri üzerinde yapılan çalışmalarla yüksek düzeyde uyumluluk göstermektedir. Örneğin, Raal ve ark. [162] ile Kačániová ve ark. [221], farklı Avrupa ülkelerinde yetiştirilen *S. officinalis* örneklerinde thujone türevleri, camphor ve 1,8-cineole'un baskın bileşenler olduğunu belirtmiştir. Aynı şekilde, El Euch ve ark. [222] da adaçayı yağının bu temel bileşenlere dayalı antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri taşıdığını vurgulamıştır. Ayrıca elde edilen kimyasal profilin, *S. officinalis* uçucu yağı için geçerli olan ISO 9909 kalite standardı ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Standartta belirtilen sınırlar içinde kalan cis-thujone (%18–43), camphor (%4,5–24,5), 1,8-cineole (%5,5–13,0) ve diğer bileşikler, çalışmamızda tespit edilen oranlarla yüksek derecede örtüşmektedir. Bu durum, kullanılan bitki materyalinin farmasötik kaliteye uygun olduğunu ve analiz edilen uçucu yağın terapötik olarak değerlendirilebilir olduğunu göstermektedir. Çalışmada elde edilen adaçayı uçucu yağı, bileşen çeşitliliği ve oranları bakımından hem literatürle hem de uluslararası kalite kriterleriyle yüksek düzeyde örtüşmekte olup, biyolojik aktivite potansiyeli taşıyan bir doğal ürün profili sunmaktadır.

Origanum onites L. türünün toprak üstü kısmından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi GC-FID/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Toplam 12 bileşik tanımlanmış olup, bu bileşenler uçucu yağın %97,9'unu oluşturmuştur. Bu durum,

elde edilen uçucu yağın yüksek düzeyde karakterize edildiğini ve analitik yöntemin yeterliliğini ortaya koymaktadır. Kimyasal sınıflandırmaya göre, bileşiklerin %88,6'sı oksijenize monoterpenlerden oluşmakta olup, bu grup uçucu yağın baskın fraksiyonunu temsil etmektedir. Özellikle carvacrol bileşiği $80,6 \pm 0,3$ oranıyla uçucu yağın majör bileşeni olarak tespit edilmiştir. Carvacrol, fenolik bir monoterpen olarak bilinir ve antimikrobiyal, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile farmasötik açıdan oldukça değerli bir bileşiktir. Bu çalışmada elde edilen yüksek carvacrol oranı, *O. Onites* uçucu yağının biyolojik potansiyelinin kayda değer olduğunu göstermektedir. Carvacrol dışında; linalool (%5,6), α -bisabolene (%2,8) ve p-cymene (%2,4) orta düzeyde bulunan diğer bileşiklerdir. Bu dağılım, daha önce *O. onites* üzerine yapılan çalışmalarda bulgularla büyük ölçüde örtüşmektedir. Carroll ve ark. [223] çalışmasında da carvacrolün uçucu yağda baskın olduğu rapor edilmiştir. Tasdemir ve ark. [224] ise Türk *O. onites* uçucu yağının carvacrol kaynaklı antiprotozoal aktivitesini vurgulamıştır. Ayrıca, Özkan ve ark. [225] tarafından yürütülen bir çalışmada, hasat zamanının uçucu yağın fenolik içeriğini ve özellikle carvacrol oranını etkilediği bildirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen uçucu yağ bileşimi, fenolik monoterpen olan carvacrol'un baskınlığı ile karakterize edilmiş ve bu özellik, *O. onites* uçucu yağının geleneksel kullanımlarının yanı sıra farmakolojik uygulamalar açısından da önemli bir kaynak olabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bileşen dağılımı, daha önceki çalışmalarda bildirilen değerlerle uyumlu olup, kullanılan bitki materyalinin kimyasal standardizasyon açısından yüksek kalitede olduğunu göstermektedir.

Helichrysum italicum (Roth) G. Don. bitkisinin çiçekli toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi GC-FID/MS yöntemiyle analiz edilmiştir. Toplam 16 bileşen tanımlanmış olup, uçucu yağın %88,1'lik kısmı başarıyla karakterize edilmiştir. Bu durum, elde edilen uçucu yağın kimyasal profili açısından yeterince temsil edici olduğunu göstermektedir. Bileşik gruplarına göre değerlendirildiğinde, seskiterpen hidrokarbonlar (%52,7) uçucu yağın baskın kimyasal grubunu oluşturmuştur. Seskiterpen türevlerinin uçucu yağdaki bu yoğun varlığı, *H. italicum*'un diğer türlerinden ayırt edici bir özelliği olarak literatürde de tanımlanmıştır. Ana bileşenler arasında yer alan caryophyllene ($23,3 \pm 0,2$), neryl acetate ($20,7 \pm 0,2$), γ -curcumene ($12,6 \pm 0,1$) ve nerol ($5,0 \pm 0,1$) bu uçucu

yağın karakteristik profiline katkı sağlamaktadır. Bu bulgular, Talić ve ark. [226] tarafından Bosna-Hersek orijinli *H. italicum* örneklerinde rapor edilen kimyasal çeşitlilikle uyumlu olup, özellikle seskiterpenlerin ve neryl acetate'ın belirgin oranlarda bulunması ile paralellik göstermektedir. Benzer şekilde, Kladar ve ark. [227] çalışmasında da Karadağ kökenli örneklerde caryophyllene ve neryl acetate bileşenlerinin uçucu yağ profilinde ön planda olduğu gösterilmiştir. Özellikle neryl acetate, literatürde *H. italicum* uçucu yağlarının belirleyici bileşeni olarak tanımlanmakta ve bu bileşiğin antioksidan, antiinflamatuvar ve cilt yenileyici etkileri olduğu bildirilmektedir. Seskiterpen yapısındaki γ -curcumene ve nerol gibi bileşikler ise hem aromatik profili hem de biyolojik aktiviteleri açısından önemli katkılar sağlamaktadır. Bu çalışmada elde edilen *H. italicum* uçucu yağı bileşimi, daha önceki çalışmalarda tanımlanan kemotiplerle yüksek düzeyde örtüşmekte ve bu bitkinin farmakolojik açıdan değerli bir uçucu yağ kaynağı olabileceğini göstermektedir. Özellikle seskiterpen hidrokarbonlar ve oksijenize monoterpenlerin bileşime olan yüksek katkısı, bu türün aromaterapötik ve dermokozmetik uygulamalar için potansiyelini desteklemektedir.

2- Sitotoksisite Testleri

Günümüzde hücre canlılığının ve sitotoksisitenin değerlendirilmesinde çeşitli kolorimetrik yöntemler kullanılmakta olup, MTT testi bunlar arasında en yaygın başvuru tekniklerden biridir. Bu testin temel prensibi, hücrelerdeki mitokondriyal enzim aktivitesinin ölçülmesine dayanır. İlk olarak Mosmann tarafından 1983 yılında tanımlanan bu yöntem, hücre canlılığı analizlerinde “altın standart” olarak kabul edilmektedir. MTT, sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur; çoğalan hücrelerde artan mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi sonucu suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine indirgenir. Oluşan bu kristaller izopropil alkol veya dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılarak çözülür ve elde edilen renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülür. Analizlerde, herhangi bir uygulama yapılmamış hücreler %100 canlı kabul edilir ve diğer gruplar buna göre oransal olarak değerlendirilir. Oldukça güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sunan MTT testi hem sitotoksisiteyi hem de hücre proliferasyonunu belirlemek amacıyla yaygın şekilde kullanılmaktadır [185, 228]. Çalışmamızda da bitki ekstraktları (EX1–EX4) ve uçucu yağ emülsiyonlarının (EM1–EM4) insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki etkileri

MTT testi aracılığıyla sistematik olarak incelenmiştir. Bulgular, hücre canlılığı açısından ekstrelerin emülsiyonlara kıyasla çok daha yüksek biyouyumluluğa sahip olduğunu göstermektedir.

Ekstreler grubunda, bazı ekstrelerin özellikle düşük ve orta konsantrasyonlarda fibroblast hücre canlılığını koruduğu ya da artırdığı, bazı ekstrelerin ise yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. EX3 (*Hypericum perforatum* L.) ekstresi, 80 µg/mL konsantrasyonda $120,01 \pm 20,4$ oranında hücre canlılığı ile tüm gruplar arasında en yüksek proliferatif etkiyi göstermiştir. Bu bulgu, EX3'ün içerdiği fenolik bileşikler, flavonoidler gibi biyoaktif bileşenlerin fibroblast proliferasyonunu desteklediğine işaret etmektedir. Anaya-Mancipe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Plantago major* gibi fitokimyasal olarak benzer türlerin fibroblast çoğalmasında artırdığı ve in vitro yara iyileşmesi süreçlerini hızlandığı gösterilmiştir [229]. Ayrıca, Süntar ve arkadaşlarının çalışmasında *Hypericum perforatum* yağı ile adaçayı ve kekik uçucu yağlarını içeren yeni bir merhem formülasyonunun yara iyileştirici etkileri ortaya konmuştur [230]. EX4 (*Matricaria recutita* L.) ekstresi ise 60 µg/mL'de $114,41 \pm 6,51$ ile yüksek hücre canlılığı sergileyerek ikinci sırada yer almıştır. Bu sonuç, EX4'ün içeriğindeki flavonoidler ve antioksidan maddelerin oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunarak hücre canlılığını desteklediğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, flavonoid açısından zengin ekstrelerin fibroblastlar üzerinde sitoprotektif ve proliferatif etkiler gösterdiği daha önceki çalışmalarda da vurgulanmıştır [163, 231]. EX2 (*Calendula officinalis* L.) grubunda ise 100 ve 80 µg/mL konsantrasyonlarında belirgin bir sitotoksik etki gözlenmiş olup, hücre canlılığı sırasıyla $72,71 \pm 62,36$ ve $62,2 \pm 56,63$ olarak ölçülmüştür. Bununla birlikte, 60 µg/mL ve daha düşük konsantrasyonlarda bu olumsuz etki tersine dönmüş ve canlılık oranı $108,49 \pm 2,35$ 'e ulaşmıştır. Bu bulgu, bazı fitokimyasal bileşenlerin konsantrasyona bağlı çift yönlü etki (hormetik etki) gösterebildiğini desteklemektedir. Örneğin, St. John's wort (*Hypericum perforatum*) gibi bitkilerde de hiperisin gibi bileşenlerin düşük dozda faydalı, ancak yüksek dozda toksik etkiler gösterebildiği bildirilmektedir [210, 232]. EX1 (*Plantago major* L.) grubu ise genel olarak düşük varyans ve stabil hücre canlılığı oranları ile dikkat çekmiş, tüm konsantrasyonlarda güvenli kabul edilebilecek düzeyde hücre canlılığı sağlamıştır. Bu durum, EX1'in düşük toksisiteye sahip fitokimyasal içeriğe sahip olabileceğini ve yara iyileşmesi

