

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL İÇERİKLİ POLİMERİK NANOLİF YAPILI
BİYOMALZEME ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE
YARA ÖRTÜSÜ OLARAK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Burak ÖZDEMİR

DOKTORA TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

Ağustos, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL İÇERİKLİ POLİMERİK NANOLİF YAPILI BİYOMALZEME
ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE YARA ÖRTÜSÜ OLARAK
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Burak ÖZDEMİR tarafından hazırlanan tez çalışması 04.08.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Saadet PABUÇÇUOĞLU, Üye
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Prof. Dr. Tülin Banu İYİM, Üye
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Doç.Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç.Dr. Yasemin KILINÇ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN sorumluluğunda tarafımda hazırlanan BİTKİSEL İÇERİKLİ POLİMERİK NANOLİF YAPILI BİYOMALZEME ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE YARA ÖRTÜSÜ OLARAK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Burak ÖZDEMİR

İmza

Bu tez Tübitak 2211/C Yurt İçi ncelikli Alanlar Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

*Ailem
ve Arkadaşlarıma İthafen*

TEŞEKKÜR

Bu doktora tez çalışması süresince benden desteğini esirgemeyen, bilgi birikimi ve önerileriyle yol gösteren, tez çalışması sırasında gösterdiği hoşgörü ve sabırdan dolayı Hocam Sayın Prof.Dr. Mehmet Burçin Pişkin'e, jüri üyelerim İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Prof.Dr. Saadet Pabuccuoğlu ve Prof.Dr. Tülin Banu İYİM hocalarıma, Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyeleri Sayın Doç.Dr. Cem Bülent Üstündağ ve Doç.Dr.Yasemin Kılınç hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tezim süresince beni koşulsuz destekleyen ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım; Bahar Gök'e, Ozan Barış Kürtür'e, İlke Kıldacı'ya, Abdurrahman Can Eğil'e, Tolga Zorlu'ya, Ahmet Çetinkaya'ya, Fatih Çiftçi'ye, Caner Ilgın'a ve Emre Karaduman'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, hayatım boyunca bana yol gösteren, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, daima bana inanıp güvenen annem Hanife Özdemir'e, babam Hasan Özdemir'e, ablam Burcu Esen'e, kardeşim Busenur Özdemir'e, eniştem İlhan Esen'e, anneannem Nahide Özdemir'e, dedem Hüdaverdi Özdemir'e, dayılarım İsmail Özdemir ve Hasan Özdemir'e teşekkürü bir borç bilirim.

Teşekkür: Bu tez Tübitak 2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

Burak ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xv
TABLO LİSTESİ	xvii
ÖZET	xix
ABSTRACT	xxi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez	5
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Deri ve Derinin İşlevleri	6
2.2 Derinin Anatomisi	7
2.2.1 Epidermis	7
2.2.2 Dermis	9
2.2.3 Hipodermis	10
2.3 Yara ve Yara Türleri	10
2.3.1 Akut Yaralar	12
2.3.2 Kronik Yaralar	12
2.3.3 Karmaşık Yaralar	14
2.4 Yara İyileşme Süreci ve Basamakları	14
2.5 Yara İyileştirici Ürünler	16
2.5.1 Gazlı Bez	16
2.5.2 Film Sargılar	16
2.5.3 Hidrokolloidler	17
2.5.4 Aljinat Örtüler	17
2.5.5 Hidrojeller	17

2.5.6	Köpük Örtüler	18
2.5.7	Silikon Örtüler	18
2.5.8	Antimikrobiyal Örtüler	19
2.6	Yara Örtüsü Çeşitleri	19
2.6.1	Pasif Örtüler	19
2.6.2	İnteraktif Örtüler	19
2.6.3	Biyoaktif Örtüler	20
2.7	Yara İyileşmesinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar	20
2.7.1	Nanopartiküller	20
2.7.2	Nanolif Malzemeler	23
2.7.3	PCL Nanolif ve Kitosan Nanopartikülleri ile Yapılan Yara Örtüsü Çalışmaları	26
2.8	Bitkisel Materyallerin Yara İyileşiminde Kullanımı	26
2.8.1	Kantaron	27
2.8.2	Safran	29
2.8.3	Propolis	31
3	MATERYAL VE METOD	35
3.1	Deneylerde Kullanılan Kimyasallar	35
3.2	Deneylerde Kullanılan Cihazlar	36
3.3	Deneyde Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri	37
3.3.1	DNA Bağlanma Deneyinde Kullanılan Çözelti	37
3.3.2	DNA Kesme Deneyinde Kullanılan Çözeltiler	37
3.3.3	AMES Deneyinde Kullanılan Kullanılan Besiyerlerin ve Stok Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.3.4	%20'lik Glukoz Çözeltisinin hazırlanması	40
3.3.5	MİK Deneyinde Kullanılan Solüsyonlar ve Besiyerleri	43
3.3.6	Kitosan Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Solüsyonlar	44
3.3.7	Elektroeğirme Solüsyonunun Hazırlanması	45
3.4	Deneysel Metodlar	45
3.4.1	Dekoksiyon Metodu ile Bitki Ekstraksiyonu	45
3.4.2	DNA Bağlanma Deneyi	46
3.4.3	DNA kesme Deneyi	47
3.4.4	MİK Yöntemi	47
3.4.5	Ames Yöntemi	49
3.4.6	Ekstrakların Kombinasyonlarının Antioksidan Potansiyellerinin Belirlenmesi	53
3.4.7	Ekstrakların Spektrumunun Belirlenmesi ve Kalibrasyon Grafiğinin Çıkarılması	54

3.4.8	Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi	54
3.4.9	Ortalama boyut, Polidispersite İndeksi(PdI) ve ζ Potansiyelinin Belirlenmesi	55
3.4.10	Enkapsülasyon verimi ve Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi	55
3.4.11	Salım Kinetiğinin Belirlenmesi	56
3.4.12	Kitosan Nanopartiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Mikrografisi	56
3.4.13	Elektroeğirme ile Nanoliflerin Elde Edilmesi	56
3.4.14	Nanolif İçerisindeki Madde Miktarının Belirlenmesi	57
3.4.15	Nanoliflerin SEM ile Morfolojilerinin İncelenmesi	57
3.4.16	Nanoliflerin Salım Kinetiğinin Belirlenmesi	57
3.4.17	Nanoliflerin <i>In vivo</i> Etkisinin Belirlenmesi	57
4	BULGULAR VE TARTIŞMA	59
4.1	DNA Bağlanma Deneyleri Sonuçları	59
4.2	DNA Kesme Sonuçları	63
4.3	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Sonuçları	71
4.4	Ames Deneyi Sonuçları	79
4.4.1	Histidin Gereksinimi Kontrolü Sonuçları	79
4.4.2	<i>rfa</i> Mutasyonu Kontrol Sonuçları	80
4.4.3	<i>uvrB</i> Mutasyonu Kontrol Sonuçları	80
4.4.4	R Faktörü Kontrol Deneyi	81
4.4.5	Ekstrakların Ames Deneyi Sonuçları	81
4.5	Ekstrakt Kombinasyonlarının Antioksidan Potansiyellerinin Belirlenmesi	86
4.6	Safran, Kantaron ve Propolis Ekstraklarının Spekturum Sonuçları	87
4.7	Safran, Kantaron ve Propolis Ekstraklarının Kalibrasyon Eğrileri	88
4.8	Boş, Kantaron ve Safran Yüklü Nanopartiküllerin DLS Analiz Sonuçları	88
4.9	Safran ve Kantaron Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi	90
4.10	Safran Yüklü ve Kantaron Yüklü Nanopartiküllerin Salım Kinetiklerinin Sonuçları	91
4.11	Kitosan Nanopartiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analiz Sonuçları	93
4.12	Nanolif İçerisindeki Madde Miktarı	96
4.13	Nanoliflerin Morfolojik Analiz Sonuçları	96
4.14	Nanoliflerin Salım Kinetiklerinin Analizi	96
4.15	Nanoliflerin <i>In vivo</i> Etkisinin Belirlenmesi Deney Sonuçları	98
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	102

KAYNAKÇA	105
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	135

SİMGE LİSTESİ

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
$^{\circ}C$	Derece
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
dk	Dakika
g	Gram
kb	Kilobaz
kV	Kilovolt
KX	Kat büyütme
M	Molar
m^2	Metrekare
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mV	Milivolt
mW	Milivat
N	Normal
ng	Nanogram
nm	Nanometre

pH	Hidrojen Kuvveti
rpm	Dakikada Gerçekleştirilen Dönüş Kuvveti
sa	Saat
sn	Saniye
W	Watt
α	Alfa
β	Beta
ϵ	Epsilon
γ	Gama
ζ	Zeta

KISALTMA LİSTESİ

AGF	Anjiyogenez Faktörü
AOF	Osteosentez Sorunları İçin Çalışma Grubu
BSA	Sığır Serum Albumin
CDX	Sefadroksil
CSNP	Kitosan Nanopartikülü
CFU	Oluşturan Birim Koloni
CT-DNA	Sığır Timus Deoksiribonükleik Asit
Cur	Kurkumin
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EEMM	Enkapsüle Edilen Madde Miktarı
EHT	Elektron Yüksek Gerilim
EO	Esansiyel Yağ
EOMM	Enkapsüle Olan Madde Miktarı
EV	Enkapsülasyon Verimi
GAG	Glikozaminoglikan
GTP	Yeşil Çay Fenolleri
HB	Histidin-Biyotin
HBA	Histidin-Biyotin Agar

Hep-G2	İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HP	Heparin
HS	Heparin Sülfat
IL	İnterlökin
kob	Koloni Oluşturan Birim
LN	Laminin
MCF-7	Meme Kanseri Hücre Hattı
MGA	Minimal Glukoz Agar
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MMP-9	Matriks Metallopeptidaz
MOPS	4-morfolinpropansülfonik asit
MÖ	Milattan Önce
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NF- κ B	Nükleer Faktör
NPD	4-Nitro-o-fenilendiamin
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
PBS	Fosfat Tamponu
PCL	Poli- ϵ kaprolakton
PDGF	Platlet Kökenli Büyüme Faktörü
PdI	Polidispersite İndeksi
PLA	Poli-Laktik Asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVP	Polivinil pirolidon
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
SMA	Düz Kas Aktinin
SRG	Radikal Süpürücü Etki
SSD	Gümüş Sülfadiazin

TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopu
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TMM	Total Madde Miktarı
TNA	Total Nanopartikül Ağırlığı
TNE	Tris-NaCl-EDTA
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TPP	Sodyum Tri-poli-fosfat
TRP	Spesifik Geçici Reseptör
USSC	Sınırsız Somatik Kök Hücreler
UVB	Ultraviyole B
VB	Vogel-Bonner E ortamı
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VN	Vitronektin
WD	Çalışma Mesafesi
YK	Yükleme Kapasitesi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Derinin Anatomik Yapısı	2
Şekil 2.1	Derinin katmanları	7
Şekil 2.2	Epidermin anatomik yapısı	8
Şekil 2.3	Epidermin histolojik yapısı	9
Şekil 2.4	Dermisin anatomik yapısı	10
Şekil 2.5	Dermisin Histolojik yapısı	11
Şekil 2.6	Hipodermisin yapısı	11
Şekil 2.7	Yara iyileşme basamakları (E:Epidermis, D:Dermis, H:Hipodermis) .	16
Şekil 2.8	Yara iyileşmesinde kullanılan nano yapılar	21
Şekil 2.9	Kantaron çiçeği	28
Şekil 2.10	Safran çiçeği	30
Şekil 3.1	MİK deneyinin yapılışı	48
Şekil 3.2	Ames Deneyinin Yapılışı	52
Şekil 3.3	İyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanopartikül sentezi	55
Şekil 3.4	<i>In vivo</i> yara modelinin yapılışı	58
Şekil 4.1	Safran sulu ekstraktının CT-DNA'ya bağlanma şeklini gösteren spektrum	59
Şekil 4.2	Kantaron sulu ekstraktının CT-DNA'ya bağlanma şeklini gösteren spektrum	60
Şekil 4.3	Propolis sulu ekstraktının CT-DNA'ya bağlanma şeklini gösteren spektrum	61
Şekil 4.4	Sulu ekstraktların hidrolitik reaksiyon sonucu DNA kesme potansiyellerini gösteren jel görüntüsü	64
Şekil 4.5	Sulu ekstraktların oksidatif reaksiyon sonucu DNA kesme potansiyellerini gösteren jel görüntüsü	64
Şekil 4.6	Histidin gereksinimi kontrol sonucu. (a)HB, (b)MGA besiyerlerinde (A)TA98 ve (B) TA100 suşlarının üreme durumu	80
Şekil 4.7	TA98 ve TA100 suşlarının <i>rfa</i> mutasyonu kontrol sonuçları	80
Şekil 4.8	(A)TA98 ve TA100 suşlarının <i>uvrB</i> mutasyonu kontrol sonuçları, (B)TA98 ve TA100 suşlarının R faktörü kontrol sonuçları	81
Şekil 4.9	Kombinasyonların % radikal süpürücü aktivite sonuçları	86

Şekil 4.10 (a)Safran, (b)kantaron ve (c)propolis sulu ekstraktlarına ait UV-vis spektrumları	87
Şekil 4.11 (a)Safran, (b)kantaron ve (c)propolis sulu ekstraktlarına ait kalibrasyon eğrileri	88
Şekil 4.12 Boş kitosan nanopartiküllerin a) Boyut ve PdI değerleri b) ζ potansiyelleri	89
Şekil 4.13 Safran yüklü nanopartiküllerin a) Boyut ve PdI değerleri b) ζ potansiyelleri	89
Şekil 4.14 Kantaron yüklü nanopartiküllerin a) Boyut ve PdI değerleri b) ζ potansiyelleri	89
Şekil 4.15 Safran Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Salınım Grafiği	92
Şekil 4.16 Kantaron Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Salınım Grafiği	93
Şekil 4.17 Boş kitosan nanopartiküllerin SEM görüntüsü	94
Şekil 4.18 Safran yüklü kitosan nanopartiküllerin SEM görüntüsü	94
Şekil 4.19 Kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerin SEM görüntüsü	95
Şekil 4.20 Boş ve dolu nanoliflerin morfolojik analizleri (A-C:Boş nanoliflerin farklı büyütmelelerdeki görüntüsü, B-D:Dolu Nanoliflerin farklı büyütmelelerdeki görüntüsü, E-F:Nanolifler içindeki ve üzerindeki kitosan nanopartiküllerinin görüntüsü)	97
Şekil 4.21 Safran, kantaron ve propolisin nanoliflerden salınım kinetiği	98
Şekil 4.22 <i>In vivo</i> yara modelinde hayvan gruplarının yaralarının haftaya bağlı iyileşmesi (A:Ekstrakt, B:Dolu PCL- Nanolif, C:Boş PCL-Nanolif, D:Pozitif Kontrol, E:Negatif Kontrol)	100

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	Deneylerde kullanılan kimyasal listesi	35
Tablo 3.2	Deneylerde kullanılan kimyasal listesi devamı	36
Tablo 3.3	Yükleme tamponu hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	37
Tablo 3.4	TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	38
Tablo 3.5	Histidin/Biyotin Agarın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	39
Tablo 3.6	Minimal Glukoz Agarın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	39
Tablo 3.7	Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) Agarın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	39
Tablo 3.8	50X VB tuz çözeltisinin (Vogel-Bonner E ortamı) hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	40
Tablo 3.9	Top agarın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları . . .	40
Tablo 3.10	Nutrient broth hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları .	40
Tablo 3.11	Glukoz çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	40
Tablo 3.12	Histidin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	41
Tablo 3.13	Biyotin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	41
Tablo 3.14	NaOH çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	41
Tablo 3.15	Ampisilin Çözeltisinin (% 0,8/0,02 N NaOH) hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	41
Tablo 3.16	Sodyum-Fosfat Tamponunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	42
Tablo 3.17	Histidin/Biyotin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	42
Tablo 3.18	Kristal viyole çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	42
Tablo 3.19	NPD (0,1 µg/µL) çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	43
Tablo 3.20	NaN ₃ çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	43

Tablo 3.21 NA'ın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	43
Tablo 3.22 Mueller-Hinton Broth'un hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	43
Tablo 3.23 Saboraud Dextroz Agar'ın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	44
Tablo 3.24 RPMI 1640 Besiyeri'nin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	44
Tablo 3.25 McFarland Turbidity Standart Hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	44
Tablo 3.26 Kitosan Solüsyonunun Hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	45
Tablo 3.27 TPP solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	45
Tablo 3.28 Elektroegirme blended olüsyonunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları	45
Tablo 3.29 Biyolojik Deneyler Sonunda Oluşturulan Kombinasyonlar	54
Tablo 4.1 Safran (S), kantaron(K) ve propolis(P) sulu ekstraktlarının MİK değerleri (Gen.:Gentamisin, Amp.:Ampisilin, Flu.:Flukonazol, D:DMSO)	71
Tablo 4.2 Safran, kantaron ve <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkileri	82
Tablo 4.3 In vivo hayvan modelinde haftalık % yara iyileşmesi	99

BİTKİSEL İÇERİKLİ POLİMERİK NANOLİF YAPILI BİYOMALZEME ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE YARA ÖRTÜSÜ OLARAK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Burak ÖZDEMİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

Bu tez çalışmasında, biyolojik aktiviteleri, mutajenitesi ve genotoksik dozu çeşitli testler ile belirlenen sarı kantaron ve safran ekstraktı içeren kitosan nanopartiküllerinin sentezlenmiştir. Sentezlenen bu nanopartiküller ile birlikte propolis içeren yara örtüsü elektroegirme tekniği kullanılarak geliştirilmiştir ve elde edilen bu yara örtüsünün etkinliğinin *in vivo* yara modeli kullanılarak incelenmiştir. DNA bağlanma deneyi sonucunda, Safran ve kantaronun sulu ekstraktlarının CT-DNA'ya elektrostatik olarak bağlandığı, propolis ekstraktının ise CT-DNA'ya interkalatif bağlandığı belirlenmiştir. Safran sulu ekstraktının DNA'yı kestiği ancak kantaron ve propolisin DNA'yı kesmediği görülmüştür. Ames Deneyii sonucunda, TA98 ve TA100 suşları için safran sulu ekstraktının 1,25 mg dozda, kantaron ve propolisin 2,5 mg dozda genotoksik etki ve mutajeniteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Tüm ekstraktların antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir ve tüm ekstraktların MİK değeri 1 mg/ml altı ve üstü değerler olarak bulunmuştur. kitosan nanopartiküllerinin ortalama boyutu, PdI ve ζ potansiyeli sırası ile 57.61 ± 1.234 nm 0.175 ± 0.008 ve 14.0 ± 0.755 mV olarak bulunmuştur. Kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerinin ortalama boyutu, PdI ve ζ potansiyeli sırası ile 64.49 ± 0.423 nm, 0.185 ± 0.010 ve 15.1 ± 0.436 mV olarak bulunmuştur. Safran ve kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimleri sırası ile %71,76 ve %71,92 olarak belirlenmiştir. Safran yüklü kitosan nanopartiküllerinin yükleme kapasitesi %2,67, kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerinin yükleme kapasitesi %2 olarak bulunmuştur. Safran yüklü kitosan nanopartiküllerinin %79,54 oranında

safranı, 168 saat sonunda serbest bıraktığı, kantaron yüklü nanopartiküllerin %88.44 oranında kantaronu, 48 saat sonunda serbest bıraktığı belirlenmiştir. SEM analizi sonucunda kitosan nanopartiküllerinin yuvarlak ve uniform olduğu görülmüştür. PCL nanoliflerine safran, kantaron ve propolis sulu ekstraktlarının sırası ile %70,51, %76,11 ve %90,25 olarak bulunmuştur. PCL-nanoliflerinden, 168 saatte %58,24 oranında safran sulu ekstraktının salındığı, 168 saatte %70,61 oranında kantaron sulu ekstraktının salındığı ve 8 saatte %90 oranında propolis salındığı görülmüştür. In vivo yara modeli sonucunda üretilen nanolif bazlı yara örtüsünün pozitif kontrole kıyasla daha hızlı iyileştirici özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Üretilen yara örtüsünün etkinliğinin incelendiği *in vivo* yara modeli deneyi sonucunda, yara örtüsünün yara iyileşme hızını arttırdığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, Nanolif, Nanopartikül, Yara Örtüsü

ABSTRACT

Production and Characterization of Plant Containing Polymeric Nanofiber Biomaterials and Investigation of It's Effectiveness as Wound Dressing

Burak ÖZDEMİR

Department of Bioengineering
Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

In this thesis, chitosan nanoparticles loaded with St. John's Wort and saffron extract and propolis loaded wound dressing were developed, whose biological activities, mutagenicity and genotoxic dose were determined by various tests. The effectiveness of this wound dressing was investigated using an *in vivo* wound model. As a result of DNA binding experiment, it was determined that aqueous extracts of Saffron and St. John's Wort were electrostatically bound to CT-DNA, while propolis extract was intercalally bound to CT-DNA. It was observed that saffron aqueous extract cut DNA, but St. John's Wort and propolis did not cut DNA. As a result of the Ames Experiment, it was determined that saffron aqueous extract at a dose of 1.25 mg and St. John's Wort and propolis at a dose of 2.5 mg did not have genotoxic effects and mutagenicity for TA98 and TA100 strains. It was determined that all extracts showed antimicrobial effect and the MIC value of all extracts was found to be below 1 mg/ml and above. The average size, PdI and ζ potential of saffron extract loaded chitosan nanoparticles were 57.61 ± 1.234 nm, 0.175 ± 0.008 and 14.0 ± 0.755 mV, respectively. The average size, PdI and ζ potential of St. John's Wort loaded chitosan nanoparticles were found to be 64.49 ± 0.423 nm, 0.185 ± 0.010 and 15.1 ± 0.436 mV, respectively. The encapsulation efficiencies of chitosan nanoparticles loaded with saffron and St. John's Wort were determined as 71.76% and 71.92%, respectively. The loading capacity of saffron loaded chitosan nanoparticles was 2.67%, and the loading capacity of St. John's Wort loaded chitosan nanoparticles was 2%. It was determined that saffron-loaded chitosan nanoparticles released 79.54% of saffron extract after 168 hours, and 88.44% of St.

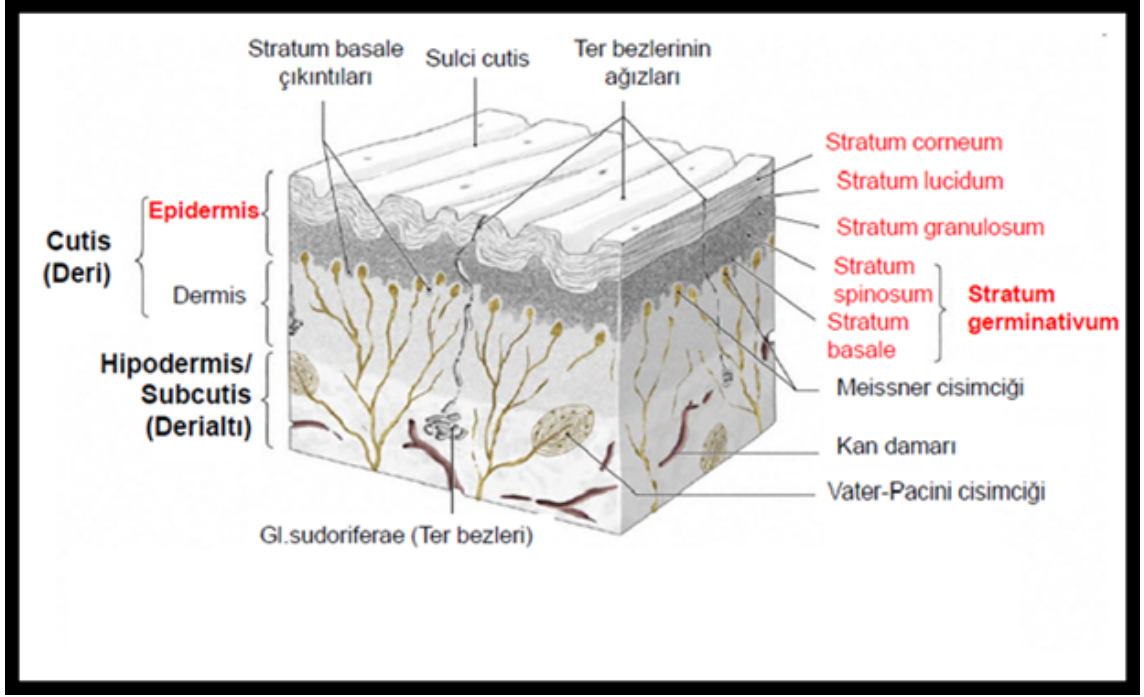
John's Wort-loaded nanoparticles released St. John's Wort after 48 hours. As a result of SEM analysis, it was seen that chitosan nanoparticles were round and uniform. Saffron, St. John's Wort and propolis aqueous extracts to PCL nanofibers were found to be 70.51%, 76.11% and 90.25%, respectively. From PCL nanofibers, it was observed that 58.24% of saffron aqueous extract was released in 168 hours, 70.61% of St. John's Wort aqueous extract was released in 168 hours and 90% of propolis was released in 8 hours. As a result of the *in vivo* wound model experiment, in which the effectiveness of the produced wound dressing was examined, it was determined that the wound dressing accelerated the re-epithelialization and accordingly increased the wound healing rate.

Keywords: Chitosan, Nanofibers, Nanoparticle, Wound Dressing

1.1 Literatür Özeti

İnsan cildi, toplam vücut ağırlığının %15'i ile vücuttaki en büyük organdır ve yaklaşık 2 m² alanı kaplar [1]. Vücutta dolaşan kan hacminin üçte birini alır ve 0,5 mm ile 6 mm arasında değişir [2]. Cildin başlıca 3 işlevi vardır; koruma, düzenleme ve hissetme [3]. İnsan cildi dış epidermal katman, orta dermal katman ve iç hipodermal katman olarak üçe ayrılabilir [4]. Avasküler Epidermal katman, embriyonik ektodermden türetilir, bariyer görevi görür ve vücudu enfeksiyondan korur [5]. Saç, tırnaklar ve ter bezleri deri türevleridir [6]. Kan damarlarının eksikliğinden dolayı epidermis difüzyon yoluyla dermal kılcal damarlardan oksijen ve besin alır [7]. Dış katmanların hücreleri sürekli olarak döküldüğünden ve yüzeye çıkan iç hücreler tarafından değiştirildiğinden, deri sürekli bir değişim durumunda olan dinamik bir organdır [8]. Epidermis, keratinositler ve dendritik hücrelerden oluşan tabakalı bir skuamöz epiteldir [9]. Melanositler, langerhans hücreleri ve merkel hücreler epidermal keratinosit olmayan hücre popülasyonlarıdır [10]. Epidermis, alt tabakadan yüzeye hareket eden keratinositlerin dağılım ve morfolojisine göre beş ayrı tabakaya bölünmüştür. Bu tabakalar *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum*, *Stratum lucidum*, *Stratum corneum*dur [11]. Dermis ve epidermis arasındaki gözenekli bazal membran, hücre ve sıvı alışverişine izin verir ve iki tabakayı bir arada tutar [12] (Şekil 1.1).

Deri epidermisinin en sert tabakası aynı zamanda corium olarak da bilinir ve embriyonik mezodermden türetilir [13]. Bağ dokusunun varlığından dolayı vücudu stresten ve gerginlikten korur [14]. Dermis, epidermisin altında bulunur ve sert hücre dışı matrsten (ECM) oluşur [15]. Dermis fibroblast hücrelerle doludur. Bu tabaka beslenme desteği, bağışıklık gözetimi, yara iyileşmesi, termal düzenleme, hemostaz ve inflamatuvar yanıt sağlamak için işlev görür [16]. Dermis, üst ince papiller tabakadan ve alt retiküler tabakadan oluşur [17, 18]. İç hipodermal tabaka yağlı deri altı dokusundan oluşmaktadır. Bu tabakada büyük kan damarları ve sinirlerden bulunmaktadır. Yağlı deri altı dokusu vücudu yalıtılmaktadır ve şoku emmektedir [19].



Şekil 1.1 Derinin Anatomik Yapısı
[20]

Yara, canlı dokunun hücresel, anatomik ve fonksiyonel devamlılığının kaybı veya kırılması olarak tanımlanabilir. Yara, altta yatan bağ dokusu kaybı olsun ya da olmasın epitelin devamlılığının kaybına neden olur [21]. Yaraların iyileşme süresinin uzunluğuna göre akut ve kronik yaralar olarak kategorize edilir [22]. Akut yara, deride zamanla değil aniden meydana gelen bir yaralanmadır. Bu tür yaralar sert nesnelerin keskin ve bıçaklayıcı hareketinden kaynaklanan mekanik hasar; aşırı ısıya, ışınlamaya, elektrik çarpmasına maruz kalma ve aşındırıcı kimyasallarla tahriş gibi travmadan kaynaklanır. Genellikle 8 ila 12 hafta içinde iyileşebilir [23]. Kronik yaralar, öngörülebilir bir süre içinde iyileşmeyen yaralardır. Bu tür yaralar diyabet, tümörler ve ciddi fizyolojik kontaminasyonlar gibi hastalıklardan kaynaklanır; genellikle kronik yaraların iyileşmesi 12 haftadan fazla sürer [24]. Fizyolojik sistem, yara iyileşmesi olarak bilinen bir dizi zamana bağlı olayla, yaralanmadan sonra hasarlı dokuyu onarmaya başlar. Bu fizyolojik olaylar hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve yeniden modelleme olarak bilinmektedir. Bir yaranın başarılı bir şekilde iyileşmesi için, dört aşamanın tümü uygun sıra ve zaman çerçevesinde gerçekleşmelidir [25].

Yaranın yönetimi, yaranın şiddetlenmesini önleyen ve yara iyileşmesi için uygun bir ortam sağlayan koşullarla ilgilidir. Yara tedavisinin temel amacı, minimum sürede ve daha fazla travmaya neden olmadan yaranın etkili bir şekilde iyileşmesini sağlamaktır [26]. Hızlı iyileşme için yaranın tipine uygun yara örtü malzemesinin seçimi önemlidir [27]. Mevcut yara iyileştirme malzemelerinin genellikle yapısal olarak (ör., Yara yeniden epitelizasyonu, sıvı kaybının kontrolü) veya işlevsel olarak (ör., Esnekliği,

dayanıklılığı, duyarlılığı vb. belirleyen histolojik özellikler) iyi bir klinik sonuç sağlamada başarısız olmaktadır. Bu nedenle nanoteknoloji, çok yönlü fizikokimyasal özellikler sayesinde, yara iyileştirici tedaviler için güvenilir bir araştırma alanıdır. Yara iyileştirmede kullanılan nanomalzemelere, sıfır boyutlu nanomalzemeler (yani, nanopartiküller, nanokarterler ve nanodotlar), tek boyutlu nanomalzemeler (yani nanolifler, nanotüpler ve nanoteller) ve iki boyutlu nanomalzemeler (yani nanoplatelets ve nanofilmler) örnek verilebilmektedir [28]. Yara iyileşmesinde kullanılan nanopartiküller metalik ve polimerik nanopartiküller olarak ikiye ayrılmaktadır. Polimerik nanopartiküller, antibakteriyel ve re-epitelizasyon özellikleri göstermeleri nedeniyle yara sargısı olarak veya taşıma vektörleri olarak polimerik nanopartikülleri (örn. Kitosan) kullanır [29]. Biyopolimerler, önemli miktarlarda sıvıyı emebilen ve aynı zamanda nemli bir yara ortamı sağlayan biyo-uyumlu polimerik ağlardır [30]. Nanomalzemelerin yaralarda kullanılan bir diğer türü elektroegirme yöntemi ile elde edilen nanoliflerdir. Nanolifler, yaralarda hücre dışı matrisin özelliklerini taklit eden iskeleler veya yara örtüsü olarak kullanılmaktadır. Buna ek olarak nanolifler, içerisine büyüme faktörü, yara iyileştirici özellikteki bitkisel özütler yüklenerek yara iyileştirme alanında kullanılmaktadır [31].

Bitkisel türevli bileşikler, yaraların tedavisi için en yaygın kullanılan geleneksel tedavilerdir. Bu tedaviler, iyileşme sürecini uyaran biyolojik olarak aktif bileşikler içeren şifalı otların, bitkisel preparatların ve bitmiş bitkisel ürünlerin kullanılmasını içermektedir. Bugün dünyanın farklı bölgelerinden gelen çok çeşitli bitkiler araştırılmakta ve yara tedavisinde kullanılmaktadır [32]. Bu bitkilere örnek olarak *Hypericum perforatum* verilebilmektedir. Türkiye’de yerel olarak “Kantaron” olarak bilinen L. ve İngilizce’de ise St. John’s Wort olarak bilinen bitki, Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Amerika Birleşik Devletleri’nde yetişen Hypericaceae familyasından çok yıllık bir bitkidir. Kantaron, yüzyıllardır Hafif ila orta dereceli depresyon, yaraların iyileştirilmesi (akut ve kontüzyonlu yaralanmalar), birinci derece yanıkların tedavisinde kullanılmıştır [33]. Bir diğer örnek ise Türkiye’de Safranbolu’da yetişen Safran bitkisi örnek verilebilir [34]. Yapılan bir çalışmada Safran bitkisine ait stamenlerin sulu ekstraktının termal yanık yaralarına iyi geldiği belirlenmiştir [35]. Arılar aracılığıyla bitki özlerinden elde edilen propolisin yara yatağında granülasyon dokusu oluşumu, doku büyümesi ve yara kapanması için gerekli olan glikozaminoglikan sentezini ve salınmasını uyarak doku onarımını hızlandırdığı gösterilmiştir [36].

Bu tez çalışmasında, biyolojik aktiviteleri, mutajenitesi ve genotoksik dozu çeşitli testler ile belirlenen sarı kantaron ve safran ekstraktı içeren kitosan nanopartiküllerinin sentezlendi. Sentezlenen bu nanopartiküller ile birlikte uygun dozda propolis özü içeren elektroegirme tekniği ile yara örtüsü geliştirildi, ve elde

edilen bu yara örtüsünün etkinliğinin in vivo olarak incelendi. Bu kapsamda, sarı kantaron ve safran stamenlerinin sulu ekstraktı dekoksasyon metodu kullanılarak elde edildi. Propolisin sulu ekstraktı ise ticari olarak satın alındı. Propolis, sarı kantaron ve safran sulu ekstraktları dondurulduktan sonra liyofilize edilerek kurutuldu. Kurutulan ekstraktlar 1,25 mg, 2,5 mg, 5 mg ve 10 mg olmak üzere tartılarak su ile çözündürüldü. Elde edilen solüsyonların DNA bağlanma şekilleri UV-vis absorpsiyon titrasyon deneyi, DNA kırma deneyi agaroz jel elektroforezi, antimikrobiyal özellikleri minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) deneyi, mutajenite ve genotoksik potansiyeli ise AMES deneyi, elde edilen kombinasyonların antioksidan potansiyelleri ise DPPH deneyi ile belirlendi. Bu deneyler sonucu, Safran sulu ekstraktının 1,25 mg dozu ve sarı kantaron sulu ekstraktının 2,5 mg dozu iyonik jelasyon tekniği kullanılarak kitosan nanopartikülleri ile enkapsüle edildi. Elde edilen kitosan nanopartiküllerinin DLS analizi yapıldı, morfolojileri ve salınım kinetiği belirlendi. Elektroegirme ile yara örtüsü oluşturma deneyi için %10'luk Polikaprolakton (PCL) solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan egirme solüsyonu içerisine 10'ar mg safran sulu ekstrakt ve kantaron sulu ekstrakt yüklü liyofilize edilmiş kitosan nanopartikülleri eklendi. Elektroegirme işlemi 10 kV, 1 mL/sa ve 15 cm uzaklık değerinde 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Elde edilen yara örtüsünün SEM analizi ve salınım kinetikleri belirlendi. Yara örtüsünün etkinliği Wistar albino erkek sıçanların dorsalinde açılan 2x2 cm'lik yaralara uygulanarak 4 hafta boyunca incelendi.

1.2 Tezin Amacı

Yara örtüleri, ciltteki yaralar ve deri travmaları gibi tıbbi ve cerrahi uygulamada tekstil örtüdür. Günümüzde birçok firma tarafından gerçekleştirilen yara örtülerinin üretimi; İyileşme sürecinde yarayı temiz tutmak için kullanılır. Hastanın enfeksiyon durumuna ve yara tipine göre yara örtüsü seçimi oldukça önemlidir. Genelde pamuklu gazlı bez, iyi emme özellikleri ve yumuşak bir yapı yarattığı için yara örtüsü olarak kullanılır. Ancak pamuklu gazlı bez, yara iyileşmesini hızlandıran nemli yara ortamını koruyamaz ve antibakteriyel alanı sağlayamaz. Modern yara örtüleri, vücuda uyumlu olmalı, antibakteriyel olmalı, nem ve gaz geçişini sağlamalı, toksik olmamalı, alerjik reaksiyon göstermemelidir. Bu tür bir yara örtüsü sentetik, yarı sentetik veya sentetik olmamalıdır [37–39].

Bu bilgiler ışığında tez çalışmasında, biyolojik aktiviteleri, mutajenitesi ve genotoksik dozu belirlenen kantaron ve safran sulu ekstraktı yüklü kitosan nanopartikülleri sentezlenmesi, karakterizasyonu ve salınım kinetiklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha sonra karakterizasyonu ve salınım kinetikleri belirlenen kitosan nanopartiküller ve biyolojik aktiviteleri, mutajenitesi, genotoksik dozu belirlenen propolis

içeren polikaprolakton bazlı nanoliflerin eldesi ve *in vivo* etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Yara örtüsü malzemeleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Yaygın çağlardan önce, yaralar yaprak ve bitki özleriyle sarılırdı, bunlar aslında günümüzün yeni nesli olan yara örtüsünün en temel adımlarıdır [40, 41]. Yara örtüsü biyouyumlu olmalı, mutajenik, toksik, alerjik ve kanserojen olmamalıdır [42, 43].

Yara örtüsü denildiğinde akla ilk olarak pamuklu gazlı bez veya alçı gibi birçok malzeme gelebilir. Ancak yaranın açık bırakılmaması ve yaranın havalanması önemlidir [44]. Hastanelerde yatan hastalar iltihaplı bakterilere açıktır, yara enfeksiyonu çok yaygın bir durumdur ve bakterileri yaradan uzak tutmak, yaranın iyileşmesini etkileyen bir faktördür . Kısacası yara örtüsü, vücudumuzdaki cilt hasarlarının iyileşmesini hızlandırmalı ve dış etkenlerden korumak için yaranın üstünü kapatmalı ve antibakteriyel bir sisteme sahip olmalıdır [45].

Bu çalışmada biyolojik aktiviteleri, mutajenitesi ve genotoksik dozu belirlenen sarı kantaron ve safran sulu ekstraktı yüklü kitosan nanopartikülleri ve propolis içeren polikaprolakton bazlı nanoliflerin cilt hasarları sonucunda oluşan yaraların iyileşmesini hızlandırması, yarayı dış etkenlerden koruması, yara iyileşmede görevli hücrelerden herhangi bir toksik etkiye sahip olmaması, yaranın iltihaplanmasına engel olması beklenmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Deri ve Derinin İşlevleri

İki veya daha fazla doku türü, vücut için belirli işlevleri yerine getiren, organ adı verilen daha karmaşık yapılar halinde organize olmaktadır [46]. Deri gibi birçok organ, dört doku türünün tamamından oluşur. Deri genellikle kutanöz membran olarak adlandırılrsa da tanım gereği bir organdır. Aslında deri, vücudun en büyük organlarından biridir. Ortalama bir yetişkinde deri, toplam vücut ağırlığının yaklaşık %7'sini oluşturur ve 4-5 kilogram ağırlığındadır. Deri, türevleri (ter bezleri, yağ bezleri, saç ve tırnaklar) ve yardımcı yapıları (kan damarları ve sinirler) ile, bütüncül sistemin bir parçasıdır [47–49].

Deri, vücut içinde nispeten sabit bir ortam sağlama yeteneği olan ve homeostaz için kesinlikle gerekli bir organdır. Derinin birincil işlevi, vücudu dehidrasyondan koruyan bir bariyer oluşturmaktır. Aslında, kara hayvanları için hayatta kalmanın önündeki en büyük tehdit dehidrasyondur. Derinin su geçirmez yapısı sıvıları ve diğer önemli maddeleri içeride tutar [50]. Deri ayrıca tüm vücudu mekanik yaralanmalardan (çarpmalar, sıyrıklar ve kesikler) ve kimyasal hasarlardan (asitler ve bazlar) korur[51]. Ek olarak, deri bizi sürekli bakteri istilasından ve güneş ışığında morötesi radyasyondan korur [52].

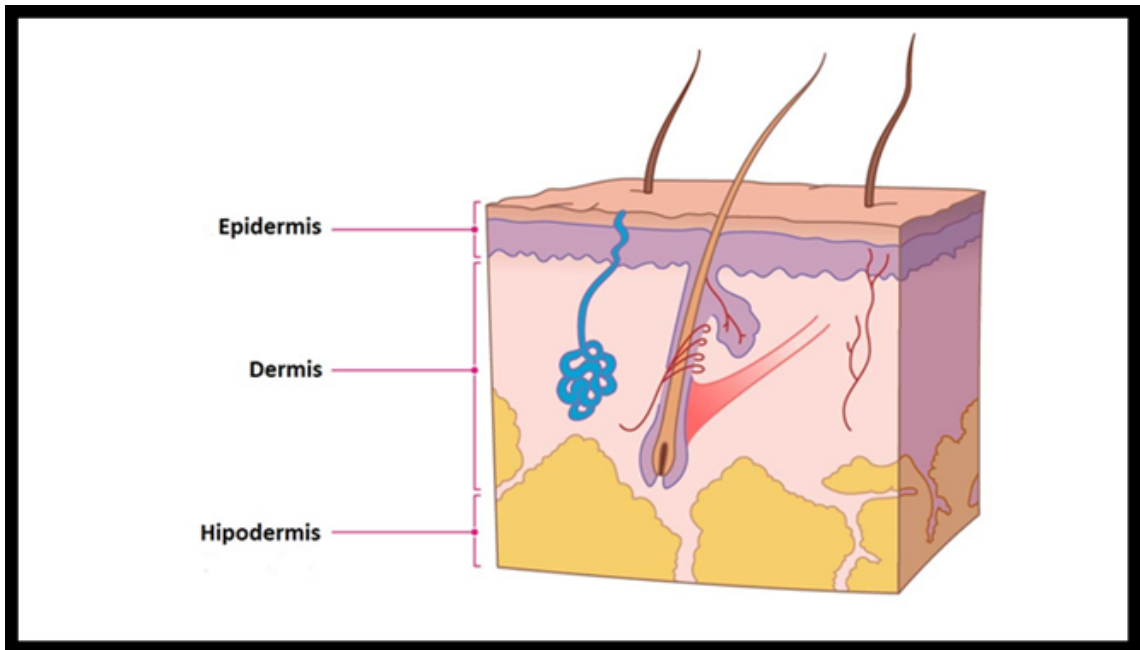
Deri, sıcaklık regülasyonunda önemli bir rol oynar. Bu durum, sinir sistemi tarafından kontrol edilen zengin kan kaynağı ve ter bezleri ile sağlanır. Örneğin, yorucu egzersiz sırasında, yüzeydeki geniş kan damarları ve ter bezlerini aktive ederek aşırı ısı ortadan kaldırır. Ter, su, tuz ve üre içerdiğinden, bütüncül sistemin teknik olarak boşaltım işlevi vardır [53–55].

Deri ayrıca ultraviyole radyasyona maruz kaldığında değiştirilmiş kolesterol moleküllerinden D vitamini sentezler [56]. İnce bağırsağın diyetdeki kalsiyumu emmesi için D vitamini gereklidir. Bu vitaminin eksikliği, kemiklerin yetersiz mineralizasyonu ile karakterize bir hastalık olan raşitizm hastalığına neden

olmaktadır. Belirtiler arasında eğilmiş bacaklar, pelvis, kafatası ve göğüs kafesinin deformiteleri yer alır [57, 58]. Son olarak deri, sıcaklık, dokunma, basınç ve ağrı uyarılarını algılayan sinir sistemi bileşenlerini içerir. Ayrıca deri, bize, dış çevremiz hakkında pek çok bilgi sağlar [59].

2.2 Derinin Anatomisi

Deri, epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır(Şekil 2.1) [60]. En dıştaki seviye olan epidermis, koruyucu bir role sahip, uzun ve iplik benzeri bir protein olan keratini sentezleme işlevi gören keratinositler olarak bilinen belirli bir hücre takımından oluşur [61]. Orta katman, dermis, temelde kolajen olarak bilinen, fibriller proteininden oluşur. Dermis, lipositler olarak bilinen küçük yağ hücresi loblarını içeren deri altı doku veya pannikulus üzerinde bulunur. Bu katmanların kalınlığı, vücudun anatomisinde konuma bağlı olarak önemli ölçüde değişir [62]. Örneğin göz kapağı, epidermisin en ince tabakasına sahiptir, 0,1 mm'den daha azdır [63], oysa ellerin avuç içi ve ayak tabanları yaklaşık 1,5 mm ile en kalın epidermal tabakaya sahiptir [64]. Dermis, üstündeki epidermisin 30-40 katıdır ve deriyi oluşturan tabakalar arasında en kalın olanıdır [65].

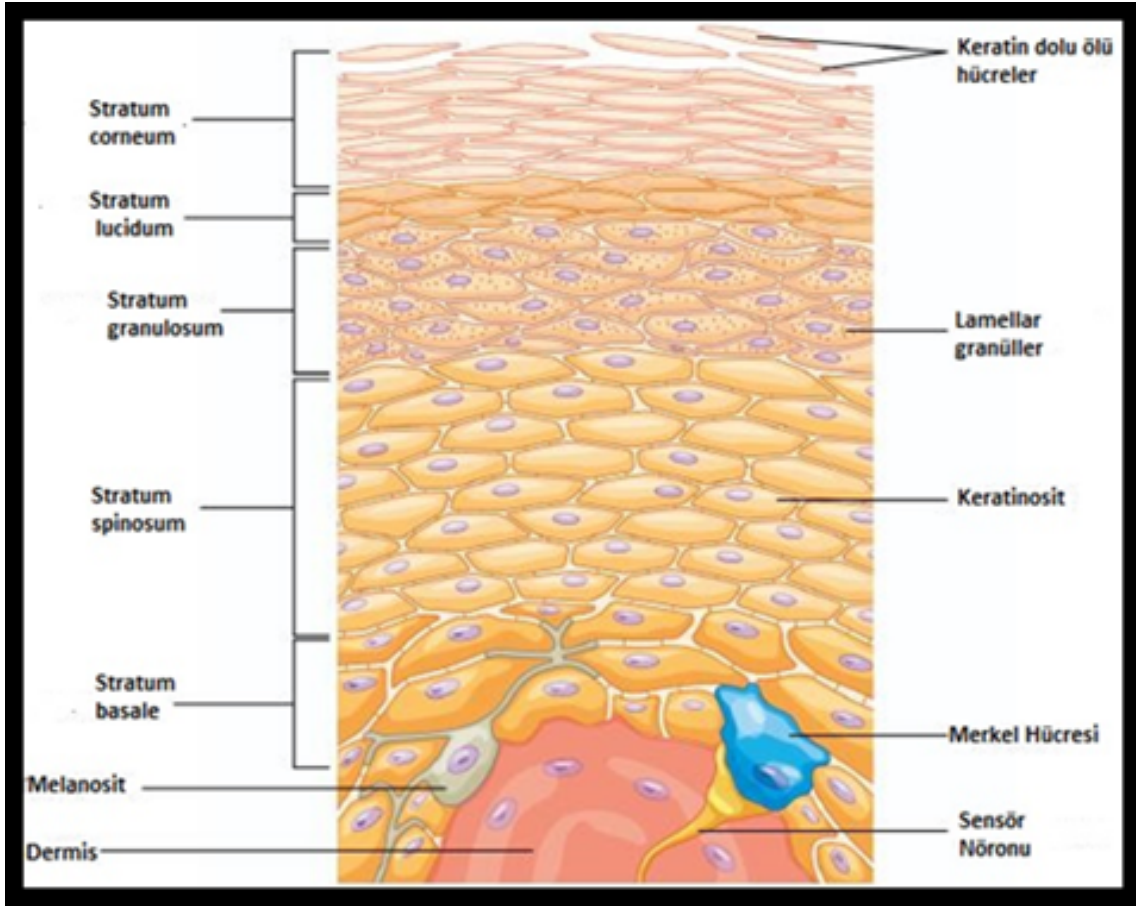


Şekil 2.1 Derinin katmanları
[66]

2.2.1 Epidermis

Epidermis, cildin dış tabakasıdır ve çoğunlukla keratinosit hücrelerinden oluşur. Keratinositlerin yanı sıra melanositler, langerhans ve merkel hücreleri epidermisin

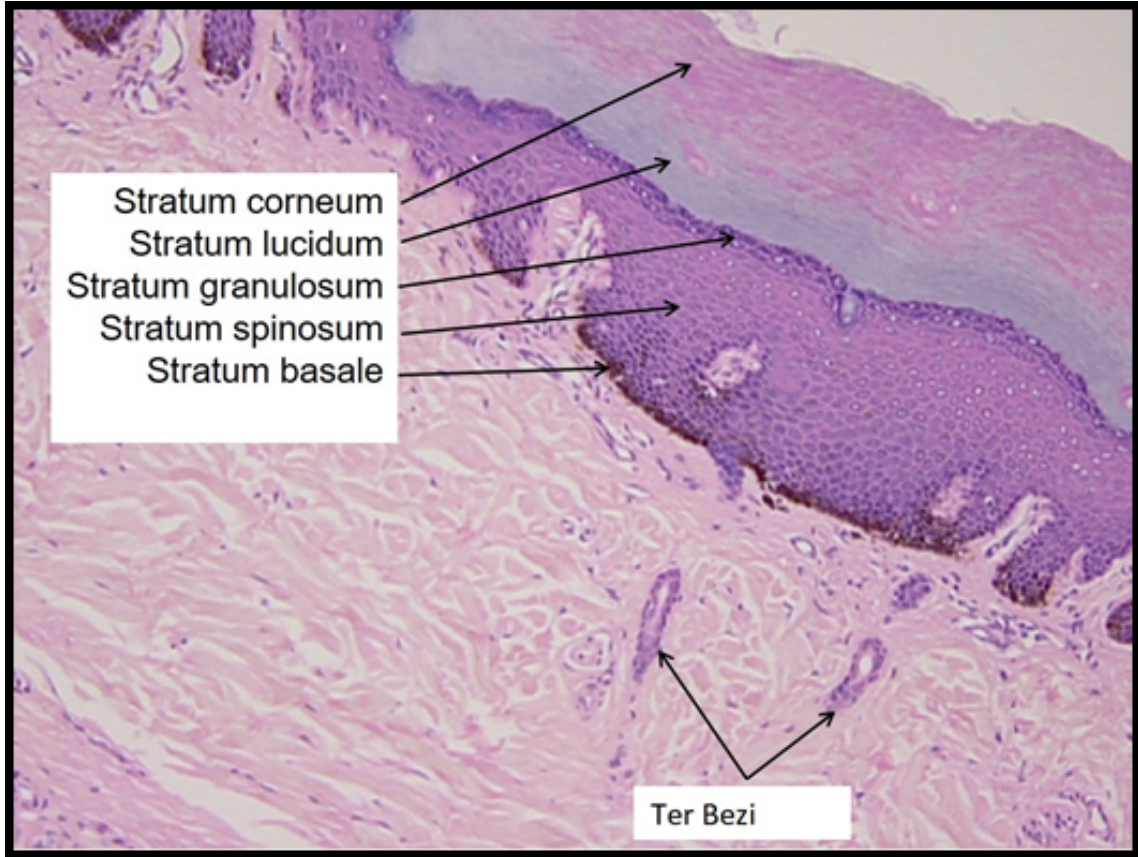
diğer bileşenleridir. Epidermis vasküler yapı içermez ve *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum lucidum*, *Stratum granulosum*, *Stratum corneum* olmak üzere 5 katmandan oluşur(Şekil 2.2) [67].



Şekil 2.2 Epidermisin anatomik yapısı
[68]

En alt katman *Stratum bazale* olarak tanımlanmıştır. Doğrudan dermisin üzerinde bulunur. Bu katman, tek sıralı bazal hücreler, merkel hücreleri (duyuyu sinirlere ileten hücreler) ve melanositlerden oluşur [69, 70]. *Stratum spinosum* tabakası keratinositlerden oluşur. Öte yandan, langerhans hücreleri (bağışıklık sistemi hücreleri) stratum spinosum tabakasında bulunur[71, 72]. *Stratum granulosum* tabakası, büyük miktarlarda protein (keratin ve keratohyalin) üreten ve lameller tabaka olarak biriken keratinositlerden oluşur. Deri dokusunda geçiş tabakası olarak da bilinir [73]. *Stratum lucidum*, *Stratum granulosum*'un hemen üstünde ve *Stratum corneum*'un altında bulunan epidermisin pürüzsüz, görünüşte yarı saydam bir tabakadır. Bu ince hücre tabakası sadece avuç içi, ayak tabanı ve parmakların kalın derisinde bulunur. *Stratum lucidum*'u oluşturan keratinositler ölüdür ve yassıdır. Bu hücreler, hücrelere şeffaf (yani berrak) bir görünüm veren ve suya karşı bir bariyer sağlayan keratohyalinden türetilen, lipidler açısından zengin berrak bir protein olan eleiden ile yoğun bir şekilde paketlenir [74]. *Stratum corneum* tabakası cildi dış

etkenlerden korur. *Stratum corneum* tabakasındaki hücreler canlı değildir. Ancak biyokimyasal olarak aktiftirler(Şekil 2.3) [75].

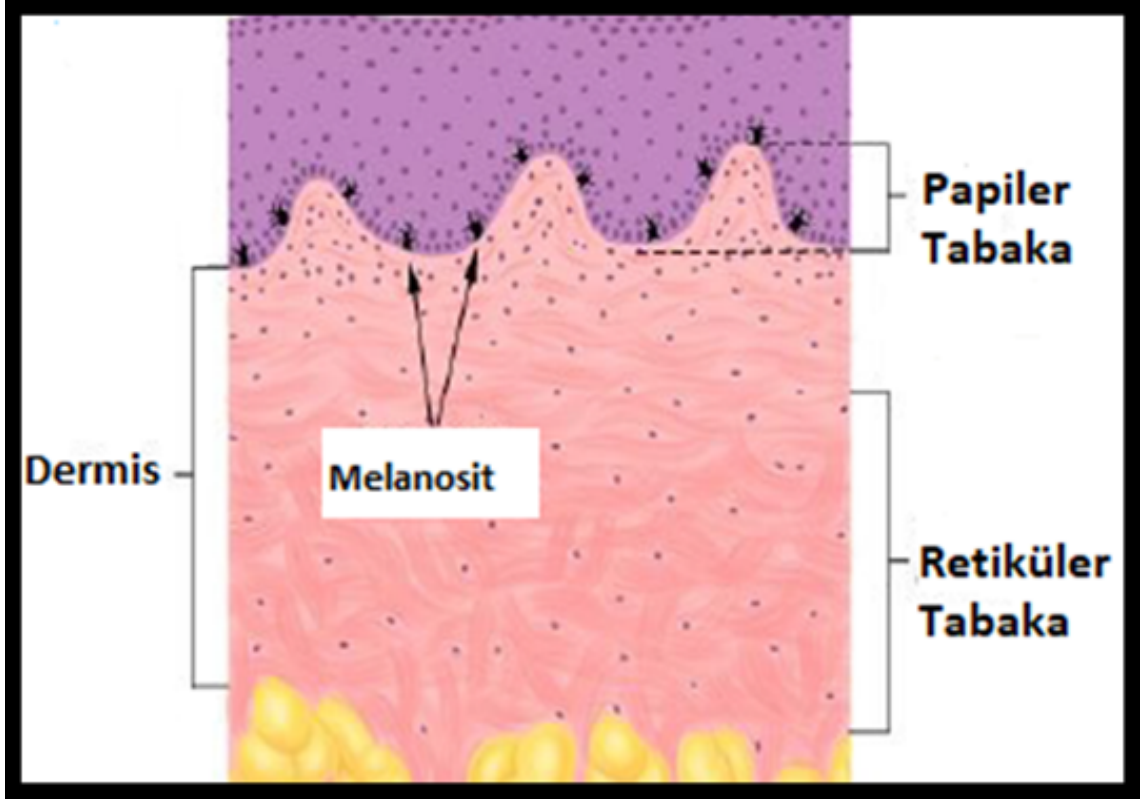


Şekil 2.3 Epidermin histolojik yapısı
[76]

2.2.2 Dermis

Dermis, cilt dokusunun ikinci tabakasıdır ve fibroblast hücrelerinden oluşur. Kan dolaşımından, besin ve oksijenden sorumlu olan kan damarları ve edinilmiş bağışıklık sistemi için lenfatik yapılar da dermiste bulunur. Kolajen ve elastin, sırasıyla deriye gerginlik ve elastikiyet veren dermin fibröz destek proteinleridir. Ayrıca dermis, papiller ve retiküler olmak üzere iki farklı bölgeden oluşur. Papiller ince tabakadır, retiküler ise dermiste kalın tabakadır (Şekil 2.4) [77].

