

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK CERRAHİSİ
DOKTORA PROGRAMI

**FARELERDE AYNİSEFA ÇİÇEĞİ (*Calendula officinalis*)
EKSTRAKTININ YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YALÇIN ALPER ÖZTURAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim AKIN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-23012 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2024

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden başlayarak, beni akademiye kazandıran, doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince gösterdiği sonsuz sabır, ilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. İbrahim AKIN'a sonsuz minnetlerimi sunarım.

Tez izleme komitemde yer alan ve değerli görüşleriyle doktora çalışmama katkı sağlayan Prof. Dr. Murat SARIERLER ve Prof. Dr. Mehmet GÜLTEKİN'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tezimde kullanılan ekstraktın hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kerem CANLI ve doktora öğrencisi Atakan BENEK'e şükranlarımı sunmak isterim. Tezimin immünohistokimyasal, biyokimyasal ve genomik ölçümleri sırasında her türlü desteği gösteren Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Erkmen Tuğrul EPİKMEN'e, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Özge ÇEVİK'e, lisansüstü öğrenciler Merve ERDAL, Bensu KOZAN ve Aslıhan KÜÇÜK'e ve çalışma materyallerinin sağlanmasında katkıları olan Ahmet EYİĞÜN ve Burak ANTAKYALIOĞLU'na teşekkür ederim.

Doktora sürecimde bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ali BELGE, Prof. Dr. Nuh KILIÇ, Doç. Dr. Rahime YAYGINGÜL, Doç. Dr. Zeynep BOZKAN ÜNAL, Doç. Dr. Büşra KİBAR KURT, Dr. Öğretim Üyesi Zeynep CENGİZ'e, Siyasal Bilgiler Fakültesi Ekonometri Bölümü İstatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tuğba AKIN'a, ayrıca The University of Texas, Southwestern Medical Center, Internal Medicine Öğretim Üyesi Aaron Göktürk ÜNER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam ve öğrenim hayatım süresince gösterdikleri sabır, özveri ve destekleri için aileme ayrıca minnettarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Yara	7
2.1.1. Yaraların Sınıflandırılması	7
2.2. Yara İyileşmesi	9
2.2.1. Yara İyileşmesinin Sınıflandırılması	11
2.2.2. Yara İyileşmesinin Aşamaları	13
2.2.2.1. Hemostazis Aşaması	13
2.2.2.2. İnflamasyon Aşaması	14
2.2.2.3. Proliferasyon (Reperasyon, Onarım) Aşaması	15
2.2.2.3.1. Kontraksiyon	17
2.2.2.4. Matürasyon (Remodelleme) Aşaması	18
2.3. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	18
2.3.1. Yaş	19

2.3.2. Enfeksiyonla İlişkili Faktörler	19
2.3.3. İlaçlar	20
2.3.4. Metabolik Hastalıklar	20
2.3.5. Beslenme	21
2.3.6. Yaranın Konumu	22
2.4. Yara İyileşmesinin Değerlendirilmesi ve Takibi	23
2.4.1. Planimetrik Ölçümler	23
2.4.2. İmmünohistokimyasal ve Histolojik Ölçümler	24
2.4.3. Biyokimyasal ve Genomik Ölçümler	24
2.4.4. Yara Tedavisi Maliyeti ve Bitkisel Alternatifler	26
2.6. <i>Calendula officinalis</i> (Aynısefa Bitkisi)	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Gereç	33
3.1.1. Etik Kurul İzni, Hayvan Materyali ve Temini	33
3.1.1.1. Hayvanların (BALB/C) Barınma ve Bakım Koşulları	33
3.1.2. Bitki (Aynısefa Bitkisi, <i>Calendula officinalis</i>) Temini	34
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi	35
3.2.2. Aynısefa Bitkisi (<i>Calendula officinalis</i>) Çiçeğinin Gaz Kromatografi-Mass Spektrometri (GC-MS) Analizi	35
3.2.3. Aynısefa Bitkisi (<i>Calendula officinalis</i>) Çiçeğinin Ekstraktının Hazırlanması	37
3.2.4. Farelerde Tam Katmanlı Deri Yaralarının Oluşturulması	40
3.2.5. Çalışma Gruplarında Tam Katmanlı Deri Yaralarında Tedavilerin Uygulanması	41
3.2.6. Planimetrik Ölçümler	41
3.2.7. Ötenazi ve Dokuların Toplanması	42