uygulamalarında biyouyumlu formülasyonlar için uygun bir aday olabileceğini düşündürmektedir. Bitkisel ürünlerin bu şekilde stabil hücre yanıtı oluşturmaları, özellikle hassas dokularla temas eden ürünlerde tercih sebebidir [233]. Genel olarak değerlendirildiğinde, EX3 ve EX4 gruplarının proliferatif etkiler göstermesi, bu ekstrelerin yara iyileşmesi sürecinde potansiyel terapötik ajanlar olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, EX2 grubundaki konsantrasyona bağlı değişkenlik, fitokimyasal içeriklerin doz-yanıt ilişkisine dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Gelecek çalışmalarda bu ekstrelerin moleküler düzeyde etkileri (örneğin VEGF, TGF- β , IL-6 gibi belirteçler üzerindeki etkileri) detaylı biçimde incelenmeli ve farklı taşıyıcı sistemlerle (örn. nanoemülsiyon, hidrojel) biyoyararlanımları optimize edilmelidir.

Uçucu yağ emülsiyonları grubunda, özellikle EM2 (*Laurus nobilis* L.), tüm konsantrasyon aralığında hücre canlılığının yüksek düzeyde korunduğu gözlenmiştir. EM2 grubu 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda $\%97,69 \pm 9,35$ ve 5 $\mu\text{g/mL}$ 'de $\%91,29 \pm 8,26$ hücre canlılığı göstermiştir. Bu bulgu, *Laurus nobilis* uçucu yağının uygun formülasyonla fibroblast hücreler üzerinde biyouyumlu özellikler gösterebileceğini desteklemektedir. Benzer şekilde, literatürde *Laurus nobilis*'in düşük toksisiteye sahip olduğu ve yara iyileşmesi sürecine olumlu katkılar sağlayabileceği rapor edilmiştir [234, 235]. Buna karşın EM1 (*Helichrysum italicum* L.), EM3 (*Salvia officinalis* L.) ve EM4 (*Origanum onites* L.) gruplarında özellikle 40 $\mu\text{g/mL}$ ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığı $\%5$ 'in altına düşmüştür. Bu durum, bu üç uçucu yağın yüksek konsantrasyonlarda fibroblastlar için belirgin sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Uçucu yağların özellikle yüksek konsantrasyonlarda membran geçirgenliğini bozarak hücre lizisine ve apoptoza neden olabileceği daha önceki araştırmalarda da vurgulanmıştır [236]. Bu etkinin ardında, uçucu yağların içerdiği fenolik monotерpenler (örneğin carvacrol, thymol) ve oksijenli bileşenler (1,8-cineole, camphor) gibi güçlü lipofilik bileşiklerin, hücre zarında deterjan benzeri etki oluşturarak membran stabilitesini bozması yatmaktadır [237, 238]. Özellikle *Salvia officinalis* ve *Origanum onites* gibi türler, yüksek miktarda thujone, carvacrol ve camphor içerebilir; bu bileşenler düşük konsantrasyonlarda antiinflatuvar ve antimikrobiyal özellikler sunarken, yüksek konsantrasyonlarda sitotoksikite riskini artırmaktadır [239, 240]. EM2 grubunun ise bu olumsuz etkilerden bağımsız olarak

tüm konsantrasyonlarda %70'in üzerinde hücre canlılığı sağlaması, hem içerdiği bileşenlerin daha az toksik profilde olduğunu hem de formülasyonda kullanılan taşıyıcıların hücre zarına zarar vermeyecek şekilde optimize edildiğini göstermektedir. Bu bulgu, emülsiyonların biyouyumluluğunun yalnızca bitkisel içeriğe değil, aynı zamanda formülasyonda kullanılan yardımcı maddelere de bağlı olduğunu göstermektedir [241]. Sonuç olarak, uçucu yağ emülsiyonları arasında yalnızca EM2 grubunun hücre canlılığı açısından güvenli olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, yara iyileşmesini destekleyecek dermal ürünlerin geliştirilmesinde EM2'nin biyouyumlu yapısı avantaj sağlayabilirken, EM1, EM3 ve EM4 gibi daha sitotoksik formülasyonların düşük konsantrasyonlarda ve kontrollü sistemlerle uygulanması gerektiği düşünülmektedir.

Bitki ekstraktları düşük toksisite ve yüksek biyouyumlulukları nedeniyle yara iyileşmesi çalışmalarında öncelikli tercih edilebilecek ajanlar olarak değerlendirilebilir. Öte yandan uçucu yağların, etkili olabilmeleri için doğru taşıyıcılarla ve optimum konsantrasyon aralıklarında formüle edilmeleri büyük önem taşımaktadır.

3- Yara İyileşme Deneyi

Yara iyileşmesi, homeostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme (remodeling) olmak üzere dört temel evreden oluşan, oldukça karmaşık ve dinamik bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, doku bütünlüğünün sağlanması ve fonksiyonun yeniden kazanılması açısından önemlidir. Özellikle travma, cerrahi müdahale, bası yaraları ve diyabetik ülser gibi klinik tablolar, yara iyileşme sürecini doğrudan etkileyen durumlardır ve sıklıkla anestezi ve yoğun bakım pratiği ile ilişkilidir. Yoğun bakım hastalarında immünsupresyon, doku perfüzyon bozuklukları ve beslenme yetersizlikleri gibi faktörler yara iyileşmesini sekteye uğrattırırken; cerrahi hastalarda da perioperatif dönemdeki inflamatuvar yanıtlar bu sürecin etkinliğini belirlemektedir [81].

Yara iyileşmesi sürecinde fibroblastlar başta olmak üzere hücreler çoğalarak hasarlı bölgeye göç ederler. Hücre migrasyonu, iyileşme hızını belirleyen sınırlayıcı basamaklardan biridir. Bu nedenle, yara iyileşmesini araştıran deneysel çalışmalar genellikle hücre migrasyonu üzerine kurgulanır. İn vitro yara iyileşme modellerinde,

belirli standart koşullar altında hücre tabakası üzerinde yapay bir yara hattı oluşturulur ve fibroblastların boş alana hareketi değerlendirilir [199]. Çoğunlukla hücre kültürü yüzeyi, hücre-matriks etkileşimlerini taklit etmek amacıyla ekstraselüler matriks bileşenleriyle kaplanır. Bu yöntemler sayesinde yeni tedavi yaklaşımlarının in vivo deneylere geçmeden önce hücre düzeyinde etkileri ayrıntılı olarak incelenebilir. Çalışmamızda da kullandığımız geleneksel iki boyutlu hücre monolayer modelleri, laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan ekipmanlarla ve standart kültür koşulları altında kolaylıkla uygulanabilmeleri nedeniyle en sık tercih edilen deneysel yaklaşımlardan biridir.

Bu çalışmada kullanılan çizik yara modeli sonrasında elde edilen 0. saat yara uzunluğu verileri, tüm deney grupları birleştirilerek istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir ve ölçümlerin istatistiksel olarak normal dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur ($p=0.7907$). Bu bulgu, çizik yara modelinin deney grupları arasında uzunluk açısından homojen şekilde oluşturulduğunu ve başlangıçtaki yara boyutlarının sistematik bir fark oluşturmada standart bir şekilde uygulandığını göstermektedir. Böylece, deney sürecinde gruplar arası başlangıç farklılıklarından kaynaklı potansiyel önyargıların minimize edildiği değerlendirilmektedir. Sonuç olarak, 24. ve 48. saatlerde elde edilen yara kapanma yüzdesi farklılıklarının, başlangıç yara uzunluğu varyasyonundan çok, uygulanan bitkisel ekstrakt ve emülsiyonların biyolojik etkileriyle ilişkili olduğu daha güçlü bir şekilde desteklenmiştir.