Papiller tabakadaki kolajen lifler ince ve gevşektir. Aynı zamanda cilt yüzeyine diktir. Papiller tabaka, dermin üst tabakasını oluşturur. Retiküler tabakada kolajen lifler daha kalın ve cilde paraleldir. Retiküler tabaka hipodermise geçiş alanıdır (Şekil 2.5) [79].



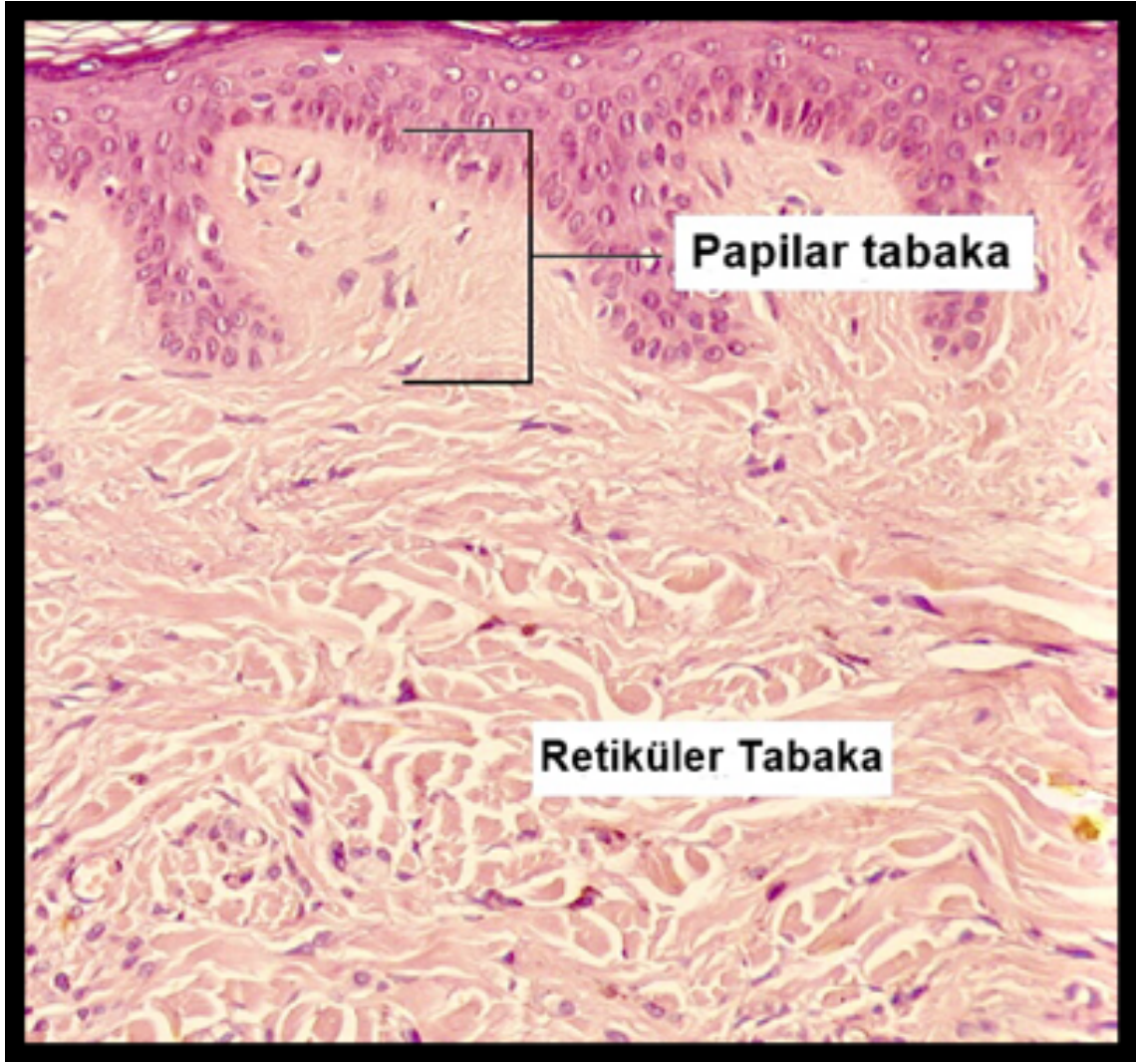
Şekil 2.4 Dermisin anatomik yapısı
[78]

2.2.3 Hipodermis

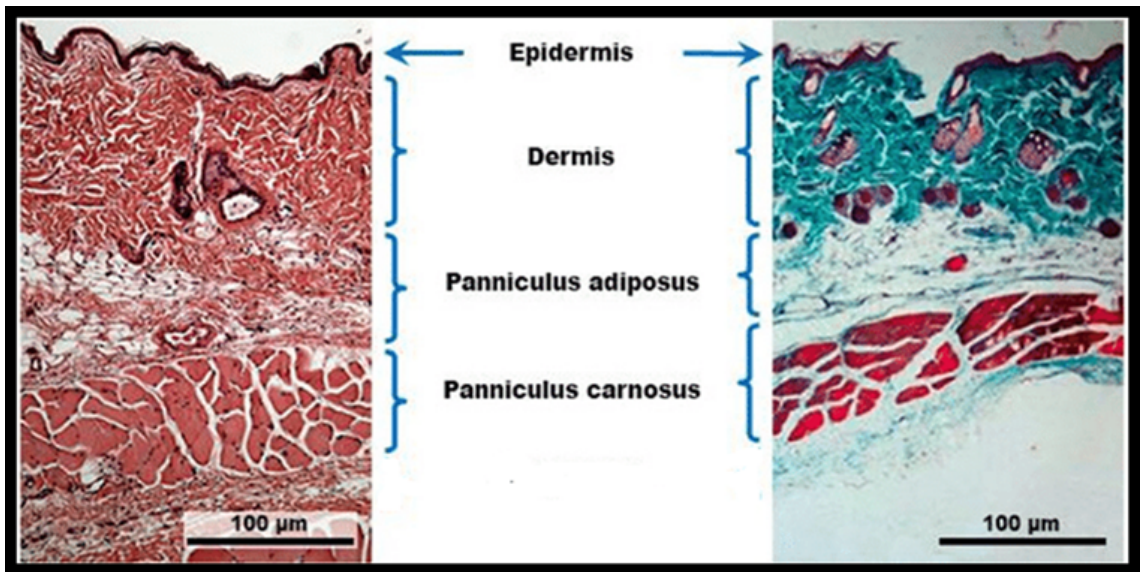
Hipodermis veya deri altı tabaka, çoğunlukla mezenkimal olarak türetilmiş yağ dokusundan oluşan cildin en derin tabakasıdır. Hipodermis ektodermden türetilmekte olup, *Panniculus adiposus* ve *Panniculus carnosus* olmak üzere iki katmandan oluşmaktadır. *Panniculus adiposus*, adipoz dokudan oluşurken, *Panniculus carnosus* çizgili kas liflerinden oluşmaktadır (Şekil 2.6). Hipodermis, alttaki kaslar, tendonlar, kemikler ve eklemler için yastıklama etkisi sağlamaktadır. Saç kökleri, sinirler ve kan damarlarını içermektedir ve tabakanın derinliği vücuttaki bölgeye göre değişmektedir. Deri altı adipoz hücreleri de sinyal vermede rol oynamaktadır ve kutanöz yara onarımını düzenleyen leptini üretmektedir [81, 82].

2.3 Yara ve Yara Türleri

Yara, dokuların fizyolojik yapısında, işlevinde bir tahribat veya hasarı temsil etmektedir. Epidermis ile sınırlandırılarak cildin bütünlüğünün bozulmasına neden olabilmektedir veya deri altı dokuya ulaşarak kaslar, tendonlar, damarlar, sinirler, parankimal organlar ve kemik gibi diğer yapılara zarar verebilmektedir [84]. Basit bir yara, önemli doku kaybı ve diğer ilişkili komplikasyonları içermez; karmaşık bir yara ise doku devitalizasyonunu, enfeksiyonu, iskemiye (flep nekrozu), hematomu



Şekil 2.5 Dermisin Histolojik yapısı
[80]



Şekil 2.6 Hipodermisin yapısı
[83]

veya kompartman sendromunu göstermektedir. Bir yaranın doğrudan sonucu, doğal savunma bariyerinin ihlali ve enfeksiyonlara neden olan mikro organizmaların istilasidir [85]. Yaraların varlığını belirleyen birçok faktör vardır; tesadüfi veya kasıtlı bir etiyojiye sahip olabilirler veya bir hastalık sürecinin sonucu olabilmektedirler. Yaraları sınıflandırmak için zaman dahil birçok kriter vardır. Nitekim, yara iyileşme sürecinin dinamikliğinden dolayı yara onarımında zaman önemli bir değişkendir [86]. Özellikle yaralar, iyileşme süresine göre akut, kronik ve karmaşık yaralar olarak kategorize edilebilmektedir [87, 88].

2.3.1 Akut Yaralar

Hem fonksiyonel hem de anatomik restorasyon sonucunda kendini onaran, zamanında ve düzenli bir iyileşme yolu izleyerek kapana yaralar akut yaralar olarak sınıflandırılır [89]. İyileşme süresi genellikle 5 ila 30 gün içinde değişir. Akut yaralar, travmatik doku kaybı veya cerrahi bir işlem sonucunda oluşabilir[90]. Deride ve altta yatan parankimde bulunan bir yumuşak doku tümörünü çıkarmak için yapılan bir operasyon, bazen doku içindeki büyük kusur nedeniyle iyileştirilemeyen büyük ama kontamine olmayan bir yaraya örnek verilebilir. Akut yaralar başlığı altında travmatik yaralara da sıklıkla rastlanır. Travmatik yaralar, yalnızca yumuşak dokuda oluşabilirler veya kemik kırıklarıyla ilişkili olabilirler. Bu kombine yaralanmalar, en kapsamlı ve en yaygın kullanılanlardan biri olan AOF'ın (Arbeitsgemeinschaft fuer Osteosynthesefragen / Association for the Study of Internal Fixation) sınıflandırma sistemine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma sistemine dahil olanlar, deri, kas, tendon ve nörovasküler yaralanmalar ile sonuçlanan kapalı ve açık kırıklardır. AOF'ın sınıflandırma sisteminin yararı, yaralı uzvun prognozunu belirlediği için kaslara ve tendonlara verilen hasarın derecesinin hesaplanmasını sağlamasıdır [91].

2.3.2 Kronik Yaralar

Kronik deri yaraları, dünya çapında 37 milyon hastayı etkileyen büyük bir sorunu temsil etmektedir [92]. Toplum için önemli bir ekonomik yük ve birey için önemli bir hastalıktır[93, 94]. Akut yaralar göre kronik yaraların iyileşmesi 6 hafta sonra tamamlanamaz ve enfeksiyona, doku hipoksisine, nekroza, eksüdaya, aşırı seviyelerde enflamatuar sitokinlere, daha az mitojenik aktiviteye ve yüksek proteaz aktivitesine duyarlıdır[95]. Kronik yaralar, bir dizi doku tepkisine neden olan sürekli iltihaplanma ve bunun sonucunda önemli, fibrotik yara izi oluşumuyla birlikte artan, kolajen birikimine neden olan, iyileşmeyen bir durumla karakterize edilmektedir [96]. Bu enflamatuar durum nedeniyle fonksiyonel ve anatomik iyileşme engellenir. Bu yaralar sıklıkla nükseder. Kronik yaralar, temel olarak diabetes mellitus, periferik

arter hastalığı, venöz yetmezlik gibi bir arada bulunan patolojilerden kaynaklanır ve tütün içimi, düşük serum albümini, ileri yaş, hareketsizlik, yetersiz beslenme ve diğer enflamatuvar durumlar ile şiddetlenmektedir. Kronik yaralar, basınç ülserlerini, diyabetik ayak ülserlerini ve vasküler ülserleri (venöz ve arteriyel ülserler dahil) kapsamaktadır [97, 98].

Basınç ülserleri en yaygın kronik yaraları temsil eder ve epidermis veya deri altı dokusunda lokalize bir yaralanmadan oluşmaktadır [99]. Yatak yaraları, basınç yaraları ve dekübit ülserleri olarak da bilinmektedirler. Kayma ve sürtünme kuvvetleriyle birlikte aşırı basınçtan kaynaklanmaktadır. Basınç ülserlerine sahip olma potansiyeline sahip hastalar, yaşlılar, inme mağdurları, diyabet hastaları, bunama hastaları, tekerlekli sandalye kullanan ve yatalak olanlardır. Hastalarda genellikle sakrum ve topuklarda basınç ülserleri görülmektedir, ancak aynı zamanda iskiümde, dirseklerde, dizlerde ve posterior kafa derisi gibi kemik çıkıntılarında görülme ihtimali vardır [100].

Diyabetik ülserler, yerçekimleriyle ilişkili olarak cildi, deri altı ve kemik dokularını etkileyebilen zor iyileşme özelliğine sahip lezyonlardır. En yaygın anatomik yerleşim ayaktadır, ayrıca parmakların tepe bölgelerini, parmak eklemlerini, metatarsal başları (plantar bölge), topuk, ayak bileği ve bacağı yerleşim görülmektedir [101]. Diyabetik ayak ülserleri, hemoglobin ve eritrosit zarlarının glikosilasyonundan kaynaklanır. Birincisi dokularda oksijenlenmenin azalmasına neden olurken, ikincisi artmış kan viskozitesine, azalmış eritrosit deformasyonuna ve kan akışının azalmasına neden olmaktadır [102]. Diyabetik hastalarda ayrıca alt ekstremitelerin uzak uçlarında paresteziye neden olan periferik nöropatiler gelişmektedir. Tüm diyabetiklerin %25'e varan oranda diyabetik ayak ülseri geliştireceği tahmin edilmektedir. Bu patoloji sıklıkla, septik nekroz gelişmesine ve bunun sonucunda amputasyona yol açabilen bir enfeksiyona dönüşmektedir [103].

Vasküler ülserler genellikle arteriyel veya venöz ülserler olarak sınıflandırılabilir. Vasküler ülserlerin yeri, görünümü, kanaması ve buna bağlı olarak ağrısı farklıdır. Bu özellikler baz alınarak arteriyel veya venöz ülserleri ayırt edilmektedir. Arteriyel (veya iskemik) ülser, deride iskemiye ve doku kaybına neden olan ilerleyici ateroskleroz veya arteriyel embolizasyondan kaynaklanmaktadır [104].

Venöz (veya staz) ülserasyon, venöz hipertansiyondan kaynaklanmaktadır. Çalışmalar, patolojinin, etkilenen dokuya oksijen ve diğer besinlerin veya büyüme faktörlerinin verilmesini engelleyen fibrinli bir perikapiller manşetin gelişmesine yol açan artmış bir stazdan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Oksijen kaybı, nekroz ve

ülserasyonun olgunlaşması anlamına gelmektedir. Bu konu hakkındaki Anothe hipotezi, damarlardaki basıncın artması ve lökositlerin aktivasyonunun endotelyuma zarar vererek yaralanma ve ülserasyona yol açtığını ileri sürmektedir [105].

2.3.3 Karmaşık Yaralar

Karmaşık bir yara, özel bir durumdur ve bir enfeksiyon veya doku bozukluğunun bir kombinasyonu olarak tanımlanır. Enfeksiyon, yaraya sürekli bir tehdit oluşturur. Ancak yara, travmatik, enfeksiyon sonrası etiyoloji veya geniş doku rezeksiyonu (örn. Tümör yönetiminde) nedeniyle gelişir. Nedeni, boyutu, konumu ve yönetimi ne olursa olsun her yara kontamine olur. Belirgin bir enfeksiyonun gelişip gelişmeyeceği, virülansa, mikroorganizmaların sayısı ve türünün yanı sıra yerel kan kaynağına ve hastanın doğal direncine bağlıdır. Enfeksiyonun tipik özellikleri, iyi belgelenmiş beş belirti ve semptomdur: etkilenen kısımda kızarıklık, ateş, ağrı, ödem ve kayıp veya sınırlı işlev. Yara enfeksiyonlarının sıklığı, yaranın türüne veya cerrahi tekniğine ve yaranın konumuna bağlıdır [106–108].

Yara sınıflandırması sırasında dikkate alınan diğer kriterler arasında etiyoloji, kontaminasyon derecesi, morfolojik özellikler yer alır [86, 109]. Etiyoloji, tetik faktörüne göre yaraları kontüzyonlar, sıyrıklar, avülsiyonlar, laserasyonlar, kesikler, bıçak yaraları, ezilme yaraları, kurşun yaraları ve yanıklar olarak sınıflandırır [110]. Kontaminasyon derecesine göre yaralar şu şekilde üç gruba ayrılır: (i) aseptik yaralar (kemik ve eklem operasyonları); (ii) kontamine yaralar (abdominal ve akciğer operasyonları); ve (iii) septik yaralar (apseler, bağırsak operasyonları, vb.). Yaralar, altta yatan dokunun travma geçirdiği ancak cildin kesilmediği kapalı veya açık olarak, deri tabakasının altta yatan doku ile hasar gördüğü yerlerde açık olarak da adlandırılabilir [111].

2.4 Yara İyileşme Süreci ve Basamakları

Yara iyileşmesi, hasarlı dokunun bütünlüğünü oluşturmak için kan hücreleri, parankimal hücreler, hücre dışı matriks gibi çeşitli biyolojik, immünolojik sistemler arasındaki koordineli etkileşimlerin sonucu olan karmaşık ve sürekli bir süreçtir [112]. Yara iyileşmesinin zamana bağlı olarak pıhtılaşma ve hemostaz, iltihaplanma, proliferasyon, yeniden şekillenmesi şeklinde dört aşaması vardır [113].

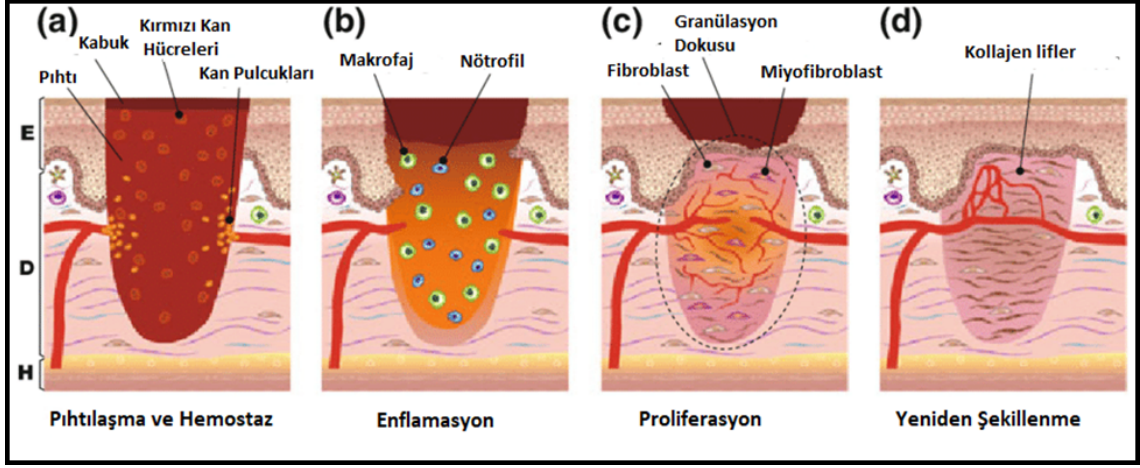
Pıhtılaşma ve hemostaz aşaması, bir yara oluşuktan hemen sonra başlar ve yaklaşık 1-3 gün sürer. Hemostaz, büyük hasarlı kan damarlarının daha sonra tıkanması ve düz kas kasılmasıyla gerçekleştirilir. Trombositlerin aktivasyonu ve agregasyonu ve damar duvarı yaralanma bölgesinde pıhtılaşma faktörlerinin salınması, hasarlı

damarların trombozunu destekleyen pıhtılaşmayı tetikler. Trombositler bir pıhtı oluşturur ve birbirine fibrin ile bağlanır. İnflamasyon aşamasını başlatmak için yaralanma bölgesine lökositleri toplayan birkaç sitokin salınır (Şekil 2.7a) [114, 115].

Enflamasyon aşamasında, nötrofiller olarak da bilinen lökositler, çevreleyen mikro damar sisteminden göç eder ve yabancı veya nekrotik kalıntıları, bakterileri ve diğer kirleticileri yara bölgesinden çıkarmaya başlar. T hücreleri yaraya sızar ve iyileşme sürecinin metabolik ihtiyaçlarını sağlamak için gerekli olan anjiyogenez ve fibroplazinin iyileştirilmesinin iki önemli yönünü başlatmak için TGF- β ve PDGF salgılayan makrofajları çağırır (Şekil 2.7b) [116, 117].

Çoğalma aşaması (Proliferasyon), yara iyileşme sürecindeki iltihaplanma aşamasını takip eder. Çoğalma aşamasının süresi, yaralanma sonrası yaklaşık 3 haftadır (3 ila 21 gün). Enflamasyon aşamasında aktif hale gelen makrofajlar, anjiyogenez faktörünü (AGF), fibroblastları kollajen ve glikozaminoglikanlar (GAG'lar) üretmek için aktive eden ve yara bölgesine kan sağlayan yeni kılcal damar gelişimini başlatan fibroblast uyarıcı faktörü salmaya başlar [118]. Kollajen ve GAG'lar, neovaskülarizasyonla birlikte proliferasyon fazı boyunca yara kusurlarını dolduran granülasyon dokusunu yapılandırır [119, 120]. Yara oluşuktan sonraki ilk ve ikinci hafta arasında kontraktıl özelliklere sahip miyofibroblastların (özel fibroblastlar) varlığında yaranın yeniden oluşturulması defektin boyutunu küçültür ve yara kenarlarını birbirine yaklaştırır. Bozukluğu köprülemek için epitel hücrelerinin granülasyon dokusu üzerinden göçünü ve çoğalmasını içeren yeniden epitelizasyon süreci proliferasyon aşamasında gerçekleşir. Yeni epitel hücreleri bakteri istilasına karşı bir bariyer görevi gördüğü ve yara bölgesinden sıvı kaybını önlediği için bu süreç yara iyileşmesi için gereklidir. Göç sırasında epitel hücrelerinin hızı, yüzey tipinden büyük ölçüde etkilenir. Nemli bir yüzey epitel hücrelerinin göçünü artırırken, yara kabuğu ile kaplı veya kuru bir yara yüzeyi yara bölgesine göçü engeller (Şekil 2.7c) [121, 122].

Yara iyileşmesi, yaralanma meydana geldikten yaklaşık 21 gün sonra başlayan ve en az 1 ila 2 yıl süren yeniden şekillenme veya olgunlaşma aşaması adı verilen son aşama ile sona erer. Bu aşamada üretilen kollajenazlar, kusurlu yara dokusunun yeniden şekillenmesinden sorumludur. Kollajen sentezinin miktarı, onarılan yaranın nihai gücünü belirler. Yeniden şekillenme aşamasının sonunda, maksimum gerilme mukavemetine ulaşılır ve sağlıklı dokunun gücünün neredeyse % 80'i kadardır (Şekil 2.7d) [123, 124].



Şekil 2.7 Yara iyileşme basamakları (E:Epidermis, D:Dermis, H:Hipodermis)
[125]

2.5 Yara İyileştirici Ürünler

2.5.1 Gazlı Bez

Yaraları sarmak için gazlı bez kullanımının kökenleri, MÖ beşinci yüzyıla dayanmaktadır ve bugün hala kullanılmaktadır. Gazlı bez, dokuma ve dokuma olmayan bandajları temsil eder. Dokuma bandajlar %100 doğal pamuk olup, dokunmamış bandajlar sentetik pansuman malzemelerinden oluşmaktadır. Dokuma gazlı bez, kesildiğinde lifleri döktüğü ve çıkarıldığında yara yatağında kalıntı bırakabileceği için pansuman ve yaraların kapatılmasında sorunludur. Aynı zamanda emicidir ve yaraya yapışma eğilimindedir, yarayı çabucak kurutup sıkıştırarak yarayı çıkarırken travmaya neden olur. Günümüzde dokuma gazlı bez "ıslaktan kuruya" bir pansuman olarak görülmekte ve çeşitli yara bakımı stratejilerinde kullanılmaktadır. Seçici olmayan fiziksel debridman moduna, yara yatağına travmaya ve buna bağlı ağrıya rağmen, halen dünyada en çok kullanılan yara sargısıdır. Aynı zamanda antimikrobiyal maddeler için bir araç olarak da kullanılır[126, 127].

2.5.2 Film Sargılar

Film sargılar yara bölgesini korumak için bir bariyer olarak kullanılabilir ve genellikle hidrokolloidler, köpük, hidrojel tabakalar ve kompozit sargılar gibi diğer sargıların yapısının bir parçasını (dış katman) oluşturur. Film sargısının yara tedavisinde uzun bir geçmişi vardır ve sıklıkla günlük klinikte kullanılmaktadır. Film sargısı nem geçişine izin verir, böylece yara bölgesinden sıvı kaybını azaltır. Ayrıca bakterileri geçişini engeller ve böylece yaranın ikincil enfeksiyonunu önler. Yaranın ürettiği sıvı miktarına bağlı olarak pansuman genellikle birkaç gün yara yatağında bırakılır. Film sargılar, yara örtüsünün çıkarılmasına gerek kalmadan yaranın görülmesini

sağlamaktadır [128–130].

2.5.3 Hidrokolloidler

Hidrokolloid yara örtüleri esas olarak selülozdan oluşur ve tıkayıcı bir yapıya sahiptir, bu nedenle çeşitli yara türlerinin(basınç ülserleri, bacak ülserleri, cerrahi yaralar, sıyrıklar ve küçük yanıklar) optimal iyileşmesine yardımcı olan yeni doku oluşumunu uyarmak için nemli ortam sağlar [131]. Hidrokolloidler, bakteri ve su geçirmeyen bir dış tabakaya sahiptir, ayrıca ısı yalıtımı sağlayarak yara yatağının vücut sıcaklığına yakın kalmasını sağlar[132]. İç hidrokolloid tabaka, otolizi teşvik eden bir jel oluşturmak için yara eksüdasıyla etkileşime girer [133]. Hidrokolloid sargı bezleri, hidrojellerden çok daha karmaşıktır çünkü metilselüloz, pektin, jelatin ve poli izobutilen gibi çeşitli bileşenler içerirler, bazıları da aljinat içerir [134, 135]. Yara yüzeyiyle temas ettikten sonra, hidrokolloidler sıvıları yavaşça emerek sargının fiziksel durumunda bir değişikliğe ve yarayı örten jel oluşumuna yol açar. Bu nedenle interaktif pansuman olarak adlandırılır [136, 137]. Ürün seçimine bağlı olarak, hidrokolloidler hem akut yaraların hem de kronik yaraların sarılması için uygundur. Başlangıçta, hidrokolloid yara örtülerinin günlük olarak değiştirilmesi gerekir (eksüda seviyesine bağlı olarak), ancak eksüda azaldığında, pansumanlar 7 güne kadar yara yüzeyinde kalabilir. Birkaç istisna dışında, hidrokolloidler, yerine sabitlenmesi için ikincil bir sargı gerektirir. Hidrokolloidler enfekte yaralarda kullanılmamalıdır [138].

2.5.4 Aljinat Örtüler

D-Mannuronik ve L-Guluronik asidi farklı oranlara sahip deniz yosunlarından elde edilen aljinat yaradaki sodyum ve kalsiyum dengesini sağlamaktadır. D-Mannuronic açısından zengin aljinatlar, çözelti içinde daha fazla dağılan yumuşak amorf jeller oluşturur. L-Guluronik asit bakımından zengin aljinatlar, bazik yapılarını korurken, çözelti içinde daha fazla şişme eğilimindedir [139]. Kanla temas ettiğinde, aljinattaki kalsiyum iyonları kandaki sodyum iyonları ile değiştirilerek sargının çözünürlüğünü artırır. Jel oluşumunu hızlandırmak için pansumandaki bazı kalsiyum iyonlarının sodyum iyonları ile değiştirilmesi gerektiği belirlenmiştir ancak bu durum pıhtılaşmanın aktive edilmesini azaltabilir [140].

2.5.5 Hidrojeller

Hidrojeller, kimyasal veya fiziksel bağlarla bir arada tutulan hidrofilik tabiatlı üç boyutlu ağlardır. Polimer zincirleri üzerindeki hidroksil (OH) ve karboksil (COOH) gibi hidrofilik gruplar suyu emer ve depolar. Yapıda bulunan ağda yeterli boşluk varsa, su molekülleri yakalanabilir ve hareketsiz hale getirilerek mevcut boş hacim

doldurulur [141, 142]. Bu, hidrojenlerin yara tedavisinde spesifik faydasını sağlayan kalitedir. Hidrojenler nemli yara örtüsü olarak işlev görürler. Aynı zamanda kontamine olmuş eksüdalari emebilir ve bunlari jel yapısı içinde güvenli bir şekilde tutabilirler. Salgıların emilmesi, polimer zincirlerindeki çapraz bağların genişlemesine neden olur. Hidrojel sargıların temel fiziksel özellikleri, kullanılan polimerlerin özelliklerine göre özel olarak değiştirilebilir. Hidrojenler yarayı sıvı kaybından korur, lezyona ek nem sağlayabilir ve onu harici travmalara karşı güvenli bir şekilde koruyabilir. Pansuman altında, yara iyileşmesinin bireysel aşamalarında tüm hücrel aktivitelere ve beslenme süreçlerini uyaran, düzenleyen bir mikro iklim geliştirilir [143].

Şeffaflık, tamponlama etkisi, soğutma etkileri vb. gibi ek avantajlar, özellikle hasta konforu ve uygulama kolaylığı açısından hidrojenlerin fayda değerini önemli ölçüde artırır. Şeffaf hidrojenlerin avantajı, yara iyileşme sürecinin pansumanı çıkarmadan kolaylıkla izlenebilmesidir. Hidrojenin yüksek nem içeriğı ve yumuşak elastik, tamponlama özellikleri neredeyse "ikinci bir cilt" gibi davranır. Hidrojel sargının çıkarılması neredeyse ağrısızdır çünkü hidrojel yaraya yapışmaz, ancak yara yüzeyindeki hidrofilik gruplarla ikincil bağlar oluşturan hidrofilik grupların varlığından dolayı yara bölgesinde bozulmadan kalır. Hidrojel kalıcı olarak nemli kalır ve uzun süreli uygulamadan sonra bile ağrı ve yara tahrişi riski olmadan çıkarılabilir. Ayrıca hidrojel sargılarla kötü koku azaltılır, çünkü koku molekülleri salgıların emilmesiyle birlikte jel yapısında tutulur. Yaraların hidrojenlerle tedavisi hem hasta hem de bakım personeli için büyük rahatlama sağlayabilir. Bu nedenle, hidrojel ile bir yara tedavisinin kabulü, genel olarak, hasta açısından çok yüksektir [144, 145].

2.5.6 Köpük Örtüler

Köpük yara örtüsü, orta ila yüksek düzeyde eksüdalı yaralarda kullanılır. Örtüler, optimum sıvı dengesini sağlamak için emer, tutar ve açığa çıkarır. Bu işlem, optimum yara iyileşme ortamını koruyarak daha hızlı iyileşmeyi teşvik etmeye yardımcı olur ve yaranın çok ıslanmasına izin vermeyerek maserasyon riskini azaltır. Yapışkan köpük örtüler emiciliğe yardımcı olurken, birincil örtülerin yara yatağında kalmasına yardımcı olmak için ikincil örtüler olarak da kullanılır. Köpük örtüler, debride yaralarda kullanılması uygun değildir [146, 147].

2.5.7 Silikon Örtüler

Silikon, ya bir temas sargısı olarak ya da bir örtü içinde temas tabakası olarak kullanılır [148]. Bu duruma örnek olarak, yumuşak silikon bir tabaka ile kaplanmış bir poliüretan köpük zar olan Mepilex verilebilir. Dokumasız polyester ağlar gibi malzemeler üzerinde kaplama olarak da kullanılırlar. Negatif basınç tedavisinde,

silikon kaplı polyester iyileşme oranlarını artırır ve basınç terapisi ile kombine edildiğinde hipertrofik skarlaşmanın önlenmesine yardımcı olabilir [149]. Yumuşak silikon temas katmanları içeren örtüler, yara bölgesine yapışmazken kuru cilde yapışır, bu da atravmatik çıkarma ile sonuçlanır ve örtü değişikliklerinde yara bölgesinde hasar riski azalır. Silikon, birçok farklı bandajlama stratejisine dahil edildiği için bir dizi akut ve kronik yarada kullanılabilir [150].

2.5.8 Antimikrobiyal Örtüler

Bal örtüleri (örn: Derma Sciences MediHone), İyotlu örtüler (Inadine), Gümüş örtüler (Sorbsan Silver), antibiyotikler içeren örtüler yara enfeksiyonları için kullanılan antibakteriyel örtülerden bazılarıdır [151, 152].

2.6 Yara Örtüsü Çeşitleri

2.6.1 Pasif Örtüler

Bunlar gazlı bez, tül ve tüyleri kucaklayan geleneksel örtü malzemeleridir. İdeal örtü malzemelerinin çok az özelliğini yerine getirirler. Birçoğu, yara yatağını kuruturken yoğun yapışma nedeniyle ikincil yara sargısı olarak kullanılır ve bu da daha fazla travmaya yol açar. Gazlı bez, bandaj, sünger, tüp bandaj ve çorap olarak üretilmektedir. Bu örtüler, yaralara yapışabilir ve çıkarıldığında yara yatağını bozabilir. Bu nedenle bunlar küçük yaralar için uygundur (örn. Multisorb, Tül gazlı bez ve vazelin içeren yağlı gazlı bezler). Bu örtü yara yüzeyine yapışmaz ve minimum ıla orta derecede eksüdalı düz ve sık bir yara için uygundur [153–155].

2.6.2 İnteraktif Örtüler

İnteraktif örtü malzemeleri, oksijen ve su buharının taşınmasına izin veren, mikrobiyal saldırıyı önleyen ve doğası gereği şeffaf olan polimerik film ve köpüklerden oluşur. Bu filmler düşük eksüdalı yaralar için uygundur ve yara iyileşmesi kademesini uyarma özelliğine sahiptir. Polimerik filmler saydamdır ve ayrıca düşük eksüdalı sık yaralar için uygundur (örneğin: Tegaderm) Köpükler, büyük miktarda eksüdayı emecek şekilde tasarlanmıştır. Kuruluğa ve kabuklanmaya neden olacağından düşük ekzudasyonlu yaralarda kullanılmazlar (örn. Allevyn). Amorf jeller çapraz bağlı değildir. Ölü dokuyu rehidrate etmek ve çıkarmak için nekrotik veya gevşek yara yatakları için kullanılırlar. Orta ve ağır derecede eksüdalı yaralar için kullanılmazlar [156–158].

2.6.3 Biyoaktif Örtüler

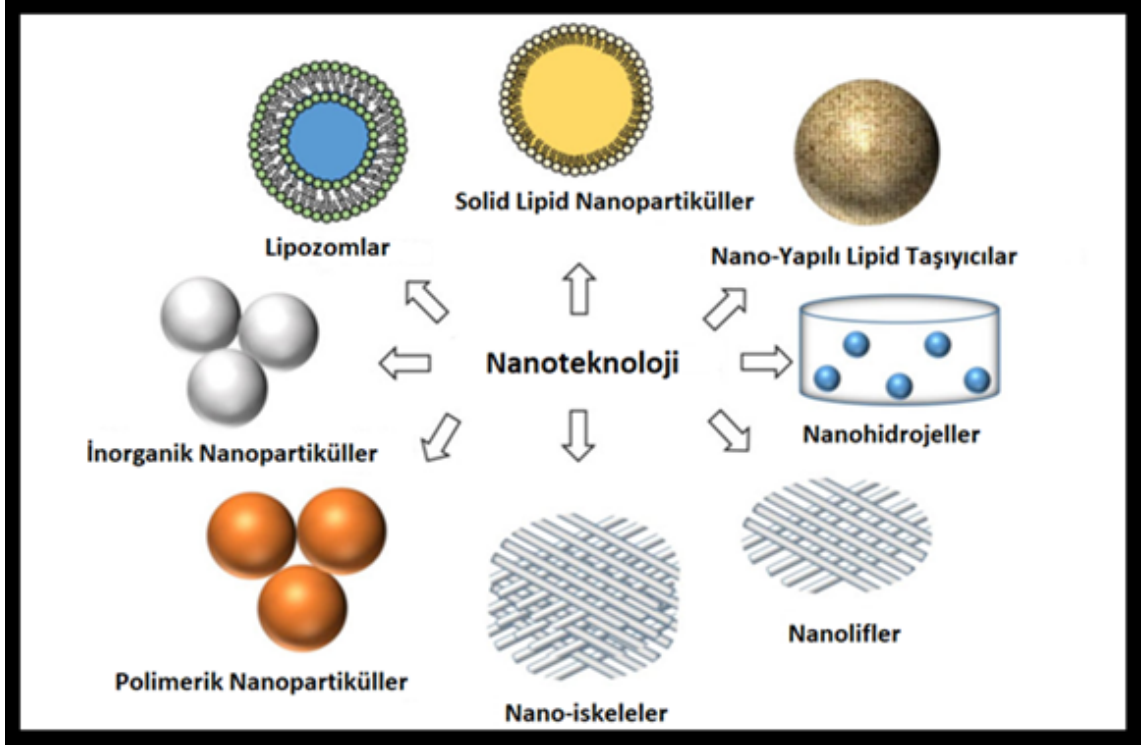
Biyoaktif materyaller ayrıca aktif yara sargı materyalleri olarak bilinir. Bunlar, biyoaktif bileşiklerin verilmesi yoluyla yara iyileşmesinde aktif maddeler verebilmektedir veya sargılar, hidrokolloidler, aljinatlar, kolajenler ve kitosan dahil olmak üzere endojen aktiviteye sahip malzemelerden yapılmıştır [159, 160]. Hidrokolloidler, katı formunda yarı geçirgen poliüretan filmlerdir; Eksüdalarla şişen veya jel oluşturan sodyum karboksimetil selüloz gibi hidroaktif partiküller içerir. Seçilen hidrokolloid pansumana bağlı olarak, hafif ila ağır eksüdalı yaralarda, soyulma veya granül yaralarda kullanılabilirler (Örn DouDERM) [154]. Deniz yosunu türevi aljinatlar, yumuşak ve dokunmamış kalsiyum-sodyum aljinat sargılarını sentezlemek için kullanılır, genellikle yüksek eksüda drenajına sahip yaralar için kullanılır ve ağırlıklarının 20 katını emebilir. Bunlar genellikle yapışkan değildir ve sıvı ile temas halinde jel oluşturmazlar ancak yapışkan görünmektedir ve hiçbir eksüda yarasında jel oluşturmamaktadır. Bu tür pansumanlar çarşaf ve ipler şeklinde mevcuttur (Örn Kaltostat) [161]. Kolajen, dokuda doğal bir yapı iskelesidir ve hücre dışı matrisin ana bileşenidir. Kolajen sargı bezleri; pedler, jeller veya partiküller halinde mevcuttur. Yeni oluşan kolajenin yara yatağında birikmesini teşvik ederler, eksüdaları emerler, nemli bir ortam sağlarlar ve yara iyileşme sürecini desteklerler [162]. Hidrofiberler, sodyum karboksimetil selüloz liflerinden yapılan yumuşak dokunmamış ped veya şerit sargıdır. Sıvıyı yara yatağından çekip kilitlerler ve sıvı ile jel temasına geçerler. Bu tür örtülerde bulunan lifler, örtü materyallerine, doku büyümesini istila etmeden, yara ve pansumanlar arasında yapışma sağlar, bu da materyallerin kolay uygulanması, bakımı ve çıkarılması için faydalıdır(Örn Aquacel) [163].

2.7 Yara İyileşmesinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar

Nanoteknoloji, rejeneratif tıpta çok sayıda ümit vaat eden uygulamaları olan heyecan verici, gelişen bir alandır [164]. Birçok çalışmada, nanoyapılı, değişken bileşimli ve yara iyileşme sürecinde farklı rollere sahip malzemeler geliştirilmiştir[165]. Bunların arasında, nanolifli malzemeler cilt yenilenmesi için iskeleler ve ilaç dağıtım sistemleri olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır [166]. Nanopartiküller ve lipozomlar gibi diğer nano yapılı ilaç dağıtım sistemleri, farklı aşamalarda yara iyileşmesini iyileştirmek için kullanılmıştır (Şekil 2.8) [28].

2.7.1 Nanopartiküller

Son yıllarda yapılan çalışmalar, geleneksel ilaçların uygulamalarında birçok sıkıntının ortaya çıktığını rapor etmiştir. Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler sonucunda, nano bazlı yeni ilaç dağıtım ve iletim sistemlerinin geliştirilmesine dayalı kapsamlı



Şekil 2.8 Yara iyileşmesinde kullanılan nano yapılar
[167]

araştırmalar yapılmıştır. Son birkaç yılda, yeni ilaç salınım sistemlerinin kullanımı, farklı ilaçların terapötik etkililiğini artırmak ve istenmeyen yan etkilerini en aza indirmek için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Bu sistemler kanserler, osteoporoz, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar, artrit, enfeksiyonlar ve yara iyileşmesi gibi çok çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için faydalı olabilir [168, 169].

İlaçların kontrollü bir şekilde nano bazlı ilaç dağıtım sistemlerinden salınması yara iyileşmesi açısından büyük avantajlar sağlamaktadır. Kullanılan biyoaktif moleküllerin yaraya bozulmadan ve parçalanmadan ulaştırması, yan etkilerin ve toksisitenin azaltılması, yara bölgesinde uzun süre kalması, cilt hidrasyonunu sağlaması, iyileştirme sürecini hızlandırması, nano bazlı kontrollü ilaç salınım sistemlerinin avantajları arasında yer almaktadır. Yara iyileşmesinde kullanılan en önemli nano bazlı ilaç taşıyım sistemlerine örnek olarak polimerik nanopartikülleri verilebilmektedir. Ayrıca miseller lipozomlar, nanofiberler, polimerik iskeleler, lipid nazlı nanopartiküller yara iyileşmesinde kullanılan diğer kontrollü ilaç dağıtım sistemleridir. (Şekil 2.8) [170–172].

2.7.1.1 Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, yara iyileşmesinde kullanılan en önemli ilaç dağıtım ajanlarından biridir. Yara iyileşmesinde kullanılan biyoaktif maddeler ve terapötik ajanların, polimerik nanopartiküller ile enkapsülasyonu, bu maddelerin kontrollü bir şekilde yara ortamına salınmasına, yan etkilerin ve toksik etkilerinin ortadan kaldırılmasına, biyoyararlanım oranının artmasına, neden olmaktadır. Kullanılan polimerler biyoyumlu olması ve parçalandıktan sonra vücut dışına atılması da polimerik nanopartiküllerin diğer avantajları arasındadır. Polimerik nanopartiküller PCL, poli (laktik asit) (PLA), PLGA, poli alkil-siyanoakrilat gibi sentetik polimerler kullanılarak elde edildiği gibi, jelatin, dekstroza, aljinat ve kitosan gibi doğal polimerlerin kullanılması ile elde edilebilmektedir. [173].

Kitosan, güçlü bir antimikrobiyal ajandır ve antimikrobiyal özelliği, katyonik yapısının varlığından kaynaklanmaktadır. Antimikrobiyal, mikroorganizmaları öldüren veya büyümelerini engelleyen bir ajandır. İltihabı azaltan madde veya tedavi, anti-enflamatuar olarak bilinir. Anti-enflamatuar ilaçlar, merkezi sinir sistemini etkileyen opioidlerin aksine, iltihabı azaltan ve böylece ağrıyı dindiren analjeziklerin yaklaşık yarısını oluşturur. Kitosan, umut verici çeşitli biyomedikal uygulamalara sahiptir ve şu anda, son zamanlarda yayınlanan çok sayıda çalışmanın gösterdiği gibi, ilaç verme sistemleri, yara iyileştirme, antibakteriyel, yağ bağlayıcı, hemostatik ajan, hipokolesterolemik etki alanlarında yeni ve yenilikçi bir materyal olarak kabul edilmektedir [174–176].

Asetik asidin intraperitoneal uygulanmasına bağlı olarak, kitosan tedavisi enflamatuar ağrıyı doza bağlı bir şekilde azaltır. Bradikinin, ağrı ile ilgili ana maddelerden biridir. Peritoneal lavaj sıvısında kitosan asit asetik solüsyonunun uygulanması sırasında bradikinin konsantrasyonunun %0,5 asetik asit solüsyonunun uygulanmasına göre daha düşük olduğu bildirildi, ki bu da kitosanın analjezik etkilere sahip olduğunu düşündürdü. Yara tedavisi için formüle edilmiş kitosan, açık bir yaraya uygulandığında serin, hoş ve yatıştırıcı bir etki sağlayarak analjeziye neden olabilir. Kitosan, yanıklar, deri sıyrıkları, deri ülserleri ve deri greftli alanlar gibi açık yaralara topikal bir ajan olarak uygulandığında mükemmel bir ağrı giderimi sağladı [177].

Hou ve ark. 2020 yılında vacarin isimli bileşiği kitosan nanopartikülleri ile enkapsüle ederek yara iyileştirmesini hızlandırmasını amaçlamışlardır. Çalışmanın sonucunda Vacarin yüklü kitosan nanopartiküllerinin, yara iyileşmesinin tedavisi için potansiyel bir uygulama değerine ve biyo-tıbbi olarak ilgili sistemlerde umut verici bir performansa sahip olabileceğini belirtmişlerdir [178]. Biranje vd. 2019 yılında yaptıkları çalışmada, Etkili ve ekonomik bir yara pansumanı malzemesi için kitosan nanopartikülleri içeren biyolojik olarak parçalanabilir bir pansuman

başarıyla geliştirmeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda etkili ve hızlı yara iyileşmesi için geliştirilen kitosan nanopartikül bazlı pansumanın nekrotik dokuları çıkarma ve hemostaz aktivitesini hızlandırma etkisine sahip olduğu belirlenmiştir [179]. Diğer bir çalışmada, yara iyileşmesini destekleyebilen ve eşlik eden olası bakteriyel enfeksiyonu inhibe edebilen sefadroksil (CDX) yüklü kitosan nanopartiküllerin kolayca uygulanabilen yeni bir jel üretmeyi amaçlamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda serbest CDX ile tedavi edilen sıçanlarla karşılaştırıldığında, CDX yüklü kitosan nanopartiküller ile tedavi edilen grup, cilt biyopsilerinin histopatolojik incelemesiyle daha da doğrulanmış, kayda değer bir hızlandırılmış yara iyileşme süreci ve bakteriyel klirens ortaya çıkardığı belirlenmiştir [180].

2.7.2 Nanolif Malzemeler

Son on yılda, nanolif yapı iskeleleri, özellikle ECM'ye benzerlikleriyle, cilt onarımı için yapı iskelesi olarak büyük ilgi görmüştür [181]. Nanofibröz iskeleler üretme teknikleri arasında olan elektroegirme, çok çeşitli polimer çözeltilerinden mikro ve nano lif üretme yeteneği sayesinde öne çıkmıştır. Elektrosinning temel kurulumu, bir şırınga pompası, bir yüksek voltaj kaynağı ve bir toplayıcıdan oluşur. Bu teknikte, fiber oluşumu, polimerik bir çözeltinin yüzeyinde bir elektrik alanı oluşturulduğunda başlar ve elektriksel potansiyel kuvvet, çözeltinin yüzey geriliminin üstesinden gelerek, küresel damlayı konik bir şekle değiştirerek Taylor konisi olarak bilinir. Elektrik yüklü jetler koninin ucundan ortaya çıkar ve elektrostatik kuvvetler, jetleri kollektöre yönlendiren kaotik bir hareket (bükülme kararsızlığı) yaratırken, sürekli nanoliflerin uzaması ve katılaşması meydana gelir [182, 183]. Toplayıcı özellikleri, elektrik alanını ve dolayısıyla elektrosun fiberlerin morfolojisini ve mimari birikimini güçlü bir şekilde etkiler. Yenilikçi nanolif desenler oluşturmak için yeni sistem konfigürasyonları ve toplayıcı tasarımları geliştirilmiştir [184–186].

Elektroegirme nanolifler, biyoaktif dağıtım sistemleri ve çok fonksiyonlu biyomalzemelerin geliştirilmesi için olağanüstü özellikler sunar. Bu özellikler arasında yüksek yüzey alanı hacim oranı, ayarlanabilir gözeneklilik ve ECM'ye yapısal benzerlik bulunur. Elektroegirme işleminin en önemli özelliği, muhtemelen, sentetik ve doğal polimerler, karışımlar ve kopolimerler dahil olmak üzere çok çeşitli polimerlerle nanolif malzemeler üretme çok yönlülüğüdür [187–189].

Elektroegirme konfigürasyonunun ve parametrelerinin manipölasyonu, iskele özelliklerini kontrol etmek ve nihayetinde belirli bir uygulama için en iyi tasarımı elde etmek için önemli bir araç oluşturur. Elektroegirme solüsyonunun kimyasal bileşimi, elektroegirme ile oluşturulan malzemeni fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik özelliklerinin temel bileşenidir. Nanoliflerin düzenli olması malzemeye

benzersiz özellikler getirirken, seçilen polimerlerin kendine özgü özellikleri elektroğirme sonucu oluşan iskeletonin nihai özelliklerini yansıtır. Polimerin değişken konsantrasyonu ve moleküler ağırlığı, elektroğirme sonucu oluşan malzemelerin morfolojisini kontrol etmenin en etkili yoludur. Nanoliflerin morfolojisi ve iskeletonin üç boyutlu mimarisi, hücre davranışı ve nihayetinde belirli bir dokunun onarım süreci üzerinde muazzam bir etkiye sahiptir [190].

Bir dizi biyoaktif bileşik, antibiyotikler, antikanser ilaçlar ve analjezikler gibi sentetik ilaçlar da dahil olmak üzere yenilikçi iskeleler ve dağıtım sistemleri oluşturmak için başarıyla nanoliflere yüklenmiştir. Nanoliflere yükleme de, bitkilerden elde edilen doğal bileşikler ve hatta nükleik asitler, peptidler ve proteinler kullanılmıştır [191]. Nanolif bazlı biyoaktif dağıtım sistemleri üretmek için farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bunların en basiti, biyoaktif maddenin, biyoaktif bileşik çözünür olduğunda uygulanabilecek şekilde, polimerik çözeltiye doğrudan dahil edilmesidir. Öte yandan, koaksiyel elektroğirme ve emülsiyon elektroğirme ile üretilen çekirdek-kabuk nanolifler, büyüme faktörlerini fiberlerin çekirdeğine kapsüllemek için başarıyla uygulanmış, biyoaktivitelerini ve sürekli salımlarını korumuştur[192]. Enzimler, adhezyon molekülleri ve büyüme faktörleri gibi fonksiyonel biyomoleküllerin hareketsizleştirilmesi, nanoliflerin yüzey özelliklerini değiştirerek yapışmayı ve hücre canlılığını arttırmaktadır. Yüzey işlevselleştirme, plazma işlemi, kaplama veya kimyasal yöntemlerle (örneğin hidroliz ve aminoliz) yapılmaktadır ve liflerin mekanik özelliklerini korurken yüzey özelliklerini değiştirme avantajına sahiptir [193, 194].

Yara sargısı olarak kullanıldığında, elektroğirme nanolifler, yaraya sürekli olarak verilebilen bir dizi biyoaktif bileşik ile yüklenebilirken, üç boyutlu, oldukça gözenekli yapıları, mikroorganizmalara karşı bir bariyer görevi görerek yeterli bir gaz değişimini ve eksüdaların emiciliğini korur. Ayrıca, enfeksiyonlu yara tedavisine yönelik yara sargısı olarak antibiyotik içeren bir dizi elektroğirme nanolif orijinli kompozitler geliştirilmiştir. Enfeksiyonları önlemenin yanı sıra, iyileşme sürecini etkileyen hücre çoğalması ve göçü, iltihaplanma, anjiyogenez, kolajen sentezi ve diğer ECM bileşenlerini de içeren hücresel olayları dikkate almak önemlidir. Bu olaylarda büyüme faktörleri önemli rol oynar ve iyileşme sürecinin başarısı için belirleyicidir. Bu nedenle, bir dizi çalışmada, büyüme faktörlerinin sağlanması için elektrospun nanolifler geliştirmiştir [195].

Hem doğal hem de sentetik polimerlerin yara örtüleri, yara tipine daha iyi uyması için bir elektroğirme sistemi kullanılarak üretilir. Biyoaktif nanolifler elde etmek için elektroğirme polimer çözeltisine uçucu yağlar ve bitki özleri dahil doğal ürünler de eklenebilir [32, 196, 197].

2.7.2.1 PCL Nanolifler

PCL, nanolif fabrikasyonu için en yaygın olarak kullanılan biyouyumlu, düşük maliyetli, biyolojik olarak parçalanabilen, lineer-alifatik polyesterdir [198, 199]. Antibakteriyel ve biyolojik özellikleri geliştirmek için doğal polimerler ve biyomoleküllerle kombinasyon halinde kolayca işlenebilir. Ayrıca, PCL nispeten yüksek mekanik özellikler sergiler. PCL liflerinin "iyi huylu" (toksik olmayan) çözeltiler kullanılarak elektrospinning yoluyla geliştirilmesi de araştırılmıştır. Son yıllarda, esansiyel yağlar (EO) ve PCL kombinasyonları, çeşitli çalışmalarda yara örtüsü malzemeleri olarak araştırılmıştır [200]. Örneğin, Suganya ve ark. (2011) Elektrospinning tekniği ile *Tecomella undulata*'dan bitkisel ilaç içeren PCL ve polivinil pirolidon (PVP) nanofiber matlar üretmiştir. Çalışmaları, EO ile birleşmenin *Pseudomonas aureuginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* gibi birkaç bakteri suşuna karşı güçlü antibakteriyel özelliklere yol açtığını ortaya koydu [41].

Shao ve ark. (2011), yeşil çay fenoller (GTP) yüklü poli (ϵ -kaprolakton) / çok duvarlı karbon nanotüpler (PCL / MWCNT'ler) kompozit nanolifler osteoblast hücreleri için düşük sitotoksikite gösterirken Hep-G2 tümör hücreleri için yüksek inhibisyon etkisi gözlenmiştir [201]. Başka bir çalışmada Karami ve ark. (2013), yara iyileşmesi için timol yüklü 50/50 PCL / poli (laktik asit) (PLA) hibrit nanofibröz matlar üretti. *In vivo* sıçan yarası iyileştirme sonuçları, yara kapanma yüzdesinin 14 gün sonra % 92.5 olduğunu, buna karşılık gazlı bez bandajlarının kontrol olarak % 68 olduğunu göstermiştir [202]. Daha yakın zamanlarda, Amiri ve Rahimi (2019) tarçın yağı nanopartikülleri içeren PCL elektrospun nanolifleri geliştirdiler ve sonuçları, ilaç dağıtımı ve doku mühendisliği uygulamalarında kontrollü tarçın yağı salınımının olumlu etkisini ortaya koymuştur [203].

Bahrami ve ark., PCL nanofibröz iskelelere yüklenen ve sıçanların tam kalınlıktaki deri kusurlarında cilt yenilenmesi için kullanılan sınırsız somatik kök hücreler (USSC'ler) hazırlamıştır. Hayvan modelinde yapılan yara iyileştirme çalışması, 21 günlük tedavide yara kapanması üzerinde belirgin bir etki sergilemiştir. USSC'lerle yüklü nanofibröz yapı iskelesi ile tedavi edilen yeniden yapılandırılmış cilt alanı, saç kökleri ve yağ bezlerinin oluşumu ile birlikte sağlam bir epitel göstermiştir. Benzer şekilde, çinko oksit (ZnO) nanopartiküller, elektrospun nanolifler kullanılarak PCL nanofiberlere dahil edilmiştir ve ayrıca, deri ikame malzemeleri olarak performans gösterme yetenekleri Amerikan saten kobayları kullanılarak test edilmiştir. *In vivo* fibroblast hücre proliferasyonu, saf PCL membranlarının ve ağırlıkça % 1 ZnO nanopartikülleri içeren PCL membranlarının 20 günlük subkutan implantasyonu sırasında analiz edilmiştir. Histolojik görüntü, ZnO nanopartikül emdirilmiş PCL nanofibröz yapı iskeletlerinin hücre proliferasyonunu arttırdığını göstermiştir. Ayrıca,

yara iyileştirme çalışması da 30 günlük bir gözlem dönemini kapsamıştır; yaralar, nanopartikül içeren membranlar için herhangi bir yara izi oluşmadan tamamen kapatılmıştır. Tersine, iyileşmiş alandaki saç oluşumu, temiz PCL membranları ile tedavi edilen hayvanlar için önemli ölçüde daha az olduğu görülmüştür. Genel sonuçlar, ZnO nanopartiküllerinin dahil edilmesinin yara iyileştirme etkilerini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir [204]. Ayrıca Pinzon-Garcia ve ark. , bir antioksidan karotenoid pigment olan Bixin, PCL nanoliflere yüklenmişlerdir ve diyabetik farelerde yapılan *in vivo* yara iyileştirme çalışması, saf PCL nanoliflere kıyasla hızlandırılmış yara iyileşmesi ve daha az yara izi oluşumu ile sonuçlanmıştır [205].