3.2.8. İmmunohistokimyasal Analizler	43
3.2.9. Biyokimyasal Analizler	45
3.2.9.1. Dokularda Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi ile Biyobelirteçlerin Ölçüm Aşamaları	47
3.2.9.2. Dokularda Total Protein Ölçümleri	50
3.2.10. Genomik Analizler	51
3.2.11. İstatistiksel Analizler	57
4. BULGULAR	58
4.1. Deney Süreci ve Klinik Muayene Bulguları	58
4.2. Aynısefa Bitkisi Çiçeğinin GC-MS Analiz Bulguları	58
4.3. Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulguları	59
4.3.1. Aynısefa Çiçeği (AYSEF) Grubu Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulguları	60
4.3.2. Negatif Kontrol (NEGKON) Grubu Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulguları	61
4.3.3. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) Grubu Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulguları	62
4.3.4. Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulgularının Gruplar Arası Karşılaştırılması	63
4.4. Yara Dokularının İmmunohistokimyasal Analiz Bulguları	64
4.4.1. Fibroblast Sayım Bulguları	64
4.4.2. Makrofaj Sayım Bulguları	65
4.5. Yara Dokularının Biyokimyasal Analiz Bulguları	66
4.5.1. Hidroksiprolin (HP) Bulguları	66
4.5.2. Oksidatif Stres Biyobelirteç Bulguları	67
4.5.2.1. Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	67

4.5.2.2. Total Oksidan Kapasitesi (TOS) Düzeyleri	67
4.5.2.3. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) Düzeyleri	67
4.5.2.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Düzeyleri	68
4.5.2.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeyleri	68
4.5.2.6. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzeyleri	68
4.5.3. Büyüme Faktörleri Belirteç Bulguları	70
4.5.3.1. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) Düzeyleri	70
4.5.3.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) Düzeyleri	70
4.5.4. İnflamasyon Biyobelirteç Bulguları	71
4.5.4.1. Miyeloperoksidaz (MPO) Düzeyleri	71
4.5.4.2. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α) Düzeyleri	72
4.5.4.3. İnterlökin 1 (IL-1) Düzeyleri	72
4.5.4.4. İnterlökin 6 (IL-6) Düzeyleri	72
4.5.4.5. Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF) Düzeyleri	73
4.5.4.6. Matriks Metalloproteinaz 2 (MMP-2) Düzeyleri	73
4.5.4.7. Matriks Metalloproteinaz 9 (MMP-9) Düzeyleri	73
4.6. Genomik Analiz Bulguları	75
4.6.1. Matriks Metalloproteinaz 2 (MMP-2) Gen Ekspresyon Bulguları	75
4.6.2. Matriks Metalloproteinaz 9 (MMP-9) Gen Ekspresyon Bulguları	75
4.7. MMP-2 Gen Ekspresyonu Kat Değişim ve Protein Düzeylerinin İlişkisi	76
4.8. MMP-9 Gen Ekspresyonu Kat Değişim ve Protein Düzeylerinin İlişkisi	76
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	86
KAYNAKLAR	87
EKLER	112
Ek 1 (Etik Kurul Formu)	112

BİLİMSEL ETİK BEYANI	113
ÖZ GEÇMİŞ	114



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AYSEF	: Sulu Aynısefa Bitkisi Çiçeği Ekstraktı
BCA	: Bikinkoninik Asit Tahlili
CAGR	: Yıllık Bileşik Büyüme Oranı
cDNA	: Komplementer DNA
DEPC	: Dietil Pirokarbonat
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
GC-MS	: Gaz Kromatografi-Mass Spektrometri
GM-CSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
HP	: Hidroksiprolin
IL-1	: İnterlökin 1
IL-6	: İnterlökin 6
LD-50	: Letal Doz 50
MDA	: Malondialdehit
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MMP-1	: Matriks Metalloproteinaz-1
MMP-2	: Matriks Metalloproteinaz 2
MMP-9	: Matriks Metalloproteinaz 9

MPO	: Miyeloperoksidaz
mRNA	: Mesajcı RNA
NEGKON	: Negatif Kontrol
NSAİD	: Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar
OSH	: Ortalama Standard Hata
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Kapasitesi
TGF- α	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TOS	: Total Oksidan Kapasitesi
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Derinin kesitsel görüntüsü ve barındırdığı hücreler	6
Şekil 2.	Yara iyileşme fazları sırasında meydana gelen olaylar	11
Şekil 3.	Yara iyileşmesini etkileyen faktörler	19
Şekil 4.	Çalışma gruplarında ölçüm günlerinde yara alanı ölçüm ortalama değerleri	63