Bitki ekstreleri (EX1–EX4) ve uçucu yağ emülsiyonlarının (EM1–EM4), in vitro çizik testi yöntemi ile yara iyileşmesi üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, özellikle 24. saatte EX2 (*Calendula officinalis* L.) grubunda ortalama yara uzunluğunun $90,9 \pm 21,2 \mu\text{m}$, EM2 (*Laurus nobilis* L.) grubunda ise $121,9 \pm 25,7 \mu\text{m}$ olarak ölçüldüğü ve her iki grubun da kontrol grubuna ($179,4 \pm 26,1 \mu\text{m}$) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha kısa yara uzunluğu gösterdiği ($p < 0,001$) tespit edilmiştir. Süntar ve arkadaşları [230], *Hypericum perforatum* ve *Origanum vulgare* yağları içeren formülasyonlarda 24. saatte yara uzunluğunda yaklaşık %35–40 azalma saptandığını rapor etmiştir. Çalışmamızda *Calendula officinalis* ekstresinin kontrol grubuna göre yaklaşık %49,3 oranında yara uzunluğu azalması sağlaması,

literatürde belirtilen yara kapanma hızlarıyla kıyaslandığında dikkate değer düzeyde bir etkinlik göstermektedir. Martinotti ve Ranzato [242] tarafından bildirilen fibroblast çizik testi protokolünde, fitoterapötik ajan uygulanan gruplarda ortalama yara uzunluğunun genellikle 120–150 µm seviyelerine düştüğü belirtilmiştir. Bu verilerle karşılaştırıldığında, özellikle EX2 grubunda saptanan 90,9 µm değerinin, önceki çalışmalardan daha yüksek düzeyde bir iyileşme potansiyeline işaret ettiği söylenebilir. Ayrıca EM2 grubunda gözlenen ortalama yara uzunluğunun 121,9 µm olması, *Laurus nobilis* uçucu yağının da migrasyonu anlamlı ölçüde desteklediğini düşündürmektedir. *Calendula officinalis* L.'in yara iyileşmesini destekleyici etkisi literatürde sıklıkla vurgulanmakta olup, Shahane ve arkadaşları [243] bu bitkinin flavonoid ve triterpenoid içeriği sayesinde inflamasyonu azaltarak fibroblast proliferasyonunu uyardığını ve doku onarımını hızlandığını bildirmiştir. *Laurus nobilis* L. ise antiinflamatuvar ve antimikrobiyal özellikleriyle epitelizasyon sürecini destekleyen bir bitki olarak tanımlanmış, Fidan ve arkadaşları [171] tarafından uçucu yağlarının zengin fenolik madde ve flavonoit bileşimlerinin bu etkilerle ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca, Özcan ve Chalchat [170], *Laurus nobilis* L.'in uçucu bileşik profilinin coğrafi bölgeye bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ve bu değişkenliğin biyolojik aktivite üzerinde belirleyici rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Çalışmamızda EM2 grubunda erken dönemde gözlenen pozitif etkinin 48. saatte devam etmemesi, muhtemelen *Laurus nobilis* L.'in uçucu bileşenlerinin volatilitesi nedeniyle etkinin kısa süreli olmasına bağlanabilir. Bu bulgular, *Calendula officinalis* L. ve *Laurus nobilis* L.'in yara iyileşmesi sürecinde potansiyel fayda sağlayabileceğini, ancak etkilerinin formülasyon tipi ve uygulama süresi gibi parametrelerden önemli ölçüde etkilendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, farklı çalışmalarda kullanılan hücre hatları, serum koşulları ve çizik genişliği gibi metodolojik değişkenler, yara uzunluğu değerlerinde gözlenen farklılıkların önemli bir nedenini oluşturabilmektedir. Dolayısıyla elde ettiğimiz veriler, bitkisel ürünlerin etkili konsantrasyonlarda formüle edilmesi durumunda fibroblast migrasyonunu literatürde rapor edilen oranlardan daha yüksek düzeyde hızlandırabileceğini düşündürmektedir.

EX1 (*Plantago major* L.) ve EM3 (*Salvia officinalis* L.) gruplarında yara uzunluğu hem 24. saatte (EX1 için $144,2 \pm 34,9$ µm; EM3 için $126,9 \pm 28,5$ µm) hem

de 48. saatte (EX1 için $151,0 \pm 20,0 \mu\text{m}$; EM3 için $46,0 \pm 10,0 \mu\text{m}$) kontrol grubuna (24. saatte $179,4 \pm 26,1 \mu\text{m}$; 48. saatte $113,0 \pm 20,0 \mu\text{m}$) kıyasla daha düşük seyretmiş olmakla birlikte, bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). *Plantago major* L., allantoin ve fenolik bileşikler açısından zengin içeriğiyle bilinen bir bitkidir ve Anaya-Mancipe ve arkadaşları [229] tarafından yapılan çalışmada, bu bitkinin fibroblast proliferasyonunu artırarak yara iyileşmesini destekleyebileceği gösterilmiştir. *Salvia officinalis* L. ise kolajen sentezini uyarıcı etkileri ve belirgin antiinflamatuvar potansiyeliyle öne çıkmaktadır; Farahpour ve arkadaşları [163], adaçayı yağının bakteriyel enfeksiyon modellerinde yara kapanmasını hızlandırdığını rapor etmiştir. Bu çalışmada, her iki bitkinin de olumlu etkileri gözlenmekle birlikte, istatistiksel anlamlılığa ulaşamamış olması; formülasyon tipi, uygulama süresi, seçilen doz aralıkları veya çizik testi modelinin sınırlılıklarıyla ilişkili olabilir. Ayrıca, *Plantago major* L.'in polifenolik profili ve *Salvia officinalis* L.'in uçucu bileşik içeriği, stabilite ve hücre penetrasyonu gibi faktörlerden etkilenebileceği için, in vivo koşullarda bu bitkilerin etkinliğinin daha belirgin hale gelebileceği düşünülmektedir. Bu bulgular, bitkisel ürünlerin yara iyileşmesindeki potansiyel faydalarının, formülasyona ve deneysel tasarıma duyarlılığını bir kez daha ortaya koymaktadır.

EM1 (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) grubunda yara uzunluğu, 24. saatte ortalama $161,7 \pm 34,2 \mu\text{m}$, 48. saatte ise $117,9 \pm 23,6 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüş ve bu değerler her iki zaman noktasında da kontrol grubuna (24. saatte $179,4 \pm 26,1 \mu\text{m}$; 48. saatte $98,1 \pm 20,4 \mu\text{m}$) kıyasla hafif bir azalma göstermiş olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). *Helichrysum italicum* uçucu yağı, özellikle caryophyllene, γ -curcumene ve neryl asetat gibi bileşenler açısından zengin olup, bu kimyasal profilin antiinflamatuvar, antioksidan ve epitelizasyonu destekleyici etkiler sunduğu literatürde belirtilmektedir. Kladar ve arkadaşları [227], bu bitkinin seskiterpen hidrokarbon içeriğinin yara iyileşmesi süreçlerinde önemli katkılar sağlayabileceğini vurgulamıştır. Benzer şekilde Talić ve arkadaşları [226], neryl asetat'ın fibroblast proliferasyonunu uyarak doku onarımını destekleyebileceğini ifade etmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgular, EM1 emülsiyonunun yara kapanmasını pozitif yönde etkileyebileceğini düşündürse de gözlenen etkinin anlamlı düzeye ulaşmaması, kullanılan konsantrasyonun biyolojik yanıt oluşturmak için yeterli olmaması ya da uçucu bileşenlerin volatil özellikleri nedeniyle hücre tabakasıyla

temas süresinin sınırlı kalmasına bağlanabilir. Ayrıca Andjić ve arkadaşları [168], *Helichrysum italicum* uçucu yağının in vitro modellerde antiinflamatuvar etkilerinin daha çok oksidatif stresin modülasyonu yoluyla ortaya çıktığını ve migrasyon üzerindeki etkilerinin doz bağımlı olabileceğini ifade etmiştir. Bu nedenle, *Helichrysum italicum* emülsiyonlarının yara iyileştirici potansiyelinin daha geniş konsantrasyon aralıklarında ve farklı taşıyıcı sistemlerle değerlendirilmesi önerilmektedir.

EM4 (*Origanum onites* L.) grubunda yara uzunluğu 24. saatte ortalama $135,5 \pm 29,3$ μm , 48. saatte ise $42,0 \pm 5,1$ μm olarak ölçülmüş olup, her iki zaman noktasında da kontrol grubuna (24. saatte $179,4 \pm 26,1$ μm ; 48. saatte $98,1 \pm 20,4$ μm) kıyasla daha düşük seyretmiş, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır ($p > 0,05$). *Origanum onites* L.'nin karvakrol ve timol gibi fenolik monoterpenler açısından zengin olduğu ve bu bileşenlerin güçlü antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antioksidan etkiler sunduğu Spyridopoulou ve arkadaşları [244] ile Avola ve arkadaşları [245] tarafından ortaya konmuştur. Bu özelliklerin fibroblast migrasyonu ve proliferasyonunu destekleyerek yara kapanmasını hızlandırıcı potansiyel yaratabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda elde edilen veriler, EM4 emülsiyonunun her iki zaman noktasında da yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini düşündürmekle birlikte, gözlenen farkların istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmaması, uygulanan konsantrasyon aralığının yeterli biyolojik yanıt oluşturmakta sınırlı kalmış olabileceğini ya da emülsiyonun hücre tabakasıyla etkileşiminin kısıtlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca uçucu yağın volatil yapısı nedeniyle etkisinin zaman içinde azalmasının da bu sonuçlara katkıda bulunmuş olabileceği değerlendirilmektedir. Bu nedenle, *Origanum onites* L. emülsiyonlarının yara iyileştirici etkileri daha yüksek örneklem sayıları ve farklı konsantrasyonlarda tekrar araştırılmalıdır.