2.7.3 PCL Nanolif ve Kitosan Nanopartikülleri ile Yapılan Yara Örtüsü Çalışmaları

PCL nanofiberlerin içerisine konulan aktif bileşenlerin veya ilaçların yüklendiği kitosan nanopartikülleri ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak, Piran ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada PDGF-BB yüklü kitosan nanopartikülleri içeren PCL nanolifleri üreterek bu nanoliflerin yara iyileştirici özelliğini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda PDGF-BB yüklü yara örtüsünün hücre proliferasyonunu ve hücre migrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir [206]. Bir diğer çalışmada Jung ve ark. 2015 yılında, kitosan nanopartiküller ile elektrospun polikaprolakton nanofiber kompozit üretmeyi ve ardından ilaç salımı ve deri fibroblastlarına biyouyumluluğu açısından değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda Çalışmalarımız, yan etkiler olmaksızın cilt yara iyileşmesi için ilaç iletimli bir yara pansuman sistemi olarak kitosan nanopartikül PCL nanokompozitlerin uygulanma potansiyelini sahip olduğunu göstermektedir [207]. Zahir ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada Kurkumin yüklü kitosan nanopartikülü içeren bir elektrospun polikaperlakton (PCL) ve jelatin (Gela) iskelesi üretmeyi ve bu yapı iskeletlerinin *in vivo* yara iyileştirme kabiliyetini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, üretilen iskelenin üzerindeki hücre bağlanması ve proliferasyonu, PCL ve PCL / Gela iskelelerinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca histolojik analizde, hibrit yapı iskeletinin ve insan endometriyal kök hücrelerin kapasitesi açısından, bu yeni doku mühendisliği yapısı, yaralı cildi onarmak ve rejeneratif tıp uygulaması için bir cilt ikame maddesi olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [208].

2.8 Bitkisel Materyallerin Yara İyileşiminde Kullanımı

Bitkiler, yaraların yönetimi ve tedavisi için muazzam bir potansiyele sahiptir. İnsanlar tarafından birçok ülkede yaraların ve yanıkların tedavisi için çok sayıda

bitki kullanılmaktadır. Bu doğal ajanlar, birden fazla mekanizma ile kayıp dokunun iyileşmesine ve yenilenmesine neden olur. Bu bitkisel tıp sadece ucuz ve uygun fiyatlı değil, aynı zamanda güvenlidir [32]. Bitkilerde çeşitli yaşamı sürdüren bileşenlerin varlığı, bilim insanlarını, potansiyel yara iyileştirme özelliklerini belirlemek amacıyla bu bitkileri incelemeye sevk etmiştir . Pek çok fitofarmasötik laboratuvarı, çeşitli tıbbi bitkilerin aktif bileşenlerini ve etki tarzlarını belirleme çabalarına yoğunlaşmaktadır. Bu bitkilerin tıbbi değeri, insan vücudu üzerinde kesin fizyolojik etki üreten biyoaktif fitokimyasal bileşenlerde yatmaktadır. Bu bileşenler, alkaloidler, uçucu yağlar, flavonoidler, tanenler, terpenoidler, saponinler ve fenolik bileşikler gibi çeşitli kimyasal aileleri içerir. Bitkisel özlerin taranması, yeni etkili ilaçların keşfi için bilim adamlarının büyük ilgisini çekmiştir. Literatürde çeşitli bitkilerin antibakteriyel, antiinflamatuvar ve yara iyileştirici aktivitelerine ilişkin bir dizi rapor yayınlanmıştır, ancak büyük çoğunluğu henüz araştırılmamıştır. Geleneksel iddialarının doğrulanması ve yaralar için güvenli, etkili ve dünya çapında kabul gören bitkisel ilaçların geliştirilmesi için farklı yara iyileştirme modelleri ve bunun altında yatan moleküler mekanizma kullanan bitkiler hakkında çeşitli farmakolojik raporlar mevcuttur [209–211].

2.8.1 Kantaron

Hypericum perforatum L., *Hypericaceae* ailesine aittir (Şekil 2.9). Aynı zamanda kantaron olarak da bilinir ve geleneksel olarak bitki çayı ve besin takviyesi olarak kullanılır. Farmakolojik ve biyokimyasal aktivite ile karakterize edilen çok sayıda bileşik içerir. Kantaron, antidepresan etkiden sorumlu olduğu düşünülen naftodiyatron, hiperisin ve psödohiperisin içerir. Yapısında diğer bileşikler arasında rutin, hiperosit, izokersitrin, kuersitrin ve miquelianin gibi flavonol glikozitler bulunur. Floroglukinol türevleri ve hiperforin ve türevi adhyperflorin gibi biflavonoidler de bulunur [212–214].

Kantaron preparatları, yalnızca antidepresan aktiviteleri için değil, aynı zamanda antioksidan, anksiyolitik, antikanser ve antiinflamatuvar aktiviteleri için de geniş çapta incelenmektedir. Kantaron ekstraktları, oksidatif stresi azaltabilir ve bu nedenle enflamasyonu, nörotoksiteyi ve gastrointestinal sorunları önleyebilir. Zou ve ark. (2010) kantaron ekstrelerinin oksidatif strese karşı koruyucu etkileri nedeniyle Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda uygulamaları olabilir. Kantaron ekstraktının antimikrobiyal ve antiviral aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [216].

Yeni antimikrobiyal maddelere sadece farklı enfeksiyon ve hastalıklara karşı değil aynı zamanda gıda bozulmasına ve bozulmasına neden olan mikroorganizmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Avato ve ark. (2004), kantaronun yalnızca incelenen Gram pozitif



Şekil 2.9 Kantaron çiçeği
[215]

bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesini gözlemledi[217]. Gibbons ve ark. (2002), kantaron cinsinin anti-stafilokokal etkisini vurguladılar. Kantaron ekstraktında bulunan hiperisin, zarflı virüslere karşı da etkili olabileceği bulunmuştur. Yağlı kantaron preparatları, derideki küçük yaraları, yanıkları ve iltihabı tedavi etmek için kullanılabileceği belirlenmiştir. Yaraların tedavisi, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar aktivitelerin yanı sıra fibroblast hareketliliğinin ve kolajen üretiminin uyarılması ile ilgilidir. Hiperforin, atopik dermatit dahil farklı cilt problemlerinin tedavisi için potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir [218]. Reuter ve ark. (2008), kantaron ekstraktı içeren yeni banyo yağını test etmiş ve iyi cilt toleransı gözlemlemiştir [219].

2.8.1.1 Kantaron'un Yara İyileşmesinde Kullanımı

Mukherjee ve ark., farklı sıçan yara modellerinde *Hypericum patulum*'dan metanolik bir yaprak özütünün etkilerini araştırmışlardır ve kontrol ile karşılaştırıldığında, *H. patulum* ekstraktı ile kesik yaralarında eksizyon yaralarının daha hızlı kapanması ve daha yüksek gerilme mukavemeti bulmuşlardır. Buna göre Süntar ve ark., kantaron

yağı ekstresi ve glikol stearat, propilen glikol ve sıvı parafin karışımı içinde uygulanan etanol ekstresi ile tedavi edildiğinde, sıçanlarda eksizyon, dairesel ve lineer insizyon yaralarının iyileşmesinde önemli bir hızlanma olduğunu doğrulamışlardır [220].

Castro ve ark., sıçan modellerinde tek başına mikro akım uygulaması ve bir homeopatik % 10'luk kantaron preparatı ile kombinasyon halinde yara iyileştirme özelliklerinde hiçbir fark bulanamamıştır. *Hypericum perforatum* preparatı tek başına muhtemelen düşük konsantrasyon nedeniyle etkili olmadığı belirlenmiştir [221]. Öztürk ve ark., dekspantenol ve *Centella asiatica* ekstraktına kıyasla 1-100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ etanolik kantaron ekstraktının embriyonik tavuk fibroblast kültürleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. *H.perforatum* konsantrasyonunun artmasıyla birlikte, en yüksek konsantrasyon dışında, toplam fibroblast sayısı ve mitozla çoğalan hücre sayısı artmıştır. Yüksek motiliteyi gösteren poligonal hücrelerin yüzdesi % 31'den % 80'e yükselirken, yaşlanan, hareketsiz ve cansız hücrelerin yüzdesi buna bağlı olarak azaldığı ve fibroblastlardaki kolajen granül sayısı da arttığı belirlenmiştir. 3 test maddesinin etkilerinin kantitatif karşılaştırması, her iki bitki özünün, dekspantenol için karakteristik olduğu gibi, mitotik hücre proliferasyonunu arttırmaktan ziyade, kollajen üretiminin ve fibroblastların göçünün uyarılmasıyla yara onarımını destekleyebileceğini göstermiştir [222]. .

Kantaronun etkisi, yara iyileşmesinin proliferatif fazı ile sınırlı değildir, aynı zamanda, yaralanmadan sonra veya atopik dermatit ve sedef hastalığı gibi hastalıklar tarafından fonksiyonel olarak bozulduğunda epidermin fonksiyonel organizasyonunu iyileştirir [223, 224]. Üst epidermal tabakaların eksik oluşumu, trans-epidermal su kaybının artmasına, mikrobiyal enfeksiyonlara, iltihaplanmaya ve kaşıntıya yol açar. Hiperforin, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar aktivitesinin yanı sıra, keratinosit farklılaşmasını ve "kornifiye zarf" oluşumunu uyararak bozulmuş epidermal organizasyonu geri yükleyebilir. Keratinositlerin farklılaşması, spesifik geçici reseptör potansiyel kanalının (TRPC6, hiperforinin antidepresif aktivitesinde de rol alan bir etki) aktivasyonu ile, fizyolojik uyarın, hücre dışı kalsiyum konsantrasyonundaki artışla hemen hemen aynı şekilde teşvik edilir. TRP reseptörleri de kaşıntı ile ilişkili görüldüğünden, hiperforin çok hedefli bir dermatolojik farmakon olabilir [225].

2.8.2 Safran

Safran (*Crocus sativus*) (Şekil 2.10), kurutulmuş yiyeceklerin yanı sıra, boyamak, tatlandırmak ve renklendirmek için kullanılan altın renkli *Iridaceae* ailesinin çok yıllık soğanlı bir bitkisidir. Safran, özellikle İspanya, İran, Yunanistan ve Türkiye'de yetiştirilen bir baharattır. Safran adı, sarı anlamına gelen Arapça za'faran'dan gelmektedir. Safran kullanımı aynı zamanda eski Mısır ve Roma'ya kadar

uzanmaktadır. Burada boya olarak, parfümlerde, ilaç olarak ve yemek pişirme amaçlarıyla kullanılmıştır. Tıbbi bir bitki olarak safran, geleneksel olarak bir anodin, antidepresan, solunum tıkanıklığı giderici, antispazmodik, afrodizyak, terletici, emmenagog, balgam söktürücü ve yatıştırıcı olarak kabul edilmiştir. Kızıl, çiçek hastalığı, soğuk algınlığı, astım, göz ve kalp hastalıkları, tümör ve kansere karşı halk ilaçlarında kullanılmıştır. Safran ayrıca, diş çıkaran bebeklerin rahatsızlığını azaltmak ve yaraları temizlemek, iyileştirmek için topikal olarak kullanılabilir [226–228].



Şekil 2.10 Safran çiçeği
[229]

2.8.2.1 Safran'ın Yara İyileşmesinde Kullanımı

Safran polenlerinin özü, termal kaynaklı yanık yaralarının tedavisinde etkinliğini değerlendirmek ve sonuçlarını sıçanlarda gümüş sülfadiazin (SSD) ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Hayvanlar dört gruba ayrılmış ve sıcak suyla meydana gelen yanık yaralanmasından 24 saat sonra kontrol, baz, safran (%20) veya SSD (% 1) içeren bir topikal krem uygulanmıştır. Özel günlerde, önceden planlanmış bir programa göre, topikal tedaviler altında farklı gruplarda hayvanın ağırlığı, yara boyutu ve cilt histo-patolojisi tespit edilmiştir. 25. günde kontrol, baz, safran ve gümüş gruplarında ortalama yara büyüklüğü 5.5, 4, 0.9 ve 4.1 cm^2 idi. Safran grubunun yara büyüklüğü diğer gruplardan anlamlı derecede daha küçüktü. Histolojik karşılaştırma, safranın, krema ile tedavi edilen diğer yaralara kıyasla, yanık yaralarında yeniden epitelizasyonun önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Safranın kesin mekanizması

belirsiz olsa da safranın anti-enflamatuar ve antioksidan etkileri, yara iyileşmesine katkıda bulunmuş olabilir. Bu çalışmanın sonuçları, safranın yanık yaralanmalarında yara iyileşmesini hızlandırmadaki potansiyel etkinliği olasılığını arttırmaktadır [35].

2.8.3 Propolis

Propolis veya arı tutkalı, bal arıları tarafından ağaç tomurcuklarından veya kavak, söğüt, huş ağacı, karaağaç, kızılğaç, kayın, kozalaklı ağaç ve at kestanesi ağaçları gibi diğer botanik kaynaklardan toplanan doğal reçineli bir maddedir [230, 231]. Arılar tarafından kovanda kullanılan propolis, kovayı enfeksiyon yaratan mikroorganizmalardan korumaktadır [232]. Propolis maddesi yüzyıllardır hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. [233]. *In vitro* çalışmalar, bazı propolis türlerinin galangin gibi flavonoidlerin ve kafeik asit gibi hidroksisinnamik asitlerin, antibakteriyel ve antifungal aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir [234–236]. Yanık yarasının iyileşmesinde önemli bir faktör, ölüme yol açabilecek enfeksiyondur. Bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm, yaraların iyileşmesinin gecikmesine neden olmaktadır. Bu sebeple, yara iyileşmesi süresince, yaralarda oluşabilecek enfeksiyonların kontrolü çok önemlidir. [237]. Biyofilm oluşumunu engellemedeki rolüne ek olarak antimikrobiyal aktivitenin, propolisin en önemli biyolojik özellikleri olduğu, *Staphylococcus aureus*, *Streptococci*, *Moraxella catarrhalis* ve mevcut antibiyotiklerin çoğuna dirençli olan bazı tüberküloz mikobakterileri gibi farklı bakterilerle başarılı bir şekilde savaşabilmesini sağladığı ileri sürülmüştür [238]. Propolisin biyolojik özellikleri, anti-mikrobiyal aktivitesiyle sınırlı değildir. Ön *in vivo* çalışmalar, propolisin sıçanlarda deri yanıklarının inflamatuvar bileşeninin tedavisinde etkili olabileceğini göstermektedir [239, 240]. Yapılan bir diğer ön çalışmada, Brezilya'nın çeşitli yörelerinden toplanan propolis ile elde edilen cilt kreminin yanıklar sonucu oluşan yaralarda SSD'ye göre daha hızlı iyileşme sağladığı belirlenmiştir [241]. Propolisin hem immünosupresif hem de immünostimülan etkiler sergilediği gösterilmiştir [242, 243]. Ek olarak, propolisin antioksidan aktivitesi, sıçan yavrularında katarakt olasılığını azalttığı daha önce gösterilmiştir [244]. Son olarak, propolisin yara yatağında granülasyon dokusu oluşumu, doku büyümesi ve yara kapanması için gerekli olan glikozaminoglikan sentezini ve salınmasını uyararak doku onarımını hızlandırdığı gösterilmiştir [245]. Hepatoprotektive, antitümöral ve sitostatik aktiviter gibi diğer biyolojik özellikler propolisin biyolojik özellikleri arasındadır [246, 247]. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar propolisin çeşitli yaraların iyileşmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Ancak, yara iyileşmesinde kullanılan propolisin toksik dozu, oluşabilecek yan etkileri ve klinik denemeleri hakkında hala sınırlı bilgi bulunmaktadır. [248].

2.8.3.1 Propolis'in Yara İyileşmesinde Kullanımı

Mast hücreleri, yara iyileşmesinin tüm aşamalarında önemli rol oynar [249]. Dış etmenler sonucu oluşan doku hasarının hemen ardından, mast hücreleri doku hasarının olduğu bölgede toplanır. Daha sonra yine mast hücreleri tarafından damarların genişlemesini sağlayan ve damar geçirgenliği arttıran, histamin, proteazlar, tümör nekroz faktörü (TNF) ve araziidonik asit gibi ajanlar serbest bırakılır. Ek olarak, heparin, triptaz, kimaz ve plazminojen aktivatörünün salınmasıyla, mast hücreleri geçici pıhtının çözülmesine katkıda bulunur, antikoagülan aktiviteleri destekler ve cilt yaralarının iyileşmesini artırır. Enflamatuvar süreç geliştikçe, mast hücreleri yaralı bölgede lökosit toplanmasında doğrudan bir role sahiptir; bu lökositler, yerleşik makrofaj popülasyonları ile fagositoza ve debridmana katkıda bulunur. Yara iyileşme basamaklarından biri olan çoğalma fazında, mast hücreleri epitel hücrelerin artmasında etkin rol oynamaktadır. Bu aşamada, fibroblast çoğalmasından ve anjiyogenezden sorumlu olan TGF- β 1 ile VEGF gibi bazı faktörler mast hücreleri tarafından salgılanır. Mast hücreleri ayrıca fibroblastların bir miyofibroblast fenotipine dönüşümünü uyararak yaranın kasılmasını ve kapanmasını kolaylaştırır. Çoğalma aşamasından sonra, yara iyileşme süreci, tekrar modelleme ve yara olgunlaşması süreci ile devam eder. Bu sırada, mast hücreleri, yara kapanmasında önemli ve etkin rol oynayan matrisler oluşturur. Aynı zamanda mast hücreleri tarafından salınan bazı maddeler (histamin ve triptaz) fibroblastların kollajen üretimini sağlamaktadır. Buna ek olarak salınan histamin ve triptaz molekülleri α düz kas aktininin (α SMA) kasılmasına neden olmaktadır [250–252].

Büyük boyutlu yara kusurlarının iyileşmesinde en önemli sınırlamaların, yara izi ve yara izi kontraktürü olduğu ileri sürülmüştür [253]. Azalmış enflamatuvar yanıt, azalmış fibrin, pıhtı oluşumu ve trombosit degranülasyonu gibi birçok faktör, büyük boyutlu yara iyileşmesini doğrudan etkiler [254]. Yara dokusu oluşumu doğumdan sonra insanlarda yara iyileşmesinin genel modu iken, embriyonik yara iyileşmesi iz bırakmadan gerçekleşir [255]. Mast hücreleri, yaraların fibrotik iyileşmeye dönüşümde önemli bir role sahiptir. Keloidler ve hipertrofik yaraların her ikisi de çok sayıda mast hücresi içerir. Mast hücrelerinin yaşlı bireyler ile genç bireylerin derisinde bulunma ve olgun olma durumu kıyaslanırsa, yaşlı bireylerde mast hücrelerinin daha olgun, granüler ve büyük olduğu görülür. Genç bireylerin derilerinde bulunan mast hücrelerinde degranülasyon olayı görülmez. Yapılan bir çalışmada, olgun bireylerin derilerinde bulunan mast hücrelerinin, dış ve iç uyaranlara karşı daha yüksek yanıt verebildikleri belirlenmiştir. Buna bağlı olarak aynı çalışmada mast hücrelerinin artışı, deride oluşan degranülasyondan sorumlu olabileceği de bildirilmiştir. [254]. Mast hücreler triptaz gibi çeşitli enflamatuara neden olabilecek molekülleri serbest bırakır. Bu moleküller sayesinde fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşması

uyarılır.. Farklılaşma sonucunda oluşan miyofibroblastlar yara kapanma sürecinde önemli role sahiptir [256, 257]. Yara iyileşmesinde mast hücrelerinin rolü önceden kanıtlanmış olmasına rağmen, çok sayıda mast hücresinin varlığı iyileşme sürecine zarar verebilir [258]. İyileşmiş yaranın biyomekanik özelliklerini etkilemeden mast hücrelerinin aktivasyonunun bloke edilmesinin skar oluşumunu ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir [259].

Topikal propolis uygulaması mast hücre sayısını azaltabilir. Propolis mast hücreleri üzerindeki bu etkisi, yaraların kapanma sürecini hızlandırmaktadır. Propolis, akut inflamatuvar fazda cerrahi yaradaki mast hücrelerinde önemli bir azalmaya neden olur ve kafeik asit fenetil ester ve propolis içindeki diğer aktif bileşikler muhtemelen bu etkiden sorumludur [249]. Propolis bileşenlerinden biri olan kafeik asit fenetil ester, yara iyileşmesinde etkili olan histamin salınımını ve inflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltmaktadır. [260]. Buna ek olarak yine propolisin yapısında bulunan krizin ve kaempferol maddeleri anti-alerjik etkiye sahiptir. Krizin, mast hücrelerinde TNF- α , IL-1 β , IL-4 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu bir NF-jB ve kaspaz-1 bağımlı mekanizma ile azaltabilir. Ek olarak, aktive edilmiş mast hücrelerinin hücre içi kalsiyum içeriğini azaltır ve hücrelerin dışından kalsiyum akışını baskılar. Diğer madde olan kaempferol ise, aktif mast hücreleri tarafından gerçekleştirilen degranülasyon olgusunun ve sitokin üretiminin durdurulmasına neden olmaktadır. [261, 262].

Yapılan birçok *in vitro* çalışma, propolis maddesinin ve içeriğinde bulunan maddelerin çeşitli biyolojik özelliklere (antibakteriyel, antiinflamatuvar gibi) sahip olduğunu göstermiştir. *In vivo* çalışmalar ile karşılaştırıldığında, *in vitro* araştırmaların bazı değerli bulguları olmasına rağmen, bu tür bulgular klinik duruma tam olarak çevrilememiştir. *In vitro* ve klinik çalışmalara kıyasla *in vivo* çalışmaların sonuçları propolisin yaralar üzerindeki etkisinin belirlenmesinde daha güvenilirdir. Ek olarak hayvan çalışmaları *in vitro* ve klinik çalışmalar arasında köprü kurulmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte, hayvan modellerinin sonuçlarının klinik ortamlara dönüştürülmesinde farklı hayvan türleri ve insanlar arasındaki anatomik ve fizyolojik farklılıklar dikkate alınmalıdır [263–265]. Hayvan modellerinin kullanıldığı çalışmalarda domuz, sıçan, fare ve köpek gibi hayvanlar kullanılmıştır. Bu çalışmalarda propolisin çeşitli yara türlerine karşı iyileştirici özellikleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, propolisin iyileşme sürecini hızlandırdığı ve yara iyileşmes süresini kısalttığı görülmüştür. [266–270].

Propolisin yara iyileştirici özelliğinin araştırıldığı çalışmalarda yapılan histopatolojik deneylerde, propolisin yarayı debride etme aktivitesini hızlandırdığı, mast hücrelerinin ve inflamatuvar hücrelerin, n sayısını azalttığı, buna bağlı olarak

inflatuar fazını kısalttığı belirlenmiştir. Ayrıca propolisin yara kontraksiyonunu hızlandırdığı bulunmuştur. Yara kontraksiyonu, yaralanmayı takiben yumuşak dokulardaki boşluğun kapanmasına yardımcı olan ve fibroblastlar tarafından kollajen sentezi ile ilişkili olan onarımın temel bir sürecidir [271, 272]. PPropolis, kollajen sentezini arttırarak yaraların daha hızlı kasılmasını sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada, propolis uygulamasının yara iyileşmesinde önemli rolü olan tip I kollajen miktarını arttırdığı görülmüştür. [273]. Ahmed ve ark., yaptıkları çalışmada Mısır'dan örnekledikleri propolisin yanı yaralarındaki tedavi edici özelliğini, Dermazin ile kıyaslayarak araştırmışlardır. Mısır propolis-Dermazin karışımının, propolis ve Dermazine ile tedavi edilen gruba kıyasla koloni sayısını daha önemli ölçüde azalttığını ve yüzey alanını yaktığını göstermişlerdir [274, 275]. Ayrıca propolisin, yara onarımının erken evrelerinde hemostaz ve inflamasyona katılan vitronektin (VN)'in artmış birikiminden sorumlu olan TGF- β ekspresyonunu uyararak yara iyileşmesinin başlangıcında VN içeriğini arttırdığı belirlenmiştir [276].

Propolis HS/HP birikimini arttırır ve süperoksit dismutaz aktivitesini uyarır. Süperoksit dismutaz, heparanaz ekspresyonunu azaltır. Bununla birlikte, yara iyileşmesinin son aşamasında HS/HP içeriğinde bir azalma vardır ve bu, gelişmiş fibroblast aktivasyonu ile ilişkilendirilebilir ve aşırı ECM birikimi ve kasılmasına yol açabilir. Olczyk ve arkadaşlarının çalışmasından elde edilen bulgular. propolisin (sertifika numarası: HŻ / 06107/00) iyileşme sürecinde ECM yeniden şekillenmesinin kontrolünde apiterapötik bir ajan olarak düşünülebileceğini öne sürmektedir [276]. Fibronektin, yara iyileşmesinin her aşamasında görev alan, yara onarımı sürecinde yapısal ve fonksiyonel roller oynayan çok işlevli bir glikoproteindir. Propolis (sertifika numarası: HŻ / 06107/00), yara iyileşme sürecinde fibronektin metabolizmasını değiştirir. Yanık yaralarının propolis ile tedavisi, iyileşen yaralardan fibronektin bileşenlerinin salınımını azaltır. Propolis bileşenlerinden olan kuarsetin ve resveratrol, yarada sentezlenen fibronektini inhibe etmektedir. [277, 278]. ECM'de fibronektin konsantrasyonunda oluşan artış, dokularda kollajen salgılanması ile sonuçlanmaktadır. Yanık tedavilerinde kullanılan propolis, fibronektin salgılanmasını düşürerek, keloid yara oluşum riskinide azaltmaktadır [277].

3

MATERYAL VE METOD

3.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasallar isimleri, alındığı ticari firmalar ve katalog numaraları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan kimyasal listesi

Malzeme Adı	Firma	Kat. ve CAS Numarası
Kitosan	Sigma-Aldrich	9012 -76-4
TPP	Sigma-Aldrich	7758 -29 -4
HCl	Merck-Millipore	100317
NaOH	Merck-Millipore	106469
CT-DNA	Sigma-Aldrich	D4522
Tris	Merck-Millipore	648310
EDTA	Merck-Millipore	324503
DMSO	Merck-Millipore	102952
NaCl	Merck-Millipore	137017
PBR322 Plasmid DNA	Thermo	SD0041
DNA ladder	Thermo	SM0311
EcoRI	Thermo	ER0271
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma-Aldrich	M2773
$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich	5949-29-1
K_2HPO_4	Sigma-Aldrich	4.11.7758
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich	10049-21-5
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Sigma-Aldrich	7786-30-3
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich	7558-79-4
KCl	Sigma-Aldrich	7447-40-7
Difco Agar	BD	9316509
L-histidine	Sigma-Aldrich	71-00-1
D -biotin	Sigma-Aldrich	851209
$NaH_2NH_4(PO_4 \cdot 4H_2O)$	Sigma-Aldrich	S9506
NPD	Sigma-Aldrich	108871

Tablo 3.2 Deneylerde kullanılan kimyasal listesi devamı

<i>Salmonella tphymurium TA98</i>	Xenometrix	PSS-0110
<i>Salmonella tphymurium TA100</i>	Xenometrix	PSS-0111
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	25923
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	6633
<i>Escherichia coli</i>	NRRL	B-3704
<i>Escherichia coli</i>	ATCC	25922
<i>Escherichia faecalis</i>	ATCC	29212
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	27853
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC	7644
<i>Candida albicans</i>	ATCC	60193
Müeller Hinton Agar	Merck	105437
Sabouraud Dekstrozu Agar	Merck	105438
NaCl	Merck	1.06404.1000
Nutrient Broth	Sigma	70123
Agar	Oxoid	LP0011
Ampisilin	Sigma	7177-48-2
NaOH	Merck	1.06462.1000
Kristal Viyole	Merck	548-62-9
NaN_3	Merck	26628-22-8
RPMI 1640	Sigma	R8758
MOPS	ChemCruz	1132-62-2
H_2SO_4	Merck	7664-93-9
$BaCl_2$	Sigma	10326-27-9
Glasiyal Asetik Asit	Merck	1.00056.2500
Kloroform	Merck	1.02445.2500
PCL	Sigma	440752
DMSO	Biofrox	1084

3.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Malvern Zetasizer Nano ZS

Shimadzu UV 1601 UV Spektrofotometre

Bandelin Sonorex Ultrasonik Su Banyosu

FEI Versa 3D-FEG HR-SEM

Millipore Ultra Saf Su Cihazı

Prob Sonikasyon Cihazı

Hanna pH metre

Biobase Liyafilizatör

Witeg Isıticılı Çalkalamalı Su Banyosu

Elektrospining Cihazı

Biorad Güç Kaynağı

Yatay Agaroze Jel Elektroforezi

3.3 Deneyde Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri

3.3.1 DNA Bağlanma Deneyinde Kullanılan Çözelti

8 mM Tris, 50 mM NaCl tartılarak 800 mL ultra saf su içerisinde çözöldü. Elde edilen solösyonun içerisinde 0.5 M EDTA (pH: 8) eklendi ve 1000 mL tamamlandı. Solösyonun pH değeri HCl kullanılarak 7.4 seviyesine ayarlandı. 0,22 µm'lik steril filtre kullanılarak solösyon sterilizasyonu yapıldı ve deneyde kullanım süresince oda sıcaklığında saklandı.

3.3.2 DNA Kesme Deneyinde Kullanılan Çözeltiler

3.3.2.1 100 mM Tris-HCl Tamponu Hazırlanması

100 mM Tris tartıldıktan sonra 150 mL ultra saf suda çözdüröldü. Solösyon tamamen berrak hale geldikten sonra HCl ile pH değeri 7.4'e ayarlandı ve 50 mL su eklendi. Sterilize etmek amacıyla solösyon 0,22 µm'lik filtreden geçirildi ve deney süresince oda sıcaklığında saklandı.

3.3.2.2 Agaroze Jel Elektroforez Yökleme Tamponu Hazırlanması

Toplam hacim 10 mL olacak şekilde EDTA, Gliserol, ksilen siyanol ve bromofenol mavisi karıştırılarak yökleme tamponu hazırlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 Yökleme tamponu hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

EDTA	0,5 M
Gliserol	%30
Ksilen Siyanol	%0,3
B.Mavisi	%0,3

3.3.2.3 TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) Tamponunun Hazırlanması

TAE tamponunu hazırlamak için Tris, Glasiyel Asetik Asit ve EDTA 800 mL ultra saf su içerisinde çözdüröldü. Elde edilen solösyonun pH değeri ölçöldükten sonra 8'e

ayarlandı ve 1000 mL tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında muhafaza edildi (Tablo 3.4).

Tablo 3.4 TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

EDTA	20 mL (0,5 M)
Glasiyel asetik asit	5,5 mL
Tris	48,4 g

3.3.2.4 Agaroz Jelin Hazırlanması

AAgaroz jel elektroforezi için gerekli olan agaroz jeli hazırlamak için 1 gr agaroz tartılarak içerisinde Tris asetat tampon (1mM EDTA, 40mM tris asetat, pH 8.0) tampon içeren 100 mL çözeltinin içerisine konuldu. Solüsyon berrak haline gelinceye kadar ısıtıcı manyetik karıştırıcı da ısıtılarak karıştırıldı. Kaynama derecesine geldikten sonra ısıtıcı manyetik karıştırıcıdan alınarak 60°C'ye kadar soğutuldu ve içerisine 3 µL etidyum bromür eklendi. Solüsyon agaroz jel elektroforez tankına dökülerek taraklar yerleştirildi.

3.3.3 AMES Deneyinde Kullanılan Besiyerlerin ve Stok Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.3.1 Nutrient Agar (NA) Hazırlanması

1,25 mg nutrient broth ve 0,75 mg agar 50 mL ultra saf su içerisinde çözdürüldü ve otoklavlanarak steril hale getirildi. Sterilizasyon işlemi sonrasında besiyeri, petri kaplarının her birine 25 mL olacak şekilde döküldü.

3.3.3.2 Histidin/Biyotin (HB) Agar

HB agar Tablo 3.5'te verilen oranlarda 50 mL ultra saf su içerisinde çözdürülerek hazırlandı. Besiyerinin hazırlanması için agar saf su içerisine eklenerek otoklavlandı. Otoklavlanma sonrasında steril 50X VB tuz çözeltisi, %20'lik glukoz ve % 0,5'lik histidin solüsyonları besiyerine eklendi. Solüsyon 50 mL'ye tamamlandıktan sonra her petriye 25 mL olacak şekilde döküldü.

3.3.3.3 Minimal Glukoz Agar (MGA) Hazırlanması

Besiyerinin hazırlanması için agar tartıldıktan sonra ultra saf su içerisinde çözdürüldü. Daha sonra elde edilen solüsyon otoklavlandı. Otoklav işlemi sonrasında solüsyon içerisine 50X VB tuz solüsyonu eklendi ve tuz solüsyonu tamamen çözüldükten sonra

Tablo 3.5 Histidin/Biyotin Agarın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Agar	1,5 g
50X VB tuz çözeltisi	2 mL
Glukoz çözeltisi	10 mL
Histidin çözeltisi	1 mL
Biyotin çözeltisi	0,6 mL
Distile su	200 mL

% 20'lük glukoz solüsyonu ilave edildi (Tablo 3.6). Solüsyonun son hacmi 100 mL tamamlandı. Besiyeri eşit şekilde her bir petriye 25 mL gelecek şekilde döküldü.

Tablo 3.6 Minimal Glukoz Agarın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Agar	3 g
50X VB tuz çözeltisi	8 mL
Glukoz çözeltisi	40 mL
Distile su	400 mL

3.3.3.4 Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) Agar Hazırlanması

Ultra saf su içerisine agar eklenerek besiyeri hazırlandıktan sonra sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Sterile edilmiş solüsyon içerisine sırasıyla 50X VB tuz solüsyonu %20 glukoz ve %0,5 histidin solüsyonları ortama eklendi. Eklenen solüsyonların tamamen çözünmesinden sonra 0,5 mM biyotin çözeltisi ve ampisilin besiyerine ilave edildi (Tablo 3.7). Solüsyonun berrak hale gelmesinde sonra her bir petriye eşit miktarda döküldü ve + 4°C'de 2 ay süre boyunca saklandı.

Tablo 3.7 Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) Agarın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Agar	1,5 g
50X VB tuz çözeltisi	2 mL
Glukoz çözeltisi	10 mL
Histidin çözeltisi	1 mL
Biyotin çözeltisi	0,6 mL
Ampisilin çözeltisi	0,315 mL
Distile su	200 mL

3.3.3.5 50X VB tuz çözeltisi (Vogel-Bonner E ortamı)

Tablo 3.8'da verilen kimyasallar 45°C'deki 134 mL saf su içerisinde çözdürüldü. Eklenen kimyasalların tamamı çözündükten sonra solüsyon 200 mL'ye tamamlandı. Sterilizasyon işlemi için solüsyon otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 3.8 50X VB tuz çözeltisinin (Vogel-Bonner E ortamı) hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Magnezyum sülfat heptahidrat	2 g
Sitrik asit monohidrat	20 g
Potasyum fosfat	100 g
Sodyum amonyum fosfat tetrahidrat	35 g

3.3.3.6 Top (Üst) Agar Hazırlanması

Top (Üst) Agar hazırlanması için Agar ve NaCl tartıldıktan sonra ultra saf su içeridine konuldu. Daha sonra solüsyonun çözünmesi için ısıtıcı manyetik karıştırıcıda sıcaklık verilerek karıştırıldı. Solüsyonun tamamen çözünmesinden sonra solüsyondan her bir deney tüpüne 2 mL olmak üzere konuldu (Tablo 3.9). Deney tüplerinin ağzı pamuk ile kapatıldıktan sonra otoklav yardımı ile sterilizasyon gerçekleştirildi. Top agarların bulunduğu tüpler deney zamanına kadar + 4°C'de saklandı.

Tablo 3.9 Top agarın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Agar	0,6 g
NaCl	0,5 g
Distile su	100 mL

3.3.3.7 Nutrient Broth (NB) Hazırlanması

NB besiyerinin hazırlanması için broth tartıldıktan sonra ultra saf su içerisinde çözdürüldü (Tablo 3.10). Daha sonra elde edilen solüsyon 20 mL olarak erlen-mayerlere aktarıldıktan sonra otoklav ile sterilize edildi. Deney süresince + 4°C'de saklandı.

Tablo 3.10 Nutrient broth hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Nutrient broth	2 g
Distile su	80 mL

3.3.4 %20'lik Glukoz Çözeltisinin hazırlanması

Glukoz tartıldıktan sonra ultra saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözdürüldü (Tablo 3.11). Sterilizasyon işlemi için elde edilen glukoz solüsyonu otoklanlandı ve + 4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.11 Glukoz çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Glukoz	4 g
Distile su	20 mL

3.3.4.1 %5'lik Histidin Çözeltisinin hazırlanması

Tablo 3.12'da verilen oran dahilinde histidin tartıldıktan sonra ultra saf su içerisinde çözdürüldü. Daha sonra otoklav yardımı ile sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Sterile edilen solüsyon + 4°C'de saklandı.

Tablo 3.12 Histidin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

L-Histidin	0,05 g
Distile su	10 mL

3.3.4.2 Biyotin Çözeltisinin Hazırlanması

Biyotin çözeltisi tartıldıktan sonra ultra saf su içersine eklendi(Tablo 3.13). Manyetik karıştırıcı yardımı ile solüsyon tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Solüsyon otoklavlanarak sterile edildi ve + 4°C'de saklandı.

Tablo 3.13 Biyotin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

D-Biyotin	0,03 g
Distile su	10 mL

3.3.4.3 NaOH Çözeltisinin Hazırlanması

NaOH ultra sa su içersine ilave edilerek çözdürüldü (Tablo 3.14). Daha sonra solüsyon 10 mL'ye tamamlandı.

Tablo 3.14 NaOH çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

NaOH	0,016 g
Distile su	20 mL

3.3.4.4 Ampisilin Çözeltisinin (% 0,8/0,02 N NaOH) Hazırlanması

Ampisilin trihidrat 0.02 N'lik NaOH içersine eklenerek çözdürüldü (Tablo 3.15). Daha sonra solüsyon 0,22 µm'lik steril şırınga filtresi kullanılarak sterilize edildi.

Tablo 3.15 Ampisilin Çözeltisinin (% 0,8/0,02 N NaOH) hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Ampisilin trihidrat	0,4 g
NaOH	50 mL

3.3.4.5 Sodyum-Fosfat Tamponunun hazırlanması

Tablo 3.16’te verilen değerler dikkate alınarak ayrı kaplarda hazırlanan solüsyonlar karıştırıldı. Solüsyonu pH değeri 7.4 olarak ayarlandı. Otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.16 Sodyum-Fosfat Tamponunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

0,2 M $NaH_2PO_4.H_2O$	60 mL
0,2 M $Na_2HPO_4.2H_2O$	440 mL

3.3.4.6 Histidin/Biyotin Çözeltisinin Hazırlanması

Biyotin tartıldıktan sonra ultra saf su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürüldü. Daha sonra ortama histidin eklendi (Tablo 3.17). Solüsyon tamamen çözdürüldükten sonra 0,22 µm membran filtre kullanılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi ve + 4°C’de saklandı.

Tablo 3.17 Histidin/Biyotin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

D-Biyotin	0,124 g
L-Histidin.HCl	0,096 g
Distile su	1000 mL

3.3.4.7 %0,1’lik Kristal Viyole Çözeltisinin Hazırlanması

Kristal viyole boyası tartıldıktan sonra ultra saf su içerisinde çözdürüldü (Tablo 3.18). Ardından karanlık ortamda + 4°C’de saklandı.

Tablo 3.18 Kristal viyole çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Kristal viyole	0,02 g
Distile su	20 mL

3.3.4.8 4-Nitro-o-fenilendiamin (NPD) (0,1 µg/µL) Çözeltisinin Hazırlanması

NPD tartıldıktan sonra DMSO ile çözdürüldü. Ardından 0,22 µm’lik steril filtreler kullanılarak solüsyon sterile edildi (Tablo 3.19). Mutajenite çalışmalarında 10 µg/plak olacak şekilde kullanıldı. Çalışmalar sırasında oda sıcaklığında mufaza edildi.

Tablo 3.19 NPD (0,1 µg/µL) çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

NPD	0,2 mg
DMSO	2 mL

3.3.4.9 Sodyum Azid Çözeltisinin Hazırlanması

Sodyum azid'in tartılma işlemi gerçekleştirildikten sonra ultra saf su içerisine konularak çözündürüldü (Tablo 3.20). Daha sonra 0,22 µm'lik steril filtreler kullanılarak solüsyon sterile edildi. Mutajenite çalışmalarında 1 µg/plak olacak şekilde kullanıldı. Çalışmalar sırasında + 4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.20 NaN_3 çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

NaN_3	0,1 mg
Distile su	10 mL

3.3.5 MİK Deneyinde Kullanılan Solüsyonlar ve Besiyerleri

3.3.5.1 NA Hazırlanması

NA tartıldıktan sonra ultra saf su içerisinde çözündürüldü ve otoklav yardımı ile sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi (Tablo 3.21).

Tablo 3.21 NA'nın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

NA	6 g
Distile su	300 mL

3.3.5.2 Mueller-Hinton Broth'un Hazırlanması

Tablo 3.22'de verilen oranda tartılan besiyeri ultra saf su içerisinde tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Ardından hazırlanan besiyerinin pH değeri 7.4 olarak ayarlandı ve otoklav yardımı ile sterile edildi.

Tablo 3.22 Mueller-Hinton Broth'un hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Mueller-Hinton Broth	13 g
Distile su	200 mL

3.3.5.3 Saboraud Dekstroz Agar'ın Hazırlanması

Besiyeri tartıldıktan sonra ultra saf su içerisinde tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı (Tablo 3.23). Daha sonra besiyeri sterilizasyon işlemi için otoklavlandı.

Tablo 3.23 Saboraud Dextroz Agar'ın hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Saboraud Dekstroz Agar	13 g
Distile su	200 mL

3.3.5.4 RPMI 1640 Besiyeri'nin Hazırlanması

RPMI 1640, Glukoz ve MOPS Tablo 3.24'da verilen oranda tartıldıktan sonra ultra saf su kullanılarak çözdürüldü. Elde edilen besiyerinin pH değeri 7.4 olarak ayarlandı ve steril filtre kullanılarak sterile edildi.

Tablo 3.24 RPMI 1640 Besiyeri'nin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

MOPS	17,26 g
RPMI 1640	5,2 g
Glukoz	3,75 g
Distile su	450 mL

3.3.5.5 McFarland Turbidity Standart Hazırlanması

0,36 N H_2SO_4 ve %1,175'lik $BaCl_2$ solüsyonları hazırlandıktan sonra Tablo 3.25'de verilen oranlarda karıştırıldı. Daha sonra UV-vis spektrofotometre yardımı ile 625 nm'de abdorbars okuması yapıldı. Solüsyonun Optik density aralığı 0,08-0,010 olarak ayarlandı. Optik densitesi ayarlanan standart solüsyonu tüplere konulduktan sonra ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 3.25 McFarland Turbidity Standart Hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

H_2SO_4	19,90 mL
$BaCl_2$	0,10 mL

3.3.6 Kitosan Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Solüsyonlar

3.3.6.1 Kitosan Solüsyonunun Hazırlanması

Düşük moleküler ağırlıklı kitosan tartıldıktan sonra içerisinde galsiyal asidik asit bulunan ultra saf su içerisinde 24 saat boyunca çözdürüldü (Tablo 3.26). Kitosan tamamen çözüldükten sonra solüsyonun pH değeri 4.7'ye ayarlandı. Ardından 0,45 μ m'lik membran filtre ile süzüldü. Deney süresince + 4°C'de saklandı.

Tablo 3.26 Kitosan Solüsyonunun Hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

Kitosan	20 mg
Glasiyal Asetik Asit	333 µL
Distile su	100 mL

3.3.6.2 Tripolifosfat (TPP) Solüsyonunun Hazırlanması

Tablo 3.27’de belirtilen oranda tartılan TPP ultra saf su içerisinde çözöldü. Solüsyonun berrak hale gelmesinden sonra solüsyon 0,22 µm’lik membran filtre ile süzöldü. Deney boyunca + 4°C’de saklandı.

Tablo 3.27 TPP solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

TPP	50 mg
Distile su	100 mL

3.3.7 Elektroğirme Solüsyonunun Hazırlanması

%10’luk PCL solüsyonunun hazırlanması için deneyden 24 saat önce PCL polimeri tartıldıktan sonra 2:1 oranında DMSO:kloroform içerisinde çözödüröldü (Tablo 3.28). Polimerin tamamen çözöündükten sonra solüsyonun içerisine safran ve kantaron içeren kitosan nanopartiköülü ve propolis ekstraktı eklendi. Elde edilen solüsyonun saklanması için solüsyon şırınga içine çekildi ve sıkıca parfilmlenip oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 3.28 Elektroğirme blended olüsyonunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve oranları

PCL	1.5 g
Safran Yöklü Kitosan Nanopartiköülleri	10 mg
Kantaron yöklü Kitosan Nanopartiköülleri	10 mg
Propolis	1.25 mg
DMSO	10 mL
Kloroform	5 mL

3.4 Deneyssel Metodlar

3.4.1 Dekoksiyon Metodu ile Bitki Ekstraksiyonu

Safran ve kantaron bitkilerinden 1 g tartıldı. Tartılan bitkiler önceden 70°C’ye ısıtılan ultra saf su içerisine konuldu ve manyetik karıştırmacı yardımı ile 30 dk. boyunca karıştırdı. Daha sonra solüsyonun oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Solüsyonun içerisindeki büyük partiköüllerden kurtulmak için kurutma kağıdı ile süzme işlemleri

gerçekleştirildi. Kaba süzme işlemi sonrasında elde edilen solüsyon 0,45 µm'lik membran filtre ile süzüldü. Ardından - 20°C'de dondurulduktan sonra, deneylerde kullanılmak üzere liyofilize edildi. Propolis sulu ekstraktı ticari olarak elde edildi.

3.4.2 DNA Bağlanma Deneyi

3.4.2.1 UV-Vis Absorpsiyon Titrasyon Deneyi

DNA bağlanma aktivitesi deneyinde birçok araştırmacı tarafından kullanılan Dana Timüs DNA'sı kullanıldı. Deneyde tampon çözelti olarak TNE tamponu kullanıldı. CT-DNA'nın RNA ve protein kontaminasyonuna sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla 260 nm ve 280 nm'deki absorbanslar alındı. Absorbans oranları 1,8 ile 1,9 arasında olduğu görüldü. Ölçüm sonucunda CT-DNA'nın herhangi bir RNA ve protein kontaminasyona sahip olmadığı görüldü. UV-vis absorpsiyon titrasyon deneyinin yapılmasında küvet olarak kuartz küvet kullanıldı. Tezde kullanılan propolis, safran ve kantaron ekstraktlarından 1 mg tartılarak DMSO ile çözdürüldü ve stok solüsyon hazırlandı. Deneyde ekstraktların stoklarının seyreltilmesinde kullanılan TNE tamponu kör olarak alındı. Deney sırasında CT-DNA konsantrasyonu kademeli olarak arttırılırken, ekstraktların konsantrasyonları sabit tutuldu ve CT-DNA'nın kuartz küvete her eklenmesi sonrası karıştırılarak 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonrasında UV spektrofotometrede 200-600 nm arasında spektrum okuması yapıldı. Titrasyon sonucu elde edilen veriler sayesinde bileşiklerin DNA'ya hangi modla bağlandığını gösteren bağlanma sabiti değeri hesaplanabilmektedir. Bu sabitin hesaplanabilmesi için bir formül geliştirilmiştir. Deney sonucunda ekstraktların DNA'ya bağlanma şekillerini gösteren bağlanma sabiti adı verilen bir değer hesaplandı. Bağlanma sabitini hesaplanması için aşağıda verilen formül kullanıldı.

$$DNA/[\epsilon_A - \epsilon_f] = DNA/[\epsilon_B - \epsilon_f]p + 1/K_b[\epsilon_B - \epsilon_f] \quad (3.1)$$

ϵ_A ;ölçülen konsantrasyondaki sönüm katsayısı

ϵ_B ;DNA'ya tüm bileşiklerin bağlanması sonrasındaki sönüm katsayısı

ϵ_f ;serbest haldeki bileşiğin sönüm katsayısı

Formüldeki K_b değeri, $DNA/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ ve DNA değerleri kullanılarak oluşturulan grafikteki eğim yardımı ile bulunmuştur.

Absorbansdaki değişimler aşağıda verilen formül ile yüzdelik olarak hesaplandı.

$$\%H = \frac{A_i - A_s}{A_i} \times 100 \quad (3.2)$$

Formülde verilen A_i değeri ekstraktların ortama CT-DNA eklenmeden önceki absorbans şiddetini, A_s ise CT-DNA'nın maksimum seviyede eklenmesi sonucunda oluşan absorbans şiddetini ifade etmektedir.

3.4.3 DNA kesme Deneyi

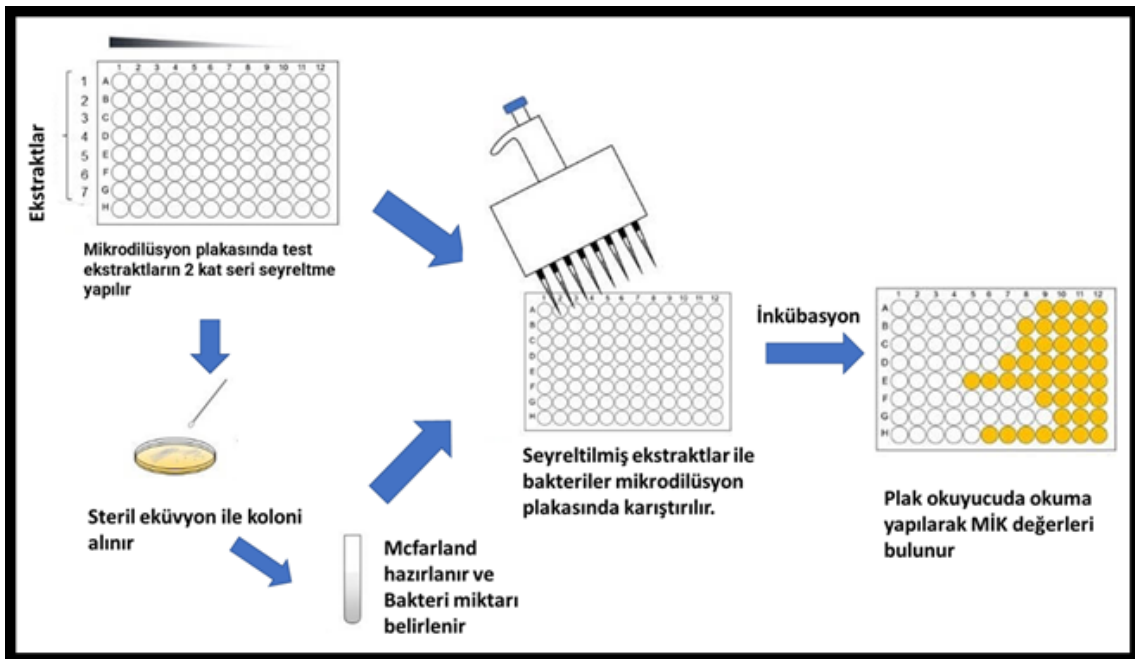
Safran, kantaron ve propolis sulu ekstraktlarının DNA kesme aktivitelerinin belirlenmesi agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Bu yöntemde DNA örneği olarak süper kıvrımlı yapıya sahip pBR322 plazmid DNA kullanıldı. Sulu ekstraktların dilüsyonları 100 mM Tris-HCl tampon (pH:7,6) kullanılarak elde edildi. Ekstraksiyon sonrası liyofilize edilen safran, kantaron ve propolisin herbirinden 1,25 mg, 2.5 mg, 5 mg ve 10 mg tartıldıktan sonra Tris-HCl ile çözdüdü. Sulu ekstraktların DNA kesme aktiviteleri iki farklı şekilde belirlendi. Bunlardan birincisi H₂O₂ varlığında olan oksidatif yöntem, ikincisi ise hidrolitik yöntemdir. Deneyde reaksiyon ortamı 2 μ L pBR322 plazmid DNA, 2 μ L Tris-HCl tampon (pH:7,6) karıştırılarak hazırlandı. Daha sonra reaksiyon ortamına sulu ekstraktlarının her bir dozundan eklendi. Oksidatif yöntemde ise reaksiyon ortamına ekstra olarak 2 μ L H₂O₂ eklendi. Ardından reaksiyon ortamı 20 μ L'e tamamlandı ve 37°C'de 3 saat boyunca karanlık ortamında inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforez deneyi için %1 'lik agaroz jeli hazırlandı ve içerisinde TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. 3 saati inkübasyon sonrasında DNA örnekleri 6X yürütme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Pozitif kontrol olarak plazmid DNA'da çift kırık oluşturan EcoRI enzimi kullanıldı. Elektroforezde marker olarak 1 kb'lık ladder kuyucuğa yüklendi. Elektroforez işlemi 1 saat boyunca 60 V'da gerçekleştirildi. Agaroz jel UV ışık altında incelendi ve alanizi Gel Pro ver.3.0 kullanılarak yapıldı.

3.4.4 MİK Yöntemi

Safran, kantaron ve propolisin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesinde broth mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Çalışmada gram pozitif bakterilerden; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* NRRL B-3704, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve mayalardan *Candida albicans* ATCC 60193 kullanıldı.

Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesinde U tabanlı 96 kuyucuklu steril mikropalaklar kullanılarak yapıldı. Pozitif kontrol olarak bakteriler için gentamisin ve ampisilin, maya örneği için flukonazol kullanıldı. Çalışmada kullanılan bakteriler NA'a, mayalar ise Saboraud Dextroz Agar'a ekildi ve 37°C de 24 saat inkübe edilerek çoğaltıldı.

Deneyde kullanılan inokulum süspansiyonunun hazırlanması için çoğaltılan kültürlerden benzer koloniler alınarak serum fizyolojik suda süspanse edildi. Süspansiyonun yoğunluğu 0,5 McFarland solüsyonu kullanılarak $1-2 \times 10^8$ CFU/mL'ye ayarlandı.



Şekil 3.1 MİK deneyinin yapılışı
[279]

Broth mikrodilüsyon testinde mikropalakdaki kuyucuklara bakteriler için 100'er μL Mueller-Hinton Broth, maya için 100'er μL RPMI 1640 besiyeri eklendi. Sulu ekstraktların 10 mg'lık stok çözeltilerden 100 μL eklendikten sonra mikropipet ile karıştırılma işlemi gerçekleştirildi. İkinci kuyucuğa 100 μL aktarım yapıldı ve bu işlem 5. kuyucuğa kadar devam ederek seri dilüsyon yapılmış oldu. Daha sonraki iki kuyucuk pozitif ve negatif kontrol için kullanıldı. Hazırlanan inokulum süspansiyonu 1:20 oranın seyreltildi ve negatif kontrol kuyucuğu dışında her kuyucuğa 100 μL konuldu. Seyreltme sonunda her kuyucuktaki bakteri yoğunluğu 5×10^4 CFU/mL olarak ayarlandı. İnokulumun hazırlanması ve mikropalakdaki kuyucuklara eklenmesi, deneyde kullanılan bakteri ve maya konsantrasyonlarının değişmemesi için 15 dk içerisinde gerçekleştirildi. Bakteriler 37°C'de 24 saat ve mayalar 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, sulu ekstraktların bakteriler ve mayaya

karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlendi (Şekil 3.1). Pozitif kontrol için gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler için gentamisin ve ampisilin kullanıldı. Maya içinse flukonazol kullanıldı. Negatif kontrol ve kontaminasyonu engellemek için DMSO uygulaması yapıldı.

3.4.5 Ames Yöntemi

Ames testinin güvenilirliği açısından, deneyde kullanılan *Salmonella tphymurium* TA98 ve TA100 suşlarının istenilen genetik özelliklere sahip olup olmadığının kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle istenilen mutasyonların suşlarda bulunup bulunmadığı aşağıda verilen testler ile belirlenmiştir.

3.4.5.1 Test Suşlarının Histidin gereksinimi kontrolü

Salmonella tphymurium TA98 ve TA100 suşlarının histidin oksotrofu (his-) özelliğine sahip olduğunu belirlemek amacıyla histidin gereksinimi kontrolü deneyi yapıldı. Bu kontrol deneyinde histidin sentezleme kabiliyeti olmayan mutant suşlar, histidin içermeyen MGA plaklarına ve HB agara NB içerisindeki taze kültür kullanılarak çizgi ekim yapıldı. Plaklar, 37°C'de 48-72 saat inkübe edildikten sonra MGA ve HB plaklarında üreyip üremedikleri belirlendi.

3.4.5.2 Test Suşlarının *rfa* mutasyonu kontrolü

Ames deneyinde kullanılan TA98 ve TA100 tes suşlarının *rfa* mutasyon kontrolü kristal viyole boyası kullanılarak yapıldı. Bu amaçla, her bir suşa ait taze gecelik kültürden 100'er µL alınarak NA besiyerine ekim yapıldı. Kontrol deneyinde kullanılmak üzere 0,5 cm boyutunda steril filtre kağıdından diskler hazırlandı ve besiyerinin ortasına yerleştirildi. Daha sonra bu disklerin üzerine %0.1'lik kristal viyole çözeltisinden eklendi ve disklerin bu çözeltiyi emmesi sağlandı. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kristal viyole emdirilen disklerin etrafında şeffaf olarak 14 mm'lik inhibisyon zonunun var olup olmadığı gözlemlendi. *rfa* mutasyonuna sahip olan suşların hücre duvarından kristal viyole boyası geçerek, suşların üremesinin engellemesi nedeniyle zon oluşumu gözlenmektedir.

3.4.5.3 Test Suşlarının *uvrB* mutasyonu kontrolü

UV hassasiyet testi aracılığıyla Ames deneyinde kullanılacak olan TA100 ve TA98 suşlarının *uvrB* mutasyonuna sahip olup olmadığının kontrolü yapıldı. Taze gecelik kültürden alınan suş örnekleri bir öze yardımıyla NA besiyerine paralel çizgi ekimi yapıldı. NA besiyerinin bulunduğu petri kabının yarısı ışık geçirmeyen bir

materyal kullanılarak kapatıldı. Petrileri, 8 sn boyunca 33 cm yükseklikten 30 W'lık germisidal UV ışınlarına maruz bırakıldı. Ardından petriler 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda petrilerin ışık geçirmeyen materyal ile kapatılan kısımlarında üreme olduğu takdirde test suşlarının *uvrB* delesyonuna sahip olduğu anlaşılmaktadır.

3.4.5.4 Test Suşlarının R faktörü kontrolü

Salmonella tphymurium TA100 ve TA98 suşlarının, ampisilin antibiyotiğine direnç faktörü olan R faktörü içeren pKM101 plazmidlerine sahip olup olmadığının kontrolü amacı ile suşlar ampisilin içeren HBA agarlarına ekildi. Daha sonra petriler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübe işlemi sonrasında HBA agarlarda üreyen suşların pKM101 plazmidini taşıdıkları anlaşılmaktadır.

3.4.5.5 AMES deneyinde Kullanılacak Suşların Master Plaklarının Hazırlanması

Taze kültürlerden alınan test suşları, çizgi ekim tekniği kullanılarak HBA agarlarına ekildi. Ardından petriler inkübatörde 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonrasında, besiyerlerinde üremiş olan iyi izole olmuş ve normal büyüklüğe sahip koloniler belirlendi. Belirlenen koloniler öze yardımı ile alındı ve içerisinde 6.3 µL ampisilin içeren 2 mL NB ekildi. Ekim yapılan NB'lar 37°C'de 12 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından master plakların elde edilmesi için inkübasyon sonrası tekrar HBA agarına ekim yapıldı ve 37°C'de 48 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen master plaklar + 4°C'de muhafaza edildi.

3.4.5.6 AMES deneyinde Kullanılacak Suşların Gecelik Kültürlerinin Hazırlanması

Deneyde kullanılacak TA100 ve TA98 suşlarının gecelik kültürleri önceden hazırlanan master plaklardan elde edildi. Master plaklarda bulunan kolonilerden izole olmuş ve normal büyüklüğe sahip koloni seçildi ve öze yardımı ile alınarak ampisilin (63µL) içeren 20 mL'lik NB besiyerine ekildi. Ekim sonrası besiyeri, çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de 140 rpm'de 16 saat boyunca inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından hazırlanan gecelik kültürden 0,5 mL bakteri süspansiyonu alınarak taze besiyerine aktarıldı ve besiyeri çalkalayıcı inkübatör kullanılarak 37°C'de 110 rpm'de 6 saat inkübe edildi. Deneyde 1-2 x 10⁹ (kob)/ml yoğunluk oranına sahip olan bakteri kültürleri kullanıldı.

3.4.5.7 Sıvı Besiyerinin mL'sindeki Test Suşlarının Sayısının Belirlenmesi

Ames deneyinde kullanılacak test suşlarına ait gecelik kültürlerdeki bakteri sayısının belirlenmesi için spektrofotometrik ve NA plaklarına ekim yöntemi ile belirlendi. Spektrofotometrik ölçümler 540 nm'de yapıldı. Yapılan ölçümlerin absorbans değerlerinin 0,1-0,2 arasında olması beklendi. NA plaklarına ekim için gecelik kültürler %0,9 serum fizyolojik ile 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar seri dilüsyon yapıldı. Daha sonra taze kültürden 100 μ L alındıktan sonra 43°C 'ye sahip olan 2 mL'lik top agara eklendi. Top agar vorteks yardımı ile karıştırıldıktan sonra NA plaklarına döküldü. Top agarın donmasından sonra, plaklar 37°C 'de 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonrasında oluşan koloniler sayıldı ve altta verilen formül kullanılarak mL'de bulunan canlı bakteri suşlarının sayısı belirlendi.

$$BS[kob/ml] = SF \times PKS \times 10 \quad (3.3)$$

BS;Bakteri Sayısı

SF;Sulandırma Faktörü

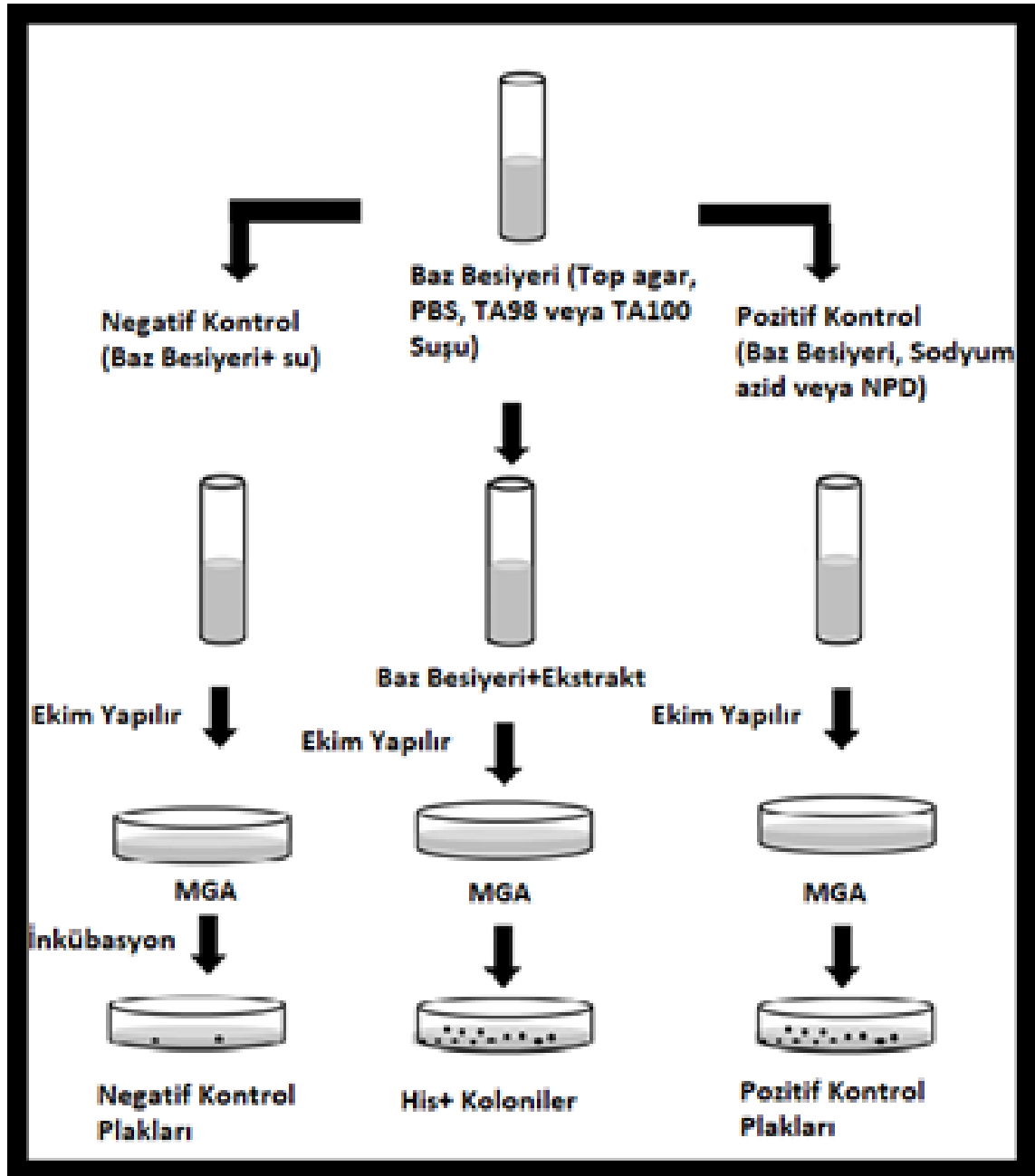
PKS;Plaktaki Koloni Sayısı

3.4.5.8 Ames Deneyinin Yapılışı

Ames deneyinin prensibi, histidin aminoasidine gereksinim duyan mutasyona uğramış oksotrof *Salmonella* suşlarının, sulu ekstraktlar ile mualmele edilmesinden sonra suşların tekrardan histidin sentezleyebilme özelliğine sahip olmasına dayanmaktadır.

Safran, kantaron ve propolis sulu ekstraktlarının mutajenitesinin belirlenmesi için, histidin- biyotin çözeltisi içeren 43°C 'de su banyosunda tutulan 2 mL'lik top agarlara, 500 μ L sodyum fosfat tamponu eklendi. Ardından bu karışımın içerisine her bir dozdan 100 μ L'lik sulu ekstrakt eklendikten sonra, 100 μ L test suşu konuldu. Elde edilen karışım vorteks yardımı ile karıştırıldıktan sonra MGA plaklarına ekim yapıldı. Top agarın donması amacıyla plaklar 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 37°C 'de 48 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. İnkübasyon işlemi sonrasında histidin sentez özelliğini geri kazanan koloniler (his+ revertantlar) sayıldı. Çalışmada sulu ekstraktların her konsantrasyonu için üç ayrı MGA plağına ekim yapıldı.

Deneyde pozitif kontrol için TA98 suşları için NPD, TA100 suşları için NaN3 kullanıldı. Histidin biyotin içeren 2 mL'lik top agara 500 μ L sodyum fosfat eklendikten sonra 100 μ L pozitif kontrol maddesi eklendi. Karışıma 100 μ L test suşu konulduktan sonra



Şekil 3.2 Ames Deneyinin Yapılışı
[280]

vortekslendi ve MGA plaklarına ekim yapıldı. Top agarın donması beklendi. 37°C'de 48 saat inkübasyon işlemi sonrasında his+ revertant koloniler sayıldı.

Her iki test suşunun negatif kontrolü için saf su kullanıldı. Histidin biyotin eklenen 2 mL'lik top agar içerisine 500 µL sodyum fosfat eklendi. Ardından karışımın içerisine 100 µL negatif kontrol maddesi, 100 µL test suşu konuldu ve vortekslendi. MGA plakları ekim yapıldıktan sonra Top agarın donması için 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. 37°C'de 48 saat inkübasyon işlemi sonrasında his+ revertant koloniler sayıldı.

Spontan kontrolü için, histidin biyotin içeren 2 mL'lik top agara sırası ile 500 µL sodyum fosfat tamponu ve 100 µL test suşları eklendikten sonra MGA plaklarına ekim yapıldı. Plaklar, 37°C'de 48 saat inkübe edildi ve his+ revertant koloniler sayıldı (Şekil 3.1).

3.4.5.9 Ames Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan safran, kantaron ve propolis sulu ekstraktlarının herhangi bir mutajenik aktiviteye sahip olup olmadığı negatif kontrolle kıyaslanarak belirlenmiştir. Test edilen sulu ekstraktların MGA plaklarında üreyen his+ revertant koloni sayısının negatif kontrolle kıyasla iki katı ve daha üstü olması durumunda bu dozların mutajenik aktiviteye sahip olduğu söylenebilmektedir.

3.4.6 Ekstraktların Kombinasyonlarının Antioksidan Potansiyellerinin Belirlenmesi

Ekstraktlardan elde edilen kombinasyonların (Tablo 3.29) antioksidan potansiyellerinin belirlenmesinde DPPH testi kullanılmıştır. Herbir kombinasyonlardan 20 µL örnek alınacaktır ve her bir kombinasyon için 200 µL (200 µM) DPPH eklendikten sonra elde edilen solüsyon vortekslenmiştir. 30 dakika karanlık ortamda oda koşullarında inkübe edildikten sonra 517 nm UV spektrofotometrede ölçümler alınmıştır. Antioksidan potansiyelleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%SRG = \frac{A_{kontrol} - numune}{kontrol} \times 100 \quad (3.4)$$

$$A_{kontrol} = (Etanol + DPPH)_{abs} \quad (3.5)$$

Tablo 3.29 Biyolojik Deneyler Sonunda Oluşturulan Kombinasyonlar

Ekstraktlar	S:H:P (mg/ml)
1.Kombinasyon	2.5:1.25:1.25
2.Kombinasyon	1.25:2.5:1.25
3.Kombinasyon	1.25:1.25:2.50
4.Kombinasyon	2.5:2.5:1.25
5.Kombinasyon	1.25:2.5:2.5
6.Kombinasyon	2.5:1.25:2.5

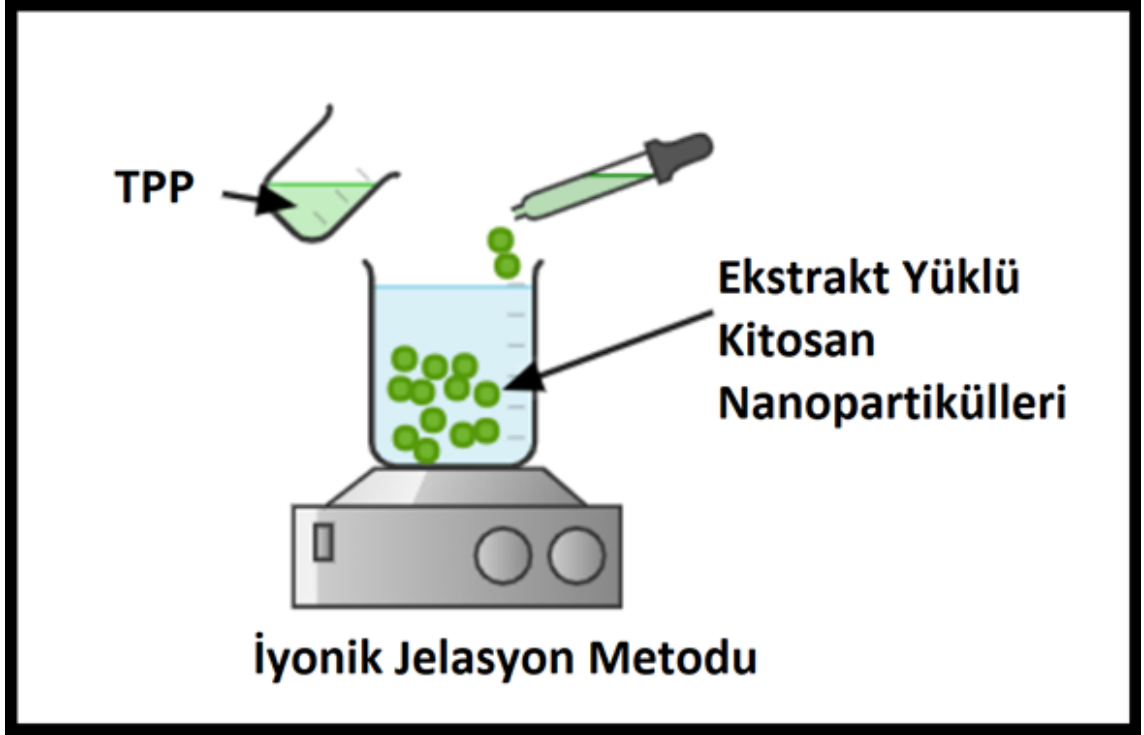
3.4.7 Ekstraktların Spektrumunun Belirlenmesi ve Kalibrasyon Grafiğinin Çıkarılması

Seçilen kombinasyonun spektrum belirlenmesi için solüsyon 1:100 oranında seyreltildikten sonra 600nm-200nm arasında spektrumu alındı. Spektrumu belirlendikten sonra seçilen kombinasyondan seri dilüsyon metodu ile elde edilen konsantrasyonların absorbansı UV-vis spektrofotometrik olarak belirlendi. Daha sonra elde edilen değerler ile salınım kinetiklerinin, enkapsülasyon veriminin ve yükleme kapasitesinin belirlenmesi için kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

3.4.8 Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi

Uygun dozları belirlenen safran ve kantaron sulu ekstraktlarının kitosan nanopartikülleri ile enkapsüle edilmesi için iyonik jelasyon yöntemi kullanıldı. İyonotropik jelleşme, polielektrolitlerin karşı iyonların varlığında nanopartiküller oluşturmak için çapraz bağlantı kurma kabiliyetine dayanır. İyonik jelleşme yönteminde, kitosan polisakkariti sulu asidik çözelti içinde çözülerek kitosan katyonu elde edilir. Bu çözeltiye polianyonik tripolifosfat çözeltisi damla damla eklenir. Zıt yüklü türler arasındaki karmaşıklık nedeniyle, kitosan iyonik jelleşmeye uğrar ve küresel parçacıklar oluşturmak için çökelir [281] .

Tez çalışmasında, 10 mL'lik kitosan solüsyonu, önceden 70°C'ye ayarlanmış olan çalkalamalı su banyosunda 10 dk tutuldu. Kitosan solüsyonu su banyosundan alınıp, önceden + 4°C'ye konmuş olan manyetik karıştırıcıya yerleştirildi. Karıştırıcı 1000 rpm'e ayarlanır. Kitosan solüsyonunun üstüne 3.3 ml'lik TPP damla damla konuldu (Şekil 3.3). Karıştırma işlemi 10 dk, + 4°C'de devam ettirildi. Ardından oluşan opak solüsyon, oda sıcaklığına getirildi. Son aşamada ise elde edilen solüsyon 0,22 µm'lik filtreden geçirildi.



Şekil 3.3 İyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanopartikül sentezi

3.4.9 Ortalama boyut, Polidispersite İndeksi(PdI) ve ζ Potansiyelinin Belirlenmesi

Ortalama boyut, polidispersite indeksi (PdI) ve ζ potansiyeli analizleri, 25 ° C'de çalışan 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) ile donatılmış Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen kitosan nanopartiküllerinin ortalama boyutları, PdI değerleri ve ζ potansiyelleri, 700µl kitosan nanopartikülleri ζ kuvetine konularak DLS cihazı ile belirlendi.

3.4.10 Enkapsülasyon verimi ve Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi

Enkapsülasyon veriminin belirlenmesi için dolu kitosan nanopartiküllerinin spektrofotometrik absorbansı alındı. Bu deney sırasında kör olarak boş kitosan kullanıldı. Enkapsülasyon veriminin belirlenmesi için aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı;

$$\%EV = \frac{TMM - EOMM}{TMM} \times 100 \quad (3.6)$$

Yükleme kapasitesinin belirlenmesi için dolu nanopartiküller liyofilize edildikten sonra

tartıldı. Yükleme kapasitesinin belirlenmesi için aşağıdaki denklem kullanıldı;

$$\%YK = \frac{EEMM}{TNA} \times 100 \quad (3.7)$$

3.4.11 Salım Kinetiğinin Belirlenmesi

Salım kinetiğinin belirlenmesi için kitosan nanopartiküllerinden 1 mg tartıldıktan sonra ultra saf suya konuldu ve ultrasonik su banyosunda çözdürüldü. Daha sonra solüsyonlar 10.000 kDa'luk selüloz membrana sahip diyaliz kapsüllerine konularak salım başlatıldı. *In vitro* salım çalışması, 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 48, 96, 120 ve 240 saatlik zaman aralıklarında gerçekleştirildi. Numunelerin inkübasyonu, çalkalama altında 37°C'de çalkalamalı bir su banyosunda yapıldı. Numunelerden 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 48, 96, 120 ve 240 saatlik zaman aralıklarında örnekler alındıktan sonra UV-vis spektrofotometrede absorbansları alındı. Alınan bu absorbanslar kalibrasyon grafiğine ait denklemde yerine konularak kümülatif salım grafiği çıkarıldı.

3.4.12 Kitosan Nanopartiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Mikrografisi

Kitosan nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) mikrografı İstanbul Üniversitesi Fizik Bölümü'nden hizmet alımı ile elde edilmiştir. İletkenlik özellikleri belirlenmiş camların üzerine 40 µL ekstrakt yüklenmiş ve boş kitosan nanopartiküllerinin damlatılmasının ardından 1 gün oda sıcaklığında kurutulmasıyla numuneler hazırlandı. SEM mikroagrafları, 120 KX büyütme, 5.00 kV elektron yüksek gerilim (EHT) ve 9.4 mm çalışma mesafesinde (WD) mercek içi detektörü ile elde edildi.

3.4.13 Elektroeğirme ile Nanoliflerin Elde Edilmesi

Safran, kantaron yüklü kitosan nanopartikülleri ve propolis sulu ekstraktı içeren %10'luk PCL solüsyonu 5 mL şırıngaya çekildi. Ardından şırınga şırınga pompasına yerleştirildi. Şırınga pompası 1 mL/sa olarak ayarlandı. Şırınga ve yağlı kağıt yerleştirilen plaka arası 15 cm olarak ayarlandı. Şırınga ucuna 10 kV elektriksel kuvvet uygulandı ve elektroeğirme işlemi 2 saat boyunca devam etti. 2 saat sonunda elektriksel akım kesildi ve yağlı kağıt plakadan dikkatlice alındıktan sonra salınım, SEM ve *in vivo* hayvan deneylerine kadar 4°C'de saklandı.

3.4.14 Nanolif İçerisindeki Madde Miktarının Belirlenmesi

Nanoliflere eklenen safran, kantaron ve propolis içeriği, nanoliflerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonundan sonra UV-vis spektroskopi kullanılarak bulundu. Safran, kantaron ve propolis ekstraktlarının her birinin nanoliflerden elde etmek için 2×2 cm nanolif parçası kesildikten sonra, nanoliflerin üzerine 1 mL kloroform ve 1 mL DMSO eklendi. Daha sonra elde edilen disperse solüsyon 10 dakika boyunca ultrasonik su banyosunda sonike edildi. Ardından solüsyon içerisine 8 mL asetronitril eklendi ve ultrasonik su banyosunda 10’ar dakika olmak üzere 2 kere sonike edildi. Elde edilen solüsyon 2500 rpm’de santrifüjlendi. Solüsyon içerisindeki ekstrak içerikleri, safran için 245,5, kantaron için 271 nm ve propolis için 274 nm absorbanları alındıktan sonra kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplandı.

3.4.15 Nanoliflerin SEM ile Morfolojilerinin İncelenmesi

Nanolifler karbon bantlara uygun şekilde kesildi. Daha sonra kesilen nanolif örnekleri karbon bantlara yapıştırıldı. Elektriksel iletkenliği arttırmak için inert gaz verilen ortamda altın-paladyum ile kaplandı. Nanoliflerin morfolojik yapısı ve çapı, 3 kV EHT, 9.3 mm WD analiz edildi.

3.4.16 Nanoliflerin Salım Kinetiğinin Belirlenmesi

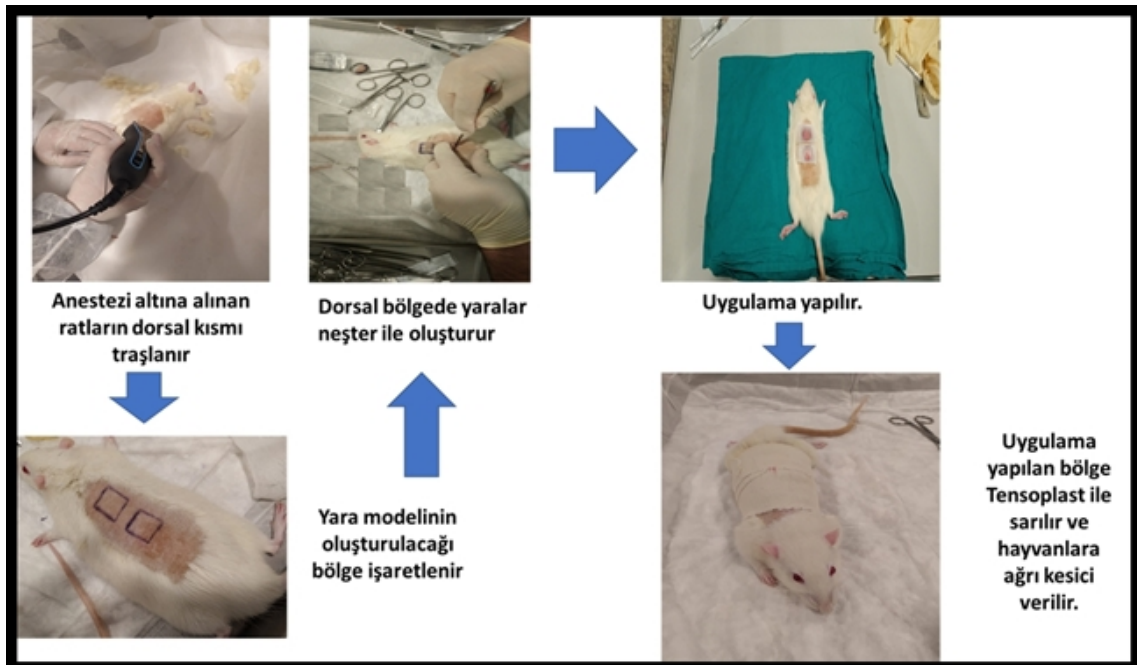
Salım kinetiğinin belirlenmesi için nano fiberlerden 1×1 cm² boyutunda üç adet parça kesildi. Daha sonra bu nanofiber parçaları ultra saf su içerisine konuldu ve ultrasonik su banyosunda 15 dk bekletildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı ve her tekrarda ısı nedeniyle nanofiberlerin zarar görmemesi için ultra sonik su banyosundaki su değiştirildi. Sonikasyon işlemi sonrasında, elde edilen süspansiyon diyaliz kapsülüne konuldu ve kapül 10.000 MW diyaliz membranı ile kaplandı. Ardından diyaliz kapsülleri içerisinde PBS (pH=7.4) olan beherlere konuldu. Beherler 37°C sıcaklığa sahip çalkalamalı su banyosuna yerleştirildi. Nanofiberlerin salımlarını belirlemek için ilk 10 saat daha sonra ise 24,48,72,96,120, 144 ve 168. Saatlerde örnekler alındı. Her örnek alındıktan sonra beherdeki PBS ortamı taze PBS ortamı ile değiştirildi. Alınan salım örneklerinin absorbanları UV-vis spektrofotometresi kullanılarak alındı. Absorbanlar standart eğri denklemlerinde yerlerine konularak nanofiberlerden salınan safran, kantaron ve propolis miktarları belirlendi.

3.4.17 Nanoliflerin *In vivo* Etkisinin Belirlenmesi

Elde edilen nanoliflerin *In vivo* etkisinin belirlenmesi için toplam yirmi beş adet 8 haftalık Wistar albino rat, 1. Grup pozitif kontrol(Yara iyileştirici özelliği bilinen ticari

yara örtüsü), 2. Grup negatif kontrol (Gazlı bez), 3. Grup ekstrak kombinasyonu (Biyolojik aktivitesi en iyi kombinasyon), 4. Grup Ekstrak kombinasyonu içeren nanolifler (Biyolojik aktivitesi en iyi olan kombinasyonu içeren PCL nanolifleri) 5. Grup ise sadece nanolifler (Boş PCL Nanolifler) şeklinde ayrıldı. Yapılacak deneyin öncesinde sıçanlar anestezi altına alındı ve dorsal kısmı traş edildi . Daha sonra sırtlarında 2x2 cm ölçülerinde tam kalınlıkta yaralar, gevşek deri altı dokularının derinliğine kadar bir neşter bıçağı kullanılarak açıldı. Yaralara binde 5'lik povidon iyodin çözeltisi sürülerek deney hayvanlarının derileri sterilize edildi. Yaralar, yara örtüleri ile örtüldükten sonra steril gazlı bez ve Tensoplast ile cerrahi müdahale yapılan tüm alanlar kapatılacak şekilde sarıldı (Şekil 3.4). Hayvanlara post operasyon sonucu oluşabilecek ağrılarını dindirmek için ağrı kesici verildi. Deney hayvanlarının sırt bölgelerinde oluşturulan 2 adet yara, belirlenen sıraya göre yara örtüleri ile kapatıldıktan sonra, uygulamanın yapıldığı gün (0. gün) fotoğrafları çekilip Image J vers. 3.0 programı ile yara alanları hesaplandı. Uygulamayı takip eden 7. 14. 21. ve 28. günlerde fotoğraflar çekilerek boyutlardaki değişim gözlemlendi. Yaralardaki % iyileşim değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\%K = 100 - \frac{A_n}{A_0} \times 100 \quad (3.8)$$

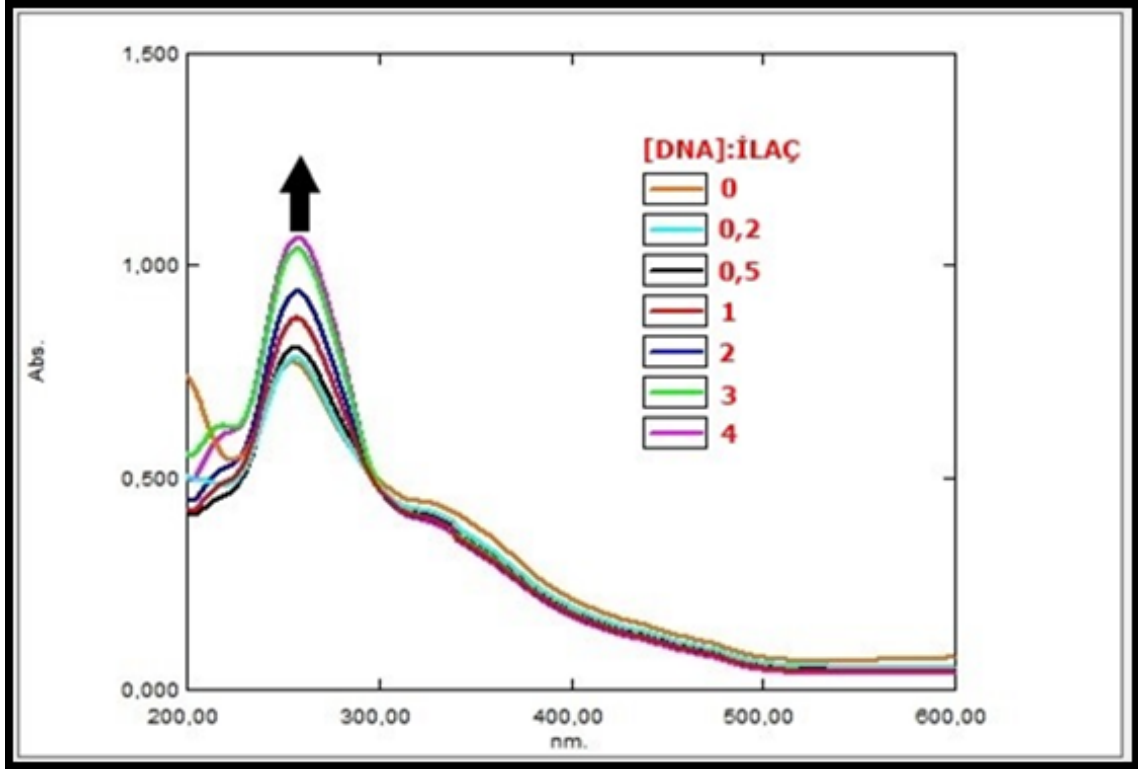


Şekil 3.4 *In vivo* yara modelinin yapılışı

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 DNA Bağlanma Deneyleri Sonuçları

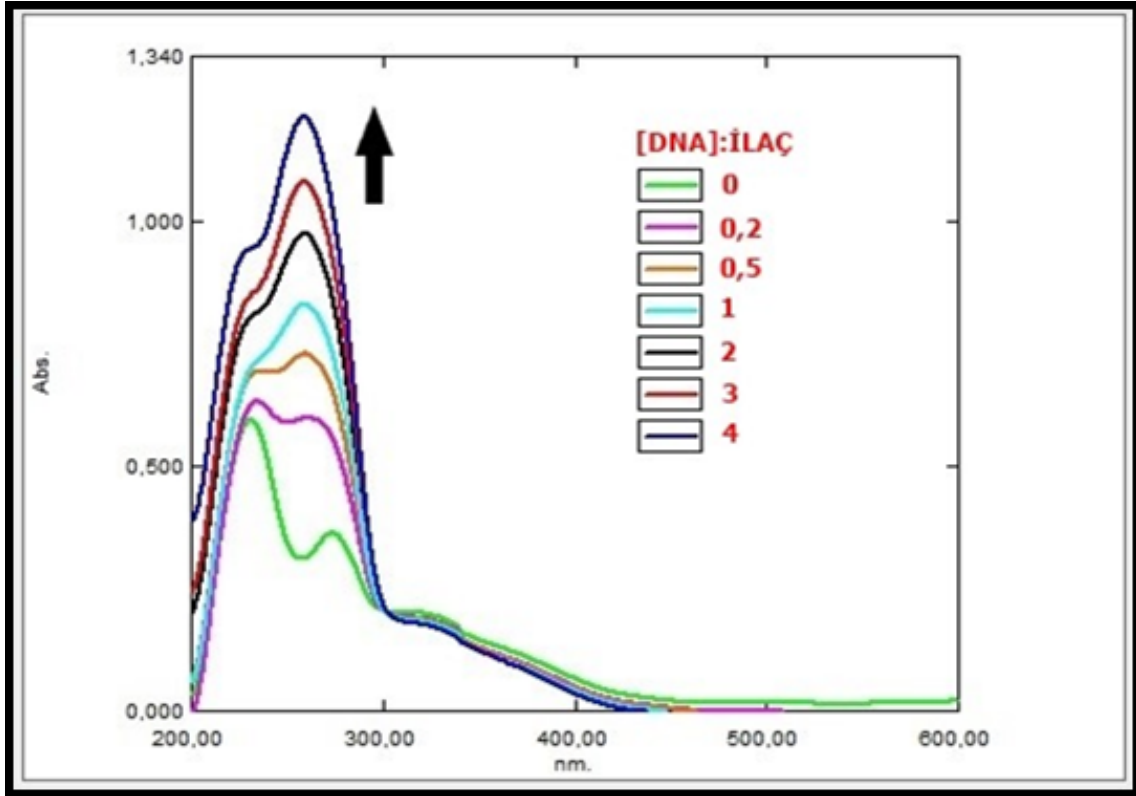
Safran sulu ekstraktının CT-DNA'ya elektrostatik olarak bağlandığı belirlendi. Bu deney sonucunda UV-vis spektrumunda hiperkromizme doğru kayma olduğu saptandı. Buna ek olarak ekstraktın 255,6 nm'de 2.60 nm kırmızıya doğru kayma tespit edildi. Ayrıca ekstraktın %29,4 oranında hiperkromizme neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Safran sulu ekstraktının CT-DNA'ya bağlanma şeklini gösteren spektrum

Kantaron bitkisine ait sulu ekstraktın DNA bağlanma deneyi için ekstrakt bulunan tamponu içerisine CT-DNA kademeli olarak eklendi. Elde edilen UV-vis spektrumuna bakıldığında absorbans değişiminin hiperkromizm yönüne doğru olduğu tespit edildi. Ayrıca ekstraktın %234 hiperkromizme neden olduğu, 259 nm absorbansta 14 nm maviye kaymaya neden olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler ışığında

kantaronun sulu ekstraktının CT-DNA'ya elektrostatik olarak bağlandığı görülmüştür (Şekil 4.2).

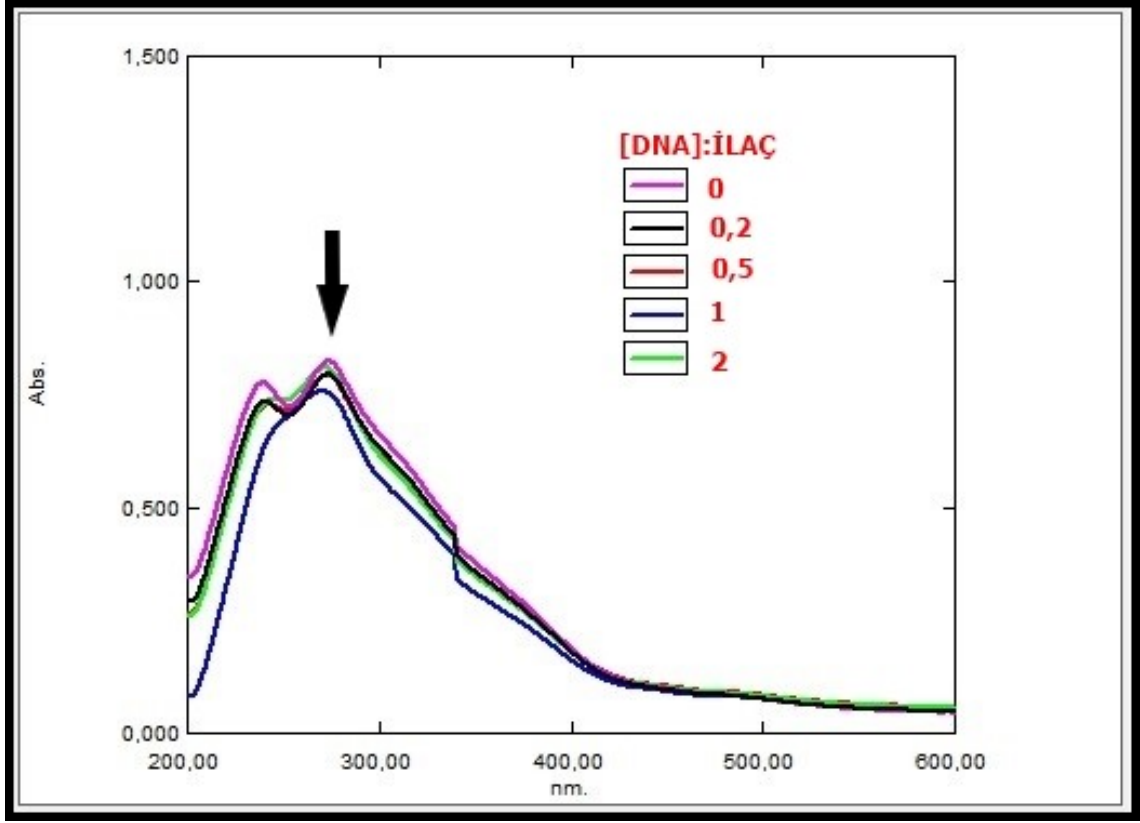


Şekil 4.2 Kantaron sulu ekstraktının CT-DNA'ya bağlanma şeklini gösteren spektrum

Propolisin UV-vis spektrumu incelendiğinde, solüsyondaki CT-DNA miktarındaki artışa bağlı olarak absorbanstaki kayma hipokromizm yönünde olduğu gözlemlenmiştir. Ekstraktın %8 oranında hipokromisiteye neden olduğu, absorbanstaki kaymanın ise 4,20 nm kırmızıya doğru olduğu görülmüştür. Propolis ekstraktının CT-DNA'ya interkalatif bağlandığı belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Genetik bilginin bir taşıyıcısı olan DNA, bu makromolekülün kopyalanmasına ve kopyalanmasına müdahale etme olasılığı nedeniyle birçok ilacın etkileşiminde birincil hedeftir. Nükleik asit etkileşimi için reaktif modeller olarak DNA zincirleri boyunca belirli bölgelerde reaksiyona giren küçük molekül çalışmaları, tedavi edici ajanların rasyonel geliştirilmesinde büyük öneme sahiptir. Küçük ligandların DNA ya bağlanabildiği birkaç tür bölge vardır. Bu bağlanma bölgeleri (i) iki baz çifti arasında (tam interkalasyon), (ii) küçük olukta, (iii) ana olukta ve (iv) sarmalın dışında şeklindedir [282–285].

Bitki özleri üzerine yapılan araştırmalar, birçok hastalığın tedavisi için ilaçların keşfedilmesine yol açmıştır. DNA ile belirli bir bölgede ve şekilde etkileşime girebilen, şu anda kullanılan doğal, sentetik veya hemisentetik biyoaktif ajanların çoğundan



Şekil 4.3 Propolis sulu ekstraktının CT-DNA'ya bağlanma şeklini gösteren spektrum

daha az toksisiteye sahip olan bitki kaynaklarından molekülleri tespit etmeye hala büyük bir ilgi bulunmaktadır [286–288]. Bu nedenle çalışmamızda safran, kantaron ve propolis ekstraktlarının DNA bağlanma şekilleri belirlenmiştir. Safran, kantaron ve propolis ekstraktları ile ilgili veya bu ekstraktların içerisinde bulunan aktif maddelerin DNA bağlanma şekilleri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır.

Ashrafi ve ark.(2005),safran ekstraktında bulunan krosetin molekülünün histidin 1 proteinine bağlanma şeklini araştırmayı amaçlamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, krosetinin spektrumunda 420 nm’de kırmızıya doğru kaymaya neden olduğu belirlenmiştir [289]. Hoshyar ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışmada, safranda bulunan safranal isimli maddenin CT-DNA ile etkileşimini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, spektrumun 248 nm’de 8 nm maviye kaydığı tespit edilmiştir [290]. Kanakis ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, safran ekstraktında bulunan safranal, krosetin ve dimetilkrosetinin CTDNA ile etkileşimini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda, araştırmacılar safranalin 314 nm’de yoğunluğunun azaldığını ve DNA’ya bağlanma şeklinin interkalasyon şeklinde olduğunu bulmuşlardır. Krosetin molekülünün DNA ile etkileşimine bakıldığında 424 ve 449 nm’de eksternal ve interkalasyon şeklinde bağlanma olduğu belirlenmiştir. Dimetilkrosetin molekülünde de safranal molekülüne benzer şekilde sadece interkalasyon şeklinde bağlanma görülmektedir [291]. Azarhazin ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada krosetin

ve dimetilkrosetinin DNA ile etkileşimini moleküler dinamik stimulasyon yolu ile belirlemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda, her iki aktif maddednin Van der Waals etkileşimi ile DNA'nin küçük ve büyük oluklarına bağlandıklarını belirlemişlerdir [292].

Kantaron ile yapılan çalışmalara bakıldığı zaman tıpkı safran ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi genellikle kantaron ekstraktlarında bulunan aktif maddeler (kuinizarin, emodin gibi) kullanılmıştır. Örneğin; Crlikova ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada, biyoaktif kuinizarin ligandını içeren dinükleer Co (III) komplekslerinin çoğalmayı önleyici, DNA bağlanması ve bölünme özelliklerini araştırmayı amaçlamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, kuinizarin içeren Co (III) molekülünün 613 nm batrokromositeye (7-9 nm) neden olduğu, 607 nm ise batrokromositenin yanında azda olsa hipokromositeye neden olduğu bildirilmiştir [293]. Diğer bir çalışmada Stanicova ve ark. 2018 yılında, emodin molekülünün CT-DNA ile etkileşimini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucu, 260 nm'de maksimum DNA absorpsiyonunun hiperkromik etkisi ve küçük batokromik kayması elektrostatik kuvvetler veya hidrojen bağlanması yoluyla emodin-DNA etkileşimini göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar, Emodin-DNA kompleksi için bağlanma sabitinin boyutu, moleküllerin elektrostatik kuvvetlerle etkileşime girdiği sonucuna varmışlardır [294].

Yapılan literatür taramasında propolis ekstraktına ve bu ekstrakt içerisinde bulunan aktif maddeler ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır. Tez çalışmamızda yapılan propolisin DNA bağlanma deneyi literatürde yapılan ilk çalışmadır.

Literatürde safranda bulunan aktif maddeler ile tezimizde çalıştığımız safran sulu ekstraktının DNA bağlanma deney sonuçları hem benzerlik hem de farklılıklar göstermektedir. Örneğin; Ashrafi ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmada safran içerisinde bulunan krosetin maddesinin 420 nm'de kırmızıya doğru kaymaya neden olduğu bulunmuştur [289]. Bu çalışma sonucunu tezimizdeki sonuçlar ile karşılaştırsak, kaymanın olduğu nm değerinde farklılık varken her iki sonuçta da kırmızıya doğru kayma bulunmuştur. Diğer çalışmada ise Hoshyar ve ark. (2008) safranalin 248 nm'de 8 nm maviye kaydığı bulunmuşlardır. Tezimizde elde ettiğimiz sonuçlara göre 255,5 nm de 2.60 nm kırmızıya kayma görülmüştür [290]. Her ne kadar kaymanın gerçekleştiği nm değerleri birbirine yaklaşık olsa da safranalin maviye doğru kayma gerçekleştirmesi büyük farklılık oluşturmaktadır. Kantaron sulu ekstraktı açısından değerlendirdiğimizde, Crlikova ve ark. tarafından yapılan çalışmadaki sonuçların tezimizde elde ettiğimiz sonuçlar tamamen farklı olduğu görülmüştür [293]. Bir diğer çalışmada kantaronun aktif maddelerden biri olan emodinin DNA da 260 nm'de maksimum hiperkromik etki ve küçük bir batrokromik kayma etkisinin görüldüğü belirtilmiştir [294]. Tezimizde elde ettiğimiz sonuçta,

kantaron sulu ekstraktının 259 nm’de % 234 hiperkromik etki gösterdiği belirlenmiştir. Her ne kadar kantaron içerisinde bulunan aktif madde olsa da bu çalışmadaki sonuç ile tezimizdeki sonuçlar paralellik göstermiştir.

Literatürdeki sonuçlar ile tezimizde elde ettiğimiz sonuçlar arasındaki farklılıklar ve benzerlikler ekstraktların ve aktif maddelerin elde edilmesinde kullanılan methodların farklı olması olarak düşünülebilir. Ayrıca bu bitkilerin toplandığı bölge, rakım, sıcaklık ve nem koşulları gibi etkenler içerilerinde bulunan aktif maddelerin oranlarının değişmesine neden olabilmektedir.

4.2 DNA Kesme Sonuçları

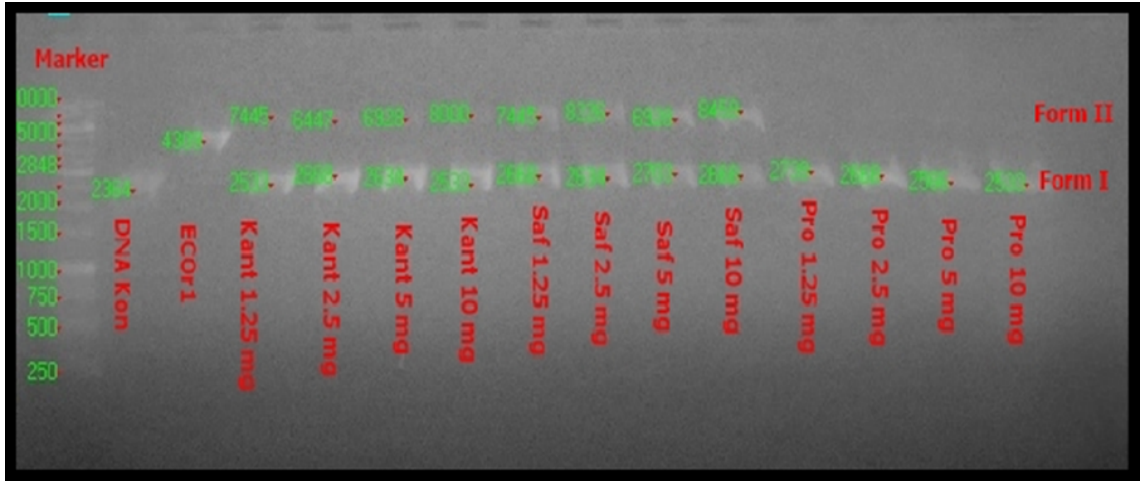
Propolis, safran ve kantaron sulu ekstraktlarının Plazmid pBR322 DNA üzerindeki hidrolitik ve oksidatif reaksiyonu sonucu kırma aktivitesi agaroz jel elektroforezi kullanılarak yapılmıştır. Jel elektroforezinde pBR322 DNA’nın kırılması sonucu 3 farklı form oluşur. Bu formlar süpersarmal form (Form I), halkasal form (Form II) ve linear form (Form III) olarak adlandırılır. Sadece Form I görülen durumlarda kullanılan ekstraktın DNA üzerinde herhangi bir kırma potansiyeli olmadığı kabul edilir. Hidrolitik reaksiyon sonucunda oluşan kesmeyi belirlenmesi için jel elektroforezi sonuçlarına bakıldığında, kantaron ve propolis ekstraktlarının 10mg, 5 mg, 2.5 mg ve 1.25 mg dozlarında Plazmid pBR322 DNA Form I formu görülmüştür. Moleküler ağırlık analizi yapıldığında Form I DNA ağırlıkları 3698 kb ile 2940 kb arasında değiştiği görülmüştür. Safran ekstraktının hidrolitik reaksiyon sonucu oluşturduğu kesme sonucunda agaroz jel elektroforezinde Form I ve Form II DNA formu görülmüştür. Moleküler ağırlık analizine bakıldığında Form I DNA’lar 3510 kb ile 3079 arasında değişirken, Form II DNA’ların moleküler ağırlıkları 10000 kb ile 8944 arasında değişmiştir (Şekil 4.4).

Oksidatif reaksiyon sonucu oluşan kesmelere bakıldığında kantaron ve safranın tüm dozlarında hem Form I hem de Form II DNA görülmüştür. Bu DNA formlarının moleküler ağırlıkları sırasıyla 2683 kb- 2538 kb ve 8459 kb- 7445 kb arasında olduğu belirlenmiştir. Propolis sulu ekstraktının oksidatif reaksiyon sonucu sadece Form I DNA oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.5)

Deri de oluşan travmaların, bazal hücreli karsinomların gelişiminde bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür Bu bağlamda, 1828’de Jean-Nicholas Marjolin tanımladığı Marjolin ülserleri genellikle skuamoz hücreleri karsinomları, kronik ve kütanoz yaralarda ortaya çıkan kanserleşmeyi tanımlamada kullanılmaktadır. Ancak marjolin ülserleri hakkında araştırmacılar arasında önemli bir tartışma bulunmaktadır. Araştırmacıların bir kısmı akut cilt yaralarının neden olduğu cilt kanserinin tesadüfi



Şekil 4.4 Sulu ekstraktların hidrolitik reaksiyon sonucu DNA kesme potansiyellerini gösteren jel görüntüsü



Şekil 4.5 Sulu ekstraktların oksidatif reaksiyon sonucu DNA kesme potansiyellerini gösteren jel görüntüsü

olduğunu bildirmişlerdir. Bu duruma karşı olan araştırmacılar ise yaralanmanın mevcut olan karsinogenez sürecini hızlandığını söylemişlerdir. Bu konuda yapılan bir çalışmada kronik yaralarda skuamöz hücre sarkomasının, akut yaralarda ise bazal hücre karsinomasının görüldüğü bildirilmiştir [295–298].

Antik tıbbın başlangıcından beri, bitkilerden türetilen kimyasal bileşikler insan hastalıklarını tedavi etmek için kullanılmıştır. Doğal ürünler, yeni kanser önleyici ve tedavi edici ajanlar olma potansiyelleri nedeniyle son 30 yılda artan ilgi görmüştür [299, 300]. Buna paralel olarak, bitkiden türetilmiş bileşiklerin, tümör oluşumunun çeşitli aşamalarının ve ilgili enflamatuar süreçlerin inhibitörleri olarak potansiyeli için artan kanıtlar vardır [301, 302]. Bu kanıtlar, bu ürünlerin kanserin önlenmesi ve terapisindeki önemini vurgulamaktadır [303, 304]. DNA üzerindeki belirli bölgeleri tanıyarak DNA'yı kesen bitki ekstraktlarının kullanılması, antimikrobiyal

ve antikanser ilaçların geliştirilmesinde oldukça önemlidir [305]. DNA kesme canlı hücrelerde meydana gelen temel bir olaydır. DNA kesilmesi sırasında, polimeraz enzimi yardımı ile DNA üzerinde çentikler oluşmaktadır ve replikasyon başlamaktadır. Daha sonra restriksiyon enzimleri oluşan çentiklere aracılığı ile DNA üzerindeki belirli nükleotidleri tanıyarak kesme işlemini gerçekleştirmektedir. DNA kesme aktivitesinin belirleme deneyleri hidrolitik ve oksidatif kesme olmak üzere iki yolla yapılmaktadır. Oksidatif kesmede hedef DNA'nın yapısında bulunan şeker ve nükleobazlarda meydana gelirken, hidrolitik kesme ise DNA'nın yapısındaki fosfodiester bağında meydana gelmektedir [306, 307].

DNA kesme, kanser tedavisi için tümörlerin inhibisyonunu gerçekleştirmek için gerekli en önemli mekanizmadır [308]. Birçok kullanılan antikanser ilaçlar DNA replikasyonunu bloke ederek tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebilmektedir [309]. Bu nedenle tezimizde, akut ve kronik yaralarda oluşabilecek kanserlerin önlenmesi için safran, kantaron ve propolis ekstraktının DNA kesme aktiviteleri araştırılmıştır. Literatürde, Bu ekstraktların ve ekstraktların içerisinde bulunan aktif maddelerin DNA'yı kesme, hücre içerisinde DNA ile etkileşime girerek DNA'yı fragmentlere ayırması hakkında birçok çalışma olduğu göze çarpmaktadır.

Bakshi ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada insan pankreatik hücre hattında safrandan elde edilen krosinin DNA'yı fragmentlerine ayırma aktivitesini ve hücre döngüsünü durdurma potansiyelini araştırmışlardır. İnsan pankreatik hücrelerinden alınan örneklerden DNA saflaştırması sonrasında yapılan agarose jel elektroforez deneyi sonucunda krosin maddesinin 12. saatte DNA'yı fragmentlere ayırdığı görülmüştür [310].

Sakr ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada EAC hücrelerinin subkutan enjeksiyonu ile indüklenen katı tümörler taşıyan farelere karşı *in vivo* ve *in vitro* olarak safran ekstraktının antitümör aktivitesini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmada yapılan DNA fragmentasyon çalışması sonucunda, DNA'nın tamamı ile degrede olduğu ve fragmentlerin oluştuğu rapor edilmiştir [311].

Bir diğer çalışmada, *Crocus sativus* stigmalarının ve krosinin (trans-crocine 4) sulu ekstresinin, Comet testi kullanılarak birden fazla fare organında metil metansülfonat ile indüklenen DNA hasarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan Comet testi sonucunda, *Crocus sativus* stigmalarının ve krosinin (trans-crocine 4) sulu ekstresinin DNA üzerinde genoprotektif özelliğe sahip olduğu bulunmuştur [312].

Krosinin DNA hasarını koruması hakkında yapılan bir diğer çalışmada, fare testis dokusunda Krosin 'nin paraquat kaynaklı oksidatif hasarlara ve apoptotik indekslere karşı koruyucu etkilerini belirleme amaçlanmıştır. Bu çalışmada yapılan DNA

fragmentasyon testi sonucunda, paraquatın şiddetli bir DNA parçalanmasına neden olduğunu gösterdiği, krosin ve paraquat ile tedavi edilen gruptaki hayvanlar, sadece paraquat uygulanan grubuna kıyasla DNA fragmentasyonunun inhibe edildiği görülmüştür [313].

Tezimizde yaptığımız çalışmada, safran sulu ekstraktının hidrolitik reaksiyon sonucu kesme ve oksidatif reaksiyon sonucu kesme aktiviteleri belirlenmiştir. Literatür taramasında safran ekstraktı ve ekstraktının içerisinde bulunan krosin maddelerin DNA fragmentasyonu hakkında yapılan çalışmalara rastlanılmıştır. Bu çalışmalar bizim tezimizde kullandığımız method ile tam uyuşmamasına rağmen, safran ekstraktının ve ekstrakta bulunan krosin maddesinin DNA'yı denature ettiği ve fragmentlere ayırdığı görülmüştür. Ayrıca safran sulu ekstraktının içerisinde bulunan krosin maddesinin, DNA'yı oksidatif ajanlardan koruduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bu çalışmaları bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile kıyasladığımızda, çeşitli hücre hatlarına uygulanan safran ekstraktları ve ekstrak içerisindeki aktif maddelerin DNA fragmentlere ayrılması, DNA kesme deneyi sonrası elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Buna ek olarak oksidatif ajan varlığında DNA'nın durumunu belirleyen çalışmada uygulama gruplarında DNA korunurken, safran sulu ekstraktının bizim çalışmamızda oksidatif ajan varlığında DNA'yı kestiği görülmüştür. Bu çalışmalarda kullanılan method genellikle ekstraktın veya ekstraktın içerisinde bulunan aktif maddelerin çeşitli hücre hatlarına uygulanmasına dayanmaktadır. Bizim çalışmamızda ise direk olarak plasmid DNA kullanılmaktadır ve DNA direk olarak safran sulu ekstraktı ile etkileşime girmektedir. Bu fark, safran sulu ekstraktının direk olarak DNA ile etkileşime girerek yapılan ilk DNA kesme çalışması olmasını sağlamaktadır.