Buna karşılık, EX3 (*Hypericum perforatum* L.) grubunda yara uzunluğu 24. saatte $324,1 \pm 32,7$ μm olarak ölçülmüş ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$); ancak 48. saatte ölçülen yara uzunluğu $192,3 \pm 30,8$ μm olup bu fark istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır ($p > 0,05$). EX4 (*Matricaria recutita* L.) grubunda ise 24. saatte yara uzunluğu $259,2 \pm 33,6$ μm , 48. saatte ise $198,4 \pm 27,9$ μm olarak saptanmış ve her iki

zaman noktasında da kontrol grubuna (24. saatte $179,4 \pm 26,1 \mu\text{m}$, 48. saatte $98,1 \pm 20,4 \mu\text{m}$) göre anlamlı derecede daha yüksek değerler göstermiştir ($p < 0.001$). Bu bulgular, EX3'ün yalnızca erken dönemde iyileşmeyi belirgin şekilde yavaşlattığını, EX4'ün ise hem erken hem geç dönemde yara kapanmasını olumsuz etkilediğini ortaya koymaktadır. *Matricaria recutita* L.'nin düşük konsantrasyonlarda yara iyileşmesini desteklediği ve antimikrobiyal, antiinflamatuvar özellikler taşıdığı literatürde sıklıkla bildirilmekte olup, Singh ve arkadaşları [119] bitkinin bu özelliklerini vurgulamıştır. Bununla birlikte, kullanılan ekstrenin konsantrasyonu, taşıyıcı sistemi veya stabilitesinin bu çalışmada olumsuz sonuçlara neden olmuş olabileceği değerlendirilmektedir. *Hypericum perforatum* L.'nin yara iyileştirici etkileri ise Süntar ve arkadaşlarının [230] yürüttüğü çalışmada, geleneksel formülasyonlarda başarıyla kullanıldığı ve inflamasyon modülasyonu sağladığı şeklinde tanımlanmıştır. Ek olarak, Saddiqe ve arkadaşları [246] da *Hypericum perforatum*'un fenolik bileşenlerinin yara kontraksiyonunu hızlandırıcı potansiyele sahip olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte, bizim çalışmamızda gözlemlenen yara kapanmasındaki gecikmenin, ekstrenin yetersiz penetrasyon kapasitesine, hiperisin gibi bileşiklerin fototoksik etkisine ya da optimal olmayan uygulama parametrelerine bağlı olarak gelişmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular, bitkisel ürünlerin biyolojik etkilerinin yalnızca kimyasal içeriklerine değil, aynı zamanda uygun dozlama, taşıyıcı sistem ve stabilite koşullarına da duyarlı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda elde edilen sitotoksikite test sonuçları ve yara kapanma verileri birlikte değerlendirildiğinde, ekstre ve emülsiyonların hücre canlılığı profilleri ile yara iyileştirici etkileri arasında anlamlı bir paralellik gözlenmiştir. Özellikle EX2 (*Calendula officinalis* L.), MTT testinde düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını yüksek düzeyde korumuş ($108,49 \pm 2,35$) ve belirgin sitotoksikite göstermemiştir. Çizik testi sonuçlarında ise 24. saatte kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük yara uzunluğu ($90,9 \pm 21,2 \mu\text{m}$) ile dikkat çekmiştir. Bu bulgu, *Calendula* ekstresinin fibroblast proliferasyonu ve migrasyonunu güvenli konsantrasyon aralığında güçlü şekilde desteklediğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde EM2 (*Laurus nobilis* L.), sitotoksikite testlerinde diğer uçucu yağ emülsiyonlarına kıyasla belirgin şekilde daha düşük toksisite profili sergilemiş ve hücre canlılığını %90'ın üzerinde tutmayı başarmıştır. Bu durum, 24. saatte yara

kapama hızının artmasıyla uyumlu olup, yüksek biyouyumluluk ve yara iyileştirici potansiyelin korelasyon gösterdiğini desteklemektedir. EX3 (*Hypericum perforatum* L.) ve EX4 (*Matricaria recutita* L.) ekstrelerinin sitotoksikite deneylerinde yüksek konsantrasyonlarda fibroblast canlılığını azalttığı gözlenmiş, çizik testi sonuçlarında da her iki grupta yara uzunluklarının anlamlı şekilde yüksek kalması ile bu durum tutarlı bulunmuştur. Bu bulgu, yüksek konsantrasyonlara bağlı sitotoksik etkinin yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir. Özellikle EX4 grubunda hem hücre canlılığının azalması hem de yara kapanmasının gecikmesi, Singh ve arkadaşlarının [119] bazı papatya preparatlarının konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri olduğunu bildirdiği bulgularla benzerlik göstermektedir. EM3 (*Salvia officinalis* L.) ve EM4 (*Origanum onites* L.) gruplarında sitotoksikite düzeyleri orta düzeyde gözlenmiş, yara kapanma testlerinde ise anlamlı fark olmamakla birlikte yara uzunluklarının kontrol grubundan düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, uçucu yağların hücre canlılığını belirli bir eşik değerin altına indirmedikçe fibroblast migrasyonuna sınırlı düzeyde olumlu katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, sitotoksikite profili ve yara kapanma etkinliği arasında güçlü bir ilişki olduğu, düşük toksisiteye sahip *Calendula* ve *Laurus* gruplarının yara iyileşmesini belirgin düzeyde hızlandırdığı, yüksek konsantrasyonda sitotoksikite oluşturan *Hypericum* ve *Matricaria* gruplarının ise yara kapanmasını anlamlı şekilde yavaşlattığı belirlenmiştir. Bu bulgular, fitoterapötik ajanların yara tedavisinde kullanılacak konsantrasyonlarının hem fibroblast biyouyumluluğu hem de proliferasyon kapasitesine göre titizlikle optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamıza ait kısıtlılıklar: Çizik yara modelinin başlangıcında gruplar arası yara uzunluklarının benzer olmasına dikkat edilmiş olsa da çizik işleminin tam olarak standardize edilmemiş olması ölçümler arasında varyasyonlara neden olmuş olabilir. Ayrıca ekstreler yalnızca belirli konsantrasyonlarda uygulanmış ve yara kapanması morfolojik olarak değerlendirilmiştir; ölçümlerin daha kısa zaman aralıklarında yapılmaması, iyileşme hızına dair daha ayrıntılı bilgi edinilmesini kısıtlamıştır. Bununla birlikte, çalışmamız kullanılan bitkisel preparatların hangi tip yaralarda (örneğin diyabetik ülser, yanık, cerrahi yara gibi) daha etkili olduğuna dair doğrudan bir çıkarım sağlamamaktadır. Farklı komorbiditelere sahip hasta gruplarında yara iyileşmesi üzerine etkilerin değerlendirilmesi ve bulguların klinik geçerliliğinin

ortaya konması için ileri in vivo ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızın güçlü yönleri: Bitkisel ürünlerin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini çok yönlü ve kapsamlı biçimde ele almasıyla öne çıkmaktadır. Çalışmada hem dört farklı bitki ekstresi (*Matricaria recutita* L. çiçek, *Hypericum perforatum* L. toprak üstü kısmı, *Calendula officinalis* L. çiçek ve *Plantago major* L. yaprak) hem de dört farklı uçucu yağ emülsiyonu (*Laurus nobilis* L. yaprak, *Salvia officinalis* L. yaprak, *Origanum onites* L. toprak üstü kısmı ve *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. toprak üstü kısmı) in vitro çizik testi modeliyle değerlendirilmiş, yara iyileşmesi süreçleri hem 24. hem de 48. saatte olmak üzere zaman bağımlı olarak analiz edilmiştir. Ayrıca MTT testi ile sitotoksosite değerlendirilerek biyolojik etkinin yanında hücre canlılığı da dikkate alınmış ve ürünlerin biyouyumluluk profilleri ortaya konmuştur. Kullanılan tüm bitkisel materyallerin fenolik madde, flavonoid, karotenoid, hiperisin ve apigenin-7-glukozit gibi içerikleri validasyonu yapılmış HPLC, UV-VIS ve GC-FID/MS yöntemleri ile nicel olarak analiz edilmiş ve elde edilen fitokimyasal profiller ile biyolojik etkiler arasında anlamlı bağlantılar kurulmuştur. Çalışmamız ayrıca farklı disiplinlerin bir araya gelerek klinik bir problem olan yara iyileşmesi üzerine, kendi alanlarında katkılar sağlayarak iş birliklerini güçlendirmiştir.

6. SONUÇ

Bu çalışma, bitkisel ekstre ve uçucu yağ emülsiyonlarının in vitro yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini kapsamlı olarak değerlendirmiş ve özellikle *Calendula officinalis* L. (EX2) ile *Laurus nobilis* L. (EM2) gruplarının erken fazda yara kapanmasını anlamlı düzeyde hızlandırdığını göstermiştir. Elde edilen bulgular, bu doğal ürünlerin uygun doz ve formülasyonlarda farmasötik amaçlı yara bakımında potansiyel olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, moleküler düzeyde yapılacak TNF- α , IL-6, VEGF ve TGF- β gibi belirteç analizleriyle biyolojik etkilerin daha iyi anlaşılması ve in vivo modellerle doğrulanması, klinik uygulanabilirlik açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

Yara iyileşmesinde bitkisel preparatların etkinliği, yalnızca içerik profillerine değil; kullanılan konsantrasyon, formülasyon tipi, taşıyıcı sistem özellikleri ve uygulama süresine de bağlıdır. Bu bağlamda, *Calendula officinalis* ekstresi ve *Laurus nobilis* uçucu yağı içeren formülasyonların yara yönetiminde özellikle anestezi ve yoğun bakım pratiğinde destekleyici ajanlar olarak değerlendirilmesi mümkündür. Yoğun bakım hastalarında yara iyileşmesinin immün yetmezlik, doku perfüzyon bozukluğu ve inflamatuvar süreçler nedeniyle gecikebildiği göz önüne alındığında, antiinflamatuvar ve fibroblast aktivitesini artırıcı özelliklere sahip bitkisel ürünlerin kullanımı multidisipliner bakım yaklaşımlarını güçlendirebilir.