Kantaron sulu ekstraktı ve ekstrak içerisinde bulunan aktif maddeler ile literatürde yapılan DNA kesme ve DNA fragmentasyon çalışmaları bulunmaktadır. Santos-Filho ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışmada, kantaron sulu ekstraktının *E.coli* AB1157'nin hayatta kalması ve plazmit DNA topolojisi üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. DNA topolojisi üzerindeki etkisini belirlemede kullanılan tekniklerden biri de DNA kesme deneyidir. Yapılan deney sonucunda, kantaron sulu ekstraktının uygulanan 50 mg/mL, 5 mg/mL ve 0.5 mg/mL dozlarında herhangi bir kesme aktivitesine rastlanılmamıştır [314].

Vantieghem ve ark. 1998 yılında yaptıkları çalışmada ışıkla aktif hale getirilmiş hyperisinin HeLa hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yapılan DNA fragmentasyon çalışması sonucunda, 125 ng ile 1 ng arasında uygulama yapılan hücrelerde DNA fragmentasyonunun zamana ve doza bağlı olarak arttığı görülmüştür [315].

Kızıl ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, *H. scabrum* L. ve *H. triquetrifolium* Robson and Poulter bitkilerinin etanollü ekstraktlarının protein oksidasyonu ve DNA hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini araştırmışlardır. İki bitkinin etanollü ekstraktı ile yapılan oksidatif ve hidrolitik DNA kesme çalışması sonucunda, her iki bitkinin etanollü ekstraktının DNA'da kesme aktivitesine sahip olmadığı ve DNA oksidatif reaksiyondan koruduğu bildirilmiştir [316].

Kızıl ve ark. (2011) yılında yaptıkları çalışmada, *H. retusum* Aucher ve *H. scabrum* L.'nin etanol ekstraktlarının, BSA oksidasyondan ve Fenton sisteminden ($Fe_3 + / H_2O_2$ / askorbik asit) türetilen hidroksil radikalının neden olduğu DNA hasarından koruma yeteneğini araştırmayı amaçlamışlardır. Yapılan çalışmada sonucunda, her iki bitkininde etanol ekstraktlarının tüm dozlarda (100 μg /mL, 200 μg /mL, 300 μg /mL ve 400 μg /mL,) DNA'yı hasar oluşumundan koruduğu belirlenmiştir [317].

Gholivand ve ark (2012) yaptıkları çalışmada, hyperisin molekülün bileşenlerinden olan kinon türevi dathron ve quinizarin aktif maddelerinin DNA-bağlanma, DNA-kesme ve sitotoksik potansiyelini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, Kinonların varlığında DNA bölünmesi gözlenmiştir. DNA parçalanmasının büyük ölçüde kinonların konsantrasyonuna bağlı olduğu görülebildiği rapor edilmiştir. Düşük kinon konsantrasyonunda süper sargılı DNA (Form I), çentikli forma (II) dönüştürülebildiği görülmüştür. Kinonların DNA'ya konsantrasyon oranı 0.5'e ulaştığında, dikkat çekici DNA bölünmesi gözlemlenmiştir [318].

Li ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada, emodin MCF-7 hücrelerinde büyüme inhibisyonu, apoptoz indüksiyonu ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki antikanser etkileri araştırılmıştır. Yapılan Comet deneyi sonucunda, doza (0, 5, 15, 25 or 35 mg/mL) bağlı olarak kuyruk boyunda artış olduğu belirtilmiştir. DNA fragmentasyon çalışmasında ise emodin DNA'yı denature ederek fragmentlere ayırdığı bildirilmiştir [319].

Akyol ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, *H. perforatum* Linn. ekstraktının, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile indüklenen kondrositlerde hücre canlılığı, DNA hasarı, apoptoz, disintegrin benzeri ve trombospondin motifli (ADAMTS) proteinler ile metaloproteinaz üzerindeki koruyucu rollerinin incelenmesini amaçlamışlardır. Yapılan DNA hasarı çalışmasında Comet metodu kullanılmıştır. Yapılan deney sonucunda, 100 μg /mL ekstrak + 0.7 mM H_2O_2 ve 750 μg /mL ekstrak + 0.7 mM H_2O_2 uygulamalarında kuyruk oluşumu görülürken, 400 μg /mL ekstrak + 0.7 mM H_2O_2 uygulamasında herhangi bir kuyruk oluşumu görülmemiştir. 400 μg /mL ekstrak + 0.7 mM H_2O_2 dozun DNA'yı koruduğu ve herhangi bir hasara neden olmadığı şeklinde yorumlanmıştır [320].

Xing ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, emodin farklı türevlerinin (Emodin asit, Fizkion, Trimetoksiemodin, Krisofanol, emodin ramnopironositl) antitumor etkisini araştırmışlardır. Yapılan DNA fragmentasyon çalışması sonucunda, emodin ramnopironosit molekülünün DNA'yı fragmentlerine ayırdığı bulunmuştur [321].

Boga ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada, *H.capitatum* var. *capitatum* ekstraktlarının (petroleum eterli, asetonlu, methanollü ve sulu) fitokimyasal analizi, antioksidan, antimikrobiyal, antikolinesteraz ve DNA koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda metanollü ekstraktın diğer ekstrakt türlerine göre DNA üzerinde yüksek koruma etkisi olduğu bulunmuştur [322].

Sekeroglu ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, *H.perforatum* çiçek, gövde ve yaprağı su ve etanol kullanılarak ekstrakte edilmiş ve DPPH, ferrik indirgeme deneyleri ile serbest radikal temizleme aktivitesini, ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içeriklerini ve ardından ultraviyole ve hidrojen peroksit varlığında DNA koruyucu potansiyellerini araştırmayı amaçlamışlardır. Yapılan çalışma sonrasında, en düşük konsantrasyonda bile DNA koruma özelliği görülmüştür. Ayrıca tüm ekstraktların DNA'yı oksidatif reaksiyonlardan yüksek oranda koruma potansiyeli sahip oldukları bildirilmiştir [323].

Sekeroglu ve ark. 2018 yılında gerçekleştirdikleri araştırmada, *H.capitatum capitatum* (Choisy) bitkisinin ekstraktının oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, bitki ekstraktının en düşük konsantrasyonda (25 µg/mL) bile güçlü DNA koruma potansiyeli sahip olduğu görülmüştür [324].

Kurt-Celep ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada, *H.olympicum* L. ekstraktının UVB uygulanmış insan dermal fibroblastında DNA kesme aktivitesinin ve matriks metaloproteinaz (MMP) -9 aktivitesi üzerindeki etkisinin, antioksidan aktivite potansiyelinin incelenmesini amaçlamışlardır. Yapılan Comet deneyi sonucunda, *H.olympicum* L bitki ekstraktı ile 48 saat yapılan uygulama ortalama kuyruk oluşumunu ortadan kaldırmıştır [325].

Çalışmamızda yapılan DNA kesme deneyi ile literatürde yapılan DNA kesme ve DNA fragmentasyon çalışmalarında farklılıklar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL dozlarında herhangi bir DNA kesme aktivitesine rastlanmamıştır. Ancak yapılan birçok DNA fragmentasyon çalışmalarında kantaron ekstraktlarının ve içerisinde bulunan aktif maddelerin DNA'yı denature ederek fragmentlere ayırdığı görülmüştür. Çalışmamızın sonuçlarını destekleyen ve çalışmamızdaki sonuçlar ile paralel sonuçların alındığı tek çalışma Santos-Filho ve ark. (2008) yılında yapılan çalışmadır. Bu çalışmada 50

mg/mL, 5 mg/mL ve 0.5 mg/mL doza sahip kantaron sulu ekstraktının herhangi bir kesme aktivitesine sahip olmadığı bildirilmiştir. Oksidatif reaksiyon sonucu DNA kesme aktivitesi sonuçlarında ise tüm dozlarda Form I ve Form II fragment görülmüştür. Oksidatif reaksiyon sonucu DNA'da oluşun kesme aktivitesi sonuçlarımız aynı hidrolitik reaksiyon sonucu oluşan DNA kesme aktivite sonuçlarımızda olduğu gibi literatürden farklılıklar göstermektedir [314]. Bizim çalışmada tüm kantaronun tüm dozları oksidatif reaksiyon sonucunda DNA'yı kesme aktivitesine sahipken literatürde yapılan çalışmalar DNA'yı koruyucu etkiye sahip olduklarını göstermektedir. Literatürde içerisinde bulunan ve yukarıda bahsedilen çalışmalar ile bizim çalışmamız arasındaki farklılık birçok nedeni bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda kantaronun farklı türlerinin kullanılması, bu türlerin farklı bölgelerden toplanılması ve içerik bakımında farklı olmaları bu sonuçların alınmasını açıklayabilmektedir. Ayrıca kullanılan ekstraksiyon metodları ve solventler bitki içeriğindeki maddelerin çözünmesini ve açığa çıkmasını değiştirmektedir. Ayrıca özellikle koruma çalışmalarında kantaron türlerinin çiçek, gövde, kök ve yaprak kısımlarının kullanıldığı çalışmaların varlığı görülmektedir. Bitkilerin içeriğindeki maddelerin çevresel koşullar dışında çiçek, kök, gövde ve yapraklarda da değişebildiği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda kantaron bitkisinin sadece çiçek kısımları kullanılmıştır. DNA koruma çalışmalarında kullanılan oksidatif ajanların türleride çalışmaların sonuçları etkileyebilmektedir.

Bazo ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada, Wistar erkek sıçanlarda kolon kanserogenezinde propolis ekstraktının koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada DNA'daki hasarı belirlemede Comet deneyi kullanılmıştır. Yapılan deney sonucunda, propolis DNA hasarına herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir [326].

Yazıcıoğlu ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada, türk propolis ekstraktlarının, sünnet derisi fibroblast hücrelerini hidrojen peroksit (H_2O_2) ile indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı önleme veya koruma sağlama potansiyelini değerlendirmeyi amaçlanmışlardır. Oksidatif DNA hasarının bir indükleyicisi olarak hidrojen peroksit ($40 \mu M$) kullanılmıştır. DNA'nın hasarı alkalın tek hücreli jel elektroforezi (Comet) testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, propolis ekstraktı ile muamele edilen kültürlerde H_2O_2 kaynaklı DNA hasarında önemli bir azalma gösterdi [327].

Tartik ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada, propolisin, hemosistein ile indüklenmiş MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada yapılan DNA fragmentasyondeneyi sonucunda, hemosisteinin DNA'yı fragmentlere ayırdığı, propolis uygulamasının ise DNA'yı koruyucu etki gösterdiği görülmüştür [328].

Baskan ve ark. (2018) yapıkları çalışmada, İzmir bölgesinde elde edilen propolisin, antibakteriyal etkilerini ve DNA hasar inhibisyon potansiyelini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada propolisin etanollü ve asetonlu ekstraktları kullanılmıştır. Yapılan DNA kesme çalışmasında 12.5, 25, 50 ve 100 mg/mL dozlarında propolis ekstraktı kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda artan konsantrasyonda propolisin DNA'yı koruduğu belirlenmiştir [329].

Da Silva Frozza ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, Brezilya kırmızı propolis ekstraktından elde edilen zenginleştirilmiş fraksiyonun Hep-2 kanser hücre hattına olan etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu çalışma altında yapılan DNA kesme çalışması sonucunda, propolisin zenginleştirilmiş fraksiyonlarının DNA üzerinde yüksek kesme aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Buna rağmen, ham propolis ekstraktının DNA üzerinde herhangi bir kesme aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir [330].

Yalçın ve ark. (2021) gerçekleştirdikleri araştırmada, türk propolisin etanolik ekstresinin fibroblast hücrelerinde ışınına bağlı DNA hasarına karşı radyoprotektif etkisini Comet testi kullanarak değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, yalnızca ışınlanmış hücrelere kıyasla propolis ekstraktı ile uygulama yapılan hücrelerde ışını ile indüklenen DNA hasarında önemli bir azalma gösterdi [331].

Çalışmamızda hidrolitik reaksiyon sonucu DNA kesme deneyinde, propolisin tüm dozlarda (1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL) herhangi bir kesme aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda aldığımız bu sonuçlar, Da Silva Frozza ve ark. (2017) yılında yaptıkları çalışmadaki sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Da Silva Frozza ve ark. ham propolisin DNA üzerinde herhangi bir kesme aktivitesine sahip olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz oksidatif reaksiyon sonucu DNA kesme aktivitesi deneyinde, propolis ekstraktının tüm dozlarında Form I ve Form II oluşumunun görüldüğü belirlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar ile bu sonuçları karşılaştırdığımızda farklılıklar olduğu görülmektedir [330]. Örneğin; Baskan ve ark. yaptıkları çalışmada 12.5, 25, 50 ve 100 mg/mL dozlarında oksidatif reaksiyon sonucu DNA'da herhangi bir kesme aktivitesine rastlanılmamıştır. Çalışmamız ile bu çalışmadaki en önemli farklılık, Baskan ve ark. çalışmamızda kullandığımız dozun 10 katını kullanmış olmasıdır. Diğer bir farklılık ise kullanılan ekstraktların farklı solvent ile hazırlanmış olmasıdır. Baskan ve ark. yaptıkları çalışmada etanollü ve asetonlu ekstrakt kullanılırken bizim çalışmamızda sadece sulu ekstrakt kullanılmıştır [329]. Çalışmamızda kullandığımız metotta propolis sulu ekstraktı direk olarak plazmid DNA ile etkileşime girerken, Comet deneyi ile yapılan çalışmalarda ve diğer fragmentasyon çalışmalarında

uygulamalar hücrelere yapılmaktadır.

4.3 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Sonuçları

Safran, kantaron ve propolis sulu ekstraktlarının antibakteriyel aktiviteleri *Paeruginosa* ATCC 254992, *B.subtilis* ATCC 6633 , *E.coli* ATCC 25922, *E.faecalis* ATCC 29212, *L.monocytogenes* ATCC 7644, *E.coli* ATCC 35218, *B. cereus* NRRL B-3711, *S.aureus* ATCC 25923 bakterileri kullanılarak ve antifungal aktivitesi *C.albicans* ATCC 60193 kullanılarak belirlendi. Çalışmada broth mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı.

MİK deneyi sonucunda, safran ve kantaron sulu ekstraktlarının deneyde kullanılan gram pozitif ve gram negatif bakterilerde benzer antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Buna ek olarak propolisin tüm bakteri suşlarında en düşük dozda yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görüldü. Safran sulu ekstraktının 1 mg/mL'de veya üst konsantrasyonlarında tüm bakteri suşlarında antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Kantaron sulu ekstraktının minimum inhibisyon konsantrasyonlarına bakıldığında, *E. coli* NRRL B-3704 suşu hariç tüm bakteri suşlarında 1 mg/mL veya daha üst konsantrasyonlarda yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulundu. 0,250 mg/mL kantaron sulu ekstraktının *E. coli* NRRL B-3704 suşunda antimikrobiyal aktivite gösterdiği görüldü. Propolis sulu ekstraktının 0,125 mg/mL ve daha üst konsantrasyonlarında tüm bakteri suşlarında yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği belirlendi. Antifungal aktivitelerinin belirlenmesinde ise, safran ve kantaron sulu ekstraktlarının MİK değeri 1 mg/mL olarak bulunurken, propolis sulu ekstraktının MİK değeri 0,125 mg/mL olarak bulundu. Tüm ekstraktlar arasında propolisin diğer iki ekstraktlara kıyasla antimikrobiyal ve antifungal aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 4.1 Safran (S), kantaron(K) ve propolis(P) sulu ekstraktlarının MİK değerleri (Gen.:Gentamisin, Amp.:Ampisilin, Flu.:Flukonazol, D:DMSO)

Mikroorganizma	Bileşikler (mg/mL)						
	S	K	P	Gen.	Amp.	Flu.	D.
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	1	<0,125	1	0,016	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	>1	1	<0,125	0,008	0,06	-	-
<i>E. coli</i> NRRL B-3704	1	0,25	<0,125	0,13	16	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1	>1	<0,125	0,125	32	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>1	1	<0,125	1	0,016	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1	>1	<0,125	0,08	2	-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	>1	>1	<0,125	0,125	0,5	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	>1	>1	>1	-	-	0,063	-

Acar ve ark. (2010) yılında yaptıkları çalışmada Anadolu'da yetişen safran türlerinin

(*Crocus biflorus*, *C. baytopiorum*, *Crocus flavus* subsp. *dissectus*) metanollü, etil asetatlı ve heksanlı ekstraktlarının antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerini araştırmayı amaçlamışlardır. MİK testinde *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. cereus* RSKK 863 bakterileri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, safran bitkilerinin ekstraktlarının MİK değerlerinin 0,10 mg/mL ile 20,48 mg /mL arasında değiştiği bulunmuştur. En düşük MİK değerine sahip ekstrakt *C.flavus* bitkisinin metanollü ekstraktına aittir. Bu konsantrasyon değeri *B. subtilis* üzerinde etkilidir. En yüksek MİK değerine sahip ekstrakt ise *C.baytopiorum* bitkisinin heksanlı ekstraktına aittir. Bu değer *S. aureus* üzerinde etkilidir [332].

Asparganah ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada safran petallerinin ve stamenlerinin metanollü, etil asetatlı, kloroformlu, sulu ekstraktlarının gıda kaynaklı patojenler (*B.cereus*, *S.aureus*, *S.enterica*, *E.coli* ve *Shigella dysantriae*) üzerindeki antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır., *S. aureus* için maksimum MİK değerine 31,2 mg/mL ile metanollü petal ekstraktının sahip olduğu, *B. cereus* için maksimum MİK değerine 62,5 mg/mL kloroformlu, etil asetatlı petal ekstraktının ve metanollü, sulu stamen ekstraktının sahip olduğu, *E. coli* için maksimum MİK değerine 31,5 mg/mL ile etil asetatlı stamen ekstraktının sahip olduğu, *S.dysantriae* için ise maksimum MİK değerine 15,6 mg/mL ile metanollü petal ekstraktının ve etil asetatlı stamen ekstraktının sahip olduğu belirlenmiştir [333].

Parray ve ark. (2014) yılında yaptıkları çalışmada, safran stigma metanollü ekstraktının antibakteriyal ve antioksidan aktivitesinin araştırmışlardır. Yapılan çalışmada MİK deneyi *S.aureus*, *E.coli*, *Paeruginosa* ve *Shigella flexneri* bakterileri üzerinde yapılmıştır.Yapılan çalışma sonucunda safran stigma metanollü ekstraktının MİK değerleri, *S. aureus* için 300 µg/mL, *E. coli* için 500 µg/mL, *Paeruginosa* için 200 µg/mL, *S.flexneri* için 750 µg/mL olarak bulunmuştur [334].

Muzaffar ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada, safran stigmalarının petroleum eterli ve metanollü ekstraktlarının bakterisidal ve fungusidal etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri, *C.albicans*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus fumigatus* fungusları kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, MİK değerleri petroleum eterli ekstrakt ve metanollü ekstrakt için ayrı ayrı bulunmuştur. Petroleum eterli ekstraktın bakteri suşları üzerindeki MİK değerleri, *P.vulgaris* için 0,4 mg/mL, *K.pneumonia* için 0,66 mg/mL, *B. subtilis* için 0,53 mg/mL, *P. aeruginosa* için 0,4 mg/mL olarak bulunmuştur. Petroleum eterli ekstraktın mantarlar üzerindeki MİK değerleri, *C.albicans* için 2,13 mg/mL, *A.niger* için 3,2 mg/mL, *A.fumigatus* için 3,2 mg/mL olarak bulunmuştur. Metanollü ekstraktın bakteri suşları üzerindeki MİK değerleri, *P.vulgaris* için 0,66 mg/mL, *K.pneumonia* için 0,8 mg/mL, *B. subtilis* için

0,8 mg/mL, *P. aeruginosa* için 0,53 mg/mL olarak bulunmuştur. Metanollü ekstraktın mantarlar üzerindeki MİK değerleri, *C.albicans* için 3,2 mg/mL, *A.niger* için 3,2 mg/mL, *A.fumigatus* için 2,13 mg/mL olarak bulunmuştur [335].

Shadmehri ve ark. (2019) yılında yaptıkları çalışmada, safran petallerinin sulu ekstraktının sitotoksik, antioksidan ve antibakteriyal aktivitelerini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada antibakteriyal aktiviteyi araştırmak için *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, *S. aureus* için MİK değeri 250 µg/mL olarak, *E. coli* için MİK değeri 62,5 µg/mL olarak bulunmuştur [336].

Jomehpour ve ark. 2019 yılında yaptıkları çalışmada, safran stigmalarının sulu ve metanollü ekstraktlarının antibakteriyal aktivitesini belirlemeyi amaçlamıştır. Çalışmada antimikrobiyal testlerde *S. aureus*, *Enterococcus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *K.pneumonia*, *P. aeruginosa* bakterileri kullanılmıştır. Metanollü ekstraktın MİK değerleri, *S. aureus* için 160 µg/mL, *Enterococcus* için 160 µg/mL, *S.pyogenes* için 160 µg/mL, *E. coli* için 320 µg/mL, *K.pneumonia* için 320 µg/mL, *P. aeruginosa* 320 µg/mL olarak bulunmuştur. Sulu ekstraktın MİK değerleri, *S. aureus* için 320 µg/mL, *Enterococcus* için >320 µg/mL, *S.pyogenes* için 320 µg/mL, *E. coli* için 160 µg/mL, *K.pneumonia* için >320 µg/mL, *P. aeruginosa* >320 µg/mL olarak bulunmuştur [337].

Sales ve Pashazadeh 2020 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, safran petallerinin metanollü ekstraktının *S. aureus*, *B.cereus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerindeki antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, safran petallerinin metanollü ekstraktının MİK değerleri *S. aureus* için 6,25 mg/mL, *B.cereus* için 12,5 mg/mL, *E. coli* için 50 mg/mL ve *P. aeruginosa* için 100 mg/mL olarak bulunmuştur [338].

Wali ve ark. 2020 yılı içerisinde gerçekleştirdikleri çalışmada, safran petallerinin ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik ve sitotoksik aktivitelerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada antimikrobiyal çalışmalar için *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* bakterileri ve *C.albicans* mayası kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda Safran petal ekstraktlarının en yüksek MİK değeri 500 µg/mL, en düşük değeri ise 15,63 µg/mL olarak bulunmuştur [339].

Esmaelian ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada, subkritik su ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiş safran soğanlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada MİK'un bulunmasında *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda MİK değerleri, *S. aureus* için 150 mg/mL, *E. coli* için 300 mg/mL olarak bulunmuştur [340].

Zara ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada, polar olmayan fraksiyon yöntemi kullanılara

ekstrakte edilen safran stamenlerinin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella enterica* subsp. *bongori* ve *L.monocytogenes* bakterileri kullanılmıştır. Yapılan çalışmada sonucunda MİK değerleri, *S. aureus* için 4,5 mg/mL, *E. coli* için 9 mg/mL, *L.monocytogenes* için 9 mg/mL, *S.enterica* subsp. *bongori* için 9 mg/mL olarak bulunmuştur [341].

Literatürde safran bitkisinin petallerinin, stigmalarının ve stamenlerinin MİK değerlerinin belirlendiği birçok çalışmadan yukarıda bahsedilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen MİK değerleri ve kullanılan bakteri suşları birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Buna ek olarak kullanılan bitki kısımlarına bağlı olarak MİK değerlerinin bakteri suşları özelinde değiştiği görülmüştür. Çalışmamızda kullanılan safran ekstraktı stamenlerden elde edilmiştir. Bu ekstrakt kullanarak yapılan MİK değeri çalışmada kullanılan tüm bakteri suşlarında 1mg/mL veya üst konsantrasyonları olarak belirlenmiştir. Literatürde ile bu sonuçları kıyasladığımızda, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Literatürde yapılan çalışmaları kendi aralarında kıyasladığımıza ise bazı çalışmalarda MİK değerle genel olarak mg/mL seviyesinde iken bazı çalışmalarda MİK değerlerinin g/mL seviyesinde olduğu görülmüştür. Farklı coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalarda MİK değerlerinin değişebildiği rapor edilmiştir. Bunlara ek olarak ekstraksiyon sırasında kullanılan solventlerin MİK değerlerini etkileyebildiği bildirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan bakteri suşlarına bağlı olarakta MİK değerlerinin değişebileceği rapor edilmiştir. Safran sulu ekstraktı özelinde çalışmamızda suşlara bağlı olarak MİK değerinde herhangi bir değişikliğe rastlanılmamıştır. Mantar türleri için baktığımızda çalışmamızda safran sulu ekstraktının *C.albicans* için MİK değeri 0,25 mg/mL olarak bulunmuştur. Literatürde *C.albicans* kullanılarak belirlenen MİK değerleri tıpkı bakteri suşlarında olduğu gibi farklılıklar göstermektedir. Yukarıda *C.albicans* kullanılarak yapılan çalışmada, MİK değerlerinin kullanılan bitki kısmı ve solvante bağlı olarak değiştiği görülmüştür.

Rabanal ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada, Kanarya Adaları'nda yetişen üç farklı kantaron (*Hypericum canariense*, *Hypericum glandulosum* ve *Hypericum grandifolium*) türünün antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. MİK deneyinde *B.cereus* var. *mycoides*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterileri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, MİK değerlerinin 0,03 ile 0,29 mg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir [342].

Pistelli ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmada, *H.triquetrefolium* bitkisinin etanollü ekstraktının antibakteriyal etkisini araştırmışlardır. MİK değerlerinin bulunmasında *S.aureus* ve *S.epidermidis* bakterilerin farklı suşları kullanılmıştır. Yapılan çalışma

sonucunda, tüm suşlar için MİK değeri 850 µg/mL olarak bulunmuştur [343].

Pirbalouti ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada, *H.scabrum* bitkisine ait etanollü ekstraktının antimikrobiyal etkilerini, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *B.cereus* ve *E.coli* bakterilerini kullanarak araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, *H.scabrum* bitkisine ait etanollü ekstraktı için MİK değerleri, *E.coli* için 312,5 µg/mL, *S.aureus* için <19 µg/mL, *P.aeruginosa* için 78,5 µg/mL, *B.cereus* için 39 µg/mL olarak bulunmuştur [344].

Maltas ve ark. 2013 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, Türkiye’de yetişen üç farklı *Hypericum* türüne (*Hypericum aviculariifolium* Jaub. Spach subsp. *depilatum* (Freyn Bornm.) Robson var. *depilatum*, *Hypericum salsugineum* Robson Hub.-Mor., *H.perforatum* L.) ait metanollü ekstraktların antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde *Klebsiella oxytoca* ATCC 10031, *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* O101 K30 K99 F41, *Paeruginosa* ATCC 15442, *Proteus mirabilis* ATCC 43071, *S.aureus* ATCC 6538, *L.monocytogenes* Type 2 Pasteur Institute 5434 ve *B.cereus* ATCC 11778 bakterileri kullanılmıştır. *K.oxycota*, *E.coli* ATCC 25922 ve *E.coli* O101 K30 K99 F41 için en etkili doz 6250 µg/mL ile *H.salsugineum* bitkisine ait olduğu bulunmuştur. *H.perforatum* ekstraktının 3800 µg/mL dozunun *Paeruginosa* ATCC 15442 ve *P.mirabilis* ATCC 43071 bakterileri için en etkili doz olduğu belirlenmiştir. *H.aviculariifolium* Jaub. Spach subsp. *depilatum* (Freyn Bornm.) Robson var. *depilatum* bitkisine ait ekstraktın *S.aureus* ATCC 6538 ve *B.cereus* ATCC 11778 bakterilerinde en etkili ekstrak olduğu görülmüştür. Ekstraktın MİK dozları, *S.aureus* için 97,45 µg/mL, *B.cereus* için 195,31 µg/mL olarak bulunmuştur. *H.perforatum*’a ait 29,68 µg/mL doz *L.monocytogenes* için en etkili doz olarak belirlenmiştir [345].

Eroğlu Özkan ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada *Hypericum pampylicum* bitkisinin metanollü, petroleum eterli, kloroformlu, asetonlu ve total metanollü ekstraktlarının kimyasal içeriğini ve biyolojik aktivitelerini araştırmayı amaçlamışlardır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlendiği MİK deneyinde, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Paeruginosa*, *Salmonella typhi*, *S.flexneri*, *P.mirabilis* bakterileri ve *C.albicans* mayası kullanılmıştır. *S.aureus* için en etkili MİK değeri 19,25 mg/mL ile totan metanollü ekstrakta aittir. *S.epidermidis* bakterisine bakıldığında, en etkili dozun 312,50 mg/mL ile kloroformlu ekstrakta ait olduğu görülmüştür. *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *P.mirabilis* bakterilerinde ise tüm ekstraktlarda en etkili MİK değerinin 1250 mg/mL olduğu bulunmuştur. *Paeruginosa* bakterisinde en etkili MİK değerinin 625 mg/mL olduğu belirlenmiştir. *S.typhi* bakterisinde en etkili MİK değerinin 625 mg/mL ile kloroformlu ekstrakta ait olduğu bildirilmiştir. *C.albicans* manyasının üremesini engelleyen MİK değerinin total metanol ekstraktı hariç tüm

ekstraktlarda 625 mg/mL olduğu belirlenmiştir [346].

Süntar ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada, *H. perforatum* türünün etanollü, heksanlı, kloroformlu, n-bütanollü ve sulu ekstraktlarının oral yolla buşan bakterilere karşı antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada yapılan antimikrobiyal deneylerde, *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus plantarum*, ve *E.faecalis* bakterileri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, *S. sobrinus* ve *L.plantarum* bakterilerinde en etkili MİK değeri 8 µg/mL ile sulu ekstrakta ait olduğu, *S. mutans* ve *E. faecalis* için bu oranın sırası ile 32 ve 16 µg/mL olduğu bulunmuştur [347].

Eroğlu Özkan ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada, *H. perforatum* türünün de içinde bulunduğu altı farklı *Hypericum* türünün (*H. thymbrifolium*, *H. spectabile*, *H.pseudolaeva*, *H.neurocalycinum*, *H. malatyanum*) antimikrobiyal etkilerini, *S.aureus* ATCC 65538, MRSA ATCC 33591, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E.coli* ATCC 8739, *K.pneumoniae* ATCC 4352, *Paeruginosa* ATCC 1539, *P.mirabilis* ATCC 14153 bakterileri ve *C.albicans* mantarı kullanarak belirlemeyi amaçlamışlardır. Antimikrobiyal etki açısından en etkili ekstraktlar *H.neurocalycinum* ve *H. malatyanum* olduğu bulunmuştur. Tüm bakterilere karşı olan MİK dozu 4.8 µg/mL olarak belirlenmiştir [348].

Literatürde kantaron türlerinin farklı MİK değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Çalışmamızda kantaron sulu ekstraktının *E.coli* hariç tüm bakterilerde ve *C.albicans* mayasında 1 mg/mL, *E.coli* bakterisinde ise 0,25 mg/mL MİK değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu değerler literatürde yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında paralellik göstermediği belirlenmiştir. Bunun nedeni çalışmamızda kullanılan kantaron türü ile literatürde kullanılan kantaron türlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca literatürde kullanılan türlerin örneklendiği coğrafik bölgelerin farklılığı, bitki türlerinin içeriğindeki maddelerin oranlarını değiştirmektedir. Bu durum elde edilen MİK değerlerinin farklılığına nedne olmaktadır. Ekstraksiyon sırasında kullanılan solventlerin farklılığının MİK değerlerini değiştirdiği literatürde belirtilmiştir. Çalışmamızda sadece kantaronun sulu ekstraktının MİK değerleri bulunmuştur. Ayrıca tıpkı safranda olduğu gibi literatür çalışmaları da suşa bağlı olarak MİK değerlerinin değişebileceği görülmüştür. Çalışmamızda sadece *E.coli* bakterisine ait suşta MİK değerinin diğer bakteri suşlarına göre farklı olduğu bulunmuştur. *C.albicans* mayasına karşı kantaron sulu ekstraktının MİK değerlerinin literatürde farklı olduğu görülmüştür., bir çalışmada MİK değeri 4.8 µg/mL iken bir diğer çalışmada bu değer 625 mg/mL olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamız ile bu çalışmaları kıyasladığımızda herhangi bir benzerlik görülmemiştir. Bunun nedeni bu çalışmalarda kullanılan *hypericum* türlerinin farklı olması ve ekstraksiyon sırasında kullanılan çözücülerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Moreno ve Ark. (1999) yaptıkları çalışmada, Arjantin'in Tucuman bölgesinden elde edilen propolisin antimikrobiyal aktivitesini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada gerçekleştirilen MİK deneyinde, *S.aureus*, *S.pyogenes*, *E.faecalis*, *S. agalactiae* bakterileri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, *S.aureus* için MİK değeri 15,30 µg/mL, *S.pyogenes* için MİK değeri 7,80 µg/mL, *S. agalactiae* için MİK değeri 7,50 µg/mL ve *E.faecalis* için MİK değeri 14,60 µg/mL olarak bulunmuştur [349].

Santos ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada, Brezilya'ya ait propolisin oral yolla bulaşan anaerobik bakterilere karşı antibakteriyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29 523 ve FDC Y4, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10 953, *Fusobacterium necrophorum* ATCC 25 386, *P. gingivalis* ATCC 33 277, *P. intermedia* ATCC 25 611 ve *Prevotella nigrescens* ATCC 33 563, *Eubacterium lentum* ATCC 25 559 ve *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27 337 bakteri türleri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda MİK değerlerinin 64 ile 1024 µg/mL arasında değiştiği görülmüştür [350].

2005 yılında yapılan bir çalışmada, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden elde edilen propolisin antibakteriyal aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada, *S.aureus* ve *E.coli* bakterileri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, *S.aureus* için MİK değerleri <0,1 ile 0,4 µg/mL arasında, *E.coli* için MİK değeri ise 0,4 ile 14 µg/mL arasında olduğu belirlenmiştir [351].

Darwish ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada, Ürdün propolisinin antibakteriyal etkisini *S.aureus* ve *E.coli* kullanarak araştırmışlardır. Yapılan MİK deneyi sonucunda *S.aureus* için MİK değeri 4,69 µg/mL, *E.coli* için MİK değeri 18,75 µg/mL olarak bulunmuştur [352].

Temiz ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada, Irak propolisinin antimikrobial etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada gıda kaynaklı patojen olarak *E.coli*, *S.typhi*, *L.monocytogenes*, *H.pylori*, *S.pyogenes*, *Paeruginosa*, *S.aureus*, *K.Pneumoniae* ve *Enterobacter aerogenes* bakterileri ve *C.albicans* mantarı kullanılmıştır. Yapılan MİK deneyi sonucunda, %10, %20 ve %30 konsantrasyonlarda, *S.aureus* için MİK değerleri sırası ile 1280 ≥ µg/mL, 1280 ≥ µg/mL ve ≥640 µg/mL, *S.pyogenes* için MİK değerleri sırası ile 1280 ≥ µg/mL, 1280 ≥ µg/mL ve ≥640 µg/mL, *E.coli* için MİK değerleri 2560 ≥ µg/mL, 2560 ≥ µg/mL, 1280 ≥ µg/mL, *Paeruginosa* için MİK değerleri sırası ile 2560 ≥ µg/mL, 2560 ≥ µg/mL, 2560 ≥ µg/mL, *L.monocytogenes* için MİK değerleri sırası ile 2560 ≥ µg/mL, 2560 ≥ µg/mL, 1280 ≥ µg/mL, *H.pylori* için MİK değerleri sırası ile 5120 ≥ µg/mL, 5120 ≥ µg/mL, 2560 ≥ µg/mL, *S.typhi* için MİK değerleri sırası ile 2560 ≥ µg/mL, 2560 ≥ µg/mL, 2560 ≥ µg/mL, *E.aerogenes* için MİK değerleri sırası ile 5120 ≥ µg/mL, 5120 ≥ µg/mL, 2560 ≥ µg/mL, *K.Pneumoniae* için MİK değerleri

sırası ile $2560 \geq \mu\text{g/mL}$, $2560 \geq \mu\text{g/mL}$, $2560 \geq \mu\text{g/mL}$ ve son olarak *C.albicans* için MİK değerleri sırası ile $5120 \geq \mu\text{g/mL}$, $5120 \geq \mu\text{g/mL}$, $2560 \geq \mu\text{g/mL}$ bulunmuştur [353].

Zeighampour ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, propolisin etanollü ekstraktının yanık yaralarından izole edilen antibiyotiğe dirençli bakteri suşları üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada yapılan MİK deneyinde, yaralardan izole edilen *S.aureus* ve *Paeruginosa* bakterilerine ek olarak *S.aureus* ve *Paeruginosa* standart suşları kullanılmıştır. Yapılan MİK deneyi sonucunda, *S.aureus* izolatının MİK değeri ve *S.aureus* bakterisinin standart suşunun MİK değeri $11,7 \mu\text{g/mL}$, *Paeruginosa* izolat ve standart suşunun MİK değeri $750 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur [354].

Suleman ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, Güney Afrika propolisinin antimikrobiyal aktivitesini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada *S.aureus*, *E.coli*, *Paeruginosa*, *E.faecalis* bakterileri ve *C.albicans*, *Cryptococcus neoformans* fungusları kullanılmıştır. Yapılan MİK deneyi sonucunda, *S.aureus* için MİK değerinin 6 ile $1563 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği, *E.faecalis* için MİK değerinin 49 ile $1563 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği, *E.coli* için MİK değerinin 391 ile $1563 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği, *Paeruginosa* için MİK değerinin 195 ile $781 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği, *C.albicans* için MİK değerinin 98 ile $3125 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği, *C.neoformans* için 24 ile $391 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği belirlenmiştir [355].

Ristivojevic ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada, Sırbistan propolisinin antimikrobiyal aktivitesini araştırmayı amaçlamışlardır. Yapılan MİK deneyinde *Aeromonas hydrophila*, *S. flexneri*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B.subtilis* ve *E. faecalis* bakterileri kullanılmıştır. Deney sonucunda, *A.hydrophila* için MİK değerinin 0,3 ile $16,8 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği, *S. flexneri* için MİK değerinin 1 ile $15 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği, *L. monocytogenes* için MİK değerinin 0,1 ile $10,6 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği, *S. aureus* için MİK değerinin 0,3 ile $16,1 \mu\text{g/mL}$, *B.subtilis* için MİK değerinin 0,3 ile $14,9 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği, *E. faecalis* için 0,3 ile $16,8 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği bildirilmiştir [356].

Regueira Neto ve ark. 2017 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, Brezilya kırmızı propolisinin antibakteriyal aktivitesinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Çalışmada yapılan MİK deneyinde *Paeruginosa*, *S. aureus* ve *E.coli* suşları kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, *E.coli* için MİK değeri $161,3 \mu\text{g/mL}$, *Paeruginosa* için MİK değeri $512 \mu\text{g/mL}$, *S. aureus* için MİK değeri $512 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur [357].

2018 yılında yapılan bir çalışmada, Taiwan yeşil propolisinin, *B.subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* (BCRC 10780,10781 ve 10451), *Paenibacillus larvae*, *E.coli* ve

Paeruginosa bakterileri kullanılarak antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Yapılan BİK testi sonucunda, *B.subtilis* için MİK değeri 10 µg/mL, *L. monocytogenes* için MİK değeri 40 µg/mL, *S. aureus* BCRC 10780,10781 ve 10451 suşları için MİK değerleri sırası ile 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, *Plarvae* için 5 µg/mL, *E coli* için >640 µg/mL ve *Paeruginosa* için >640 µg/mL olarak bulunmuştur [358].

Propolis çok farklı içeriğe sahip ve bu içeriğinin coğrafik bölgelere bağlı olarak değişebileceği bir maddedir. Bu nedenle literatürde farklı coğrafyalara ait propolislerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda propolisin MİK değerlerini coğrafik koşullara göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca MİK deneyinde kullanılan bakteri ve maya suşlarına bağlı olarak MİK değerlerinin birbirinden farklı olduğu yukarıda bahsedilen çalışmalarda görülmüştür. Çalışmamızda propolisin 0,125 mg/mL ve daha üst konsantrasyonlarında bakterilerin ve mayanın büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonucu literatür ile kıyasladığımızda, bazı çalışmalarda daha düşük konsantrasyonlarda MİK değerleri olduğu, bazı çalışmalarda ise daha yüksek konsantrasyonlarda MİK değerleri olduğu görülmüştür. Propolis için çalışmamızda elde ettiğimiz MİK değerleri literatürde bulunan ve yukarıda bahsedilen birkaç çalışma ile paralellik göstermektedir. Buna ek olarak birkaç çalışmada MİK değerinin 1 mg/mL çok üstünde olduğu görülmüştür. MİK değerlerindeki bu değişkenliklerin nedeni farklı bölgelerden ve farklı bitki örtüsüne sahip alanlardan toplanan propolisin kullanılmasında kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmalarda kullanılan standart suşların farklılıkları da MİK değerlerinin değişmesine neden olabileceği görülmüştür. Propolisin içerisinde birçok madde bulunması ve bu maddelerin miktarlarının farklı olması ekstraksiyon sırasında kullanılan çözücülerinde önemini arttırmaktadır. Literatürde bulunan çalışmalarda çözücüye bağlı olarak MİK değerinin değişebileceği bildirilmiştir.

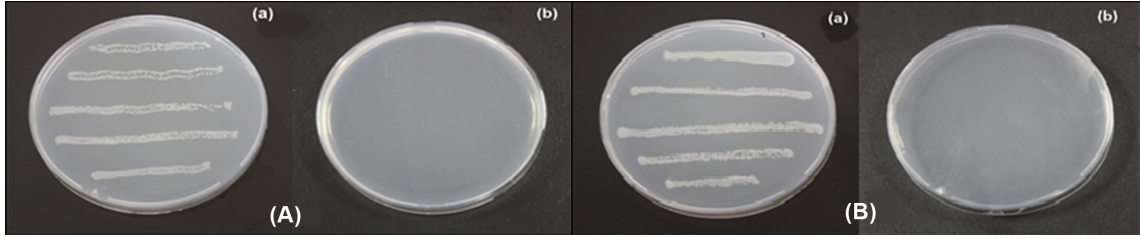
4.4 Ames Deneyi Sonuçları

Ames deneyinde kullanılan *S. Typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının genetik özelliklerinin kontrolleri her deney öncesi yapıldı. Yapılan kontroller sonrasında hem TA98 suşunun hem de TA100 suşunun mutajenite çalışmalarında kullanıma uygun olduğu görüldü.

4.4.1 Histidin Gereksinimi Kontrolü Sonuçları

Histidin gereksiniminin belirlenmesi için TA98 ve TA100 suşlarının ekimi HB ve MGA plaklarına yapıldı. Her iki suшта HB plaklarından ürerken, içerisinde histidin bulunmayan MGA plaklarında üremedi. Bu durum suşların his- mutasyonuna sahip

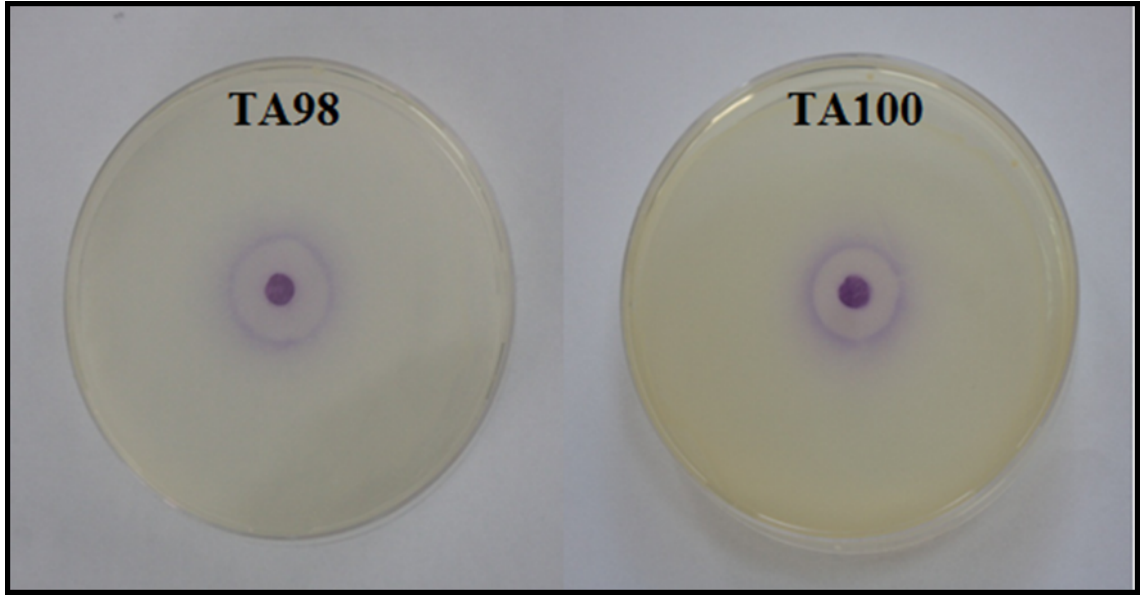
olduğunu gösterdi(Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Histidin gereksinimi kontrol sonucu. (a)HB, (b)MGA besiyerlerinde (A)TA98 ve (B) TA100 suşlarının üreme durumu

4.4.2 *rfa* Mutasyonu Kontrol Sonuçları

TA98 ve TA100 suşlarının *rfa* mutasyonuna sahip olup olmadığının belirlenmesinde kristal viyole hassasiyet testi kullanıldı. Yapılan testin sonucunda kristal viyole uygulaması yapılan disklerin etrafında 14 mm'lik şeffaf şekle zonların oluştuğu görüldü. Oluşan zonlar, TA98 ve TA100 suşlarının *rfa* mutasyonuna sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.7).



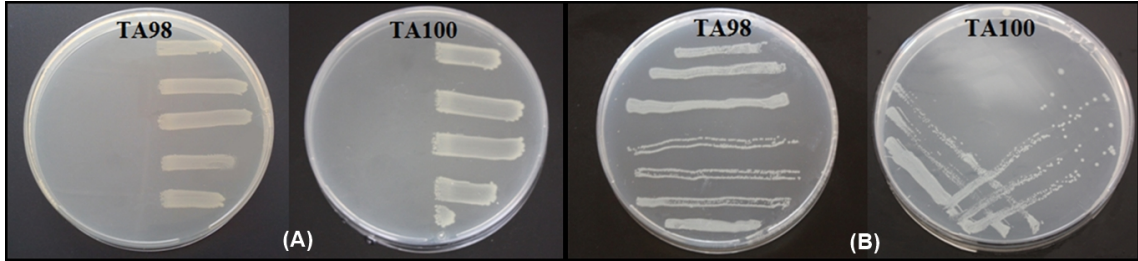
Şekil 4.7 TA98 ve TA100 suşlarının *rfa* mutasyonu kontrol sonuçları

4.4.3 *uvrB* Mutasyonu Kontrol Sonuçları

uvrB mutasyonunun kontrolü için TA98 ve TA100 suşları NB plaklarına ekildi. Daha sonra plakın yarısı ışık geçirmeyen bir plaka kapatıldıktan sonra diğer yarısı UV ışığına maruz bırakıldı. Işık geçirmeyen plaka ile kapatılan bölgede her iki suşunda ürediği görüldü. Bu üreme hem TA98 hem de TA100 suşlarının *uvrB* mutasyonuna sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.8A).

4.4.4 R Faktörü Kontrol Deneyi

TA98 ve TA100 suşlarının pKM101 plazmidlerine (ampisilen direç geni taşıyan plazmid) sahip olup olmadığının kontrolü için suşlar HBA plaklarına ekildi. İnkübasyon sonucu suşların plaklara ürettiği gözlemlendi. Böylece TA98 ve TA100 suşlarının pKM101 plazmidlerine sahip oldukları doğrulandı(Şekil 4.8B).



Şekil 4.8 (A)TA98 ve TA100 suşlarının *uvrB* mutasyonu kontrol sonuçları, (B)TA98 ve TA100 suşlarının R faktörü kontrol sonuçları

4.4.5 Ekstraktların Ames Deneyi Sonuçları

Safran, kantaron ve propolise ait 10 mg, 5 mg, 2,5 mg ve 1,25 mg dozlarının genotoksikolojik potansiyelleri AMES testi *Salmonella typhimurium* TA100 ve TA98 suşu kullanılarak belirlenmiştir. Mutajen ve genotoksik olarak adlandırılan dozlar negatif kontrolün sahip olduğu koloni sayısının 2 katına yakın şeklinde baz alınarak değerlendirilmiştir. Kantaron sulu ekstraktının ,TA98 suşlarındaki mutajenik potansiyeline baktığımızda kullanılan 1.25 mg ve 2.5 mg dozlarında negatif kontrol baz alınarak değerlendirildiğinde negatif kontrolün 2 katının altında olduğu belirlenmiştir. 5 mg ve 10 mg dozlarında ise negatif kontrolün 2 katına yakın olduğu görülmüştür. Bu sonuca göre kantaron sulu ekstraktının TA98 suşunda 1,25 ve 2,5 mg dozlarının genotoksik olmadığı, 5 mg ve 10 mg dozlarının toksik özellik gösterdiği bulunmuştur.Kantaron sulu ekstraktının TA100 suşu üzerindeki genotoksik potansiyeline baktığımızda 1.25 mg ve 2.5 mg dozlarının genotoksik olmadığı, 5 mg ve 10 mg dozlarının genotoksik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Safran sulu ekstraktında ise TA 98 suşu üzerinde 1,25 mg dozunun genotoksisite etkisi göstermediği, 2,5 mg, 5 mg ve 10 mg dozlarında genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. TA100 suşuna baktığımızda ise Safran sulu ekstraktının 1,25 mg dozunun bu suşta genotoksik etki göstermediği ancak 2,5 mg, 5 mg ve 10 mg genotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Propolis sulu ekstraktına bakıldığında TA98 suşunda 1,25 mg, 2,5 mg ve 5 mg dozlarının negatif kontrolün 2 katının altında olduğu, bu nedenle genotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Ancak TA100 suşunda 1,25 mg ve 2.5 mg suşlarının genotoksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. 5 mg ve 10 mg dozlarının ise negatif kontrolün 2 katından fazla olduğu dolayısıyla genotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 4.1).

Abdullaev ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, safranın antimutajenik ve mutajenik özelliklerini Ames/*Salmonella* testi kullanarak belirlemeyi amaçlamışlardır. Yapılan çalışmada *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98 suşu ve safranın etanollü ekstraktının 50-1500 g/mL dozları kullanılmıştır. Yapılan çalışmada safran etanollü ekstraktının mutajenik ve antimutajenik özelliği sahip olmadığı belirlenmiştir [359].

Tablo 4.2 Safran, kantaron ve *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkileri

Uygulama	Konsantrasyon (mg/plak)	His+ Revertant Koloni Sayısı/Plak	
		TA98	TA100
		Ort±SS	Ort±SS
Pozitif Kontrol	NPD	804±6,56	
	SA	994±12,1	
Kantaron	1,25	59,67±6,43	262,34±2,51
	2,5	81±10,54	285±17,08
	5	130,34±19,55	393,67±11,06
	10	145,34±10,79	456±24,25
Propolis	1,25	93±11,53	293,67±9,61
	2,5	132,67±5,03	381±11,06
	5	139,34±18,9	454,67±10,02
	10	155±8,88	474±8,72
Safran	1,25	120,34±3,06	309,34±14,05
	2,5	154,67±9,45	441±18,33
	5	160±19,16	448,67±25,77
	10	171±13,45	468±15,82
Negatif Kontrol		75±7,21	185,67±4,04
Spontan Kontrol		46,33±5,51	165,67±6,03

* NPD (4-nitro-o-fenilendiamin): TA98 suşu için, SA (sodyum azid):

TA100 suşu için pozitif kontrol amacıyla,

**Su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

***Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma

Hernández ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, safran bitkisinin sulu ve etanollü ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının mutajenik ve antimutajenik özelliklerini Ames/*Salmonella* testi kullanarak belirlemişlerdir. Testte *S. typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan ekstraktların dozları 50-1500 µg/mL arasında belirlenmiştir. Safranın Sulu ekstraktlarının ve etanollü ekstraktlarının herhangi bir mutajenik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir [360].

Riverón-Negrete 2004 yılında yaptıkları çalışmada, sodyum selenit ile kombine edilmiş safranın tümör hücreleri üzerindeki inhibitör etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada safranın 500-1500 g/mL dozları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda safran etanollü ekstraktının mutajenik özelliğe sahip olmadığı belirlenmiştir [361].

Literatürde safran ekstraktları ile yapılan çalışmalar ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile kıyasladığımızda, paralellikler göze çarpmaktadır. Çalışmamızda safran sulu ekstraktının TA98 suşunda ve TA100 suşunda 1,25 mg/mL'de genotoksik potansiye belirlenmemiştir. Yukarıda bahsedilen literatürlerde genellikle 50-1500 µg/mL arasında safran ekstraktlarının herhangi bir genotoksik potansiyel ve mutajeniteye sebep olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmalar ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları kıyasladığımızda, literatürdeki sonuçlar ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar paralellik göstermektedir. Buna ek olarak ekstraksiyonda kullanılan solventlerin mutajeniteye etki göstermediği de görülmektedir. Örneğin; Abdullaev ve ark. (2003) yılında yaptıkları çalışmada etanollü ve sulu safran ekstraktı kullanılmasına rağmen herhangi bir dozda genotoksik potansiyel ve mutajeniteye rastlanılmamıştır [359]. Ayrıca literatür çalışmalarında safranın genotoksik potansiyele sahip olmadığından bahsedilmektedir. Bir maddenin veya ekstraktın genotoksik olup olmadığı uygulanan doza bağlıdır. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bunu göstermektedir. 1.25 mg/mL üzerindeki dozlar safran ekstraktında genotoksik ve mutajenik etkiye sahiptir.

Tolan ve ark. 2009 yılında yaptıkları çalışmada, *Hypericum lysimachioides* bitkisine ait petroleum eterli, heksanlı, etil asetatlı ve metanollü ekstraktların mutajenitesini araştırmışlardır. Çalışmada Ames/*Salmonella* testi için *S.typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Çalışmada petroleum eterli ve etil asetatlı ekstraktlar 5 µg/plak- 60 µg/plak arasında, heksanlı ve metanollü ekstraktlar 0,1 µg/plak-50 µg/plak arasında dozlar kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, tüm ekstraktların mutajenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [362].

Bhatia ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, *H.perforatum* bitkisinin metanollü ve asetonlu ekstraktlarının antimutagenik ve mutajenik özelliklerini Ames/*Salmonella* testi kullanarak belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada Ames deneyi için *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Uygulama dozları $0,01 \times 10^3 \mu g / 0.1 \text{ mL /plak}$ - $2,5 \times 10^3 \mu g / 0.1 \text{ mL /plak}$ olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda her iki ekstraktında herhangi bir mutajenik etki göstermediği belirlenmiştir [363].

Uysal ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, Türkiye'de bulunan üç farklı *Hypericum* türünün (*H.pruinatum* Boiss.Bal., *H.olimpicum* L. ve *H. scabrum* L.) mutajenik ve anti-mutajenik özelliklerini Ames/*Salmonella* testi ile belirlemeyi amaçlamışlardır. Ames/*Salmonella* deneyinde TA98 ve TA100 suşları ve bitkilerin metanollü ekstraktları kullanılmıştır. Deneyde 1 µg/plak-1000 µg/plak arasında ekstrakt dozları kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, tüm ekstraktların mutajenik aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir [364].

Okmen ve Balpınar 2017 yılında yaptıkları çalışmada, *H.perforatum* bitkisinin biyolojik aktivitelerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada antimutajenite çalışması için Ames/*Salmonella* test sistemi ve bu testte TA98-100 suşları kullanılmıştır. Test suşlarına 1250 µg/plak ve 2500 µg/plak metanollü ekstrak uygulanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda *H.perforatum* bitkisinin metanollü ekstraktının antimutajenik etkiye sahip olduğu ancak mutajenik etki göstermediği belirlenmiştir [365].

Boran ve Ugur (2017) yaptıkları çalışmada, *Hypericum lydium* bitkisinin etanollü ekstraktının anti-mutajenik, mutajenik ve antioksidan özelliklerini araştırmayı amaçlamışlardır.Çalışmada yapılan Ames/*Salmonella* deneyinde TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. 2.0–0.002 µg/plak arasındaki dozların mutajenik etkileri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, *H.lydium* bitkisinin etanollü ekstraktının mutajenik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir [366].

Boran 2018 yılında yaptığı çalışmada, *Hypericum origanifolium* bitkisinin etanollü ekstraktının anti-kollajenaz, anti-elastaz ve anti-hiyalüronidaz etkilerini, antioksidan ve genotoksik / antigenotoksik aktiviteleriyle birlikte araştırmayı amaçlamıştır. Yapılan çalışmada *H.origanifolium* bitkisinin etanollü ekstraktının genotoksik ve antigenotoksik özelliklerinin belirlenmesinde Ames/*Salmonella* testi kullanılmıştır. Uygulama gruplarında kullanılan dozlar 0.1 µg/plak–1000 µg/plak arasındadır. Çalışma sonucunda *H. origanifolium* bitkisinin etanollü ekstraktının genotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir [367].

Ames/*Salmonella* test sistemi kullanılarak kantaron bitkisine ait ekstraktlarının genotoksitesini ve mutajenitesini araştıran birçok çalışma vardır. Bu çalışmalarda genel olarak farklı dozlar kullanılmasına rağmen herhangi bir mutajenikve genotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda ise kantaronun 1.25 mg/mL ve 2.5 mg/mL dozlarında genotoksik potansiyele ve mutajeniteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Literatürde, elde ettiğimiz sonuçlara paralel sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin; Boran ve Balpınar'ın 2017 yılında yaptığı çalışmada 1250 µg/plak ve 2500 µg/plak kantaron metanollü ekstraktın herhangi bir genotoksik potansiyel ve mutajeniteye sahip olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışma sonucu bizim çalışmamızda kantaron için elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Yukarıda bahsedilen diğer çalışmalara baktığımızda genellikle 2 mg/plak ve altı değerlerde kantaron ekstraktlarının genotoksik potansiyel ve mutajenik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Çalışmaları kantaron türleri bakımından kıyasladığımızda farklı türler kullanılmasında rağmen belirli dozlarda kantaron ekstraktlarının herhangi bir genotoksik potansiyel ve mutajenik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Ayrıca ekstraksiyonda kullanılan solventlerinde genotoksik ve mutajenik dozlar üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. Tıpkı safranda olduğu gibi genotoksik ve

mutajenik etki uygulanan doza bağlıdır. Çalışmamızda bu dozlar kantaron için 5 mg /mL ve 10 mg /mL olarak belirlenmiştir. Literatürde bu dozlarında uygulandığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü genellikle çalışmalarda kantaronun herhangi bir genotoksik ve mutajenik etkiye sahip olmadığı söylenmektedir.

Varanda ve ark.(1999) yaptıkları çalışmada, propolis ve bal arısı (*Apis mellifera*) zehirinin etanolik özütünün antimutajenik etkisini Ames/*Salmonella* test sistemi kullanarak araştırmışlardır. Ames/*Salmonella* deneyinde TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Propolis için uygulama dozları 0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 μ L/plak olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda deneyde kullanılan dozlarda herhangi bir mutajenik aktiviteye rastlanılmamıştır [368].

Moreno ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmada, Arjantin'nin Tucuman şehrinden alınan propolisin toksik, mutajenik, antimutajenik özelliklerini belirlemeyi amaçlamışlar. Propolisin mutajenik ve antimutajenik özelliklerinin belirlenmesi için Ames/*Salmonella* deneyi kullanılmıştır. 0.003-300 μ g/plak dozlarda propolis TA98 ve TA100 suşlarına uygulanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, propolisin mutajenik aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir [369].

Jang ve ark. 2009 yılında gerçekleştirdikleri araştırmada, Amerikan ve Kore propolisin antibakteriyal ve antimutajenik özelliklerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada antimutajenik ve mutajenik özellikleri belirlenmesi için Ames/*Salmonella* testinin TA98 suşu kullanılmıştır. Uygulama dozları 1 μ g/plak-200 μ g/plak arasındadır. Yapılan çalışma sonucunda Amerikan ve Kore propolisinin mutajenik aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir[370].

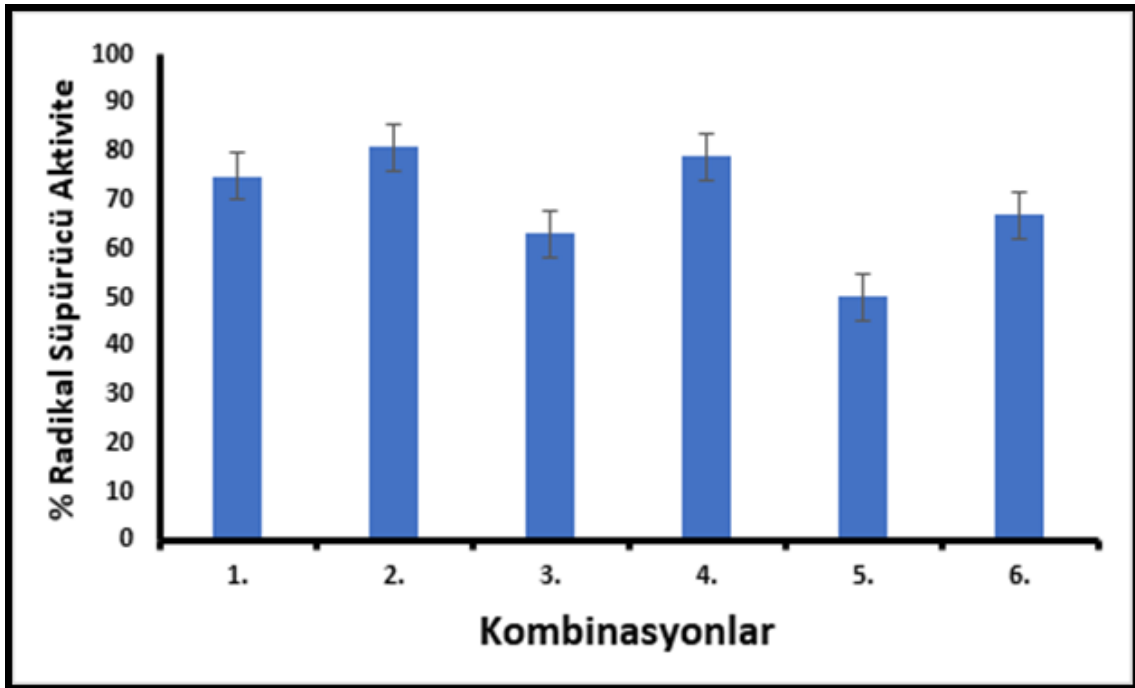
Bir diğer çalışmada, Bayram ve ark. 2015 yılında propolisin etanollü ekstraktının antimutajenik ve mutajenik özelliklerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada Ames/*Salmonella* test sistemine ait TA1535, 1537 suşları kullanılmıştır. Uygulama dozları 0,2 mg/plak-1 mg/plak olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda herhangi bir mutajenik aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir [371].

Propolisin genotoksit potansiyelinin ve mutajenitesinin Ames/*Salmonella* testi ile değerlendirildiği çalışmalara bakacak olursak, propolisin belirli dozlarda herhangi bir mutajenik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Ancak bu çalışmalar düşük dozlarda gerçekleşmiştir. En yüksek doz olarak Bayram ve ark. (2015) yılında yaptıkları çalışmada kullandıkları 1 mg /plak oranındaki dozdur. Çalışmamızda propolisin TA98 suşu için 1.25 mg/plak , 2.5 mg/plak ve 5 mg/plak dozlarında herhangi bir genotoksik potansiyel ve mutajeniteye sahip olmadığı, TA100 suşları için ise 1.25 mg/plak ve 2.5 mg/plak dozlarında genotoksik potansiyel ve mutajeniteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu farklılıkların nedeni, propolis içeriğinin bölgeden ve bu bölgede

bulunan çiçekli bitki türlerindeki farklılıklar olarak gösterilebilir. Bitki florasının farklılıkları propolis içerisinde bulunan fenolik bileşiklerin oranlarının değişmesine neden olmaktadır. Bu da propolisin genotoksik potansiyelini ve mutajenik etkisinin değişmesine neden olmaktadır.

4.5 Ekstrakt Kombinasyonlarının Antioksidan Potansiyellerinin Belirlenmesi

Ekstraklardan oluşturulan 6 kombinasyonun antioksidan ppotansiyelleri DPPH deneyi ile belirlenmiştir. Yapılan Deney sonucunda 1. Kombinasyonun radikal süpürücü aktivitesi % 75 olarak, 2. Kombinasyonun radikal süpürücü aktivitesi %81 olarak, 3. Kombinasyonun radikal süpütücü aktivitesi %63, 4. Kombinasyonun radikal süpürücüsü %79, 5. Kombinasyonun radikal süpürücü aktivitesi %50, 6. Kombinasyonun radikal süpürücü aktivitesi %67 olarak bulunmuştur. 3. 5. ve 6. Kombinasyonların ekstrak oranları diğer kombinasyonlara göre fazla olmasına rağmen % radikal süpürücü aktiviteleri %70'in altında bulunmutur (Şekil 4.9). Yapılan deney sonucunda 2. Kombinasyondaki ekstrak oranları enkapsülasyon ve nanofiber oluşumunda kullanılmıştır (Şekil 4.9).



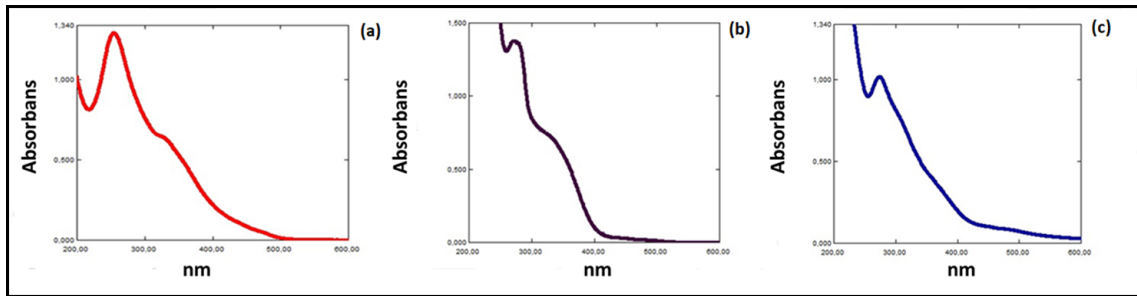
Şekil 4.9 Kombinasyonların % radikal süpürücü aktivite sonuçları

Son yıllarda, bitkisel ve bitki türevi ilaçların kullanımı revaçta olmasına rağmen, bitkilerin içeriğinde bulunan maddelerinin hangilerinin neye yaradığını belirlemek oldukça zordur. Farmakognozi alanında çalışan araştırmacılar, iyileştici özellik olarak bitkisel içerikli maddelerin saf aktif maddelerden daha yararlı olduğunu öne

sürmektedirler. Hatta birden fazla bitki içeriğini karıştırıp etkilerini arttırmaya çalışmaktadırlar. Ancak her zaman bir bir daha iki etmemektedir. Kullanılan bitkisel içerikli maddelerin birbirlerini maskeleye özelliği de bulunmaktadır. Bu olaya antagonistik etki denilmektedir [372]. Örneğin Wang ve ark., yaptıkları çalışmada antioksidan özellikleri bilinen ahududu, adzuki fasulyesi, brokoli ve soya fasulyesinin kombinasyonlarının antioksidan bakımından antagonistik ve sinerjistik etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda ahududu ve adzuki fasulyesinin olduğu kombinasyon sinerjistik etkiye, brokoli ve soya fasulyesinin oluşturduğu kombinasyon ise antagonistik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [373]. Bir diğer çalışmada, Nedamani ve ark, biberiye ve meşe palamutunun metanollü ekstraktlarının bireysel ve kombinasyonlarının antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, belirli dozlarda biberiye ve meşe palamutu ekstrakt karışımlarının antagonistik etkiye, belirli dozlarda karıştırılanların sinerjistik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [374]. Literatürde yapılan bu çalışmalar ile çalışmamızdaki elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırsak, Tablo 3.29’da verilen kombinasyonların Şekil 4.9’te görüldüğü gibi belirli dozlarda karıştırılanların antagonistik özelliğe sahip olduğu görülmüştür.

4.6 Safran, Kantaron ve Propolis Ekstraktlarının Spekturum Sonuçları

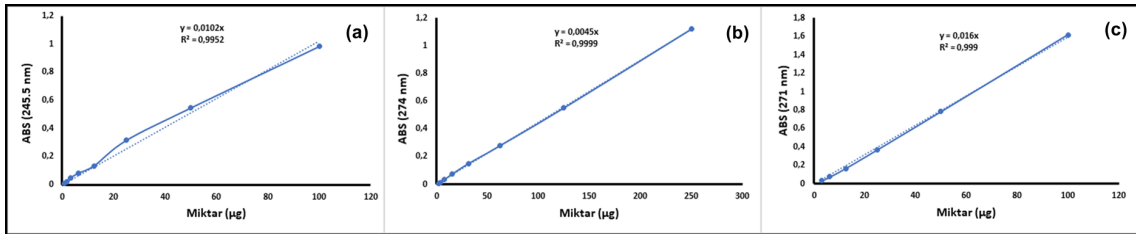
Uv-vis spektroskopisi kullanılarak alınan spektrum sonucunda safran sulu ekstraktının dalga boyu 254.5 (Şekil 4.10a), kantaron sulu ekstraktının dalga boyu 274 nm (Şekil 4.10b), propolis sulu ekstraktının dalga boyu 271 nm (Şekil 4.10c) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10 (a)Safran, (b)kantaron ve (c)propolis sulu ekstraktlarına ait UV-vis spektrumları

4.7 Safran, Kantaron ve Propolis Ekstraktlarının Kalibrasyon Eğrileri

Salınım profillerinin belirlenmesi için tüm ekstraktlara ait kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Bu eğrilerden elde edilen $y=mx$ şeklindeki denklemler kullanılarak kontrollü salınım profilleri çıkarılacaktır. Safranın kalibrasyon eğrisinin çıkarılması sonucunda $y=0,0102x$ denklemi elde edilmiştir. Bu denklemin doğruluğunu belirleyen R^2 değeri ise 0,9952 olarak bulunmuştur (Şekil 4.11a). Kantaron sulu ekstraktının kalibrasyon eğrisine bakıldığında, $y=mx$ şeklindeki denklem $y= 0,0045x$ şeklinde bulunmuştur. R^2 değeri ise 0,9999 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11b). Propolis sulu ekstraktının kalibrasyon eğrisinin oluşturulması sonucunda $y=0,016x$ denklemi elde edilmiştir. Bu denklemin R^2 değeri ise 0,999 olarak bulunmuştur (Şekil 4.11c).

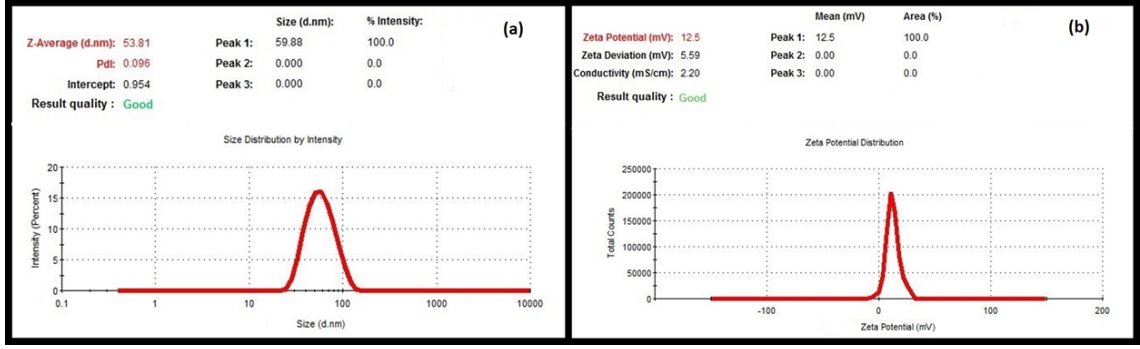


Şekil 4.11 (a)Safran, (b)kantaron ve (c)propolis sulu ekstraktlarına ait kalibrasyon eğrileri

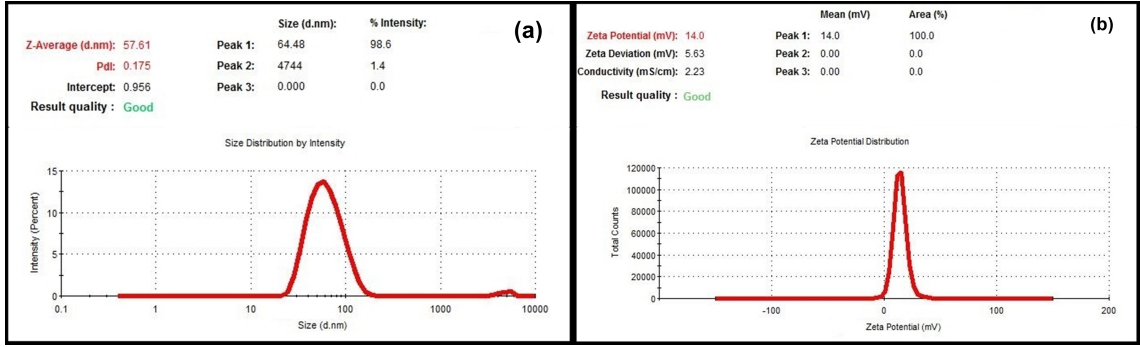
4.8 Boş, Kantaron ve Safran Yüklü Nanopartiküllerin DLS Analiz Sonuçları

Boş, Kantaron ve Safran yüklü nanopartiküllerin DLS analizleri Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan DLS analizleri sonucunda, boş nanopartiküllerin boyutu 53.81 ± 0.805 nm (Şekil 4.12a), safran yüklü kitosan nanopartiküllerinin boyutu 57.61 ± 1.234 nm (Şekil 4.13a), kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerinin boyutu ise 64.49 ± 0.423 nm (Şekil 4.14a) olarak bulunmuştur. Partiküllerin PdI değerleri boş, safran yüklü ve kantaron yüklü olmak üzere sırasıyla 0.096 ± 0.016 (Şekil 4.12a), 0.175 ± 0.008 (Şekil 4.13a), 0.185 ± 0.010 (Şekil 4.14a) olarak bulunmuştur. ζ potansiyelleri ise boş nanopartiküllerde 12.5 ± 0.265 mV (Şekil 4.12b), safran yüklü nanopartiküllerde 14.0 ± 0.755 mV (Şekil 4.13b) ve kantaron yüklü nanopartiküllerde 15.1 ± 0.436 mV (Şekil 4.14b) olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda kitosan nanopartikülleri içerisine enkapsüle ettiğimiz kantaron ve safran sulu ekstraktları hakkında literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Buna rağmen çeşitli bitki ekstraktlarının kitosan ile enkapsüle edilip, yara iyileşmesi dahil birçok alanda tedavi edici özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Kitosan nanopartiküllerinin sentezlenmesinde farklı yöntem bulunmasına rağmen

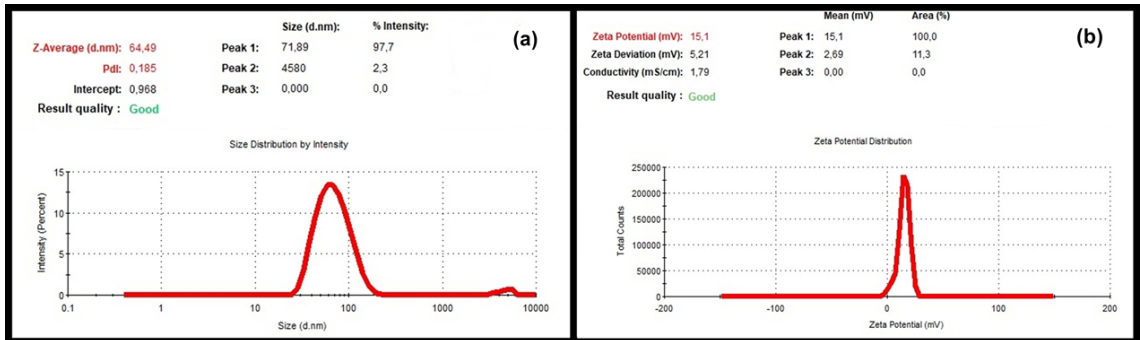


Şekil 4.12 Boş kitosan nanopartiküllerin a) Boyut ve PdI değerleri b) ζ potansiyelleri



Şekil 4.13 Safran yüklü nanopartiküllerin a) Boyut ve PdI değerleri b) ζ potansiyelleri

en çok bilinen yöntem iyonik jelasyon yöntemidir. Bu yöntem kısaca TPP gibi çapraz bağlayıcı kullanılarak kitosan moleküllerini birbirine bağlanmasına dayanmaktadır[375, 376]. Çalışmamızda yapılan kitosan nanopartikülleri sentezinde iyonik jelasyon yöntemi kullanılmıştır. İdeal bir nanopartikül için senztezlenen nanopartikülün boyutu 1-100 nm arasında, 0,1 PdI değerine sahip ve ζ potansiyelinin +30 ve -30 mV arasında olmalıdır [377]. Çalışmamız sonucunda, safran ve kantaron sulu ekstraktlarının yüklendiği kitosan nanopartiküllerinin boyut, PdI ve ζ potansiyel sonuçlar sırası ile, 57.61 ± 1.234 nm, 0.175 ± 0.008 , 14.0 ± 0.755 mV, 64.49 ± 0.423 nm, 0.185 ± 0.010 15.1 ± 0.436 mV şeklinde bulunmuştur. Literatüre bakıldığında bizim



Şekil 4.14 Kantaron yüklü nanopartiküllerin a) Boyut ve PdI değerleri b) ζ potansiyelleri

çalışmamıza paralel ve farklı DLS analiz sonuçlarına sahip çalışmalar vardır. Örneğin Manne ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada *Pterocarpus marsupium* ekstraktını kitosan ile enkapsüle ettikten sonra biyolojik etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada sentezlenen ekstrakt yüklü nanopartiküllerin ortalama boyutu 676 ± 2.76 nm, ζ potansiyeli ise 57,3 mV olarak bulunmuştur [378]. Diğer bir çalışmada Eğil ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada *Epilobium parviflorum* bitkisinin ekstraktının kitosan partikülleri ile enkapsüle edilmesini ve elde edilen partiküllerin biyolojik aktivitelerini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda ekstrakt yüklü nanopartiküllerinin ortalama boyutu 64.47 nm, PdI değeri 0.168, ζ potansiyeli 15.2 mV olarak bulunmuştur [379]. Nanopartiküllerin boyutlarının farklı olmasının en büyük nedenlerinden biri de partiküle yüklenmek istenen madde miktarıdır [380, 381]. Çalışmamızda kitosan nanopartiküllerine 1.25 mg safran sulu ekstraktı ve 2.5 mg kantaron sulu ekstraktı yüklenmiştir. Safran yüklü nanopartiküllerin ortalama boyutu 57.61 ± 1.234 nm iken, kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerin ortalama boyutu 64.49 ± 0.423 nm'dir. Literatürde yüklenmek istenen miktarındaki artışın boyuta etkisinde araştırıldığı bir çalışmada, %5 oranında rosmarinik asit yüklenen nanopartikülün boyutu 230.0 ± 48.8 nm iken %50 oranında rosmarinik asit yüklenen nanopartikülün boyutu 1218.0 ± 136.2 nm olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kitosan nanopartikülleri sentezinde %20'lik kitosan çözeltisinden ve %50 lik TPP çözeltisinden 3:1 oranında kullanılmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda kitosan ve TPP oranının ortalama da boyutlarda değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir. Kitosan nanopartiküllerinin optimizasyon için yapılan bir çalışmada TPP oranı arttırıldığında boyutunun düştüğü bulunmuştur. Yine aynı çalışmada kitosan oranının arttırılması sonucunda ortalama boyutta artış görülmüştür. PdI değerinin ise ortalama boyuta bağlı olarak arttığını gösteren araştırmalar vardır [382]. Çalışmamızda safran sulu ekstraktı yüklü nanopartiküllerin ve kantaron yüklü nanopartiküllerin ζ potansiyelleri sırası ile 14.0 ± 0.755 mV ve 15.1 ± 0.436 mV olarak bulunmuştur. Yapılan analiz sonucunda nanopartikül boyutunun düştüğü durumlarda ζ potansiyelinin de buna bağlı olarak düştüğü görülmüştür. Literatürde yapılan bir çalışmada, zeta potansiyelin boyuta bağlı olarak düştüğü sonucuna varılmıştır. Çalışmada ayrıca TPP oranının arttırılmasının zeta potansiyelini düştüğü ve buna bağlı olarak da boyutun düştüğü belirlenmiştir. Literatürde görülen bu faktörler ve değişimler çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermiştir [383].

4.9 Safran ve Kantaron Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesi

Safran yüklü kitosan nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi %71.76 olarak bulunmuştur. Kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi ise

%71.92 olarak bulunmuştur. Safran yüklü kitosan nanopartiküllerinin 1 mg'da 23.74 µg, kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerinin 1 mg ise 35.15 µg olarak belirlenmiştir.

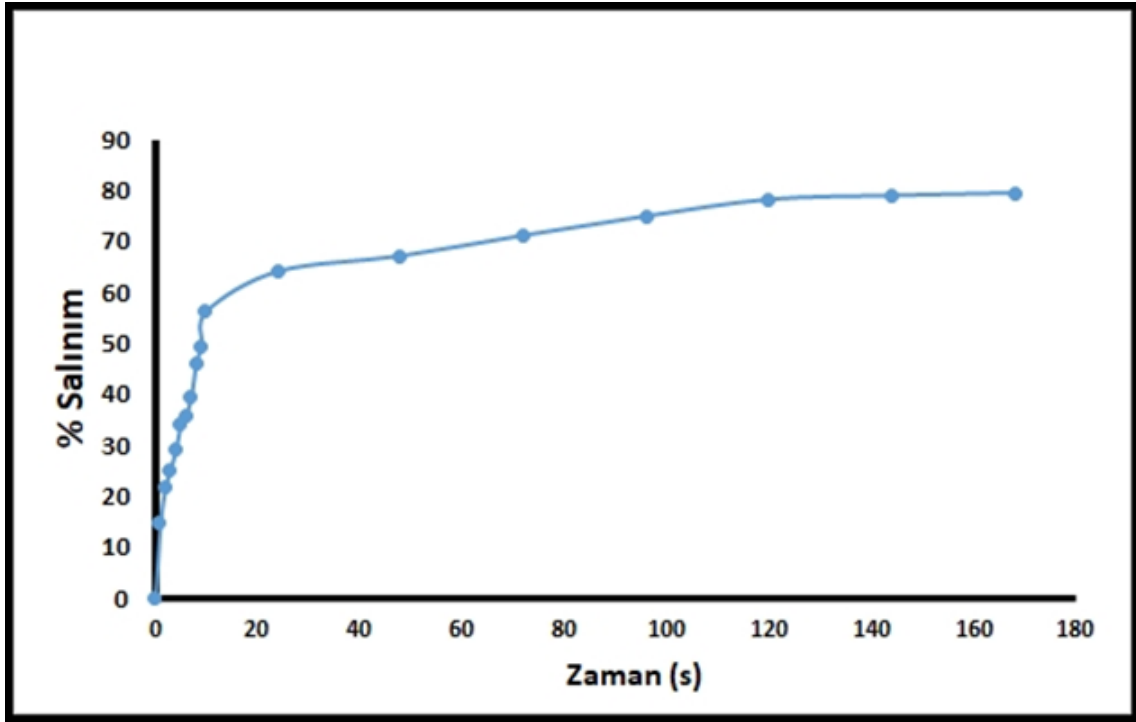
Nanopartiküllerin içerisine yüklenen miktarın, yüklenmek istenen miktara oranına enkapsülasyon verimi denmektedir. Nanopartiküllerin yükleme kapasitesini belirlemek için enkapsülasyon veriminin hesaplanması gerekmektedir. Yükleme kapasitesi ise birim nanopartikül miktarına yüklenen madde miktarı olarak tanımlanabilir. Çalışmamızda kullanılan ekstraktların kitosan nanopartiküller ile enkapsüle edilmesi sonucu enkapsülasyon veriminin ve yükleme kapasitesinin hesaplandığı çalışmalar bulunmamaktadır. Ancak çeşitli bitkilerin ekstraktlarının kitosan ile enkapsüle edildiği, enkapsülasyon veriminin ve yükleme kapasitesinin hesaplandığı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Stoica ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada kuşburnu bitkisinin ekstraktını kitosan nanopartikülleri ile enkapsüle etmeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda enkapsülasyon verimi %46 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca küçük nanopartiküllerin daha yüksek enkapsülasyon verimine sahip olduğu bulunmuştur [382]. Yapılan bir başka çalışmada, yakı otu ekstraktının kitosan ile enkapsülasyon işlemi yapılmış ve enkapsülasyon veriminin %92,46, yükleme veriminin ise %8 olarak bulunmuştur [379]. Li ve ark 2019 yılında kurkumini kitosan ile enkapsüle etmişlerdir. Çalışmada enkapsüle verimi %77,2 yükleme kapasitesi ise %35,1 olarak bulunmuştur [384].

Enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesini etkileyen birçok faktör vardır. Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi enkapsülasyon verimi, yükleme kapasitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Enkapsülasyon verimi ne kadar yüksek olursa yükleme kapasitesi o kadar düşük olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Diğer bir faktör ise yüklenmek istenen madde miktarıdır. Yüklenmek istenen madde miktarı ne kadar yüksek olursa enkapsülasyon verimi o kadar yüksek olurken yükleme kapasitesi ise buna bağlı olarak düşmektedir [383]. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatürde bulunan bilgiler ve sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

4.10 Safran Yüklü ve Kantaron Yüklü Nanopartiküllerin Salım Kinetiklerinin Sonuçları

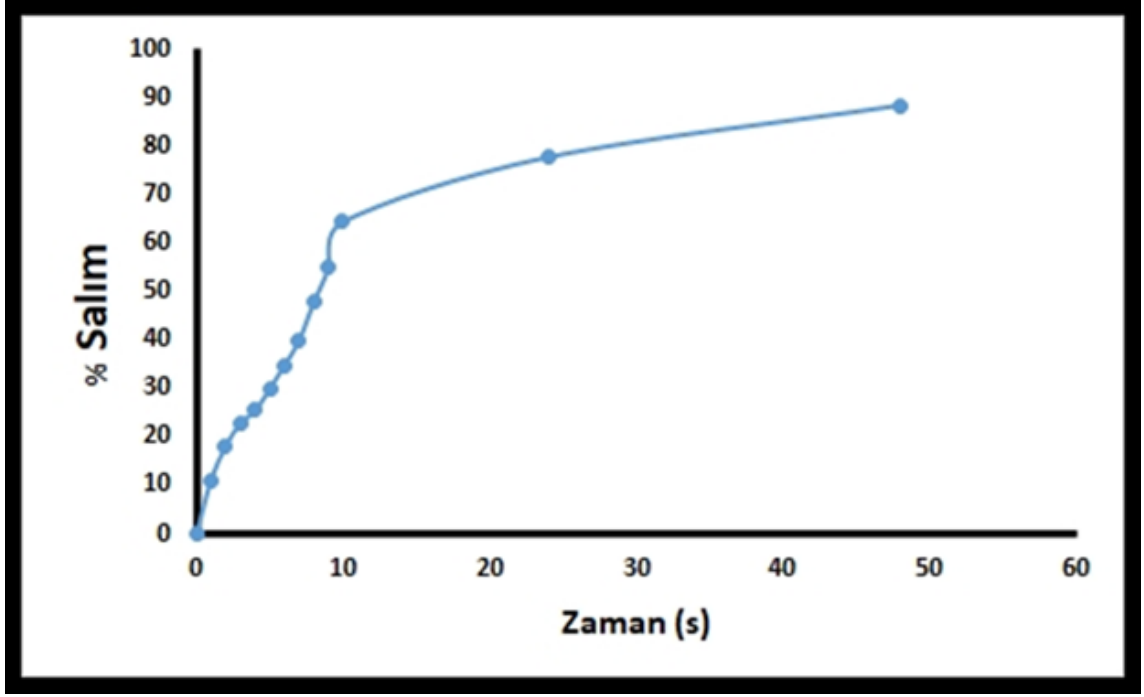
In vitro salım grafiği, zamana göre kümülatif salım miktarı kullanılarak çizilmiştir. *In vitro* salım test sonuçlarına göre, ilk 24 saatte safran yüklü kitosan nanopartiküllerinin pH: 7.4'te %64.14 salındığı belirlenmiştir. İkinci 24 saatte, kapsüllenmiş maddenin %67.17 oranında serbest bırakıldığı bulunmuştur. Safran yüklü kitosan nanopartiküllerinin %79.54, 168 saat serbest bırakıldığı ve deney sonlandırılmıştır (Şekil 4.15). Kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerinin pH:7.4'te ilk 24 saatte

%77.77 salınım yaptığı, 48 saat sonunda ise %88.44 madde salındığı bulunmuştur. Kantaron yüklü nanopartiküllerin %88.44, 48 saat sonunda salındığı belirlenmiş ve deney sonlandırılmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.15 Safran Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Salınım Grafiği

Kontrollü salım formülasyonlarının çoğunda, salım ortamına yerleştirildikten hemen sonra, salım hızı stabil bir profile ulaşmadan önce büyük bir ilaç bolusu salınır. Bu fenomene "patlama salımı" denir. Bu durum daha yüksek ilk ilaç dağıtımına yol açar ve ayrıca formülasyonun etkin kullanım ömrünü azaltır [385]. Kitosan nanopartikülleri ile yapılan formülasyonlarda patlama salımı özelliğine sahiptir [386]. Yapılan çalışmalarda ilk 24 saatte kitosan nanopartiküllerinin yüklenen ilaç miktarının tamamını veya en az %50 sini salım ortamına verdiği belirlenmiştir. Bu çalışmalara örnek verecek olursak, kurkumin yüklü nanopartiküllerin servikal kanserde kullanılmasını araştıran bir çalışmada, kitosan nanopartiküllerinin yüklenen kurkumin miktarının %80'ini 3 saatte saldırdığı belirlenmiştir [387]. Diğer bir çalışmada, yakı otu yüklü kitosan nanopartiküllerinin, ilk 24 saatte kitosan nanopartiküllerinin yakı otu ekstraktının %67,55 saldırdığı belirlenmiştir [379]. Manne ve ark. 2020 yılında yaptıkları salım testinde kitosan nanopartiküllerinin yüklenen ekstraktın %80 ilk 13 saatte saldırdığı görülmüştür [378]. Çalışmamızdan elde edilen salım verilerine göre safran ve kantaron sulu ekstraktları yüklü kitosan nanopartiküllerinde de patlama salımının varlığı görülmüştür. Salım sonuçlarımız literatürde yapılan benzer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

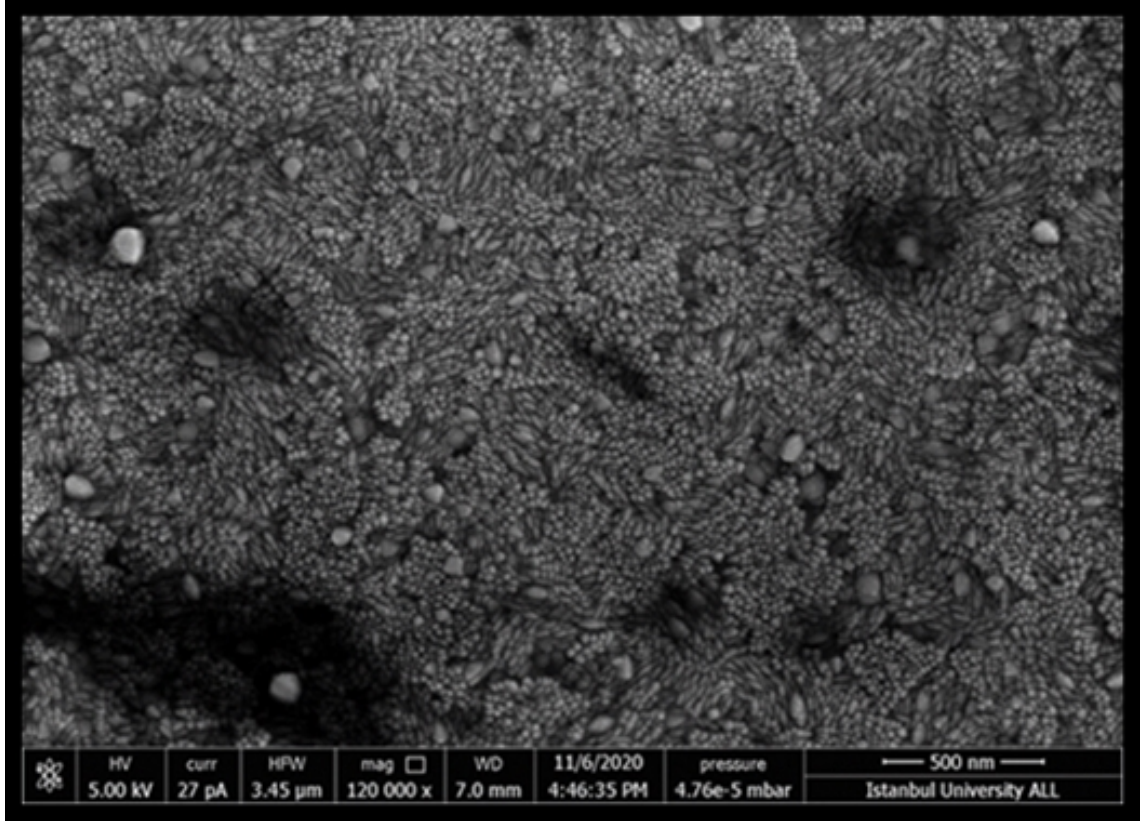


Şekil 4.16 Kantaron Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Salınım Grafiği

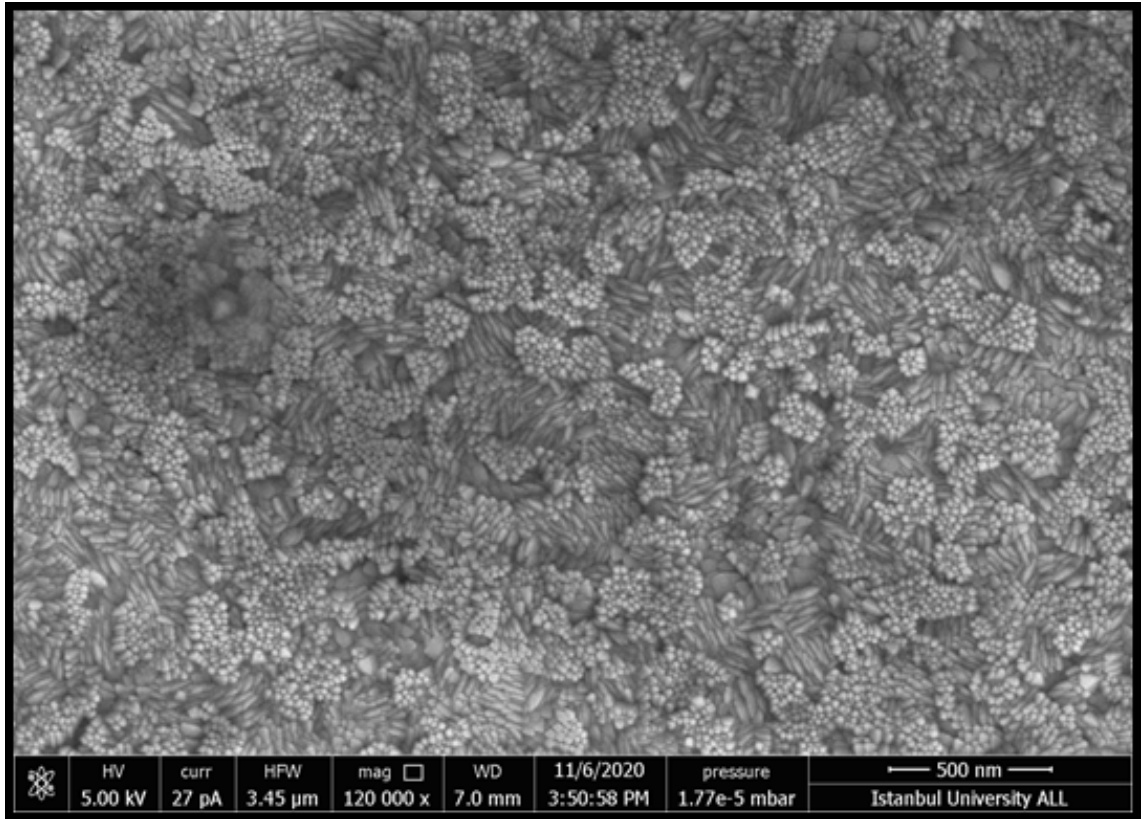
4.11 Kitosan Nanopartiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analiz Sonuçları

Boş nanopartiküllerin, Safran yüklü nanopartiküllerin ve kantaron yüklü nanopartiküllerin morfolojik analizleri bir taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. SEM görüntülerine göre boş NP'lerin ortalama boyutunun yaklaşık 53 nm olduğu bulundu (Şekil 4.17). Safran yüklü kitosan nanopartiküllerinin ortalama boyutuna bakıldığında, yaklaşık 57 nm olduğu belirlendi (Şekil 4.18). Kantaron yüklü nanopartiküllerin ortalama boyutuna bakıldığında ise 64 nm olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19). Hem SSAE yüklü Cht-NP hem de boş nanopartiküllerin homojen olarak dağıldığı, toplanmaya rastlanmadığı ve tüm nanopartiküllerin tek biçimli ve küresel olduğu gözlemlendi.

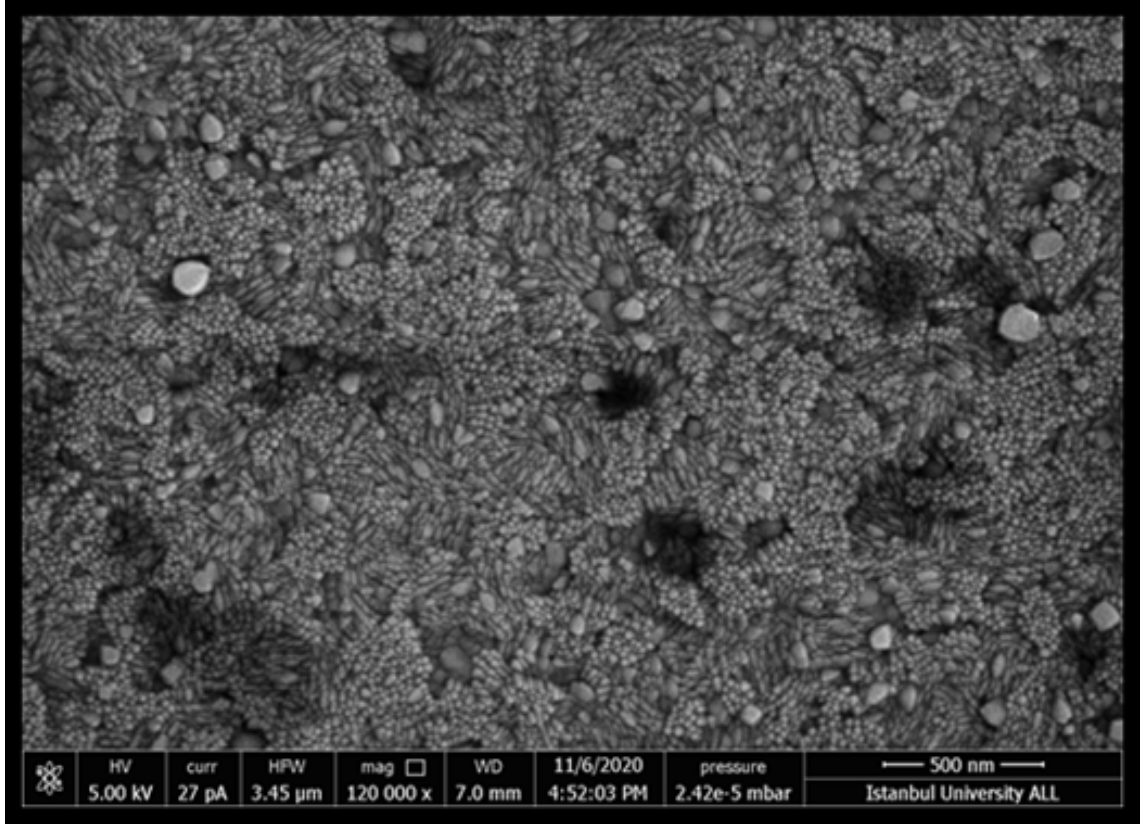
Kitosan nanopartiküllerinin morfolojik karakterlerinin belirlenmesi için genellikle SEM ve TEM kullanılmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda kitosan nanopartiküllerin genel olarak yuvarlak ve uniform olduğu görülmektedir. Örneğin; Egil ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada *Epilobium parviflorum* bitkisinin kitosan ile enkapsüle etmişlerdir ve yapılan SEM analizinde partiküllerin genellikle yuvarlak ve uniform olduğu görülmüştür. Diğer bir çalışmada *Satureja hortensis* bitkisinin esansiyel yağı kitosan nanopartikülüne yüklenmiştir. Yapılan sem analizinde partiküllerin yuvarlak olduğu fakat agregatlarında olduğu bildirilmiştir [379]. Li ve ark. 2019 yılında ürettikleri kurkumin yüklü kitosan nanopartiküllerine yapılan TEM analizinde nanopartiküllerin yuvarlak ve uniform olduğu görülmüştür



Şekil 4.17 Boş kitosan nanopartiküllerin SEM görüntüsü



Şekil 4.18 Safran yüklü kitosan nanopartiküllerin SEM görüntüsü



Şekil 4.19 Kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerin SEM görüntüsü

[384]. Çalışmamızda yapılan SEM analizinde ürettiğimiz kitosan nanopartiküllerin yuvarlak ve uniform olduğu görülmüştür ve SEM sonuçlarımız literatür ile paralellik göstermektedir.

SEM analizleri sonucunda elde edilen nanopartikül boyutları genellikle DLS analiz sonuçlarından elde edilen boyutlardan daha küçük olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bu farkın nedeni DLS analizinde partikülün hidrodinamik yarı çapı ölçülürken, SEM analizlerinde örnekler kuru olarak bakılmaktadır. Ancak kuru olarak bakılma sırasında boyutların DLS analizi sonucunda elde edilen boyutlardan büyük olduğu çalışmalarda mevcuttur. Bu durumun nedeni analizi yapılan partiküllerin stabilitesinin düşük olması ve nanopartiküllerin agregat oluşurması ile açıklanmaktadır [388]. Çalışmamızda ürettiğimiz nanopartiküllerin DLS analizleri sonucunda elde edilen ortalama boyutlar, SEM analizi sonucu elde ettiğimiz ortalama boyutlardan büyüktür ve herhangi bir agregat oluşumu görülmemiştir. SEM sonuçlarımız literatürde bulunan bilgiler ve sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

4.12 Nanolif İçerisindeki Madde Miktarı

Nanolifler içerisindeki safran, kantaron ve propolis içeriği, hesaplanması Fahimirad ve ark. göre yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda nanolifler içerisindeki safran sulu ekstrak içeriği %70,51 olarak bulunmuştur. Kantaron sulu ekstraktının nanolifler içindeki miktarı ise %76,11 olarak bulunmuştur. Son olarak propolisin nanolifler içerisindeki miktarı %90,25 olarak bulunmuştur.

Fahimirad ve ark. yaptıkları çalışmada, kurkumin yüklü kitosan nanopartiküllerini PCL nanolifleri içerisine hapsetmeyi, biyolojik özelliklerini ve yara iyileştirme zellini araştırmayı amaçlamışlardır. Nanoliflerin kurkumin içeriğini belirlemek için yaptıkları deney sonucunda, 1978.8 ± 0.178 g olarak bulmuşlardır [389]. Elde edilen sonuçlar ile bizim çalışmamız kıyaslandığında, sonuçlarımızın farklı olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni, kullanılan aktif maddelerin farklı olmasıdır. Farklı boyutlarda olan maddelerin enkapsüle edilme sırasında yükleme kapasiteleri ve enkapsülasyon verimlilikleri arasında tıpkı kitosan nanopartiküllerinde olduğu gibi farklılıklar olabilmektedir.

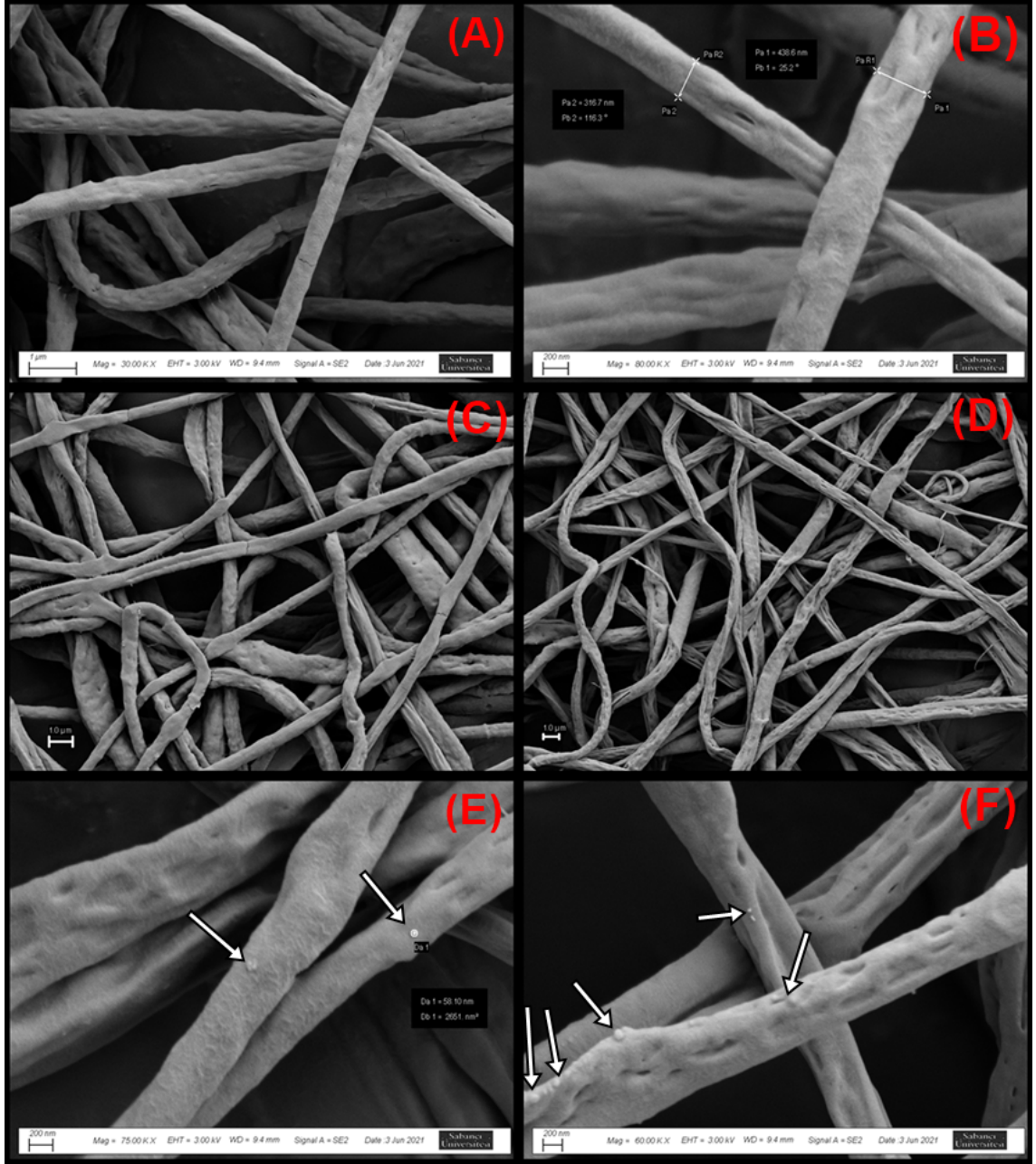
4.13 Nanoliflerin Morfolojik Analiz Sonuçları

SEM analizlerinde boş nanoliflerin (şekil 4.20C) ve dolu nanoliflerin (şekil 4.20D) analizleri yapılmıştır. Yapılan sem analizi sonucunda nanoliflerin çaplarının 450 nm ile 300 nm arasında değiştiği belirlenmiştir (şekil 4.20B). Hem boş nanoliflerde hem de dolu nanoliflerde herhangi topaklanmaya rastlanmamıştır (şekil 4.20A, şekil 4.20C ve şekil 4.20D). Kitosan nanopartiküllerin dolu nanolifler üzerinde ve içerisinde olduğu yapılan analizler sonucu belirlenmiştir (şekil 4.20E ve şekil 4.20F). Dolu nanolif üzerindeki ve içerisindeki kitosan nanopartiküllerinin 58 nm olduğu grlmştir (şekil 4.20E). Dolu nanoliflerde bazı deformasyonların olduğu belirlenmiştir (şekil 4.20A-F). Bu deformasyonların örnek hazırlanma sırasında ve kargolama sürecinde oluşabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamıza ile yapılan benzer bir çalışmada, nanolifler üzerinde ve içerisinde kitosan nanopartiküllerin varlığı bildirilmiştir. Nanolilerin boyutları ortalama 220 nm olduğu belirlenmiştir. Bu farklılıkların nedeni kullanılan elektroğirme solüsyonunun viskozitesi gibi parametrelere bağlı olduğu bilinmektedir [389].

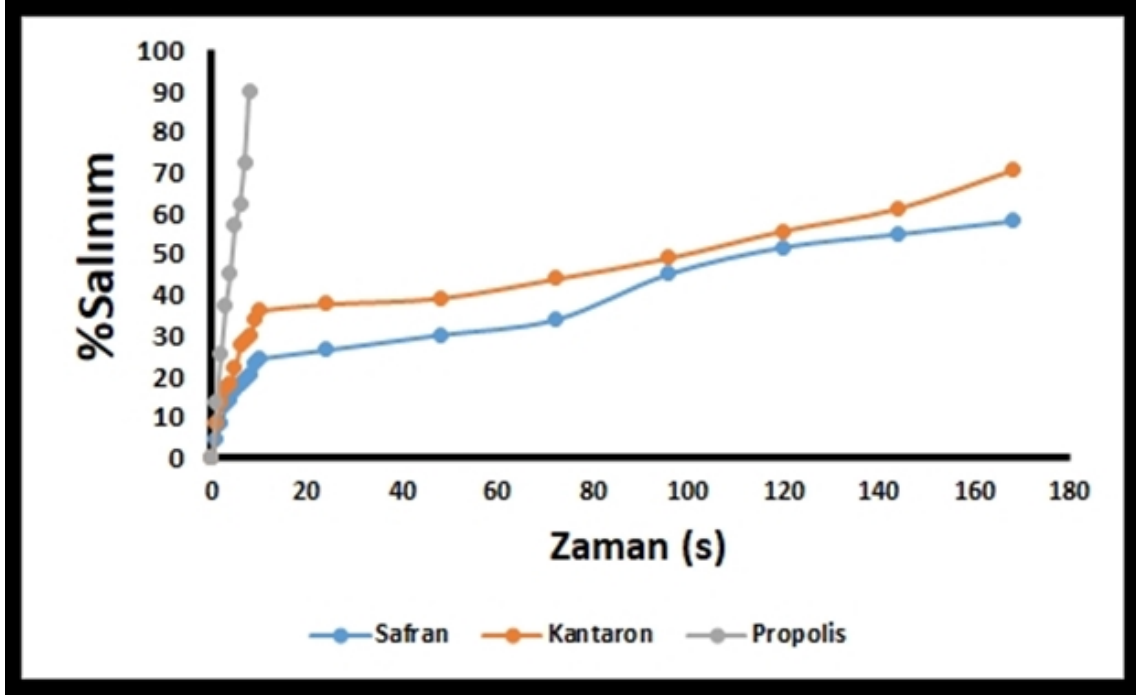
4.14 Nanoliflerin Salım Kinetiklerinin Analizi

Nanoliflerin *in vitro* salım kinetiği,zamana bağlı olarak kümülatif salım miktarı kullanılarak belirlendi. Nanoliflerden salınan safran miktarı, ilk 10 saatte %24,42 iken 24. saatte bu oranın %26,59 olduğu görüldü. 48. saatte ise kümülatif salım değeri



Şekil 4.20 Boş ve dolu nanoliflerin morfolojik analizleri (A-C:Boş nanoliflerin farklı büyütmelerdeki görüntüsü, B-D:Dolu Nanoliflerin farklı büyütmelerdeki görüntüsü, E-F:Nanolifler içindeki ve üzerindeki kitosan nanopartiküllerinin görüntüsü)

%30,30 olarak bulundu. 168. saatte salım oranı %58,24 olarak belirlendi. Kantaron sulu ekstraktının nanoliflerden ilk 10 saatte %36,04 oranında, 24. saatte %37,77, 48. saatte ise %39,25 oranında salındığı belirlendi. 168. saatte nanofiberlerden %70,61 oranında kantaron sulu ekstraktının salındığı görüldü. Propolis sulu ekstraktının nanoliflerden salımına bakıldığında, ilk 8 saatte %90 oranında salım gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 Safran, kantaron ve propolisin nanoliflerden salınım kinetiği

Çalışmamızda nanoliflerin içerisine yüklenmiş olan safran, kantaron ve propolisin, tıpkı kitosan nanopartiküllerinde olduğu gibi patlama salımı ile karakterize olduğu görülmüştür. Fahimirad ve ark. yaptığı çalışmada, kurkumin yüklü kitosan nanopartiküller içeren PCL nanofiberlerinin patlama salımı karakterini gösterdiği görülmüştür. İlk 10 saatte yaklaşık %30 ile %40 arasında kurkumin salındığı belirlenmiştir [389]. Bir diğer çalışmada ise Zahiri ve ark., yine kurkumin yüklü kitosan nanopartiküllerini PCL /jelatin nanoliflerinin içine hapsetmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda, ilk 6 saatte %60 oranın kurkumin salımı gözlenmiştir [208]. Çalışmamızda elde ettiğimiz salım sonuçları literatürde yapılan benzer çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

4.15 Nanoliflerin *In vivo* Etkisinin Belirlenmesi Deney Sonuçları

In vivo hayvan çalışması, boş-PCL nanolif, dolu nanolif ve ekstrak karışımının yara iyileştirici özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada, pozitif kontrol olarak yara iyileştirici özelliği bulunan FİTOKREM isimli ticari ürün, negatif

kontrol olarak ise serum fizyolojik kullanılmıştır. Yapılan çalışmada, sıçan dorsal kısımlarına açılan 2×2 cm yaralar 0. Hafta olarak kabul edilmiştir. Her 7 günde bir toplamda 4 hafta yara iyileşmesinin gözlenebilmesi için sıçan dorsal kısımları fotoğraflanmıştır. Fotoğraf analizleri yapıldıktan sonra elde edilen yüzde iyileşme değerleri Tablo 4.3’de, yara fotoğrafları ise Şekil 4.22’de verilmiştir.