Sonuç olarak, çalışma kapsamında seçilen bitkisel ekstre ve uçucu yağların literatürde etkili olduğu bildirilmesine rağmen, bitki bileşimi, uygulanan yöntem ve formülasyon parametreleri sonuçlar üzerinde belirleyici olmuştur. Bulgular, özellikle *Calendula officinalis* L. ve *Laurus nobilis* L.'nin yara iyileşmesini destekleyici etkilerini ortaya koymuş olup, ileri düzey biyolojik ve klinik araştırmalarla bu verilerin doğrulanması gerekliliğini vurgulamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
2. Benbow, M., *The skin. 1. Its structure and functions*. Nurs Times, 2002. **98**(25): p. 43-6.
3. Rittié, L., *Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals*. J Cell Commun Signal, 2016. **10**(2): p. 103-20.
4. Fenner, J. and R.A. Clark, *Anatomy, physiology, and functional relationships in human skin*. In *Skin Tissue Models* Academic Press., 2016: p. 1–19.
5. Bichakjian, C.K. and T.M. Johnson, *Cutaneous biology*. Dermatologic Clinics, 2007. **25**(4): p. 487–499.
6. Nestle, F.O., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 679-91.
7. Ita, K., *Polyplexes for gene and nucleic acid delivery: Progress and bottlenecks*. Eur J Pharm Sci, 2020. **150**: p. 105358.
8. Gilaberte, Y., et al. , *Dermal structural changes and biomechanical alterations*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology,, 2016. **30**(Suppl. 2): p. 1-9.
9. Kirby, J.S., et al., *Bundled payment for actinic keratosis management: Pilot evaluation of developed models*. J Am Acad Dermatol, 2019. **80**(3): p. 679-684.
10. Gilaberte, Y., et al. , *Dermal structural changes and biomechanical alterations*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology,, 2016. **30**(Suppl. 2): p. 1–9.
11. Şen, H., *Hipodermisin histolojik özellikleri ve endokrin fonksiyonu*. Fizyoloji ve Histoloji Dergisi, 2021. **9**(2): p. 101–109.
12. Zubair, M., et al., *Effects of Plantago major L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay*. J Ethnopharmacol, 2012. **141**(3): p. 825-30.
13. Elias, P.M., *Stratum corneum defensive functions: an integrated view*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(2): p. 183-200.
14. Holick, M.F., *Vitamin D deficiency*. N Engl J Med, 2007. **357**(3): p. 266-81.

15. Harder, J., et al., *A peptide antibiotic from human skin*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 861.
16. Takeo, M., W. Lee, and M. Ito, *Wound healing and skin regeneration*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(1): p. a023267.
17. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
18. Lazarus, G.S., et al., *Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing*. Archives of Dermatology, 1994 **130**(4): p. 489-493.
19. Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj, *The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms*. J Int Med Res, 2009. **37**(5): p. 1528-42.
20. Han, G. and R. Ceilley, *Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments*. Adv Ther, 2017. **34**(3): p. 599-610.
21. Young, A., *Wound types and their management*. Primary Health Care, 2012. **22**(7): p. 34-40.
22. Singer, A.J. and A.B. Dagum, *Current management of acute cutaneous wounds*. N Engl J Med, 2008. **359**(10): p. 1037-46.
23. Edlich, R.F., et al. , *Modern concepts of the diagnosis and treatment of lacerations*. The Journal of Emergency Medicine, 2005. **29**(3): p. 289-296.
24. Kirsner, R.S. and W.H. Eaglstein, *The wound healing process*. Dermatologic Clinics, 1993. **11**(4): p. 629-640.
25. Brusselaers, N., et al., *Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality*. Crit Care, 2010. **14**(5): p. R188.
26. Brienza, D.M., et al., *Predictors of pressure ulcer incidence in nursing home residents: a multivariate analysis of risk factors*. Wound Repair and Regeneration, 2010. **18**(4): p. 298-308.
27. *Prevention and Treatment of Pressure Ulcers/Injuries: Clinical Practice Guideline*. in *European Pressure Ulcer Advisory Panel (EPUAP), National Pressure Injury Advisory Panel (NPIAP), Pan Pacific Pressure Injury Alliance (PPPIA)*. 2019.
28. Black, J., et al., *National Pressure Ulcer Advisory Panel's updated pressure ulcer staging system*. Adv Skin Wound Care, 2007. **20**(5): p. 269-74.
29. Mangram, A.J., et al., *Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Am J Infect Control, 1999. **27**(2): p. 97-132; quiz 133-4; discussion 96.
30. Onyekwelu, I., et al., *Surgical Wound Classification and Surgical Site Infections in the Orthopaedic Patient*. J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev, 2017. **1**(3): p. e022.
31. Wallace, H.A., B.M. Basehore, and P.M. Zito, *Wound Healing Phases*, in *StatPearls*. 2025, StatPearls Publishing

32. Baltzis, D., I. Eleftheriadou, and A. Veves, *Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights*. Adv Ther, 2014. **31**(8): p. 817-36.
33. Vanwijck, R., *[Surgical biology of wound healing]*. Bull Mem Acad R Med Belg, 2001. **156**(3-4): p. 175-84; discussion 185.
34. Pool, J.G., *Normal hemostatic mechanisms: a review*. Am J Med Technol, 1977. **43**(8): p. 776-80.
35. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 12s-34s.
36. Sen, C.K. and S. Roy, *Redox signals in wound healing*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(11): p. 1348-61.
37. Strecker-McGraw, M.K., T.R. Jones, and D.G. Baer, *Soft tissue wounds and principles of healing*. Emerg Med Clin North Am, 2007. **25**(1): p. 1-22.
38. Jespersen, J., *Pathophysiology and clinical aspects of fibrinolysis and inhibition of coagulation. Experimental and clinical studies with special reference to women on oral contraceptives and selected groups of thrombosis prone patients*. Dan Med Bull, 1988. **35**(1): p. 1-33.
39. Sinno, H. and S. Prakash, *Complements and the wound healing cascade: an updated review*. Plast Surg Int, 2013. **2013**: p. 146764.
40. Reinke, J.M. and H. Sorg, *Wound repair and regeneration*. Eur Surg Res, 2012. **49**(1): p. 35-43.
41. Robson, M.C., D.L. Steed, and M.G. Franz, *Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories*. Curr Probl Surg, 2001. **38**(2): p. 72-140.
42. Lawrence, W.T., *Physiology of the acute wound*. Clin Plast Surg, 1998. **25**(3): p. 321-40.
43. Sahni, A., T. Odrlicin, and C.W. Francis, *Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7554-9.
44. Tuan, T.L., et al., *Increased plasminogen activator inhibitor-1 in keloid fibroblasts may account for their elevated collagen accumulation in fibrin gel cultures*. Am J Pathol, 2003. **162**(5): p. 1579-89.
45. Martin, P., *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 75-81.
46. Clark, R.A., *Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair*. Arch Dermatol, 1988. **124**(2): p. 201-6.
47. Hart, J., *Inflammation. I: Its role in the healing of acute wounds*. J Wound Care, 2002. **11**(6): p. 205-9.
48. Wilgus, T.A., S. Roy, and J.C. McDaniel, *Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013. **2**(7): p. 379-388.

49. Flanagan, M., *The physiology of wound healing*. J Wound Care, 2000. **9**(6): p. 299-300.
50. Samuels, P. and A.K. Tan, *Fetal scarless wound healing*. J Otolaryngol, 1999. **28**(5): p. 296-302.
51. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *Wound healing: an overview*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 1e-S-32e-S.
52. Ramasastry, S.S., *Acute wounds*. Clin Plast Surg, 2005. **32**(2): p. 195-208.
53. Ennis, W.J. and P. Meneses, *Wound healing at the local level: the stunned wound*. Ostomy Wound Manage, 2000. **46**(1A Suppl): p. 39S-48S; quiz 49S-50S.
54. Sieggreen, M.Y., *Healing of physical wounds*. Nurs Clin North Am, 1987. **22**(2): p. 439-47.
55. SL, R., K. B, and C. R, *6 th ed, Acut and Chronic Inflammation: Robbins SL. Pathologic basic of disease. Philadelphia: WB Saunders: 26-59*. 2000.
56. Leibovich, S.J. and R. Ross, *The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum*. Am J Pathol, 1975. **78**(1): p. 71-100.
57. Sayek, İ., *Temel Cerrahi* Ankara Güneş Kitabevi, 2004. **157**: p. 1503-1522.
58. Brunicardi, F.C., *Principles of surgery 8th ed*. 2005: New York, USA. p. 223-248.
59. Li, J., J. Chen, and R. Kirsner, *Pathophysiology of acute wound healing*. Clin Dermatol, 2007. **25**(1): p. 9-18.
60. CM, T., B. RD, and e.a. Evers BM, *Sabiston textbook of Surgery*. The biological basis of modern surgical practice, ed. M.D. In: Leong M, Phillips GL, eds. 2017, Amsterdam: Elsevier.
61. Drucker, D.E., et al. , *Fibroblast activity during wound healing*. Journal of Investigative Dermatology, 1998. **110**(3): p. 330–337.
62. Robbins, S.L., V. Kumar, and R.S. Cotran, *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. (6th ed.) ed. 2000: W.B. Saunders.
63. Reger, J.F. and M.K. Dabbous, *A comparative fine structure study on myofibroblasts from a cultured human and an in-situ rat tumor source*. J Submicrosc Cytol Pathol, 1988. **20**(3): p. 501-8.
64. Matthew, C.W., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *Extracellular matrix bioscaffolds for tissue reconstruction*. Translational Research, 2009. **163**(4): p. 268–285.
65. Reddy, G.K. and C.S. Enwemeka, *A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues*. Clin Biochem, 1996. **29**(3): p. 225-9.
66. Akça, T. and E. Öcal, *Yara iyileşmesi*. Fırat Tıp Dergisi, 2010. **15**(1): p. 55-64.

67. Marx, J., et al. , *Angiogenesis in wound healing: The role of VEGF*. Surgery, 1994. **115(6)**: p. 564–572.
68. Hendriks, T. and M.W.J. B., *Wound healing in the elderly: Deficiencies and strategies for improvement*. Age and Ageing, 1990. **19(Suppl)**: p. 19–22.
69. Remensnyder, J.P. and G. Majno, *The healing of wounds*. American Journal of Pathology, 1968. **52(2)**: p. 401–417.
70. Posthauer, M.E., B. Dorner, and N. Collins, *Nutrition: a critical component of wound healing*. Adv Skin Wound Care, 2010. **23(12)**: p. 560-72; quiz 573-4.
71. Hendriks, T. and W.J. Mastboom, *Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair*. Dis Colon Rectum, 1990. **33(10)**: p. 891-901.
72. Midwood, K.S., L.V. Williams, and J.E. Schwarzbauer, *Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36(6)**: p. 1031-7.
73. Lau, K., R. Paus, and S. Tiede, *Hair cycle–regulated expression of versican in human hair follicles*. Journal of Investigative Dermatology, 2006. **126(6)**: p. 1171–1175.
74. Shyam Bass, S. and A. kaur., *Key Advancements in The Treatment Strategies To Accelerate Wound Healing*. . Modern Phytomorphology, 2021. **15(3)**.
75. Chhabra, S., et al., *Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS*. J Maxillofac Oral Surg, 2017. **16(4)**: p. 403-423.
76. Eming, S.A., T. Krieg, and J.M. Davidson, *Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms*. Journal of Investigative Dermatology, 2014. **127(3)**: p. 514-525.
77. Sen, C.K., *Wound healing essentials: let there be oxygen*. Wound Repair Regen, 2009. **17(1)**: p. 1-18.
78. Barrientos, S., et al., *Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound Repair Regen, 2008. **16(5)**: p. 585-601.
79. Falanga, V., *Wound healing and its impairment in the diabetic foot*. Lancet, 2005. **366(9498)**: p. 1736-43.
80. Koria, P., *Delivery of growth factors for tissue regeneration and wound healing*. . BioDrugs, 2012. **26(3)**: p. 163-175.
81. Guo, S. and L.A. DiPietro, *Factors affecting wound healing*. J Dent Res, 2010. **89(3)**: p. 219-29.
82. Gosain, A. and L.A. DiPietro, *Aging and wound healing*. World J Surg, 2004. **28(3)**: p. 321-6.
83. Keylock, K.T., et al., *Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294(1)**: p. R179-84.
84. Öztürkcan, S., et al., *Keloidlerin oluşumunda etnik farklılıkların etkisi*. Türkderm, 2005. **39(3)**: p. 136–139.

85. Bayat, A., et al. , *Keloid and hypertrophic scar: A review of the literature*. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2005. **58(10)**: p. 1078–1086.
86. Sen, C.K., *Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2019. **8(2)**: p. 39-48.
87. Kurumlu, Z. and H. Çelebi, *Malnütrisyonun yara iyileşmesi üzerindeki etkisi Türkiye Klinikleri Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi*, 2007. **3(34)**: p. 58–63.
88. Bayır, H., C. Kırkıl, and F. Yavuz, *Kronik yara bakımında beslenmenin önemi*. Gülhane Tıp Dergisi, 2011. **53(3)**: p. 230–234.
89. Burgess, J.L., et al., *Diabetic Wound-Healing Science*. Medicina (Kaunas), 2021. **57(10)**.
90. Woo, K., E.A. Ayello, and R.G. Sibbald, *The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge*. Adv Skin Wound Care, 2007. **20(2)**: p. 99-117; quiz 118-9.
91. Galkowska, H., U. Wojewodzka, and W.L. Olszewski, *Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers*. Wound Repair Regen, 2006. **14(5)**: p. 558-65.
92. Armstrong, D.G., A.J.M. Boulton, and S.A. Bus, *Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence*. N Engl J Med, 2017. **376(24)**: p. 2367-2375.
93. Game, F., W. Jeffcoate, and J. Apelqvist, *Risk factors for foot ulceration in diabetes* Diabetologia, 2016. **59(1)**: p. 20–27.
94. Sakuragi, T., S. Inoue, and M. Iwase, *Carbon monoxide from cigarette smoking delays cutaneous wound healing in mice*. International Journal of Experimental Pathology, 1997. **78(4)**: p. 217–222.
95. Mosely, L.H., F. Finseth, and C. Deveney, *The effect of cigarette smoking on flap survival: an experimental study in a rat model*. Plastic and Reconstructive Surgery, 2005. **115(4)**: p. 1025–1030.
96. Radek, K.A., *Immune defense and wound healing in alcohol-exposed skin*. Advances in Wound Care, 2012. **1(3)**: p. 108–113.
97. Rodriguez, P.G., et al., *The role of oxygen in wound healing: a review of the literature*. Dermatol Surg, 2008. **34(9)**: p. 1159-69.
98. Guillier, M., M. Prat, and A. Legrand, *Hypoxia and wound healing: Molecular and cellular mechanisms*. Revue Médicale Interne, 2007. **28(9)**: p. 616–621.
99. Zink, M., C. Carlsson, and F. Hölzle, *Hyperbaric oxygen in wound healing*. Deutsches Ärzteblatt International, 2003. **100(11)**: p. 647–653.
100. Menke, N.B., et al., *The physiology of wound healing*. Wound Repair and Regeneration, 2007. **15(6)**: p. 712–721.
101. Bisla, R.S. and D.L. Tanelian, *Bacterial toxins and their effect on wound healing*. Plastic and Reconstructive Surgery, 1992. **90(6)**: p. 1145–1150.
102. Gurbet, A., *Enfekte yaralarda iyileşme dinamikleri*. Türkiye Klinikleri Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi, 2008. **4(3)**: p. 155-162.

103. Bowler, P.G., B.I. Duerden, and D.G. Armstrong, *Wound microbiology and associated approaches to wound management*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(2): p. 244-69.
104. Schultz, G.S., et al., *Wound bed preparation: a systematic approach to wound management*. Wound Repair Regen, 2003. **11 Suppl 1**: p. S1-28.
105. Winter, G.D., *Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig*. Nature, 1962. **193**: p. 293-4.
106. Mustoe, T.A., K. O'Shaughnessy, and O. Kloeters, *Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 35s-41s.
107. Hansson, C., et al., *The effects of occlusive and conventional dressings on wound healing*. European Journal of Surgery, 1993. **159**(5): p. 275-278.
108. Thomas, S., *Wound management and dressings*. Pharmaceutical Press, 1990.
109. Steed, D.L., *Debridement*. Am J Surg, 2004. **187**(5a): p. 71s-74s.
110. Argenta, L.C. and M.J. Morykwas, *Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience*. Ann Plast Surg, 1997. **38**(6): p. 563-76; discussion 577.
111. Stechmiller, J.K., *Understanding the role of nutrition and wound healing*. Nutr Clin Pract, 2010. **25**(1): p. 61-8.
112. Barker, A.T., L.F. Jaffe, and J.W. Vanable, *The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery*. The American Journal of Physiology, 1984. **242**(3): p. R358-R366.
113. Bekeschus, S., et al., *Medical gas plasma stimulation of wound healing mechanisms*. Biological Chemistry, 2020. **401**(8): p. 873-886.
114. Natarajan, V., P.V. Venugopal, and T. Menon, *Effect of Azadirachta indica (neem) on the growth pattern of dermatophytes*. Indian J Med Microbiol, 2003. **21**(2): p. 98-101.
115. Pereira, A.S., C.A. Figueiredo, and R.S. Cordeiro, *The wound healing effects of Salvia officinalis L. extract: A molecular perspective*. . Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018. **101**: p. 453-460.
116. Schempp, C.M., et al., *Topical application of St. John's wort (Hypericum perforatum) and its effect on epithelial wound healing in pigs*. Research in Veterinary Science, 2003. **74**(3): p. 271-276.
117. Sala, A., et al., *Anti-inflammatory and antioxidant properties of Helichrysum italicum*. . 68(09), 2002: p. 791-795.
118. *Matricaria recutita L. (Alman papatyası)*. Public domain, Rob Hille, Wikimedia Commons (2007).
119. Singh, O., et al., *Chamomile (Matricaria chamomilla L.): An overview*. Pharmacogn Rev, 2011. **5**(9): p. 82-95.

120. Jarić, S., et al., *An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia)*. J Ethnopharmacol, 2007. **111**(1): p. 160-75.
121. Hur, M.H. and S.H. Han, *[Clinical trial of aromatherapy on postpartum mother's perineal healing]*. Taehan Kanho Hakhoe Chi, 2004. **34**(1): p. 53-62.
122. Kupfersztain, C., et al., *The immediate effect of natural plant extract, Angelica sinensis and Matricaria chamomilla (Climex) for the treatment of hot flushes during menopause. A preliminary report*. Clin Exp Obstet Gynecol, 2003. **30**(4): p. 203-6.
123. Verdier-Sévrain, S., F. Bonté, and B. Gilchrest, *Biology of estrogens in skin: implications for skin aging*. Exp Dermatol, 2006. **15**(2): p. 83-94.
124. Mills, S.J., et al., *The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(5): p. 1053-62.
125. Ramos-e-Silva, M., et al., *Clinical evaluation of fluid extract of Chamomilla recutita for oral aphthae*. J Drugs Dermatol, 2006. **5**(7): p. 612-7.
126. Mazokopakis, E.E., et al., *Wild chamomile (Matricaria recutita L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis*. Phytomedicine, 2005. **12**(1-2): p. 25-7.
127. Kobayashi, Y., R. Takahashi, and F. Ogino, *Antipruritic effect of the single oral administration of German chamomile flower extract and its combined effect with antiallergic agents in ddY mice*. J Ethnopharmacol, 2005. **101**(1-3): p. 308-12.
128. Khayyal, M.T., et al., *Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast) and its components against ulcers and rebound acidity*. Phytomedicine, 2006. **13 Suppl 5**: p. 56-66.
129. Ashida, Y., M. Denda, and T. Hirao, *Histamine H1 and H2 receptor antagonists accelerate skin barrier repair and prevent epidermal hyperplasia induced by barrier disruption in a dry environment*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(2): p. 261-5.
130. Quatresooz, P., et al., *Healing effect of ketanserine on chronic leg ulcers in patients with diabetes*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2006. **20**(3): p. 277-81.
131. Gomaa, A., et al., *Matricaria chamomilla extract inhibits both development of morphine dependence and expression of abstinence syndrome in rats*. J Pharmacol Sci, 2003. **92**(1): p. 50-5.
132. Poonawala, T., et al., *Opioids heal ischemic wounds in the rat*. Wound Repair Regen, 2005. **13**(2): p. 165-74.
133. Hsiao, G., et al., *Morphine-potentiated platelet aggregation in in vitro and platelet plug formation in in vivo experiments*. J Biomed Sci, 2003. **10**(3): p. 292-301.
134. *Hypericum perforatum L. çiçeği*. Fotoğraf: H. Zell (9 Haziran 2010), Wikimedia Commons; CC BY-SA 3.0.