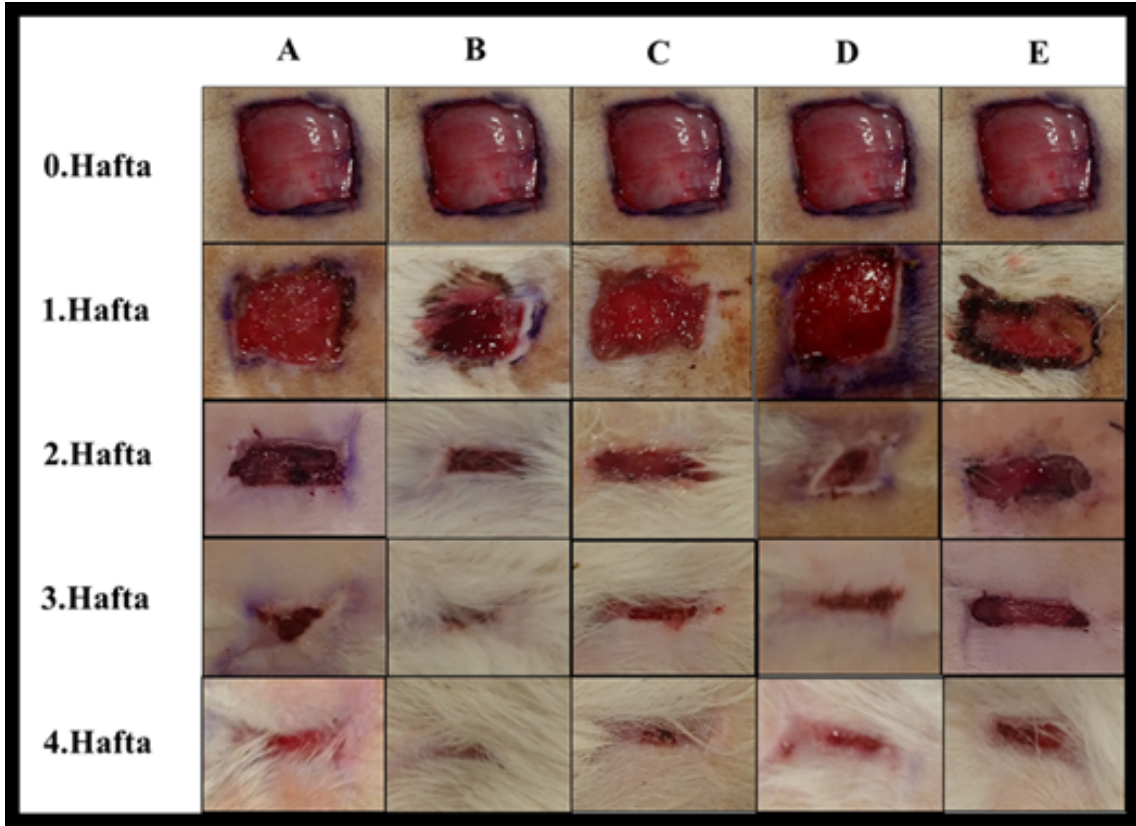
İlk 7 gün sonuçlarına bakıldığında Dolu-PCL nanoliflerin %39,67±16,79, boş nanoliflerin %34,5±13,94, ekstrakt karışımının %32,1±13,43, pozitif kontrolün %34,88±16,43, negatif kontrolün ise %23,60±14,39 oranında yara iyileşmesini sağladığı belirlenmiştir. İlk 7 gün sonuçlarını kıyasladığımızda, dolu nanoliflerin negatif kontrole göre %16,07 oranında pozitif kontrole göre %4,79 oranında daha iyi yara iyileşmesini sağladığı bulunmuştur. Boş nanoliflerin ilk 7 günde negatif kontrole göre %10,9 oranında daha iyi iyileştirme oranına sahip olduğu, pozitif kontrole göre ise %0,33 oranında daha az iyileştirme özelliğine sahip olduğu görülmüştür. Ekstrakt karışımının negatif kontrol ile kıyaslaması sonucunda ekstrakt karışımının %8,5 oranında daha etkili olduğu bulunmuştur. Ekstrak karışımının pozitif kontrole göre %2,78 daha az iyileştirme özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. Dolu-PCL nanolifler, boş nanolifler ve ekstrak karışımının 7. Günde birbirleri arasında kıyaslama yapıldığında dolu-PCL nanoliflerinin boş nanoliflerden %5,17, ekstrak karışımından %7,57 daha iyi yara iyileştirme sağladığı görülmüştür.

Tablo 4.3 In vivo hayvan modelinde haftalık % yara iyileşmesi

	1.Hafta	2.Hafta	3.Hafta	4.hafta
Ekstrakt	32,1±13,43	84,24±4,1	91,18±3,44	95,83±0,60
Dolu PCL-Nanolif	39,67±16,79	86,43±1,97	94,84±0,68	98,28±1,05
Boş PCL-Nanolif	34,5±13,94	82,46±2,10	92,22±4,05	97,41±2,56
Pozitif Kontrol	34,88±16,43	74,53±4,23	86,72±1,23	93,52±3,43
Negatif Kontrol	23,60±14,39	50,87±20,22	84,69±1,99	91,94±0,60

İkinci 7 günlük periyoda bakıldığında, dolu-PCL nanoliflerinin %86,43±1,97, boş-PCL nanoliflerinin %82,46±2,10, ekstrak karışımının %84,24±4,1, pozitif kontrolün %74,53±4,23, negatif kontrolün ise %50,87±20,22 oranında yara iyileştirmesini sağladığı belirlenmiştir. 14. günde dolu-PCL nanoliflerinin yara iyileştirme özelliğinin pozitif kontrol ve negatif kontrol ile kıyaslamasının sırası ile %11,9 ve %35,6 oranlarında dolu-PCL nanolifler tarafında olduğu belirlenmiştir. Boş nanoliflerinin yara iyileştirme oranının pozitif ve negatif kontrole kıyasla %7,93 ve %35,56 oranlarında daha iyi olduğu bulunmuştur. Ekstrak karışımının yara iyileştirici özelliğinin ise pozitif kontrole göre %1,78 daha iyi olduğu, negatif kontrole göre kıyaslandığında %33,37 oranında daha iyi olduğu belirlenmiştir. İlk 7 gün ile ikinci 7 gün kıyaslandığında dolu -PCL nanoliflerin uygulandığı gruptaki yara boyutları %46,76 oranında küçüldüğü gözlenmiştir. Boş nanoliflerde ise bu oranın %47,96

olduğu bulunmuştur. Ekstrak karışımındaki bu kıyaslama sonucu ise %52,1'dir. 14.gün sonunda dolu PCL nanoliflerinin boş nanoliflerden %4,03, ekstrak karışımında ise %2,19 oranında daha iyi yara iyileştirme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.22 *In vivo* yara modelinde hayvan gruplarının yaralarının haftaya bağlı iyileşmesi (A:Ekstrakt, B:Dolu PCL- Nanolif, C:Boş PCL-Nanolif, D:Pozitif Kontrol, E:Negatif Kontrol)

21.gün sonunda, dolu-PCL nanoliflerinin yara iyileştirme oranının $94,84 \pm 0,68$ olduğu, boş nanoliflerin yara iyileştirme oranının $92,22 \pm 4,05$, ekstrak karışımının yara iyileştirme oranının $91,18 \pm 3,44$, pozitif kontrolün yara iyileştirme oranının $86,72 \pm 1,23$ ve son olarak negatif kontrolün yara iyileştirme oranının $84,69 \pm 1,99$ olduğu belirlenmiştir. Dolu-PCL nanoliflerinin pozitif kontrol ve negatif kontrol ile kıyaslanmasının sonucunda, dolu-PCL nanoliflerinin pozitif kontrole göre %8,12, negatif kontrole göre ise %10,15 oranında daha iyi iyileştirme özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. Boş nanolifler ile her iki kontrol grubu kıyaslandığında, boş nanoliflerin pozitif kontrolden %5,5, negatif kontrolden ise %7,53 oranında daha iyi olduğu görülmüştür. Ekstrak karışımında bu oranlar pozitif kontrol kıyasla %4,46, negatif kontrol kıyasla %6,49 oranında daha iyi olduğu belirlenmiştir. Dolu-PCL nanoliflerinin, boş nanolifler ve ekstrak karışımı ile kıyaslanması sonucunda, dolu-PCL nanoliflerinin boş nanoliflerden %2,62 oranında, dolu-PCL nanoliflerinin ekstrak karışımından %2.62 oranında daha iyi iyileştirici özelliğe sahip olduğu görülmüştür.

28. gün sonuna bakıldığında, dolu-PCL nanoliflerinin $98,28 \pm 1,05$ yara küçülmesini sağladığı, boş nanoliflerin $97,41 \pm 2,56$ yara küçülmesini sağladığı, ekstrakt karışımının $95,83 \pm 0,60$ yara küçülmesini sağladığı, pozitif kontrolün $93,52 \pm 3,43$ yara küçülmesini sağladığı ve negatif kontrolün ise $91,94 \pm 0,60$ yara küçülmesini sağladığı bulunmuştur. 28. Gün sonunda dolu-PCL nanoliflerinin pozitif kontrole kıyasla $4,76$ oranında daha iyi iyileştirme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu grubun negatif kontrole kıyaslanması sonucunda iyileştirme oranının $6,34$ oranında daha iyi olduğu görülmüştür. Boş nanoliflerin pozitif ve negatif kontrole kıyaslanması sonucunda, boş nanoliflerin sırası ile $3,89$ ve $5,47$ daha iyi iyileştirme özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. Ekstrakt karışımının 28. gün sonunda pozitif kontrole kıyaslandığında, $3,89$ oranında daha iyi iyileştirme özelliğine sahip olduğu görülmüştür. 28. gün sonunda Dolu-PCL nanoliflerinin yara iyileştirme oranının, boş nanolifler ve ekstrakt karışımının yara iyileştirme oranları ile kıyaslandığında sırası ile $0,87$ ve $2,45$ oranında dolu-PCL nanoliflerinin daha iyi olduğu belirlenmiştir.

Yara iyileşme sürecindeki en önemli nokta daha hızlı yeniden epitelizasyon sağlanmasıdır. Hızlandırılmış yeniden epitelizasyon yara iyileşmesini kolaylaştırmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre ürettiğimiz yara örtüsünün pozitif kontrole göre ve boş nanoliflere göre daha hızlı yara iyileşmesini sağladığı görülmüştür. Literatürdeki çalışmalar ile kıyaslandığında, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile literatürdeki sonuçların paralellik gösterdiği görülmüştür. Örneğin; Merrel ve ark. (2009), streptozotosin ile indüklenen diyabetik fare modelinde, yüksek antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere bağlı olarak kurkumin yüklü PCL nanoliflerin yara iyileştirici özelliğini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, kurkumin yüklü PCL nanopartiküllerinin yara iyileştirmesini hızlandırdığı bulunmuştur [390]. Diğer bir çalışmada, kitosan içerisine yüklenmiş kurkumin içeren PCL nanoliflerinin yara iyileştirici özelliği sıçanlar üzerinde denenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, kitosan içerisine yüklenmiş kurkumin içeren PCL nanoliflerin yara iyileşmesini hızlandırdığı belirlenmiştir [389]. 2015 yılında Jung ve ark. kitosan nanopartiküller içeren PCL nanolifleri üretmişlerdir ve bu üretilen malzemenin yara iyileştirici özelliğe sahip olduğu bulmuşlardır [207]. Piran ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada, PDGF-BB yüklü PCL bazlı yara örtüsünün hücre proliferasyonunu ve hücre migrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir [206]. 2020 yılında Zahiri ve ark. kurkumin içeren kitosan nanopartikülleri içeren PCL ve jelatin bazlı doku iskelesi üretmişlerdir. Çalışma sonucunda üretilen doku iskelesinin hücre bağlanması ve proliferasyonunun, PCL ve PCL/jelatin iskelelerinden daha iyi olduğu belirlenmiştir [208].

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, dekoksasyon yöntemi kullanılarak elde edilen safran ve kantaron sulu ekstraktlarının ve ticari olarak alınan propolis sulu ekstraktının biyolojik aktiviteleri, genotoksik ve mutajenite potansiyelleri belirlenmiştir. Daha sonra safran ve kantaron sulu ekstraktları biyolojik aktivite, genotoksisite ve mutajenite potansiyelleri göz önüne alınarak kitosan nanopartikülleri ile enkapsüle edilmiştir. Elde edilen kitosan nanopartikülleri ile propolis içeren nanlif bazlı yara örtüsü üretilmiştir. Yara örtüsünün iyileştirici özelliği in vivo yara modeli kullanılarak belirlenmiştir. Ekstraktların DNA ile etkileşiminin belirlenmesi için UV-vis spektroskopisi kullanılarak DNA bağlanma deneyi, agaroz jel elektroforezi kullanılarak DNA kesme deneyi yapılmıştır. Antimikrobiyal etki gösteren dozların bulunması için MİK deneyi kullanılmıştır. Ekstraktların genotoksik ve mutajenik etki göstermeyen dozlarının belirlenmesi için Ames/Salmonella testi yapılmıştır. Ekstrakt kombinasyonlarının antioksidan etkilerinin belirlenmesinde DPPH tekniği kullanılmıştır. Kitosan nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemi ile üretilmiştir. Yara örtüsü üretiminde ise elektroegirme yöntemi kullanılmıştır. DNA bağlanma deneyi sonucunda, safran sulu ekstraktının CT-DNA'ya elektrostatik olarak bağlandığı ve UV-vis spektrumunda hiperkromizme doğru kayma neden olduğu bulunmuştur. Kantaronun sulu ekstraktının CT-DNA'ya elektrostatik olarak bağlandığı ve UV-vis spektrumuna bakıldığında absorbans değişiminin hiperkromizm yönüne doğru olduğu tespit edilmiştir. Propolis ekstraktının CT-DNA'ya interkalatif bağlandığı ve UV-vis spektrumu incelendiğinde, solüsyondaki CT-DNA miktarındaki artışa bağlı olarak absorbanstaki kayma hipokromizm yönünde olduğu gözlemlenmiştir. DNA kesme deneyinde, Safran ekstraktının hidrolitik reaksiyon sonucu DNA'da kesmeye neden olduğu, kantaron ve propolis ekstraktlarının ise hidrolitik reaksiyon sonucunda herhangi bir kesmeye neden olmadığı görülmüştür. Oksidatif reaksiyon sonucu safran ve kantaron sulu ekstraktlarının DNA'da kesmeye neden olduğu bulunmuştur. Propolis sulu ekstraktının oksidatif reaksiyon sonucu herhangi bir kesmeye sebep olmadığı belirlenmiştir. Ames deneyi sonucunda, safran sulu ekstraktının TA98 ve TA100 suşlarında 1,25 mg dozda genotoksik etki ve mutajeniteye sahip olmadığı

belirlenmiştir. Kantaron sulu ekstraktında ise 1,25 ve 2,5 mg dozlarının her iki suşta da genotoksisiteye ve mutajeniteye sebep olmadığı belirlenmiştir. Propolis sulu ekstraktına bakıldığında 5 mg ve altındaki dozların TA98 suşunda genotoksik etki ve mutajenik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Ancak TA100 suşunda 2,5 mg ve altındaki dozlarda genotoksik etki ve mutajenite görülmemiştir. MİK deneyine bakıldığında, deneyde kullanılan bakteriler için tüm ekstraktların antibakteriyal özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Safran sulu ekstraktının MİK değeri olarak $>1\text{mg/mL}$ olarak bulunmuştur. Kantaron sulu ekstraktının MİK değeri $>1\text{mg/mL}$ olarak, propolisin MİK değeri ise $0,125\text{mg/mL}$ olarak belirlenmiştir. Tüm ekstraktların fungal patojenlerin üremesini engellediği bulunmuştur. Antifungal özelliği gösteren MİK değerleri, safran ve kantaron için 1mg/mL , propolis içinse $0,250\text{mg/mL}$ olarak belirlenmiştir. Üretilen kitosan nanopartiküllerine bakıldığında, kantaron ve safran yüklü nanopartiküllerin $1-100\text{nm}$ arasında olduğu belirlenmiştir. DLS analizi sonucunda elde edilen PDI değerleri nanopartiküllerinin boyutlarının homojen olarak dağıldığını göstermektedir. Elde edilen kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri pozitif olarak bulunmuştur. Safran ve kantaron yüklü kitosan nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasiteleri sırası ile %71.76 ve %71.92, $23.74\text{ }\mu\text{g/mg}$ ve $35.15\text{ }\mu\text{g/mg}$ şeklinde bulunmuştur. Salınım karakteri literatürde kontrollü salınım formülasyonlarına uygun şekilde bulunmuştur. Her iki ekstraktın yüklü olduğu nanopartikülde ilk 24 saat içerisinde patlama salınımı görülmüştür. Ayrıca nanopartiküllerin kontrollü bir şekilde salınım yaptığı belirlenmiştir. Yapılan SEM analizinde nanopartiküllerin homojen ve uniform olarak dağıldığı görülmüştür.

Üretilen nanofiberlerin içerisindeki ekstrak miktarı safran, kantaron ve propolis için sırası ile %70,51, %75,8 ve %89.12 olarak bulunmuştur. Yapılan salınım deneyinde, tıpkı kitosan nanopartiküllerinde olduğu gibi ilk 24 saatte patlama salınımı görülmüştür. Nanofibere yüklü propolisin ilk 8 saatte %90 oranında salındığı belirlenmiştir. Kantaron ve safran salınımının kitosan nanopartiküllerine oranla daha yavaş olduğu bulunmuştur. In vivo yara modeli deneyinde, 7. günün sonunda üretilen yara örtüsünün pozitif kontrol ve negatif kontrole kıyasla %4,79 ve %16,07 oranında daha hızlı iyileştirme özelliğine sahip olduğu görülmüştür. 14. Gün sonunda bu oranların %11,9 ve %35,6 şeklinde üretilen yara örtüsü lehine değiştiği belirlenmiştir. 21. gün sonunda üretilen yara örtüsünün iyileştirme hızının pozitif kontrole göre %8,12 negatif kontrole göre %10,15 daha iyi olduğu bulunmuştur. 28. gün sonunda üretilen yara örtüsünün pozitif kontrole kıyasla %5,5, negatif kontrole kıyasla %7,53 daha hızlı iyileştirme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir. 0.-28. Gün aralığında üretilen yara örtüsünün ekstrak ve boş yara örtüsüne kıyasla daha hızlı yeniden epitelizeasyon ve hızlı yara iyileşmesini sağladığı görülmüştür. Ayrıca yapılan hayvan deneyinde tüm gruplarda herhangi bir enfeksiyona rastlanılmamıştır.

Günümüz dünyasında doğal ilaçların kullanılması revaçta olan bir konudur. Buna bağlı olarak bitki içeriklerinin kullanıldığı ilaç formülasyonlarının araştırıldığı çalışmalar dünya da çoğalmaktadır. Türkiye coğrafik konumu bakımından eşsiz bir bitki örtüsüne sahiptir. Türkiye'nin birçok bölgesinde, o bölgeye özgü endemik bitki türleri bulunmaktadır. Gerek hastalıkların iyileştirilmesinde gerekse çalışmamızda yaptığımız gibi yara örtüleri geliştirilmesinde Türkiye'nin bitki çeşitliliğinden faydalanılmalıdır. Ancak kullanılan bitkilerin biyolojik aktivitelerinin, çeşitli toksik etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir [391]. Bunun nedeni, literatürde ve çalışmamızda da görüldüğü gibi bitki içeriklerinin bölgesel ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişebilme özelliğine sahip olmasıdır.

2009 yılında yapılan çalışmada nanolif bazlı ürünlerin dünya üzerindeki pazar payının 80,7 milyon dolar olduğu belirlenmiştir. Bu pazar payının 2015 yılı sonunda bileşik büyüme oranının %34,3 olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu Pazar payının 2015-20 arasında %37,2 olarak belirlenmiştir. Yıllık büyüme oranları göz önünde bulundurulduğunda, nanolif bazlı ürünlerin pazar payının 2021 yılı sonuna doğru 323 milyon dolar değerinin üzerinde olacağı tahmin edilmektedir. Bu verilere dayanarak ülkemizde nanolif bazlı ürünlerin üretimine önem verilmesi gerekmektedir. Bu önem gerek akademik olarak gerekse ekonomik açıdan kalkınmada önemli bir yer tutmaktadır [392].

Sonuç olarak bu tez çalışmasında biyolojik aktiviteleri, genotoksik potansiyelleri ve mutajeniteleri belirlenen bitkisel ürünler içeren nanolif yapıli yara örtüsü üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen yara örtüsünün etkinliğı in vivo yara modeli kullanılarak kanıtlanmıştır.

- [1] G. Swann, "The skin is the body's largest organ.," *Journal of visual communication in medicine*, vol. 33, no. 4, pp. 148–149, 2010.
- [2] R. Bryant, D. Nix, *et al.*, *Acute and chronic wounds: current management concepts*. Elsevier Health Sciences, 2015.
- [3] A. M. Kligman, "What is the 'true' function of skin?" *Experimental dermatology*, vol. 11, no. 2, p. 159, 2002.
- [4] H. Yousef, M. Alhajj, S. Sharma, "Anatomy, skin (integument), epidermis," 2017.
- [5] M. F. Forni, M. Trombetta-Lima, M. C. Sogayar, "Stem cells in embryonic skin development," *Biological research*, vol. 45, no. 3, pp. 215–222, 2012.
- [6] O. Chernova, "Skin derivatives in vertebrate ontogeny and phylogeny," *Biology Bulletin*, vol. 36, no. 2, pp. 175–183, 2009.
- [7] H. B. Lillywhite, P. F. Maderson, "The structure and permeability of integument," *American Zoologist*, vol. 28, no. 3, pp. 945–962, 1988.
- [8] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, "Epidermis and its renewal by stem cells," in *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*, Garland Science, 2002.
- [9] E. S. Chambers, M. Vukmanovic-Stejić, "Skin barrier immunity and ageing," *Immunology*, vol. 160, no. 2, pp. 116–125, 2020.
- [10] J. McGrath, R. Eady, F. Pope, "Anatomy and organization of human skin," *Rook's textbook of dermatology*, vol. 1, pp. 3–2, 2004.
- [11] Đ. Koruga, J. Bandić, G. Janjić, Č. Lalović, J. Munćan, D. D. Vukojević, "Epidermal layers characterisation by opto-magnetic spectroscopy based on digital image of skin.," *Acta Physica Polonica, A.*, vol. 121, no. 3, 2012.
- [12] E. Roig-Rosello, P. Rousselle, "The human epidermal basement membrane: A shaped and cell instructive platform that aging slowly alters," *Biomolecules*, vol. 10, no. 12, p. 1607, 2020.
- [13] S. Teplytskyi, "Formation and development of the skin on the palmar surface of the hand throughout the period of prenatal ontogenesis and its importance in dermatoglyphics," *Deutscher Wissenschaftsherold German Science Herald*, p. 16, 2017.
- [14] H. M. Langevin, M. Nedergaard, A. K. Howe, "Cellular control of connective tissue matrix tension," *Journal of cellular biochemistry*, vol. 114, no. 8, pp. 1714–1719, 2013.

- [15] C. Prost-Squarcioni, S. Fraitag, M. Heller, N. Boehm, "Functional histology of dermis," in *Annales de dermatologie et de venerologie*, vol. 135, 2008, 1S5–20.
- [16] B. Eckes, R. Nischt, T. Krieg, "Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring," *Fibrogenesis & tissue repair*, vol. 3, no. 1, pp. 1–11, 2010.
- [17] K. Borowska, "How narrow-band and broad-band uvb irradiation influences the histomorphology evaluations of experimental animals' skin—a comparative study," *Part I. Our Dermatol Online*, vol. 8, no. 3e, e5, 2017.
- [18] M. Ventre, F. Mollica, P. A. Netti, "The effect of composition and microstructure on the viscoelastic properties of dermis," *Journal of biomechanics*, vol. 42, no. 4, pp. 430–435, 2009.
- [19] H. M. Langevin, P. Agache, "Subcutaneous tissue histophysiology," in *Agache's Measuring the Skin*, P. Humbert, H. Maibach, F. Fanian, P. Agache, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 1–9, ISBN: 978-3-319-26594-0. DOI: 10.1007/978-3-319-26594-0_88-1. [Online]. Available: https://doi.org/10.1007/978-3-319-26594-0_88-1.
- [20] K. YILDIRIM. (2021). "Anatomi," [Online]. Available: <https://docplayer.biz.tr/203402336-Anatomi-i-fizyoterapi-ve-rehabilitasyon-ergoterapi-ortez-protez.html> (visited on 06/21/2021).
- [21] N. Gupta, U. Jain, "Investigation of wound healing activity of methanolic extract of stem bark of *mimusops elengi* linn," *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, vol. 8, no. 2, 2011.
- [22] D. C. Bosanquet, K. G. Harding, "Wound duration and healing rates: Cause or effect?" *Wound Repair and Regeneration*, vol. 22, no. 2, pp. 143–150, 2014.
- [23] L. Cañedo-Dorantes, M. Cañedo-Ayala, "Skin acute wound healing: A comprehensive review," *International journal of inflammation*, vol. 2019, 2019.
- [24] G. Han, R. Ceilley, "Chronic wound healing: A review of current management and treatments," *Advances in therapy*, vol. 34, no. 3, pp. 599–610, 2017.
- [25] N. X. Landén, D. Li, M. Ståhle, "Transition from inflammation to proliferation: A critical step during wound healing," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 73, no. 20, pp. 3861–3885, 2016.
- [26] E. M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta, E. Chiesa, S. Pisani, B. Conti, "Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 8, p. 735, 2020.
- [27] G. Dabiri, E. Damstetter, T. Phillips, "Choosing a wound dressing based on common wound characteristics," *Advances in wound care*, vol. 5, no. 1, pp. 32–41, 2016.
- [28] T. Alberti, D. S. Coelho, A. Voytena, H. Pitz, M. de Pra, L. Mazzarino, S. Kuhnen, R. M. Ribeiro-do-Valle, M. Maraschin, B. Veleirinho, "Nanotechnology: A promising tool towards wound healing," *Current pharmaceutical design*, vol. 23, no. 24, pp. 3515–3528, 2017.
- [29] M. M. Mihai, M. B. Dima, B. Dima, A. M. Holban, "Nanomaterials for wound healing and infection control," *Materials*, vol. 12, no. 13, p. 2176, 2019.

- [30] M. Mir, M. N. Ali, A. Barakullah, A. Gulzar, M. Arshad, S. Fatima, M. Asad, "Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: A review," *Progress in biomaterials*, vol. 7, no. 1, pp. 1–21, 2018.
- [31] R. S. Ambekar, B. Kandasubramanian, "Advancements in nanofibers for wound dressing: A review," *European Polymer Journal*, vol. 117, pp. 304–336, 2019.
- [32] G. Alam, M. P. Singh, A. Singh, "Wound healing potential of some medicinal plants," *International journal of Pharmaceutical sciences Review and Research*, vol. 9, no. 1, pp. 136–145, 2011.
- [33] A. Hemmati, I. Rashidi, M. Jafari, "Promotion of wound healing by hypericum perforatum extract in rabbit," *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, vol. 2, no. 2, pp. 78–86, 2007.
- [34] S. Verjee, E. Garo, S. Pelaez, O. Fertig, M. Hamburger, V. Butterweck, "Saffron flower extract promotes scratch wound closure of keratinocytes and enhances vegf production," *Planta medica*, vol. 83, no. 14/15, pp. 1176–1183, 2017.
- [35] G. Khorasani, S. J. Hosseinimehr, P. Zamani, M. Ghasemi, A. Ahmadi, "The effect of saffron (*crocus sativus*) extract for healing of second-degree burn wounds in rats," *The Keio journal of medicine*, vol. 57, no. 4, pp. 190–195, 2008.
- [36] X.-P. Cao, Y.-F. Chen, J.-L. Zhang, M.-M. You, K. Wang, F.-L. Hu, "Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity," *Phytomedicine*, vol. 34, pp. 76–84, 2017.
- [37] S. Dhivya, V. V. Padma, E. Santhini, "Wound dressings—a review," *BioMedicine*, vol. 5, no. 4, 2015.
- [38] B. Gupta, R. Agarwal, M. Alam, "Textile-based smart wound dressings," 2010.
- [39] J. Lei, L. Sun, P. Li, C. Zhu, Z. Lin, V. Mackey, D. H. Coy, Q. He, "The wound dressings and their applications in wound healing and management," *Health Science Journal*, vol. 13, no. 4, pp. 1–8, 2019.
- [40] P. Radhika, K. Kumar, "Herbal hydrogel for wound healing: A review," *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, vol. 5, no. 2, pp. 1616–1622, 2017.
- [41] S. Suganya, T. Senthil Ram, B. Lakshmi, V. Giridev, "Herbal drug incorporated antibacterial nanofibrous mat fabricated by electrospinning: An excellent matrix for wound dressings," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 121, no. 5, pp. 2893–2899, 2011.
- [42] A. J. Domb, W. Khan, *Focal controlled drug delivery*. Springer, 2014.
- [43] M. Kokabi, M. Sirousazar, Z. M. Hassan, "Pva–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing," *European polymer journal*, vol. 43, no. 3, pp. 773–781, 2007.
- [44] J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. Stevens, G. M. Eccleston, "Wound healing dressings and drug delivery systems: A review," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, no. 8, pp. 2892–2923, 2008.

- [45] P. Aramwit, P. Muangman, N. Namviriyachote, T. Srichana, "In vitro evaluation of the antimicrobial effectiveness and moisture binding properties of wound dressings," *International journal of molecular sciences*, vol. 11, no. 8, pp. 2864–2874, 2010.
- [46] A. Farley, E. McLafferty, C. Hendry, "Cells, tissues, organs and systems.," *Nursing Standard*, vol. 26, no. 52, 2012.
- [47] E. McLafferty, C. Hendry, A. Farley, "The integumentary system: Anatomy, physiology and function of skin," *Nursing Standard (through 2013)*, vol. 27, no. 3, p. 35, 2012.
- [48] E. N. Marieb, K. Hoehn, "The integumentary system," *Human Anatomy and Physiology. 8th ed. San Francisco, CA: Benjamin Cummings*, vol. 155, 2010.
- [49] M. Caon, "Integumentary system," in *Examination Questions and Answers in Basic Anatomy and Physiology*, Springer, 2020, pp. 157–172.
- [50] C. Blanpain, E. Fuchs, "Epidermal homeostasis: A balancing act of stem cells in the skin," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 10, no. 3, pp. 207–217, 2009.
- [51] H. Dabboue, N. Builles, É. Frouin, D. Scott, J. Ramos, G. Marti-Mestres, "Assessing the impact of mechanical damage on full-thickness porcine and human skin using an in vitro approach," *BioMed research international*, vol. 2015, 2015.
- [52] M. L. Paz, E. M. Cela, A. D. Friedrich, F. S. Weill, J. Leoni, D. H. G. Maglio, "Ultraviolet radiation effects on skin cells and immune system," *UV RADIATION*, p. 145,
- [53] A. A. Romanovsky, "Skin temperature: Its role in thermoregulation," *Acta physiologica*, vol. 210, no. 3, pp. 498–507, 2014.
- [54] N. Charkoudian, "Skin blood flow in adult human thermoregulation: How it works, when it does not, and why," in *Mayo clinic proceedings*, Elsevier, vol. 78, 2003, pp. 603–612.
- [55] E. A. Arens, H. Zhang, "The skin's role in human thermoregulation and comfort," 2006.
- [56] D. D. Bikle, "Vitamin d metabolism and function in the skin," *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 347, no. 1-2, pp. 80–89, 2011.
- [57] M. F. Holick, T. C. Chen, "Vitamin d deficiency: A worldwide problem with health consequences," *The American journal of clinical nutrition*, vol. 87, no. 4, 1080S–1086S, 2008.
- [58] F. Bandeira, L. Griz, P. Dreyer, C. Eufrazino, C. Bandeira, E. Freese, "Vitamin d deficiency: A global perspective," *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, vol. 50, no. 4, pp. 640–646, 2006.
- [59] R. K. Winkelmann, "Sensory receptors of the skin," in *Spinal Afferent Processing*, T. L. Yaksh, Ed. Boston, MA: Springer US, 1986, pp. 19–57, ISBN: 978-1-4684-4994-5. DOI: 10.1007/978-1-4684-4994-5_2. [Online]. Available: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4994-5_2.

- [60] B. S. Kim, G. Gao, J. Y. Kim, D.-W. Cho, "3d cell printing of perfusable vascularized human skin equivalent composed of epidermis, dermis, and hypodermis for better structural recapitulation of native skin," *Advanced healthcare materials*, vol. 8, no. 7, p. 1801019, 2019.
- [61] Y. Gilaberte, L. Prieto-Torres, I. Pastushenko, Á. Juarraz, "Anatomy and function of the skin," in *Nanoscience in Dermatology*, Elsevier, 2016, pp. 1–14.
- [62] P. A. Kolarsick, M. A. Kolarsick, C. Goodwin, "Anatomy and physiology of the skin," *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, vol. 3, no. 4, pp. 203–213, 2011.
- [63] K.-W. Guan, Y.-Q. Jiang, C.-S. Sun, H. Yu, "A two-layer model of laser interaction with skin: A photothermal effect analysis," *Optics & Laser Technology*, vol. 43, no. 3, pp. 425–429, 2011.
- [64] M. Valle, M. P. Zamorani, "Skin and subcutaneous tissue," in *Ultrasound of the musculoskeletal system*, Springer, 2007, pp. 19–43.
- [65] C. Goodwin, "Anatomy and physiology of the skin," *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, vol. 3, no. 4, pp. 203–213, 2011.
- [66] C. Cobb. (). "The layers of your skin," [Online]. Available: <https://www.healthline.com/health/layers-of-skin>. (accessed: 21.06.2021).
- [67] S. P. Singh, V. P. Singh, "A survey paper for skin cancer detection based on retinex theory," *Research Journal of Engineering and Technology*, vol. 2, no. 4, pp. 213–218, 2011.
- [68] O. College. (). "Anatomi ve fizyoloji," [Online]. Available: <https://tr.weblogographic.com/difference-between-dermis>. (accessed: 21.06.2021).
- [69] L. A. Goldsmith, *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*. Oxford University Press, 1991, vol. 2.
- [70] E. Lane, C. Wilson, B. Hughes, I. Leigh, "Stem cells in hair follicles: Cytoskeletal studies," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 642, no. 1, pp. 197–213, 1991.
- [71] R. L. Maynard, N. Downes, "Chapter 24 - the skin or the integument," in *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*, R. L. Maynard, N. Downes, Eds., Academic Press, 2019, pp. 303–315, ISBN: 978-0-12-811837-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811837-5.00024-1>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128118375000241>.
- [72] J. Barbieri, K. Wanat, J. Seykora, "Skin: Basic structure and function," in *Pathobiology of Human Disease*, L. M. McManus, R. N. Mitchell, Eds., San Diego: Academic Press, 2014, pp. 1134–1144, ISBN: 978-0-12-386457-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.03501-2>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864567035012>.
- [73] L. Gartner, J. Hiatt, *Color Textbook of Histology*. Saunders, 1997, ISBN: 9780721651248. [Online]. Available: <https://books.google.com.tr/books?id=381qAAAAMAAJ>.

- [74] K. W. Ng, W. M. Lau, "Skin deep: The basics of human skin structure and drug penetration," in *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement*, Springer, 2015, pp. 3–11.
- [75] C. Das, P. D. Olmsted, "The physics of stratum corneum lipid membranes," *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 374, no. 2072, p. 20150126, 2016.
- [76] Anonymous. (). "Integument," [Online]. Available: <https://www.ouhsc.edu/histology/Text%5C%20Sections/Integument.html>. (accessed: 21.06.2021).
- [77] A. Korosec, S. Frech, B. Gesslbauer, M. Vierhapper, C. Radtke, P. Petzelbauer, B. M. Lichtenberger, "Lineage identity and location within the dermis determine the function of papillary and reticular fibroblasts in human skin," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 139, no. 2, pp. 342–351, 2019.
- [78] A. Foster. (). "Skin and adnexa skin adnexa (derivatives): Hair nail sebaceous glands sweat glands mammary glands," [Online]. Available: <https://elib.tips/edoc/skin-and-adnexa-skin-adnexa-derivatives-hair-nail-sebaceous-glands-sweat-glands-mammary-glands.html>. (accessed: 21.06.2021).
- [79] D. G. Janson, G. Saintigny, A. van Adrichem, C. Mahé, A. El Ghalbzouri, "Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, no. 11, pp. 2565–2572, 2012, ISSN: 0022-202X. DOI: <https://doi.org/10.1038/jid.2012.192>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15355226>.
- [80] M. Wilk-Blaszczak. (). "Integumentary system," [Online]. Available: <https://uta.pressbooks.pub/histology/chapter/integumentary-system/>. (accessed: 21.06.2021).
- [81] O. A. Bahri, N. Naldaiz-Gastesi, D. C. Kennedy, A. M. Wheatley, A. Izeta, K. J. McCullagh, "The panniculus carnosus muscle: A novel model of striated muscle regeneration that exhibits sex differences in the mdx mouse," *Scientific reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1–15, 2019.
- [82] J. P. Sundberg, C. J. Booth, L. B. Nanney, P. Fleckman, L. E. King, "24 - skin and adnexa," in *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*, P. M. Treuting, S. M. Dintzis, K. S. Montine, Eds., Second Edition, San Diego: Academic Press, 2018, pp. 511–542, ISBN: 978-0-12-802900-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00024-5>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128029008000245>.
- [83] D. Casal, D. Pais, I. Iria, E. Mota-Silva, M.-A. Almeida, S. Alves, C. Pen, A. Farinho, L. Mascarenhas-Lemos, J. Ferreira-Silva, *et al.*, "A model of free tissue transfer: The rat epigastric free flap," *Journal of visualized experiments: JoVE*, no. 119, 2017.
- [84] T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj, "The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms," *Journal of International Medical Research*, vol. 37, no. 5, pp. 1528–1542, 2009.

- [85] S. Kumar, D. J. Leaper, "Classification and management of acute wounds," *Surgery (Oxford)*, vol. 26, no. 2, pp. 43–47, 2008.
- [86] M. C. Robson, D. L. Steed, M. G. Franz, "Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories.," *Current problems in surgery*, vol. 38, no. 2, pp. 72–140, 2001.
- [87] M. C. Ferreira, P. Tuma Júnior, V. F. Carvalho, F. Kamamoto, "Complex wounds," *Clinics*, vol. 61, no. 6, pp. 571–578, 2006.
- [88] J. D. Whitney, "Overview: Acute and chronic wounds," *Nursing Clinics*, vol. 40, no. 2, pp. 191–205, 2005.
- [89] S. Chhabra, N. Chhabra, A. Kaur, N. Gupta, "Wound healing concepts in clinical practice of omfs," *Journal of maxillofacial and oral surgery*, vol. 16, no. 4, pp. 403–423, 2017.
- [90] S. Ather, K. Harding, "1 - wound management and dressings," in *Advanced Textiles for Wound Care*, ser. Woodhead Publishing Series in Textiles, S. Rajendran, Ed., Woodhead Publishing, 2009, pp. 3–19, ISBN: 978-1-84569-271-1. DOI: <https://doi.org/10.1533/9781845696306.1.3>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845692711500017>.
- [91] L. Di Mascio, "Classification and management of acute wounds and open fractures," *Surgery (Oxford)*, vol. 29, no. 2, pp. 76–79, 2011.
- [92] M. Ågren, *Wound Healing Biomaterials-Volume 2: Functional Biomaterials*. Woodhead Publishing, 2016.
- [93] M. Parani, G. Lokhande, A. Singh, A. K. Gaharwar, "Engineered nanomaterials for infection control and healing acute and chronic wounds," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 8, no. 16, pp. 10 049–10 069, 2016.
- [94] E. Boughton, S. Mclennan, "Biomimetic scaffolds for skin tissue and wound repair," in *Biomimetic Biomaterials*, Elsevier, 2013, pp. 153–180.
- [95] R. Vanwijck, "Surgical biology of wound healing," *Bulletin et memoires de l'Academie royale de medecine de Belgique*, vol. 156, no. 3-4, pp. 175–84, 2001.
- [96] H. J. Degreef, "How to heal a wound fast," *Dermatologic clinics*, vol. 16, no. 2, pp. 365–375, 1998.
- [97] D. Whelan, N. Caplice, A. Clover, "Fibrin as a delivery system in wound healing tissue engineering applications," *Journal of Controlled Release*, vol. 196, pp. 1–8, 2014.
- [98] O. Amir, A. Liu, A. L. S. Chang, "Stratification of highest-risk patients with chronic skin ulcers in a stanford retrospective cohort includes diabetes, need for systemic antibiotics, and albumin levels," *Ulcers*, vol. 2012, 2012.
- [99] Z. E. Moore, S. Cowman, "Repositioning for treating pressure ulcers," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 1, 2015.
- [100] C. K. Sen, G. M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T. K. Hunt, F. Gottrup, G. C. Gurtner, M. T. Longaker, "Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy," *Wound repair and regeneration*, vol. 17, no. 6, pp. 763–771, 2009.

- [101] M. Afsahi, H. R. Ahmadi Ashtiani, A. H. Askari Pour, E. Hazrati, "Diabetic wound care: A concise review of diabetic wound and skincare ingredients," *Journal of Archives in Military Medicine*, vol. 8, no. 2, 2020.
- [102] B. N. Xs, "Review on general effective & therapeutic diabetic wound management," *Current Research in Diabetes & Obesity Journal*, vol. 8, no. 4, pp. 1–9, 2018.
- [103] M. Volmer-Thole, R. Lobmann, "Neuropathy and diabetic foot syndrome," *International journal of molecular sciences*, vol. 17, no. 6, p. 917, 2016.
- [104] L. G. Collins, S. Seraj, "Diagnosis and treatment of venous ulcers," *American Family Physician*, vol. 81, no. 8, pp. 989–996, 2010.
- [105] P. C. Alguire, B. M. Mathes, "Chronic venous insufficiency and venous ulceration," *Journal of general internal medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 374–383, 1997.
- [106] H. Park, C. Copeland, S. Henry, A. Barbul, "Complex wounds and their management.," *The Surgical Clinics of North America*, vol. 90, no. 6, pp. 1181–1194, 2010.
- [107] T. M. Lan, G. B. A. Susie, "Approach to complex wound management and adjunct therapy," *The Singapore Family Physician*, vol. 40, no. 3, pp. 27–31, 2014.
- [108] M. Bischoff, L. Kinzl, A. Schmelz, "The complicated wound," *Der Unfallchirurg*, vol. 102, no. 10, pp. 797–804, 1999.
- [109] A. Komarcević, "The modern approach to wound treatment," *Medicinski pre-gled*, vol. 53, no. 7-8, pp. 363–368, 2000.
- [110] G. S. Lazarus, D. M. Cooper, D. R. Knighton, D. J. Margolis, R. E. Percoraro, G. Rodeheaver, M. C. Robson, "Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing," *Wound repair and regeneration*, vol. 2, no. 3, pp. 165–170, 1994.
- [111] C. E. Attinger, J. E. Janis, J. Steinberg, J. Schwartz, A. Al-Attar, K. Couch, "Clinical approach to wounds: Debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants," *Plastic and re-constructive surgery*, vol. 117, no. 7S, 72S–109S, 2006.
- [112] F. P. Beserra, L. F. S. Gushiken, M. F. Hussni, C. H. Pellizzon, "Regulatory mechanisms and chemical signaling of mediators involved in the inflammatory phase of cutaneous wound healing," in *Wound Healing-Current Perspectives*, IntechOpen, 2018.
- [113] M. Mercandetti, A. Cohen, "Wound healing and repair," *Emedicine*, vol. 14, no. 1, pp. 12–20, 2017.
- [114] A. Hsu, T. A. Mustoe, "The principles of wound healing," *Plastic surgery secrets plus*, vol. 2, pp. 3–7, 2010.
- [115] M. B. Witte, A. Barbul, "General principles of wound healing," *Surgical Clinics of North America*, vol. 77, no. 3, pp. 509–528, 1997.

- [116] L. M. Pereira, E. Hatanaka, E. F. Martins, F. Oliveira, E. A. Liberti, S. H. Farsky, R. Curi, T. C. Pithon-Curi, "Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats," *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, vol. 26, no. 2, pp. 197–204, 2008.
- [117] M. Gilmore, "Phases of wound healing.," *Dimensions in oncology nursing: journal of the Division of Nursing*, vol. 5, no. 3, pp. 32–34, 1991.
- [118] N. N. Nissen, P. Polverini, A. E. Koch, M. V. Volin, R. L. Gamelli, L. A. DiPietro, "Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing.," *The American journal of pathology*, vol. 152, no. 6, p. 1445, 1998.
- [119] S. Ghatak, E. V. Maytin, J. A. Mack, V. C. Hascall, I. Atanelishvili, R. Moreno Rodriguez, R. R. Markwald, S. Misra, "Roles of proteoglycans and glycosaminoglycans in wound healing and fibrosis," *International journal of cell biology*, vol. 2015, 2015.
- [120] F. Maquart, J. Monboisse, "Extracellular matrix and wound healing," *Pathologie Biologie*, vol. 62, no. 2, pp. 91–95, 2014.
- [121] S. K. Raja, M. S. Garcia, R. R. Isseroff, "Wound re-epithelialization: Modulating keratinocyte migration in wound healing," *Front Biosci*, vol. 12, no. 3, pp. 2849–2868, 2007.
- [122] I. Pastar, O. Stojadinovic, N. C. Yin, H. Ramirez, A. G. Nusbaum, A. Sawaya, S. B. Patel, L. Khalid, R. R. Isseroff, M. Tomic-Canic, "Epithelialization in wound healing: A comprehensive review," *Advances in wound care*, vol. 3, no. 7, pp. 445–464, 2014.
- [123] J. Li, J. Chen, R. Kirsner, "Pathophysiology of acute wound healing," *Clinics in dermatology*, vol. 25, no. 1, pp. 9–18, 2007.
- [124] Y. Yamaguchi, K. Yoshikawa, "Cutaneous wound healing: An update," *The Journal of dermatology*, vol. 28, no. 10, pp. 521–534, 2001.
- [125] A. Kawasumi, N. Sagawa, S. Hayashi, H. Yokoyama, K. Tamura, "Wound healing in mammals and amphibians: Toward limb regeneration in mammals," *New Perspectives in Regeneration*, pp. 33–49, 2012.
- [126] V. J. Jones, "The use of gauze: Will it ever change?" *International wound journal*, vol. 3, no. 2, pp. 79–88, 2006.
- [127] C. Daunton, S. Kothari, L. Smith, D. Steele, *et al.*, "A history of materials and practices for wound management," *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, vol. 20, no. 4, p. 174, 2012.
- [128] G. H. Gomez-Rodriguez, M. A. Lopez-Mata, E. Valbuena-Gregorio, R. G. Melchor, J. C. Campos-Garcia, N. P. Silva-Beltran, L. Quihui-Cota, S. Ruiz-Cruz, J. Juarez, "Microencapsulation of carvacrol using pectin/aloe-gel as a novel wound dressing films," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 18, no. 14, pp. 1261–1268, 2018.
- [129] A. Ahmed, J. Boateng, "Calcium alginate-based antimicrobial film dressings for potential healing of infected foot ulcers," *Therapeutic delivery*, vol. 9, no. 3, pp. 185–204, 2018.

- [130] R. Dutra, G. Salomé, L. Leal, M. Alves, J. Moura, A. Silva, V. Pereira, M. de Brito, L. M. Ferreira, "Cost comparison of pressure ulcer preventive dressings: Hydrocolloid dressing versus transparent polyurethane film," *Journal of wound care*, vol. 25, no. 11, pp. 635–640, 2016.
- [131] R. Andrew Heenan, "Frequently asked questions: Hydrocolloid dressings,"
- [132] M. Liang, Z. Chen, F. Wang, L. Liu, R. Wei, M. Zhang, "Preparation of self-regulating/anti-adhesive hydrogels and their ability to promote healing in burn wounds," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 107, no. 5, pp. 1471–1482, 2019.
- [133] C. Weller, "4 - interactive dressings and their role in moist wound management," in *Advanced Textiles for Wound Care*, ser. Woodhead Publishing Series in Textiles, S. Rajendran, Ed., Woodhead Publishing, 2009, pp. 97–113, ISBN: 978-1-84569-271-1. DOI: <https://doi.org/10.1533/9781845696306.1.97>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845692711500042>.
- [134] M. Sanchez-García, "21 - carrageenan polysaccharides for food packaging," in *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging*, J.-M. Lagarón, Ed., Woodhead Publishing, 2011, pp. 594–609, ISBN: 978-1-84569-738-9. DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857092786.4.594>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845697389500215>.
- [135] B. Tighe, A. Mann, "11 - adhesives and interfacial phenomena in wound healing," in *Advanced Wound Repair Therapies*, ser. Woodhead Publishing Series in Biomaterials, D. Farrar, Ed., Woodhead Publishing, 2011, pp. 247–283, ISBN: 978-1-84569-700-6. DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857093301.2.247>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845697006500103>.
- [136] D. Chakravarthy, N. Rodway, S. Schmidt, D. Smith, M. Evancho, R. Sims, "Evaluation of three new hydrocolloid dressings: Retention of dressing integrity and biodegradability of absorbent components attenuate inflammation," *Journal of biomedical materials research*, vol. 28, no. 10, pp. 1165–1173, 1994.
- [137] M. Brown-Etris, C. Milne, H. Orsted, J. L. Gates, D. Netsch, M. Punchello, N. Couture, M. Albert, E. Attrell, J. Freyberg, "A prospective, randomized, multisite clinical evaluation of a transparent absorbent acrylic dressing and a hydrocolloid dressing in the management of stage II and shallow stage III pressure ulcers," *Advances in skin & wound care*, vol. 21, no. 4, pp. 169–174, 2008.
- [138] F. S. Pott, M. J. Meier, J. G. D. Stocco, K. Crozeta, J. D. Ribas, "The effectiveness of hydrocolloid dressings versus other dressings in the healing of pressure ulcers in adults and older adults: A systematic review and meta-analysis," *Revista latino-americana de enfermagem*, vol. 22, no. 3, pp. 511–520, 2014.
- [139] B. A. Aderibigbe, B. Buyana, "Alginate in wound dressings," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 2, p. 42, 2018.

- [140] K. Varaprasad, T. Jayaramudu, V. Kanikireddy, C. Toro, E. R. Sadiku, "Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review," *Carbohydrate polymers*, vol. 236, p. 116 025, 2020.
- [141] W. Wang, R. Narain, H. Zeng, "Chapter 10 - hydrogels," in *Polymer Science and Nanotechnology*, R. Narain, Ed., Elsevier, 2020, pp. 203–244, ISBN: 978-0-12-816806-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00010-8>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128168066000108>.
- [142] N. A. Peppas, A. S. Hoffman, "1.3.2e - hydrogels," in *Biomaterials Science (Fourth Edition)*, W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, M. J. Yaszemski, Eds., Fourth Edition, Academic Press, 2020, pp. 153–166, ISBN: 978-0-12-816137-1. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00014-3>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128161371000143>.
- [143] S. Tavakoli, A. S. Klar, "Advanced hydrogels as wound dressings," *Biomolecules*, vol. 10, no. 8, p. 1169, 2020.
- [144] Z. Pan, H. Ye, D. Wu, "Recent advances on polymeric hydrogels as wound dressings," *APL bioengineering*, vol. 5, no. 1, p. 011 504, 2021.
- [145] A. Gupta, M. Kowalczyk, W. Heaselgrave, S. T. Britland, C. Martin, I. Radecka, "The production and application of hydrogels for wound management: A review," *European Polymer Journal*, vol. 111, pp. 134–151, 2019.
- [146] J. Nielsen, K. Fogh, "Clinical utility of foam dressings in wound management: A review," *Chronic Wound Care Management and Research*, vol. 2, pp. 31–38, 2015.
- [147] L. Atkin, J. Stephenson, S. Bateman, "Foam dressings: A review of the literature and evaluation of fluid-handling capacity of four leading foam dressings," *Wounds UK*, vol. 11, no. 1, pp. 75–81, 2015.
- [148] R. White *et al.*, "Evidence for atraumatic soft silicone wound dressing use," *Wounds uK*, vol. 1, no. 3, pp. 104–9, 2005.
- [149] C. W. P. Li-Tsang, Y. P. Zheng, J. C. Lau, "A randomized clinical trial to study the effect of silicone gel dressing and pressure therapy on posttraumatic hypertrophic scars," *Journal of Burn Care & Research*, vol. 31, no. 3, pp. 448–457, 2010.
- [150] F. Meuleneire, "A case study evaluation of safetac® dressings used for paediatric wounds," *Wounds*, vol. 5, pp. 12–9, 2009.
- [151] D. Simões, S. P. Miguel, M. P. Ribeiro, P. Coutinho, A. G. Mendonça, I. J. Correia, "Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 127, pp. 130–141, 2018.
- [152] O. Sarheed, A. Ahmed, D. Shouqair, J. Boateng, "Antimicrobial dressings for improving wound healing," *Wound Healing-New Insights into Ancient Challenges; Alexandrescu, V., Ed*, pp. 373–398, 2016.
- [153] T. S. Stashak, E. Farstvedt, A. Othic, "Update on wound dressings: Indications and best use," *Clinical Techniques in Equine Practice*, vol. 3, no. 2, pp. 148–163, 2004.

- [154] P. Zahedi, I. Rezaeian, S.-O. Ranaei-Siadat, S.-H. Jafari, P. Supaphol, "A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 21, no. 2, pp. 77–95, 2010.
- [155] P. H. d. S. Smaniotto, M. C. Ferreira, C. Isaac, R. Galli, "Systematization of dressings for clinical treatment of wounds," *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, vol. 27, pp. 623–626, 2012.
- [156] C. Hansson, "Interactive wound dressings," *Drugs & aging*, vol. 11, no. 4, pp. 271–284, 1997.
- [157] S.-K. Han, "Interactive wound dressings," in *Innovations and Advances in Wound Healing*, Springer, 2016, pp. 39–61.
- [158] C. D. Weller, V. Team, G. Sussman, "First-line interactive wound dressing update: A comprehensive review of the evidence," *Frontiers in pharmacology*, vol. 11, p. 155, 2020.
- [159] G. Schoukens, "Bioactive dressings to promote wound healing," in *Advanced textiles for wound care*, Elsevier, 2009, pp. 114–152.
- [160] G. Schoukens, "Bioactive dressings to promote wound healing," in *Advanced Textiles for Wound Care*, Elsevier, 2019, pp. 135–167.
- [161] A. Sood, M. S. Granick, N. L. Tomaselli, "Wound dressings and comparative effectiveness data," *Advances in wound care*, vol. 3, no. 8, pp. 511–529, 2014.
- [162] D. Brett, "A review of collagen and collagen-based wound dressings," *Wounds*, vol. 20, no. 12, pp. 347–356, 2008.
- [163] Y. Barnea, J. Weiss, E. Gur, "A review of the applications of the hydrofiber dressing with silver (aquacel ag®) in wound care," *Therapeutics and clinical risk management*, vol. 6, p. 21, 2010.
- [164] R. Saini, S. Saini, S. Sharma, "Nanotechnology: The future medicine," *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, vol. 3, no. 1, p. 32, 2010.
- [165] A. V. Singh, D. Gemmati, A. Kanase, I. Pandey, V. Misra, V. Kishore, T. Jahnke, J. Bill, "Nanobiomaterials for vascular biology and wound management: A review," *Veins and Lymphatics*, vol. 7, no. 2, 2018.
- [166] M. A. Sylvester, F. Amini, C. K. Tan, "Electrospun nanofibers in wound healing," *Materials Today: Proceedings*, vol. 29, pp. 1–6, 2020, 4th Advanced Materials Conference 2018, 4th AMC 2018, 27th 28th November 2018, Hilton Kuching Hotel, Kuching, Sarawak, Malaysia AMC2018 Publication Committee members, ISSN: 2214-7853. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.686>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221478532034298X>.
- [167] W. Wang, K.-j. Lu, C.-h. Yu, Q.-l. Huang, Y.-Z. Du, "Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration," *Journal of nanobiotechnology*, vol. 17, no. 1, pp. 1–15, 2019.
- [168] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S. K. Bannerjee, "Drug delivery systems: An updated review," *International journal of pharmaceutical investigation*, vol. 2, no. 1, p. 2, 2012.
- [169] V. K. Devi, N. Jain, K. S. Valli, "Importance of novel drug delivery systems in herbal medicines," *Pharmacognosy reviews*, vol. 4, no. 7, p. 27, 2010.