135. WHO. in *World Health Organization Monographs on Selected Medicinal Plants*. 1999. Geneva.
136. Süntar, I.P., et al., *Investigations on the in vivo wound healing potential of Hypericum perforatum L.* J Ethnopharmacol, 2010. **127**(2): p. 468-77.
137. Lavagna, S.M., et al., *Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section.* Farmaco, 2001. **56**(5-7): p. 451-3.
138. *Calendula officinalis L. (Nevin) bitkisi (fotoğraf: Needpix, public domain).*
139. B, M., K. S, and B. N., *Phytochemical constituents and pharmacological activities of Calendula officinalis Linn (Asteraceae): a review.* Trop J Pharmaceut Res, 2009. **8**: p. 455–65.
140. Fronza, M., et al., *Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts.* J Ethnopharmacol, 2009. **126**(3): p. 463-7.
141. Kapil, A. and S. Sharma, *Effect of oleanolic acid on complement in adjuvant- and carrageenan-induced inflammation in rats.* J Pharm Pharmacol, 1995. **47**(7): p. 585-7.
142. Nicolaus, C., et al., *In vitro studies to evaluate the wound healing properties of Calendula officinalis extracts.* J Ethnopharmacol, 2017. **196**: p. 94-103.
143. Fonseca, Y.M., et al., *Protective effect of Calendula officinalis extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion.* J Ethnopharmacol, 2010. **127**(3): p. 596-601.
144. *Public domain (yazar Iorsh tarafından, Wikimedia Commons).*
145. The Plant List (2013). Version 1.1. Accessed December 9, h.w.t.o.t.s.q.P.m.
146. Najafian, Y., et al., *Plantago major in Traditional Persian Medicine and modern phytotherapy: a narrative review.* Electron Physician, 2018. **10**(2): p. 6390-6399.
147. Samuelsen, A.B., *The traditional uses, chemical constituents and biological activities of Plantago major L. A review.* J Ethnopharmacol, 2000. **71**(1-2): p. 1-21.
148. Wu, H., et al., *Plantamajoside ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing NF- κ B and MAPK activation.* Int Immunopharmacol, 2016. **35**: p. 315-322.
149. Herold, A., et al., *Hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity.* Roum Arch Microbiol Immunol, 2003. **62**(1-2): p. 117-29.
150. Rahimi, R., M.R. Shams-Ardekani, and M. Abdollahi, *A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease.* World J Gastroenterol, 2010. **16**(36): p. 4504-14.
151. *Riverside Garden Centre. (t.y.). Origanum onites. Riverside Garden Centre.*

152. Ietswaart, J.H., *A Taxonomic Revision of the Genus Origanum (Labiatae)*. 1980, Springer Netherlands: Dordrecht.
153. Vokou, D., S. Kokkini, and J.-M. Bessière, *Origanum onites (Lamiaceae) in Greece: Distribution, Volatile Oil Yield, and Composition*. Economic Botany, 1988. **42(3)**: p. 407–412.
154. Tepe, B., A. Cakir, and A. Sihoglu Tepe, *Medicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of Origanum onites (L.): A Review*. Chem Biodivers, 2016. **13(5)**: p. 504-20.
155. Altintas, A., et al., *Characterization of volatile constituents from Origanum onites and their antifungal and antibacterial activity*. J AOAC Int, 2013. **96(6)**: p. 1200-8.
156. Ayvaz, A., et al., *Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects*. J Insect Sci, 2010. **10**: p. 21.
157. Bostancıoğlu, R.B., et al., *Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of Origanum onites L. essential oil*. Food Chem Toxicol, 2012. **50(6)**: p. 2002-8.
158. Baranauskaite, J., et al., *The Influence of Different Oregano Species on the Antioxidant Activity Determined Using HPLC Postcolumn DPPH Method and Anticancer Activity of Carvacrol and Rosmarinic Acid*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 1681392.
159. Bora, L., et al., *An Up-To-Date Review Regarding Cutaneous Benefits of Origanum vulgare L. Essential Oil*. Antibiotics (Basel), 2022. **11(5)**.
160. *Wikimedia Commons. (t.y.). Salvia officinalis in pot.*
161. Hendry, E.R., et al., *Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009. **64(6)**: p. 1219-1225.
162. Raal, A., A. Orav, and E. Arak, *Composition of the essential oil of Salvia officinalis L. from various European countries*. Nat Prod Res, 2007. **21(5)**: p. 406-11.
163. Farahpour, M.R., et al., *Accelerated healing by topical administration of Salvia officinalis essential oil on Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus infected wound model*. Biomed Pharmacother, 2020. **128**: p. 110120.
164. Moro, A. (2022, 5 Haziran). *Helichrysum italicum (Roth) G. Don [Fotoğraf]*. Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste. CC BY-SA 4.0. Erişim: [civico Orto Botanico web sayfası](#).
165. Sarais, G., et al., *Targeted and untargeted mass spectrometric approaches in discrimination between Myrtus communis cultivars from Sardinia region*. J Mass Spectrom, 2016. **51(9)**: p. 704-15.
166. Addis, R., et al., *Fibroblast Proliferation and Migration in Wound Healing by Phytochemicals: Evidence for a Novel Synergic Outcome*. Int J Med Sci, 2020. **17(8)**: p. 1030-1042.

167. Aćimović, M., et al., *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Essential Oil from Serbia: Chemical Composition, Classification and Biological Activity—May It Be a Suitable New Crop for Serbia? *Agronomy*. 11(7), 2021: p. 1282.
168. Andjić, M., et al., *Formulation and Evaluation of Helichrysum italicum Essential Oil-Based Topical Formulations for Wound Healing in Diabetic Rats*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(8).
169. InfoFlora. (t.y.). *Laurus nobilis* L. [Fotoğraf]. Kamu mali.
170. Ozcan, M. and J.C. Chalchat, *Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of laurel (Laurus nobilis L.) leaves growing wild in Turkey*. *J Med Food*, 2005. **8**(3): p. 408-11.
171. Fidan, H., et al., *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Laurus nobilis L. Essential Oils from Bulgaria*. *Molecules*, 2019. **24**(4).
172. Alejo-Armijo, A., J. Altarejos, and S. Salido, *Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (Laurus nobilis)*. *Nat Prod Commun*, 2017. **12**(5): p. 743-757.
173. Kupeli, E., O. Ilkay, and E. and Yesilada, *Evaluation of Some Plants Used in Turkish Folk Medicine for Their Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities*. *Pharmaceutical Biology*, 2007. **45**(7): p. 547-555.
174. Saab, A.M., et al., *Antioxidant and antiproliferative activity of Laurus nobilis L. (Lauraceae) leaves and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukaemia cells*. *Nat Prod Res*, 2012. **26**(18): p. 1741-5.
175. Süntar, I., et al., *Comparative pharmacological and phytochemical investigation on the wound-healing effects of the frequently used essential oils*. *Journal of Essential Oil Research*, 2014. **26**(1): p. 41-49.
176. Antoni, D., et al., *Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(3): p. 5517-27.
177. Polat, E., *Üç Boyutlu Hücre Kültürü Sistemlerine Güncel Yaklaşımlar*. Namık Kemal Tıp Dergisi,, 2020. **8**(1): p. 84-92.
178. Kapałczyńska, M., et al., *2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures*. *Arch Med Sci*, 2018. **14**(4): p. 910-919.
179. Duval, K., et al., *Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture*. *Physiology* (Bethesda), 2017. **32**(4): p. 266-277.
180. Ishiyama, M., et al., *A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, WST-1*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1996. **19**(11): p. 1518-1520.
181. Riss, T.L., et al., *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, S. Markossian, et al., Editors. 2004, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD).
182. Adan, A., Y. Baran, and M. Çulha, *Cell viability assays: A focus on the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016. **30**(4): p. 701-710.

183. Grela, E., J. Kozłowska, and A. Grabowiecka, *Current methodology of MTT assay in bacteria - A review*. Acta Histochem, 2018. **120**(4): p. 303-311.
184. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. Biotechnol Annu Rev, 2005. **11**: p. 127-52.
185. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
186. van Meerloo, J., G.J. Kaspers, and J. Cloos, *Cell sensitivity assays: the MTT assay*. Methods Mol Biol, 2011. **731**: p. 237-45.
187. P, E. and B. T., *Güncel İn Vitro Sitotoksikite Testleri*. HUIPHARM, 2021. **41**(1): p. 45-63.
188. van den Broek, L.J., et al., *Models for studying scar formation in human skin*. Experimental Dermatology, 2014. **23**(6): p. 382-385.
189. Sami, D.G., H.H. Heiba, and A.A.H. Abdellatif, *Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models*. Wound Medicine, 2019.
190. Bettinger, D.A., et al., *The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis*. Plast Reconstr Surg, 1996. **98**(5): p. 827-33.
191. Vidmar, J., C. Chingwaru, and W. Chingwaru, *Mammalian cell models to advance our understanding of wound healing: a review*. J Surg Res, 2017. **210**: p. 269-280.
192. Çiçek, M., et al., *Cytotoxic activity and evaluation of in vitro release of apigenin 7-O-glucoside from the topical pharmaceutical formulation containing Matricaria recutita L. flower extract*. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 2024. **81**(3): p. 483–501.
193. Skalkos, D., et al., *Photophysical properties of Hypericum perforatum L. extracts--novel photosensitizers for PDT*. J Photochem Photobiol B, 2006. **82**(2): p. 146-51.
194. Toiu, A., et al., *Determination of total carotenoid content in some Calendula officinalis and Tagetes patula varieties*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2016. **44**(1): p. 224–229.
195. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, *Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Am J Enol Vitic, 1965. **16**(3): p. 144-158.
196. Woisky, R.G.v.S., A. , *Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control*. J Apic Res, 1998. **37**(2): p. 99-105.
197. Alğın Yapar, E., et al., *Phytoactive essential oils-composed water-free organogels: Development, characterization and proof of antibacterial activity*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2024. **97**.
198. Xu, X.e.a., *Plant-derived compounds in wound healing: A review*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2018. **1864**(11): p. 3086-3099.

199. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 329-33.
200. Bakanlığı, T.C.S., *Türk Farmakopesi II – Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu II. "Papatyta Çiçeği"*. 2016, Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Yayınları.
201. Bakanlığı, T.C.S., *Türk Farmakopesi II – Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu II. "Sarı Kantaron"*. 2016, Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Yayınları.
202. Toiu, A., Vlase, L., Gheldiu, A.-M., Benedec, D., Oniga, I., & Silaghi-Dumitrescu, R., *Determination of total carotenoid content in some Calendula officinalis and Tagetes patula varieties*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2016. **44**(1): p. 224–229.
203. Pinteaa, A., et al., *Content of total carotenoids in Calendula officinalis L. from different countries cultivated in Estonia*. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture, 2003. **59**: p. 392–396.
204. Raal, A., et al., *Content of total carotenoids in Calendula officinalis L. from different countries cultivated in Estonia*. Nat Prod Commun, 2009. **4**(1): p. 35–8.
205. Sarikurkcu, C., Tepe, B., & Yamac, M., *Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of Matricaria recutita L. from Turkey*. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2013. **47**(3): p. 356–361.
206. Raal, A., Orav, A., & Arak, E., *The content and composition of essential oil in Matricaria recutita L. from Estonia*. Nat. Prod. Commun., 2012. **7**(1): p. 77–80.
207. Benedec, D., Hanganu, D., Oniga, I., Raita, O., Cuibus, F., & Vlase, L., *HPLC analysis of flavonoids from Matricaria recutita L. extracts and their anti-inflammatory activity*. Pak. J. Pharm. Sci., 2015. **28**(4): p. 1387–1393.
208. McKay, D.L. and J.B. Blumberg, *A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (Matricaria recutita L.)*. Phytother Res, 2006. **20**(7): p. 519-30.
209. Cirak, C., Radusiene, J., & Janulis, V. , *Secondary metabolites of Hypericum perforatum L. growing in Turkey: Variation among populations*. Pharmaceutical Biology, 2007. **45**(1): p. 1–6.
210. Barnes, J., L.A. Anderson, and J.D. Phillipson, *St John's wort (Hypericum perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties*. J Pharm Pharmacol, 2001. **53**(5): p. 583-600.
211. Chroho, M., et al., *Total phenolic and flavonoids contents and in vitro evaluation of antioxidant activity of several Calendula officinalis (Marigold) extracts*. Journal of Biological Research 2021. **94**(1).
212. Ak, G., Zengin, G., Sinan, K. I., Mahomoodally, M. F., Picot-Allain, M. C. N., Cakır, O., Bensari, S., Yılmaz, M. A., Gallo, M., & Montesano, D. , *A Comparative Bio-Evaluation and Chemical Profiles of Calendula officinalis L.*

Extracts Prepared via Different Extraction Techniques. Applied Sciences, 2020. **10(17)**: p. 5920.

213. Raal, A. and K. Kirsipuu, *Total flavonoid content in varieties of Calendula officinalis L. originating from different countries and cultivated in Estonia*. Nat Prod Res, 2011. **25(6)**: p. 658-62.
214. Honório, I.C.G., Bonfim, F. P. G., Montoya, S. G., Casali, V. W. D., Leite, J. P. V., & Cecon, P. R. , *Growth, development and content of flavonoids in calendula (Calendula officinalis L.)*. Acta Scientiarum. Agronomy, 2016. **38(1)**: p. 69-75.
215. Gözcü, S., & Atmaca, M. , *Antioxidant Potential and Phenolic Content of Plantago major*. Current Research in Health Sciences, 2025. **2(1)**: p. 27-32.
216. Beara, I.N., et al., *Plantain (Plantago L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants*. J Agric Food Chem, 2009. **57(19)**: p. 9268-73.
217. Teğin, İ., Canpolat, G., & Fidan, M. *The antioxidant capacity, total phenolic content and phenolic compounds of Plantago coronopus L. subsp. coronopus in naturally distributed in Akdoğan-Siirt*. in *In 2018 2nd International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies (ISMSIT)*. 2018.
218. Kivrak, Ş., Göktürk, T., & Kivrak, İ., *Assessment of volatile oil composition, phenolics and antioxidant activity of bay (Laurus nobilis) leaf and usage in cosmetic applications*. International Journal of Secondary Metabolite, 2017. **4(2)**: p. 148-161.
219. Yalçın, H., et al., *Gas chromatography/mass spectrometry analysis of Laurus nobilis essential oil composition of northern Cyprus*. J Med Food, 2007. **10(4)**: p. 715-9.
220. V. I. Babushok, P.J.L.a.I.G.Z., *Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils*. J. Phys. Chem. Ref. Data, 2011. **40(4)**: p. 043101.
221. Kačániová, M., Vuković, N. L., Čmiková, N., Galovičová, L., Schwarzová, M., Šimora, V., Kowalczewski, P. Ł., Kluz, M. I., Puchalski, C., Bakay, L., & Vukic, M. D. , *Chemical composition and biological activity of Salvia officinalis essential oil*. Acta Horticulturae et Regiotecturae, 2021. **24(2)**: p. 81–88.
222. El Euch, S.K., Hassine, D. B., Cazaux, S., Bouzouita, N., & Bouajila, J. , *Salvia officinalis essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities*. South African Journal of Botany, 2019. **120**: p. 253–260.
223. Carroll, J.F., et al., *Repellency of the Origanum onites L. essential oil and constituents to the lone star tick and yellow fever mosquito*. Nat Prod Res, 2017. **31(18)**: p. 2192-2197.
224. Tasdemir, D., et al., *Antiprotozoal Activity of Turkish Origanum onites Essential Oil and Its Components*. Molecules, 2019. **24(23)**.

225. Ozkan, G., H. Baydar, and S. Erbas, *The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (Origanum onites L.)*. J Sci Food Agric, 2010. **90**(2): p. 205-9.
226. Talić, S., Odak, I., Lukić, T., Brkljača, M., & Lasić, A. , *Chemodiversity of Helichrysum italicum essential oils from Bosnia and Herzegovina*. Fresenius Environmental Bulletin, 2021. **30**(3): p. 2492–2502.
227. Kladar, N.V., et al., *Biochemical characterization of Helichrysum italicum (Roth) G.Don subsp. italicum (Asteraceae) from Montenegro: phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant properties*. Chem Biodivers, 2015. **12**(3): p. 419-31.
228. Kumar P., N.A., Uchil P.D., *Analysis of Cell Viability by the MTT Assay*. In: *Basic Cell Culture Protocols*. Methods in Molecular Biology, 2018. **1803**.
229. Anaya-Mancipe, J.M., et al., *Electrospun Nanofibers Loaded with Plantago major L. Extract for Potential Use in Cutaneous Wound Healing*. Pharmaceutics, 2023. **15**(4).
230. Süntar, I., et al., *A novel wound healing ointment: a formulation of Hypericum perforatum oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge*. J Ethnopharmacol, 2011. **134**(1): p. 89-96.
231. Bukhari, S.N.A., et al. , *Role of flavonoids in wound healing and tissue regeneration*. Molecules, 2019. **24**(14): p. 2787.
232. *Assessment report on Matricaria recutita L*. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2015: p. EMA/HMPC/304928/2014.
233. Khan, H., et al. , *Antioxidant and wound healing potential of medicinal plants in traditional use*. Current Drug Targets, 2020. **21**(10): p. 1011–1022.
234. Nabila, B., et al., *Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Laurus nobilis leaves*. Nat Prod Res, 2022. **36**(4): p. 989-993.
235. Ali, B., Al-Wabel, N.A., et al., *Essential oils used in aromatherapy: A systemic review*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2017. **7**(8): p. 601–611.
236. Bakkali, F., et al., *Biological effects of essential oils--a review*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(2): p. 446-75.
237. Cristani, M., et al., *Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(15): p. 6300-8.
238. Burt, S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review*. Int J Food Microbiol, 2004. **94**(3): p. 223-53.
239. Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H., & Raneva, V.G. , *Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems*. Food Chemistry, 1999. **64**(1): p. 59–66.
240. Nostro, A., et al. , *In vitro activity of plant extracts and essential oils against Gram-positive and Gram-negative bacteria*. Letters in Applied Microbiology, 2004. **39**(2): p. 137–143.

241. Moghimipour, E., et al. , *Formulation and evaluation of topical berberine gel*. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2013. **3(2)**: p. 449–456.
242. Martinotti, S. and E. Ranzato, *Scratch Wound Healing Assay*. Methods Mol Biol, 2020. **2109**: p. 225-229.
243. Shahane, K., et al., *An Updated Review on the Multifaceted Therapeutic Potential of Calendula officinalis L*. Pharmaceuticals (Basel), 2023. **16(4)**.
244. Spyridopoulou, K., et al., *Extraction, Chemical Composition, and Anticancer Potential of Origanum onites L. Essential Oil*. Molecules, 2019. **24(14)**.
245. R., A., *Food and Chemical Toxicology* 2020.
246. Saddiqe, Z., I. Naeem, and A. Maimoona, *A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L*. J Ethnopharmacol, 2010. **131(3)**: p. 511-21.