- [170] I. Garcia-Orue, G. Gainza, S. Villullas, J. L. Pedraz, R. M. Hernandez, M. Igartua, "Nanotechnology approaches for skin wound regeneration using drug-delivery systems," in *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*, Elsevier, 2016, pp. 31–55.
- [171] I. Tocco, B. Zavan, F. Bassetto, V. Vindigni, "Nanotechnology-based therapies for skin wound regeneration," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2012, 2012.
- [172] G. Gainza, S. Villullas, J. L. Pedraz, R. M. Hernandez, M. Igartua, "Advances in drug delivery systems (ddss) to release growth factors for wound healing and skin regeneration," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 11, no. 6, pp. 1551–1573, 2015.
- [173] A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.
- [174] E. Vunain, A. Mishra, B. Mamba, "Fundamentals of chitosan for biomedical applications," in *Chitosan Based Biomaterials Volume 1*, Elsevier, 2017, pp. 3–30.
- [175] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, E. Chiellini, "Chitosan—a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications," *Progress in polymer science*, vol. 36, no. 8, pp. 981–1014, 2011.
- [176] R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S. V. Nair, H. Tamura, "Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—a short review," *Carbohydrate polymers*, vol. 82, no. 2, pp. 227–232, 2010.
- [177] Y. Okamoto, K. Kawakami, K. Miyatake, M. Morimoto, Y. Shigemasa, S. Minami, "Analgesic effects of chitin and chitosan," *Carbohydrate polymers*, vol. 49, no. 3, pp. 249–252, 2002.
- [178] B. Hou, M. Qi, J. Sun, M. Ai, X. Ma, W. Cai, Y. Zhou, L. Ni, J. Hu, F. Xu, *et al.*, "Preparation, characterization and wound healing effect of vaccarin-chitosan nanoparticles," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 165, pp. 3169–3179, 2020.
- [179] S. S. Biranje, P. V. Madiwale, K. C. Patankar, R. Chhabra, P. Dandekar-Jain, R. V. Adivarekar, "Hemostasis and anti-necrotic activity of wound-healing dressing containing chitosan nanoparticles," *International journal of biological macromolecules*, vol. 121, pp. 936–946, 2019.
- [180] M. Basha, M. M. AbouSamra, G. A. Awad, S. S. Mansy, "A potential antibacterial wound dressing of cefadroxil chitosan nanoparticles in situ gel: Fabrication, in vitro optimization and in vivo evaluation," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 544, no. 1, pp. 129–140, 2018.
- [181] B. Veleirinho, D. S. Coelho, P. F. Dias, M. Maraschin, R. M. Ribeiro-do-Valle, J. A. Lopes-da-Silva, "Nanofibrous poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration," *International journal of biological macromolecules*, vol. 51, no. 4, pp. 343–350, 2012.
- [182] D. H. Reneker, A. L. Yarin, "Electrospinning jets and polymer nanofibers," *Polymer*, vol. 49, no. 10, pp. 2387–2425, 2008.

- [183] W. Lu, J. Sun, X. Jiang, "Recent advances in electrospinning technology and biomedical applications of electrospun fibers," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, no. 17, pp. 2369–2380, 2014.
- [184] D. Li, Y. Wang, Y. Xia, "Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films," *Advanced materials*, vol. 16, no. 4, pp. 361–366, 2004.
- [185] A. Y. Nuryantini, M. M. Munir, M. P. Ekaputra, T. Suciati, K. Khairurrijal, "Electrospinning of poly (vinyl alcohol)/chitosan via multi-nozzle spinneret and drum collector," in *Advanced Materials Research*, Trans Tech Publ, vol. 896, 2014, pp. 41–44.
- [186] C. Wang, L. Wang, M. Wang, "Evolution of core-shell structure: From emulsions to ultrafine emulsion electrospun fibers," *Materials Letters*, vol. 124, pp. 192–196, 2014.
- [187] B. Veleirinho, M. F. Rei, J. Lopes-DA-Silva, "Solvent and concentration effects on the properties of electrospun poly (ethylene terephthalate) nanofiber mats," *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 46, no. 5, pp. 460–471, 2008.
- [188] J. Lopes-da-Silva, B. Veleirinho, I. Delgadillo, "Preparation and characterization of electrospun mats made of pet/chitosan hybrid nanofibers," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 9, no. 6, pp. 3798–3804, 2009.
- [189] B. Veleirinho, F. V. Berti, P. F. Dias, M. Maraschin, R. M. Ribeiro-do-Valle, J. A. Lopes-da-Silva, "Manipulation of chemical composition and architecture of non-biodegradable poly (ethylene terephthalate)/chitosan fibrous scaffolds and their effects on 1929 cell behavior," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, no. 1, pp. 37–46, 2013.
- [190] B. Veleirinho, R. Ribeiro-do-Valle, J. Lopes-da-Silva, "Processing conditions and characterization of novel electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/chitosan blend fibers," *Materials Letters*, vol. 65, no. 14, pp. 2216–2219, 2011.
- [191] M. Abrigo, S. L. McArthur, P. Kingshott, "Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: Advances, challenges, and future prospects," *Macromolecular bioscience*, vol. 14, no. 6, pp. 772–792, 2014.
- [192] I.-C. Liao, K. W. Leong, "Efficacy of engineered fviii-producing skeletal muscle enhanced by growth factor-releasing co-axial electrospun fibers," *Biomaterials*, vol. 32, no. 6, pp. 1669–1677, 2011.
- [193] H. Nie, B. W. Soh, Y.-C. Fu, C.-H. Wang, "Three-dimensional fibrous plga/hap composite scaffold for bmp-2 delivery," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 99, no. 1, pp. 223–234, 2008.
- [194] L. Lao, Y. Zhu, Y. Zhang, Z. Gao, F. Zhou, L. Chen, H. Ouyang, C. Gao, "Mineralization of collagen-coated electrospun poly (lactide-co-glycolide) nanofibrous mesh to enhance growth and differentiation of osteoblasts and bone marrow mesenchymal stem cells," *Advanced Engineering Materials*, vol. 14, no. 4, B123–B137, 2012.

- [195] V. Leung, R. Hartwell, H. Yang, A. Ghahary, F. Ko, "Bioactive nanofibres for wound healing applications," *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, vol. 4, no. 1, pp. 1–14, 2011.
- [196] M. Rafiq, T. Hussain, S. Abid, A. Nazir, R. Masood, "Development of sodium alginate/pva antibacterial nanofibers by the incorporation of essential oils," *Materials Research Express*, vol. 5, no. 3, p. 035 007, 2018.
- [197] Y. Tang, Y. Zhou, X. Lan, D. Huang, T. Luo, J. Ji, Z. Mafang, X. Miao, H. Wang, W. Wang, "Electrospun gelatin nanofibers encapsulated with peppermint and chamomile essential oils as potential edible packaging," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 67, no. 8, pp. 2227–2234, 2019.
- [198] B. Azimi, P. Nourpanah, M. Rabiee, S. Arbab, "Poly (ϵ -caprolactone) fiber: An overview," *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, vol. 9, no. 3, p. 155 892 501 400 900 309, 2014.
- [199] M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, "The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century," *Progress in polymer science*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, 2010.
- [200] F. Croisier, A.-S. Duwez, C. Jérôme, A. Léonard, K. Van Der Werf, P. J. Dijkstra, M. L. Bennink, "Mechanical testing of electrospun pcl fibers," *Acta biomaterialia*, vol. 8, no. 1, pp. 218–224, 2012.
- [201] S. Shao, L. Li, G. Yang, J. Li, C. Luo, T. Gong, S. Zhou, "Controlled green tea polyphenols release from electrospun pcl/mwcnts composite nanofibers," *International journal of pharmaceutics*, vol. 421, no. 2, pp. 310–320, 2011.
- [202] Z. Karami, I. Rezaeian, P. Zahedi, M. Abdollahi, "Preparation and performance evaluations of electrospun poly (ϵ -caprolactone), poly (lactic acid), and their hybrid (50/50) nanofibrous mats containing thymol as an herbal drug for effective wound healing," *Journal of applied polymer science*, vol. 129, no. 2, pp. 756–766, 2013.
- [203] S. Amiri, A. Rahimi, "Poly (ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers containing cinnamon essential oil nanocapsules: A promising technique for controlled release and high solubility," *Journal of Industrial Textiles*, vol. 48, no. 10, pp. 1527–1544, 2019.
- [204] H. Bahrami, S. H. Keshel, A. J. Chari, E. Biazar, "Human unrestricted somatic stem cells loaded in nanofibrous pcl scaffold and their healing effect on skin defects," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, vol. 44, no. 6, pp. 1556–1560, 2016.
- [205] A. D. Pinzón-García, P. Cassini-Vieira, C. C. Ribeiro, C. E. de Matos Jensen, L. S. Barcelos, M. E. Cortes, R. D. Sinisterra, "Efficient cutaneous wound healing using bixin-loaded pcl nanofibers in diabetic mice," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 105, no. 7, pp. 1938–1949, 2017.
- [206] M. Piran, S. Vakilian, M. Piran, A. Mohammadi-Sangcheshmeh, S. Hosseinzadeh, A. Ardeshirylajimi, "In vitro fibroblast migration by sustained release of pdgf-bb loaded in chitosan nanoparticles incorporated in electrospun nanofibers for wound dressing applications," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, vol. 46, no. sup1, pp. 511–520, 2018.

- [207] S.-M. Jung, G. H. Yoon, H. C. Lee, H. S. Shin, "Chitosan nanoparticle/pcl nanofiber composite for wound dressing and drug delivery," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 26, no. 4, pp. 252–263, 2015.
- [208] M. Zahiri, M. Khanmohammadi, A. Goodarzi, S. Ababzadeh, M. S. Farahani, S. Mohandesnezhad, N. Bahrami, I. Nabipour, J. Ai, "Encapsulation of curcumin loaded chitosan nanoparticle within poly (ϵ -caprolactone) and gelatin fiber mat for wound healing and layered dermal reconstitution," *International journal of biological macromolecules*, vol. 153, pp. 1241–1250, 2020.
- [209] R. Raina, S. Parwez, P. Verma, N. Pankaj, *et al.*, "Medicinal plants and their role in wound healing," *Online Veterinary J*, vol. 3, no. 1, p. 21, 2008.
- [210] B. P. Nagori, R. Solanki, "Role of medicinal plants in wound healing," *Research Journal of Medicinal Plant*, vol. 5, no. 4, pp. 392–405, 2011.
- [211] A. Budovsky, L. Yarmolinsky, S. Ben-Shabat, "Effect of medicinal plants on wound healing," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 23, no. 2, pp. 171–183, 2015.
- [212] V. Stankov-Jovanović, A. Šmelcerović, M. Smiljić, M. Ilić, M. Marković, "Ethnopharmacological application of st. john's wort in pirot county," *Pirotski zbornik*, no. 43, pp. 141–164, 2018.
- [213] N. Galeotti, "Hypericum perforatum (st john's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 200, pp. 136–146, 2017.
- [214] M. Marrelli, G. Statti, F. Conforti, F. Menichini, "New potential pharmaceutical applications of hypericum species," *Mini reviews in medicinal chemistry*, vol. 16, no. 9, pp. 710–720, 2016.
- [215] D. Çin. (). "Sarı kantaron nedir? faydaları ve zararları nelerdir?" [Online]. Available: <https://www.birbes.com/sari-kantaron-nedir-faydalari-ve-zararlari-nelerdir-9380/>. (accessed: 24.06.2021).
- [216] Y.-P. Zou, Y.-H. Lu, D.-Z. Wei, "Protective effects of a flavonoid-rich extract of hypericum perforatum l. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells," *Phytotherapy research*, vol. 24, no. S1, S6–S10, 2010.
- [217] P. Avato, F. Raffo, G. Guglielmi, C. Vitali, A. Rosato, "Extracts from st john's wort and their antimicrobial activity," *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, vol. 18, no. 3, pp. 230–232, 2004.
- [218] S. Gibbons, B. Ohlendorf, I. Johnsen, "The genus hypericum—a valuable resource of anti-staphylococcal leads," *Fitoterapia*, vol. 73, no. 4, pp. 300–304, 2002.
- [219] J. Reuter, C. Huyke, H. Scheuven, M. Ploch, K. Neumann, T. Jakob, C. Schempp, "Skin tolerance of a new bath oil containing st. john's wort extract," *Skin pharmacology and physiology*, vol. 21, no. 6, pp. 306–311, 2008.
- [220] P. K. Mukherjee, R. Verpoorte, B. Suresh, "Evaluation of in-vivo wound healing activity of hypericum patulum (family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 70, no. 3, pp. 315–321, 2000.

- [221] F. C. Castro, A. Magre, R. Cherpinski, P. M. Zelante, L. M. Neves, M. A. Esquisatto, F. A. Mendonça, G. M. Santos, "Effects of microcurrent application alone or in combination with topical hypericum perforatum l. and arnica montana l. on surgically induced wound healing in wistar rats," *Homeopathy*, vol. 101, no. 3, pp. 147–153, 2012.
- [222] N. Öztürk, S. Korkmaz, Y. Öztürk, "Wound-healing activity of st. john's wort (hypericum perforatum l.) on chicken embryonic fibroblasts," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 111, no. 1, pp. 33–39, 2007.
- [223] S. Samadi, T. Khadivzadeh, A. Emami, N. S. Moosavi, M. Tafaghodi, H. R. Behnam, "The effect of hypericum perforatum on the wound healing and scar of cesarean," *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol. 16, no. 1, pp. 113–117, 2010.
- [224] A. I. Prisacaru, C. Andritoiu, C. Andriescu, E. Havarneanu, M. Popa, A. Motoc, A. Sava, "Evaluation of the wound-healing effect of a novel hypericum perforatum ointment in skin injury," *Rom J Morphol Embryol*, vol. 54, no. 4, pp. 1053–1059, 2013.
- [225] M. NAZIROĞLU, "Is hypericum perforatum agonist or antagonist of trpc6 in neurons?" *Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress*, vol. 8, no. 2, pp. 595–600, 2016.
- [226] H. Mollazadeh, S. A. Emami, H. Hosseinzadeh, "Razi's al-hawi and saffron (crocus sativus): A review," *Iranian journal of basic medical sciences*, vol. 18, no. 12, p. 1153, 2015.
- [227] R. Kumar, V. Singh, K. Devi, M. Sharma, M. Singh, P. S. Ahuja, "State of art of saffron (crocus sativus l.) agronomy: A comprehensive review," *Food Reviews International*, vol. 25, no. 1, pp. 44–85, 2008.
- [228] A. R. Khorasany, H. Hosseinzadeh, "Therapeutic effects of saffron (crocus sativus l.) in digestive disorders: A review," *Iranian journal of basic medical sciences*, vol. 19, no. 5, p. 455, 2016.
- [229] Anonim. (). "Safran yetiştiriciliği ile siz de kazanın," [Online]. Available: <https://www.yeniisfikirleri.net/safran-yetistiriciligi-ile-siz-de-kazanin/>. (accessed: 24.06.2021).
- [230] K. Bosio, C. Avanzini, A. D'avolio, O. Ozino, D. Savoia, "In vitro activity of propolis against streptococcus pyogenes," *Letters in applied microbiology*, vol. 31, no. 2, pp. 174–177, 2000.
- [231] A. K. Kuropatnicki, E. Szliszka, W. Krol, "Historical aspects of propolis research in modern times," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013.
- [232] M. Yaghoubi, G. Gh, R. Satari, *et al.*, "Antimicrobial activity of iranian propolis and its chemical composition," *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 15, no. 1, pp. 45–48, 2007.
- [233] S. Gavanji, B. Larki, "Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on candida albicans," *Chinese journal of integrative medicine*, vol. 23, no. 3, pp. 201–207, 2017.

- [234] A. M. F. Bezerra, K. K. S. Bezerra, F. G. F. Albuquerque, A. Fernandes Filho, G. S. Casimiro, E. M. Nunes, E. M. L. da Silva, W. K. T. Bezerra, P. B. de Almeida, T. L. M. de Araújo, *et al.*, “Red propolis antifungal action on species of candida of the oral cavity,” *International Archives of Medicine*, vol. 8, 2015.
- [235] T. T. Cushnie, A. J. Lamb, “Antimicrobial activity of flavonoids,” *International journal of antimicrobial agents*, vol. 26, no. 5, pp. 343–356, 2005.
- [236] Z. Qiao, R. Chen, “Isolation and identification of antibiotic constituents of propolis from henan,” *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao za-zhi= China journal of Chinese materia medica*, vol. 16, no. 8, pp. 481–2, 1991.
- [237] R. D. Wojtyczka, A. Dziedzic, D. Idzik, M. Kępa, R. Kubina, A. Kabała-Dzik, J. Smoleń-Dzirba, J. Stojko, M. Sajewicz, T. J. Wąsik, “Susceptibility of staphylococcus aureus clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs,” *Molecules*, vol. 18, no. 8, pp. 9623–9640, 2013.
- [238] Ż. Jastrzębska-Stojko, R. Stojko, A. Rzepecka-Stojko, A. Kabała-Dzik, J. Stojko, “Biological activity of propolis-honey balm in the treatment of experimentally-evoked burn wounds,” *Molecules*, vol. 18, no. 11, pp. 14397–14413, 2013.
- [239] M. Hoşnüter, A. Gürel, O. Babuççu, F. Armutcu, E. Kargi, A. Işıkdemir, “The effect of cape on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury,” *Burns*, vol. 30, no. 2, pp. 121–125, 2004.
- [240] G. Valenzuela-Barra, C. Castro, C. Figueroa, A. Barriga, X. Silva, B. de Las Heras, S. Hortelano, C. Delporte, “Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in región metropolitana de santiago, chile,” *Journal of ethnopharmacology*, vol. 168, pp. 37–44, 2015.
- [241] S. R. Gregory, N. Piccolo, M. T. Piccolo, M. S. Piccolo, J. P. Heggers, “Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: A naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns,” *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, vol. 8, no. 1, pp. 77–83, 2002.
- [242] C. Eyng, A. Murakami, T. Santos, T. Silveira, R. Pedroso, D. Lourenco, “Immune responses in broiler chicks fed propolis extraction residue-supplemented diets,” *Asian-Australasian journal of animal sciences*, vol. 28, no. 1, p. 135, 2015.
- [243] A. Kurek-Górecka, A. Rzepecka-Stojko, M. Górecki, J. Stojko, M. Sosada, G. Świerczek-Zięba, “Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis,” *Molecules*, vol. 19, no. 1, pp. 78–101, 2014.
- [244] A. G. T. Pessolato, D. dos Santos Martins, C. E. Ambrósio, C. A. F. Mançanares, A. F. de Carvalho, “Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats,” *Burns*, vol. 37, no. 7, pp. 1192–1201, 2011.
- [245] P. Olczyk, K. Komosinska-Vassev, K. Winsz-Szczotka, J. Stojko, K. Klimek, E. M. Kozma, “Propolis induces chondroitin/dermatan sulphate and hyaluronic acid accumulation in the skin of burned wound,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013.

- [246] H. Xuan, Z. Li, H. Yan, Q. Sang, K. Wang, Q. He, Y. Wang, F. Hu, "Antitumor activity of chinese propolis in human breast cancer mcf-7 and mda-mb-231 cells," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, 2014.
- [247] V. D. Wagh, "Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials," *Advances in pharmacological sciences*, vol. 2013, 2013.
- [248] A. Oryan, E. Alemzadeh, A. Moshiri, "Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 98, pp. 469–483, 2018.
- [249] P. R. Barroso, R. Lopes-Rocha, E. M. F. Pereira, S. A. Marinho, J. L. de Miranda, N. L. Lima, F. D. Verli, "Effect of propolis on mast cells in wound healing," *Inflammopharmacology*, vol. 20, no. 5, pp. 289–294, 2012.
- [250] C. Noli, A. Miolo, "The mast cell in wound healing," *Veterinary dermatology*, vol. 12, no. 6, pp. 303–313, 2001.
- [251] M. F. Ng, "The role of mast cells in wound healing," *International wound journal*, vol. 7, no. 1, pp. 55–61, 2010.
- [252] K. Weller, K. Foitzik, R. Paus, W. Syska, M. Maurer, K. Weller, K. Foitzik, R. Paus, W. Syska, M. Maurer, "Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice," *The FASEB journal*, vol. 20, no. 13, pp. 2366–2368, 2006.
- [253] L. Yang, T. M. Witten, R. M. Pidaparti, "A biomechanical model of wound contraction and scar formation," *Journal of theoretical biology*, vol. 332, pp. 228–248, 2013.
- [254] B. C. Wulff, A. E. Parent, M. A. Meleski, L. A. DiPietro, M. E. Schrementi, T. A. Wilgus, "Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, no. 2, pp. 458–465, 2012.
- [255] E. Schwartzfarb, R. S. Kirsner, "Understanding scarring: Scarless fetal wound healing as a model," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, no. 2, p. 260, 2012.
- [256] D. Shin, K. W. Minn, "The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar," *Plastic and reconstructive surgery*, vol. 113, no. 2, pp. 633–640, 2004.
- [257] L. Van De Water, S. Varney, J. J. Tomasek, "Mechanoregulation of the myofibroblast in wound contraction, scarring, and fibrosis: Opportunities for new therapeutic intervention," *Advances in wound care*, vol. 2, no. 4, pp. 122–141, 2013.
- [258] M. S. Cho, W. S. Park, W.-K. Jung, Z.-j. Qian, D.-S. Lee, J.-S. Choi, D.-Y. Lee, S.-G. Park, S.-K. Seo, H.-J. Kim, *et al.*, "Caffeic acid phenethyl ester promotes anti-inflammatory effects by inhibiting mapk and nf- κ b signaling in activated hmc-1 human mast cells," *Pharmaceutical Biology*, vol. 52, no. 7, pp. 926–932, 2014.
- [259] L. Chen, M. E. Schrementi, M. J. Ranzer, T. A. Wilgus, L. A. DiPietro, "Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, e85226, 2014.

- [260] M. A. Nader, "Caffeic acid phenethyl ester attenuates ige-induced immediate allergic reaction," *Inflammopharmacology*, vol. 21, no. 2, pp. 169–176, 2013.
- [261] R. Nakamura, R. Nakamura, K. Watanabe, K. Oka, S. Ohta, S. Mishima, R. Teshima, "Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis," *International immunopharmacology*, vol. 10, no. 9, pp. 1107–1112, 2010.
- [262] Y. Bae, S. Lee, S.-H. Kim, "Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: Involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ b," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 254, no. 1, pp. 56–64, 2011.
- [263] A. Oryan, A. Moshiri, "Tissue engineering: Alternative option in managing large and massive tissue deficits," *Trop Med Surg*, vol. 1, e101, 2013.
- [264] A. Oryan, A. T Naeini, B. Nikahval, E. Gorjia, "Effect of aqueous extract of aloe vera on experimental cutaneous wound healing in rat," *Veterinarski arhiv*, vol. 80, no. 4, pp. 509–522, 2010.
- [265] A. Oryan, S. Zaker, "Effects of topical application of honey on cutaneous wound healing in rabbits," *Journal of Veterinary Medicine Series A*, vol. 45, no. 1-10, pp. 181–188, 1998.
- [266] A. A. Berretta, A. P. Nascimento, P. C. P. Bueno, M. M. d. O. L. Leite, *et al.*, "Propolis standardized extract (epp-af®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 8, no. 4, p. 512, 2012.
- [267] S. A. L. d. Moura, G. Negri, A. Salatino, L. D. d. C. Lima, L. P. A. Dourado, J. B. Mendes, S. P. Andrade, M. A. N. D. Ferreira, D. C. Cara, "Aqueous extract of brazilian green propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, 2011.
- [268] L. L. V. Batista, E. A. Campesatto, M. L. B. d. Assis, A. P. F. Barbosa, L. A. M. Grillo, C. B. Dornelas, "Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats," *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, vol. 39, no. 6, pp. 515–520, 2012.
- [269] A. M. Abreu, D. W. D. Oliveira, S. A. Marinho, N. L. Lima, J. L. de Miranda, F. D. Verli, "Effect of topical application of different substances on fibroplasia in cutaneous surgical wounds," *International Scholarly Research Notices*, vol. 2012, 2012.
- [270] N. Takzaree, A. Hadjiakhondi, G. Hassanzadeh, M. R. Rouini, A. Manayi, "Synergistic effect of honey and propolis on cutaneous wound healing in rats," 2016.
- [271] A. M. Abu-Seida, "Effect of propolis on experimental cutaneous wound healing in dogs," *Veterinary medicine international*, vol. 2015, 2015.
- [272] J. Rnjak, S. G. Wise, S. M. Mithieux, A. S. Weiss, "Severe burn injuries and the role of elastin in the design of dermal substitutes," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 17, no. 2, pp. 81–91, 2011.

- [273] E. B. de Almeida, J. C. Cardoso, A. K. de LIMA, N. L. de Oliveira, N. T. de Pontes-Filho, S. O. Lima, I. C. L. Souza, R. L. C. de Albuquerque-Júnior, "The incorporation of brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 147, no. 2, pp. 419–425, 2013.
- [274] A. O. Emad T.Ahmed Osama M.Abo-Salem, "The influence of egyptian propolis on induced burn wound healing in diabetic rats; antibacterial mechanism," *Science Journal of Medicines and Clinical Trials*, pp. 1–8, 2011.
- [275] W. N. Hozzein, G. Badr, A. A. Al Ghamdi, A. Sayed, N. S. Al-Waili, O. Garraud, "Topical application of propolis enhances cutaneous wound healing by promoting tgf-beta/smad-mediated collagen production in a streptozotocin-induced type 1 diabetic mouse model," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 37, no. 3, pp. 940–954, 2015.
- [276] P. Olczyk, K. Komosińska-Vashev, K. Winsz-Szczotka, E. M. Koźma, G. Wisowski, J. Stojko, K. Klimek, K. Olczyk, "Propolis modulates vitronectin, laminin, and heparan sulfate/heparin expression during experimental burn healing," *Journal of Zhejiang University Science B*, vol. 13, no. 11, pp. 932–941, 2012.
- [277] P. Olczyk, K. Komosinska-Vassev, G. Wisowski, L. Mencner, J. Stojko, E. M. Kozma, "Propolis modulates fibronectin expression in the matrix of thermal injury," *BioMed research international*, vol. 2014, 2014.
- [278] T. Phan, S. Lee, L. Sun, I. Lim, S. Chan, B. Bay, E. Tan, "Quercetin inhibits fibronectin production by keloid-derived fibroblasts. implication for the treatment of excessive scars [6]," 2003.
- [279] Clinical, L. S. Institute. (). "Minimum inhibitory concentration (mic) and minimum bactericidal concentration (mbc) assay," [Online]. Available: <https://emerypharma.com/biology/minimum-inhibitory-concentration/>. (accessed: 25.06.2021).
- [280] M. Afifi, I. Eid, R. Zaher, H. Abd El-Karem, A. A. E. Karim, M. El-Nagdy, "Identification of radiation effects on carcinogenic food estimated by ames test," *Arab Journal of Nuclear Science and Applications*, vol. 49, no. 4, pp. 23–30, 2016.
- [281] S. Usmiati, N. Richana, D. Mangunwidjaja, E. Noor, E. Prangdimurti, "The using of ionic gelation method based on polysaccharides for encapsulating the macromolecules—a review," *Encapsulation Prot. Bioact. Compd*, vol. 67, pp. 79–84, 2014.
- [282] S. H. Alotaibi, A. A. Momen, "Anticancer drugs' deoxyribonucleic acid (dna) interactions," in *Biophysical Chemistry-Advance Applications*, IntechOpen, 2019.
- [283] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, "Drug–dna interactions and their study by uv–visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 124, pp. 1–19, 2013.
- [284] D. Gibson, *Drug–dna interactions and novel drug design*, 2002.
- [285] K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Drug-DNA interactions: structures and spectra*. John Wiley & Sons, 2008, vol. 51.

- [286] C. Katiyar, A. Gupta, S. Kanjilal, S. Katiyar, "Drug discovery from plant sources: An integrated approach," *Ayu*, vol. 33, no. 1, p. 10, 2012.
- [287] U. Anand, N. Jacobo-Herrera, A. Altemimi, N. Lakhssassi, "A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery," *Metabolites*, vol. 9, no. 11, p. 258, 2019.
- [288] I. Süntar, "Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: Role of medicinal plants," *Phytochemistry Reviews*, pp. 1–11, 2019.
- [289] M. Ashrafi, S. Bathaie, M. Taghikhani, A. Moosavi-Movahedi, "The effect of carotenoids obtained from saffron on histone h1 structure and h1–dna interaction," *International journal of biological macromolecules*, vol. 36, no. 4, pp. 246–252, 2005.
- [290] R. Hoshyar, S. Z. Bathaie, M. Ashrafi, "Interaction of safranal and picrocrocin with ctDNA and their preferential mechanisms of binding to GC- and AT-rich oligonucleotides," *DNA and cell biology*, vol. 27, no. 12, pp. 665–673, 2008.
- [291] C. D. Kanakis, P. A. Tarantilis, H.-A. Tajmir-Riahi, M. G. Polissiou, "DNA interaction with saffron's secondary metabolites safranal, crocetin, and dimethylcrocetin," *DNA and cell biology*, vol. 26, no. 1, pp. 63–70, 2007.
- [292] E. Azarhazin, M. Izadyar, M. R. Housaindokht, "Molecular dynamics simulation of crocin and dimethylcrocetin interactions with DNA," *Physical Chemistry Research*, vol. 6, no. 4, pp. 825–838, 2018.
- [293] H. Crlikova, H. Kostřhunova, J. Pracharova, M. Kozsup, S. Nagy, P. Buglyó, V. Brabec, J. Kasparkova, "Antiproliferative, DNA binding, and cleavage properties of dinuclear Co(III) complexes containing the bioactive quinizarin ligand," *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 25, no. 2, pp. 339–350, 2020.
- [294] J. Staničová, V. Verebová, J. Beneš, "Interaction of a potential anticancer agent hypericin and its model compound emodin with DNA and bovine serum albumin," *in vivo*, vol. 32, no. 5, pp. 1063–1070, 2018.
- [295] M. A. Kerr-Valentic, K. Samimi, B. H. Rohlen, J. P. Agarwal, W. B. Rockwell, "Marjolin's ulcer: Modern analysis of an ancient problem," *Plastic and reconstructive surgery*, vol. 123, no. 1, pp. 184–191, 2009.
- [296] A. M. Kanth, A. J. Heiman, L. Nair, A. Giammarino, C. Carpenter, J. A. Ricci, A. Patel, "Current trends in management of marjolin's ulcer: A systematic review," *Journal of Burn Care & Research*, vol. 42, no. 2, pp. 144–151, 2021.
- [297] M. A. Abdi, M. Yan, T. P. Hanna, "Systematic review of modern case series of squamous cell cancer arising in a chronic ulcer (marjolin's ulcer) of the skin," *JCO Global Oncology*, vol. 6, pp. 809–818, 2020.
- [298] B. Kawilarang, "Marjolin's ulcer: A malignant complication of burn wound," *Recent Adv Biol Med*, vol. 6, no. 1, p. 12034, 2020.
- [299] M. Huang, J.-J. Lu, J. Ding, "Natural products in cancer therapy: Past, present and future," *Natural Products and Bioprospecting*, pp. 1–9, 2021.
- [300] G. M. Cragg, J. M. Pezzuto, "Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents," *Medical Principles and Practice*, vol. 25, no. Suppl. 2, pp. 41–59, 2016.

- [301] B. Orlikova, M. Diederich, "Power from the garden: Plant compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer," *Current medicinal chemistry*, vol. 19, no. 14, pp. 2061–2087, 2012.
- [302] C. A. Dehelean, I. Marcovici, C. Soica, M. Mioc, D. Coricovac, S. Iurciuc, O. M. Cretu, I. Pinzaru, "Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy," *Molecules*, vol. 26, no. 4, p. 1109, 2021.
- [303] A. Amin, H. Gali-Muhtasib, M. Ocker, R. Schneider-Stock, "Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs," *International journal of biomedical science: IJBS*, vol. 5, no. 1, p. 1, 2009.
- [304] J. M. Pezzuto, "Plant-derived anticancer agents," *Biochemical pharmacology*, vol. 53, no. 2, pp. 121–133, 1997.
- [305] T. Khan, M. Ali, A. Khan, P. Nisar, S. A. Jan, S. Afridi, Z. K. Shinwari, "Anticancer plants: A review of the active phytochemicals, applications in animal models, and regulatory aspects," *Biomolecules*, vol. 10, no. 1, p. 47, 2020.
- [306] S. H. Kaufmann, P. W. Mesner, K. Samejima, S. Toné, W. C. Earnshaw, "[1] - detection of dna cleavage in apoptotic cells," in *Apoptosis*, ser. Methods in Enzymology, J. C. Reed, Ed., vol. 322, Academic Press, 2000, pp. 3–15. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)22003-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)22003-X). [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007668790022003X>.
- [307] H.-M. Eun, "4 - restriction endonucleases and modification methylases," in *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, H.-M. Eun, Ed., San Diego: Academic Press, 1996, pp. 233–306, ISBN: 978-0-12-243740-3. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012243740-3/50007-7>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780122437403500077>.
- [308] J. L. Nitiss, "Targeting dna topoisomerase α in cancer chemotherapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 5, pp. 338–350, 2009.
- [309] C. Kumar Jain, H. Kumar Majumder, S. Roychoudhury, "Natural compounds as anticancer agents targeting dna topoisomerases," *Current genomics*, vol. 18, no. 1, pp. 75–92, 2017.
- [310] H. Bakshi, S. Sam, R. Rozati, P. Sultan, T. Islam, B. Rathore, Z. Lone, M. Sharma, J. Tripathi, R. C. Saxena, "Dna fragmentation and cell cycle arrest: A hallmark of apoptosis induced by crocin from kashmiri saffron in a human pancreatic cancer cell line," *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 11, no. 3, pp. 675–679, 2010.
- [311] S. Sakr, O. Badr, H. Abd-Eltawab, "Ameliorative effect of saffron extract on mice bearing solid tumors," *ISESCO Journal of Science and Technology*, vol. 12, no. 22, pp. 60–70, 2011.
- [312] H. Hosseinzadeh, A. Abootorabi, H. R. Sadeghnia, "Protective effect of crocus sativus stigma extract and crocin (trans-crocin 4) on methyl methanesulfonate-induced dna damage in mice organs," *DNA and cell biology*, vol. 27, no. 12, pp. 657–664, 2008.

- [313] F. S. Kamali, R. Shahrooz, G. Najafi, M. Razi, "Ameliorative effects of crocin on paraquat-induced oxidative stress in testis of adult mice: An experimental study," *International Journal of Reproductive BioMedicine*, vol. 17, no. 11, p. 807, 2019.
- [314] S. D. Santos-Filho, R. M. Bernardo, K. Santos, A. S. Fonseca, M. Bernardo-Filho, "Influence of an aqueous extract of hypericum perforatum (hypericin) on the survival of escherichia coli ab1157 and on the electrophoretic mobility of pbsk plasmid dna," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, no. 3, pp. 326–330, 2008.
- [315] A. Vantieghem, Z. Assefa, P. Vandenabeele, W. Declercq, S. Courtois, J. R. Vandenheede, W. Merlevede, P. de Witte, P. Agostinis, "Hypericin-induced photosensitization of hela cells leads to apoptosis or necrosis: Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis," *FEBS letters*, vol. 440, no. 1-2, pp. 19–24, 1998.
- [316] G. Kizil, M. Kizil, B. Ceken, "Protective ability of ethanol extracts of hypericum scabroides robson & poulter and hypericum triquetrifolium turra against protein oxidation and dna damage," *Food Science and Biotechnology*, vol. 18, no. 1, pp. 130–136, 2009.
- [317] G. Kızıl, M. Kızıl, B. Çeken, M. Yavuz, H. Demir, "Protective ability of ethanol extracts of hypericum scabrum l. and hypericum retusum aucher against the protein oxidation and dna damage," *International Journal of Food Properties*, vol. 14, no. 4, pp. 926–940, 2011.
- [318] M. Gholivand, S. Kashanian, H. Peyman, "Dna-binding, dna cleavage and cytotoxicity studies of two anthraquinone derivatives," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 87, pp. 232–240, 2012.
- [319] W.-Y. Li, R. Y.-K. Chan, P. H.-F. Yu, S.-W. Chan, "Emodin induces cytotoxic effect in human breast carcinoma mcf-7 cell through modulating the expression of apoptosis-related genes," *Pharmaceutical biology*, vol. 51, no. 9, pp. 1175–1181, 2013.
- [320] S. Akyol, Y. Yukselten, O. Cakmak, V. Ugurcu, A. Altuntas, M. Gurler, O. Akyol, K. Demircan, "Hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human chondrocytes: The prophylactic effects of hypericum perforatum linn extract on deoxyribonucleic acid damage, apoptosis and matrix remodeling by a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs proteinases," 2014.
- [321] J.-y. Xing, G.-p. Song, J.-p. Deng, L.-z. Jiang, P. Xiong, B.-j. Yang, S.-s. Liu, "Antitumor effects and mechanism of novel emodin rhamnoside derivatives against human cancer cells in vitro," *PLoS One*, vol. 10, no. 12, e0144781, 2015.
- [322] M. Boga, A. Ertas, E. Eroglu-Ozkan, M. Kizil, B. Ceken, G. Topcu, "Phytochemical analysis, antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase and dna protective effects of hypericum capitatum var. capitatum extracts," *South African Journal of Botany*, vol. 104, pp. 249–257, 2016.

- [323] N. Sekeroglu, E. Urlu, M. Kulak, S. Gezici, R. Dang, "Variation in total polyphenolic contents, dna protective potential and antioxidant capacity from aqueous and ethanol extracts in different plant parts of hypericum perforatum l," *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol. 51, pp. 1–7, 2017.
- [324] N. Sekeroglu, M. Karaoglan, S. Gezici, M. Kulak, F. Ozkutlu, O. Kacar, F. Gul, "Variation in the composition of the essential oils, hypericin and mineral elements in aerial parts, stem and flower of hypericum capitatum (choisy) growing in turkey with oxidative dna damage protective activity," *Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 17, no. 2, pp. 67–77, 2018.
- [325] İ. Kurt-Celep, E. Celep, S. Akyüz, Y. İnan, T. H. Barak, G. Akaydın, D. Telci, E. Yesilada, "Hypericum olympicum l. recovers dna damage and prevents mmp–9 activation induced by uvb in human dermal fibroblasts," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 246, p. 112 202, 2020.
- [326] A. P. Bazo, M. A. M. Rodrigues, J. M. Sforcin, J. L. V. de Camargo, L. R. Ribeiro, D. M. F. Salvadori, "Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis," *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, vol. 22, no. 3, pp. 183–194, 2002.
- [327] Y. Aliyazicioglu, S. Demir, I. Turan, T. N. Cakiroglu, I. Akalin, O. Deger, A. Bedir, "Preventive and protective effects of turkish propolis on h 2 o 2-induced dna damage in foreskin fibroblast cell lines," *Acta Biologica Hungarica*, vol. 62, no. 4, pp. 388–396, 2011.
- [328] M. Tartik, E. Darendelioglu, G. Aykutoglu, G. Baydas, "Turkish propolis supresses mcf-7 cell death induced by homocysteine," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 82, pp. 704–712, 2016.
- [329] C. Baskan, D. D. Kiliç, B. Siriken, "Determination of antibacterial and dna damage inhibitory activities of propolis extract from ızmir of turkey," *Asian Journal of Biology*, pp. 1–5, 2018.
- [330] C. O. da Silva Frozza, D. A. Santos, L. C. Rufatto, L. Minetto, F. J. Scariot, S. Echeverrigaray, C. T. Pich, S. Moura, F. F. Padilha, S. Borsuk, *et al.*, "Antitumor activity of brazilian red propolis fractions against hep-2 cancer cell line," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 91, pp. 951–963, 2017.
- [331] C. O. Yalcin, Y. Aliyazicioglu, S. Demir, I. Turan, Z. Bahat, S. Misir, O. Deger, *et al.*, "Evaluation of the radioprotective effect of turkish propolis on foreskin fibroblast cells," *Journal of cancer research and therapeutics*, vol. 12, no. 2, p. 990, 2016.
- [332] G. Acar, N. M. Dogan, M. E. Duru, I. Kivrak, "Phenolic profiles, antimicrobial and antioxidant activity of the various extracts of crocus species in anatolia," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 4, no. 11, pp. 1154–1161, 2010.
- [333] J. Asgarpanah, E. Darabi-Mahboub, A. Mahboubi, R. Mehrab, M. Hakemivala, "In-vitro evaluation of crocus sativus l. petals and stamens as natural antibacterial agents against food-borne bacterial strains," *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 9, no. 4, pp. 69–82, 2013.

- [334] J. A. Parray, A. N. Kamili, R. Hamid, Z. A. Reshi, R. A. Qadri, "Antibacterial and antioxidant activity of methanol extracts of crocus sativus l. cv. kashmirianus," *Frontiers in Life Science*, vol. 8, no. 1, pp. 40–46, 2015.
- [335] S. Muzaffar, S. A. Rather, K. Z. Khan, "In vitro bactericidal and fungicidal activities of various extracts of saffron (crocus sativus l.) stigmas from jammu & kashmir, india," *Cogent Food & Agriculture*, vol. 2, no. 1, p. 1158999, 2016.
- [336] A. Shadmehri, N. Farideh, M. Hamidreza, Y. Parichehre, N. Mahboobeh, "Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activities of crocus sativus petal extract," *International Journal of Research in Applied and Basic Medical Sciences*, vol. 5, no. 1, pp. 69–76, 2019.
- [337] N. Jomehpour, K. Ghazvini, M. Jomehpour, "Antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of crocus sativus stigma and cinnamomum cassia against clinical isolates of some gram-positive and gram-negative pathogenic bacteria," *Medical Laboratory Journal*, vol. 13, no. 3, pp. 31–34, 2019.
- [338] A. JAFARI-SALES, M. PASHAZADEH, "Antibacterial effect of methanolic extract of saffron petal (crocus sativus l.) on some standard gram positive and gram negative pathogenic bacteria in vitro," *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants (CUPMAP)*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2020.
- [339] A. F. Wali, H. A. A. Alchamat, H. K. Hariri, B. K. Hariri, G. A. Menezes, U. Zehra, M. U. Rehman, P. Ahmad, "Antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and cytotoxic activity of crocus sativus l. petals," *Applied Sciences*, vol. 10, no. 4, p. 1519, 2020.
- [340] M. Esmaeelian, M. Jahani, S. Einafshar, J. Feizy, "Optimization of experimental parameters in subcritical water extraction of bioactive constituents from the saffron (crocus sativus l.) corm based on response surface methodology," *Journal of Food Measurement and Characterization*, pp. 1–11, 2020.
- [341] S. Zara, G. L. Petretto, A. Mannu, G. Zara, M. Budroni, I. Mannazzu, C. Multineddu, G. Pintore, F. Fancello, "Antimicrobial activity and chemical characterization of a non-polar extract of saffron stamens in food matrix," *Foods*, vol. 10, no. 4, p. 703, 2021.
- [342] R. Rabanal, A. Arias, B. Prado, M. Hernández-Pérez, C. Sánchez-Mateo, "Antimicrobial studies on three species of hypericum from the canary islands," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 81, no. 2, pp. 287–292, 2002.
- [343] L. Pistelli, A. Bertoli, I. Morelli, F. Menichini, R. A. Musmanno, T. D. Maggio, G. Coratza, "Chemical and antibacterial evaluation of hypericum triquetrefolium turra," *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, vol. 19, no. 9, pp. 787–791, 2005.
- [344] A. G. Pirbalouti, G. Rahnema, F. Malekpoor, H. R. Broujeni, "Variation in antibacterial activity and phenolic content of hypericum scabrum l. populations," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5, no. 17, pp. 4119–4125, 2011.

- [345] E. Maltas, A. Uysal, E. Yildiztugay, M. O. Aladag, S. Yildiz, M. Kucukoduk, *et al.*, "Investigation of antioxidant and antibacterial activities of some hypericum species," *Fresenius Environ Bull*, vol. 22, no. 3, pp. 862–869, 2013.
- [346] E. E. Özkan, N. Özsoy, G. Özhan, B. Ö. Çelik, A. Mat, "Chemical composition and biological activities of hypericum pamphylicum," *Industrial crops and products*, vol. 50, pp. 182–189, 2013.
- [347] I. Süntar, O. Oyardı, E. K. Akkol, B. Özçelik, "Antimicrobial effect of the extracts from hypericum perforatum against oral bacteria and biofilm formation," *Pharmaceutical biology*, vol. 54, no. 6, pp. 1065–1070, 2016.
- [348] E. E. ÖZKAN, B. Ö. ÇELİK, M. Afife, "Antimicrobial activities of five endemic hypericum species from anatolia compared with hypericum perforatum," *Marmara Pharm J.*, vol. 23, pp. 114–119, 2019.
- [349] M. N. Moreno, M. Isla, N. Cudmani, M. Vattuone, A. Sampietro, "Screening of antibacterial activity of amaicha del valle (tucumán, argentina) propolis," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 68, no. 1-3, pp. 97–102, 1999.
- [350] F. Santos, E. Bastos, M. Uzeda, M. Carvalho, L. Farias, E. Moreira, F. Braga, "Antibacterial activity of brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 80, no. 1, pp. 1–7, 2002.
- [351] M. Popova, S. Silici, O. Kaftanoglu, V. Bankova, "Antibacterial activity of turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition," *Phytomedicine*, vol. 12, no. 3, pp. 221–228, 2005.
- [352] R. M. Darwish, J. Ra'ed, M. H. A. Zarga, I. K. Nazer, "Antibacterial effect of jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria," *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 36, 2010.
- [353] A. TEMİZ, A. ŞENER, A. Ö. TÜYLÜ, K. Sorkun, B. SALİH, "Antibacterial activity of bee propolis samples from different geographical regions of turkey against two foodborne pathogens, salmonella enteritidis and listeria monocytogenes," *Turkish Journal of Biology*, vol. 35, no. 4, pp. 503–511, 2011.
- [354] F. Zeighampour, S. M. MOHAMMADI, E. Shams, N. S. Naghavi, "Antibacterial activity of propolis ethanol extract against antibiotic resistance bacteria isolated from burn wound infections," 2014.
- [355] T. Suleman, S. Van Vuuren, M. Sandasi, A. M. Viljoen, "Antimicrobial activity and chemometric modelling of south african propolis," *Journal of applied microbiology*, vol. 119, no. 4, pp. 981–990, 2015.
- [356] P. Ristivojević, I. Dimkić, J. Trifković, T. Berić, I. Vovk, D. Milojković-Opsenica, S. Stanković, "Antimicrobial activity of serbian propolis evaluated by means of mic, hptlc, bioautography and chemometrics," *PloS one*, vol. 11, no. 6, e0157097, 2016.
- [357] M. R. Neto, S. R. Tintino, A. R. P. da Silva, M. do Socorro Costa, A. A. Boligon, E. F. Matias, V. de Queiroz Balbino, I. R. Menezes, H. D. M. Coutinho, "Seasonal variation of brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 107, pp. 572–580, 2017.

- [358] Y.-W. Chen, S.-R. Ye, C. Ting, Y.-H. Yu, "Antibacterial activity of propolins from taiwanese green propolis," *journal of food and drug analysis*, vol. 26, no. 2, pp. 761–768, 2018.
- [359] F. Abdullaev, J. Espinosa-Aguirre, "Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials," *Cancer Detection and prevention*, vol. 28, no. 6, pp. 426–432, 2004.
- [360] J. M. Hernández, F. I. Abdullaev, H. Caballero-Ortega, L. Riverón-Negrete, I. Pérez-López, M. Medécigo-Rios, "Evaluation of the mutagenic and antimutagenic activities of saffron," in *I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650*, 2003, pp. 471–475.
- [361] L. Riverón-Negrete, R. Camacho-Carranza, H. Caballero-Ortega, J. M. Hernández, M. Medécigo-Rios, A. Castillo-Villanueva, I. Pérez-López, J. J. Espinosa-Aguirre, F. I. Abdullaev, "Additive inhibitory effect of saffron in combination with sodium selenite on tumor cells," *ACTA HORTICULTURAE.*, pp. 477–484, 2004.
- [362] V. Tolan, Z. Toker, S. Özdemir, Ö. Demirci, B. Otludil, H. Ç. Özen, "Mutagenicity of hypericum lysimachioides extracts," *Pharmaceutical Biology*, vol. 47, no. 11, pp. 1035–1041, 2009.
- [363] A. Bhatia, S. Arora, B. Singh, A. Nagpal, "Evaluation of in vitro antimutagenic activity of hypericum perforatum linn. in ames assay," *Pharmacologyonline*, vol. 1, pp. 167–175, 2010.
- [364] V. Tolan, Z. Toker, S. Özdemir, Ö. Demirci, B. Otludil, H. Özen, "Mutagenicity of hypericum lysimachioides extracts," *Pharmaceutical Biology*, vol. 47, pp. 1035–1041, Oct. 2009. DOI: 10.3109/13880200902973811.
- [365] G. Okmen, N. Balpınar, "The biological activities of hypericum perforatum l.," *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, vol. 14, no. 1, pp. 213–218, 2017.
- [366] R. Boran, A. Ugur, "The mutagenic, antimutagenic and antioxidant properties of hypericum lyidium," *Pharmaceutical biology*, vol. 55, no. 1, pp. 402–405, 2017.
- [367] R. Boran, "Investigations of anti-aging potential of hypericum organifolium willd. for skincare formulations," *Industrial Crops and Products*, vol. 118, pp. 290–295, 2018.
- [368] E. A. Varanda, R. Monti, D. C. Tavares, "Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct-and indirect-acting mutagens," *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, vol. 19, no. 6, pp. 403–413, 1999.
- [369] M. I. Nieva Moreno, I. C. Zampini, R. M. Ordóñez, G. S. Jaime, M. A. Vattuone, M. I. Isla, "Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from tucuman, argentina," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, no. 23, pp. 8957–8962, 2005.
- [370] I.-W. Jang, J.-S. Park, H.-C. Kwon, M.-Y. Jung, D.-S. Choi, "Antimutagenic and antibacterial activities of korean and american propolis," *Korean Journal of Food Science and Technology*, vol. 41, no. 6, pp. 694–699, 2009.

- [371] N. E. Bayram, M. KARADAYI, M. GÜLLÜCE, S. BAYRAM, K. SORKUN, Ö. Gül Cevahir, M. N. AYDOĞAN, T. Y. KOÇ, B. ALAYLAR, B. SALİH, "Genotoxic and antigenotoxic evaluation of propolis by using in vitro bacterial assay systems," *Mellifera*, vol. 15, no. 1, pp. 29–36, 2015.
- [372] L. K. Caesar, N. B. Cech, "Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1+ 1 does not equal 2," *Natural product reports*, vol. 36, no. 6, pp. 869–888, 2019.
- [373] S. Wang, K. A. Meckling, M. F. Marcone, Y. Kakuda, R. Tsao, "Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 59, no. 3, pp. 960–968, 2011.
- [374] E. R. Nedamani, A. S. Mahoonak, M. Ghorbani, M. Kashaninejad, "Evaluation of antioxidant interactions in combined extracts of green tea (*camellia sinensis*), rosemary (*rosmarinus officinalis*) and oak fruit (*quercus branti*)," *Journal of food science and technology*, vol. 52, no. 7, pp. 4565–4571, 2015.
- [375] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, H. Ni, "Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique," *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, vol. 90, pp. 21–27, 2012.
- [376] A. L. de Pinho Neves, C. C. Milioli, L. Müller, H. G. Riella, N. C. Kuhnen, H. K. Stulzer, "Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 445, pp. 34–39, 2014.
- [377] I. Khan, K. Saeed, I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 12, no. 7, pp. 908–931, 2019, ISSN: 1878-5352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535217300990>.
- [378] A. A. Manne, B. Arigela, A. K. Giduturi, R. K. Komaravolu, U. Mangamuri, S. Poda, "Pterocarpus marsupium roxburgh heartwood extract/chitosan nanoparticles loaded hydrogel as an innovative wound healing agent in the diabetic rat model," *Materials Today Communications*, vol. 26, p. 101916, 2021.
- [379] A. C. Egil, B. Ozdemir, B. Gok, S. Kecel-Gunduz, Y. Budama-Kilinc, "Synthesis, characterization, biological activities and molecular docking of epilobium parviflorum aqueous extract loaded chitosan nanoparticles," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 161, pp. 947–957, 2020.
- [380] J. U. Chandirika, R. Sindhu, S. Selvakumar, G. Annadurai, "Herbal extract encapsulated in chitosan nanoparticle: A novel strategy for the treatment of urolithiasis," *INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, vol. 5, no. 3, pp. 1955–1961, 2018.
- [381] S. B. da Silva, M. Amorim, P. Fonte, R. Madureira, D. Ferreira, M. Pintado, B. Sarmiento, "Natural extracts into chitosan nanocarriers for rosmarinic acid drug delivery," *Pharmaceutical biology*, vol. 53, no. 5, pp. 642–652, 2015.

- [382] R. Stoica, R. Şomoghi, R. Ion, "Preparation of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for the encapsulation of polyphenols extracted from rose hips.," *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, vol. 8, no. 3, 2013.
- [383] N. İ. Büyük, P. P. ARAYICI, S. Derman, Z. Mustafaeva, S. Yücel, "An optimization study for chitosan nanoparticles: Synthesis and characterization," *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, vol. 16, no. 2, pp. 119–127,
- [384] F. Li, Y. Shi, J. Liang, L. Zhao, "Curcumin-loaded chitosan nanoparticles promote diabetic wound healing via attenuating inflammation in a diabetic rat model," *Journal of biomaterials applications*, vol. 34, no. 4, pp. 476–486, 2019.
- [385] M. E. Cam, S. Yildiz, H. Alenezi, S. Cesur, G. S. Ozcan, G. Erdemir, U. Edirisinghe, D. Akakin, D. S. Kuruca, L. Kabasakal, *et al.*, "Evaluation of burst release and sustained release of pioglitazone-loaded fibrous mats on diabetic wound healing: An in vitro and in vivo comparison study," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 17, no. 162, p. 20 190 712, 2020.
- [386] M. A. Mohammed, J. Syeda, K. M. Wasan, E. K. Wasan, "An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery," *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 4, p. 53, 2017.
- [387] M. A. Khan, M. Zafaryab, S. H. Mehdi, I. Ahmad, M. M. A. Rizvi, "Characterization and anti-proliferative activity of curcumin loaded chitosan nanoparticles in cervical cancer," *International journal of biological macromolecules*, vol. 93, pp. 242–253, 2016.
- [388] A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, J. Kreuter, "Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles," *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 57, no. 2, pp. 369–375, 2004.
- [389] S. Fahimirad, H. Abtahi, P. Satei, E. Ghaznavi-Rad, M. Moslehi, A. Ganji, "Wound healing performance of pcl/chitosan based electrospun nanofiber electrospayed with curcumin loaded chitosan nanoparticles," *Carbohydrate polymers*, vol. 259, p. 117 640, 2021.
- [390] J. G. Merrell, S. W. McLaughlin, L. Tie, C. T. Laurencin, A. F. Chen, L. S. Nair, "Curcumin loaded poly (ϵ -caprolactone) nanofibers: Diabetic wound dressing with antioxidant and anti-inflammatory properties," *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, vol. 36, no. 12, p. 1149, 2009.
- [391] G. Ozkan, S. Kamiloglu, T. Ozdal, D. Boyacioglu, E. Capanoglu, "Potential use of turkish medicinal plants in the treatment of various diseases," *Molecules*, vol. 21, no. 3, p. 257, 2016.
- [392] D. Knuth. (). "Nanofibers: Technologies and developing markets," [Online]. Available: [https : / / www . bccresearch . com / market - research / nanotechnology](https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology). (accessed: 25.06.2021).

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgileri:

Makale

1. B. Ozdemir, M. B. Piskin, B. Gok, N. Demir, Y. Budama-Kilinc, "Fabrication and characterization of saffron stamen aqueous extract controlled release system as potential topical treatment of thermal burn wounds," ChemistrySelect, vol. 6, no. 25, pp. 6579–6585, 2021.