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Bir farede gözlemlenen kabuk altı iyileşme	12
Resim 2.	<i>Calendula officinalis</i> bitkisinin fiziki görünümü	29
Resim 3.	Çalışma sürecinde bireysel kafeslenmiş farelerin görünümü	34
Resim 4.	Çalışmada kullanılan GC-MS cihazı ve numunelerin cihaza yerleştirilmesi	36
Resim 5.	GC-MS analizi sonuçlarının NIST-Wiley kütüphanelerinde karşılaştırılması	37
Resim 6.	Aynısefa bitkisi çiçeği çözeltilisinin çalkalanmaya bırakılması	38
Resim 7.	Sulu Aynısefa bitkisi çiçeği çözeltilerinin filtre kağıdından süzdürülmesi ...	39
Resim 8.	İşlemler sonucu elde edilen %5'lik steril Aynısefa bitkisi çiçeği su ekstraktı	40
Resim 9.	Yaraların oluşturulma aşamaları	41
Resim 10.	Şeffaf asetatlı kâğıtta yer alan çizimlerin milimetrik kâğıda aktarılması	42
Resim 11.	Dokulardan elde edilen kesitlerin gösterimi	43
Resim 12.	Sayım işlemine hazır hale getirilmiş doku kesitleri	44
Resim 13.	Dokuların homojenizasyon işlemine hazırlanması	46
Resim 14.	Homojenatların santrifüj edilmesi	46
Resim 15.	Mikroplaka kuyucuklarına substrat çözeltilerinin eklenmesi	48
Resim 16.	Mikroplaka kuyucuklarına durdurma çözeltisi eklendikten hemen sonra şekillenen renk değişimi	49
Resim 17.	Hazırlanma işlemleri tamamlanmış mikroplakanın mikroplaka okuyucu spektrofotometreye yerleştirilmesi	49
Resim 18.	Spektrofotometrik okuyucuya hazır hale getirilmiş BCA protein mikroplağı	51
Resim 19.	Genomik analizler için ayrılan dokular ve RNA izolasyonu işlemi hazırlığının gösterimi	52

Resim 20.	Eppendorf tüplerin inkübatöre yerleştirilip cDNA eldesi için inkübe edilmesi	54
Resim 21.	Elde edilen cDNA miktarlarının nanodropta ölçümü	54
Resim 22.	PCR analizi için plakaların hazırlanması	55
Resim 23.	qRT-PCR analizi için hazırlanan plakaların cihaza yerleştirilmesi	56
Resim 24.	qRT-PCR için cihazda kurulmuş deney düzeneği görüntüsü	57
Resim 25.	AYSEF çalışma grubundan 38 numaralı farenin çalışma sürecinde yara fotoğrafları	60
Resim 26.	NEGKON çalışma grubundan 17 numaralı farenin çalışma sürecinde yara fotoğrafları	61
Resim 27.	FTS çalışma grubundan 68 numaralı farenin çalışma sürecinde yara fotoğrafları	62

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Yara iyileşmesi aşamalarında gerçekleşen hücresel ve biyofizyolojik olaylar	10
Tablo 2.	Çeşitli <i>Calendula</i> türlerinin ana bileşenleri ve yüzdeleri	31
Tablo 3.	<i>Calendula officinalis</i> 'te bulunan çeşitli kimyasal bileşenler	31
Tablo 4.	Farelerin çalışma gruplarına ayrılması ve uygulamalar	35
Tablo 5.	Çalışmada kullanılan ticari test kitlerinin marka ve katalog numaraları	47
Tablo 6.	Aynısefa bitkisi çiçeğinin GC-MS analiz sonucu	59
Tablo 7.	Çalışma gruplarının ölçüm zamanları yara alanı değerleri ve istatistiksel karşılaştırmalar	64
Tablo 8.	Ölçüm zamanlarına göre çalışma gruplarında fibroblast ve makrofaj sayım değerleri.....	65
Tablo 9.	Çalışma gruplarında ölçüm günlerine göre hidrokspirolin düzeyleri	66
Tablo 10.	Oksidatif stres belirteçlerinin çalışma gruplarında ölçüm günlerine göre düzeyleri	69
Tablo 11.	Büyüme faktörü belirteçlerinin çalışma gruplarında ölçüm günlerine göre düzeyleri	71
Tablo 12.	İnflamasyon belirteçlerinin çalışma gruplarında ölçüm günlerine göre düzeyleri	74
Tablo 13.	Ölçüm zamanlarına göre çalışma gruplarında MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonu kat değişim değerleri	76

ÖZET

FARELERDE AYNISEFA ÇİÇEĞİ (*Calendula officinalis*) EKSTRAKTININ YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZTURAN Y. A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Cerrahisi, Doktora Tezi, Aydın, 2024.

Amaç: Sunulan çalışmada BALB/c ırkı farelerde Aynisefa bitkisi çiçeği ekstraktının yara iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada yaşları 6-8 hafta arasında değişen, 72 adet BALB/c ırkı erkek fare her grupta 24 fare olacak şekilde 3 çalışma grubuna [AYSEF (Aynisefa bitkisi çiçeği ekstraktı, FTS (fizyolojik tuzlu su) ve NEGKON (tedavi uygulanmayan)] ayrıldı. Farelerin sırt bölgesine 4 adet simetrik yara açıldı ve tedaviler topikal olarak her gün uygulandı. Yara alanları milimetrik kağıt ile ölçüldü ve çalışmanın 1., 3., 5., 7. ve 14. günlerinde immünohistokimyasal, biyokimyasal ve genomik analizler için yara dokuları toplandı.

Bulgular: Çalışmanın 3., 7. ve 14. gününde çalışma gruplarının yara alanları arasında istatistiksel anlamlı farklar bulundu. Fibroblast sayım değerlerinde çalışmanın 3., 5., 7. ve 14. gününde, makrofaj sayım değerlerinde 5., 7. ve 14. gününde gruplar arası istatistiksel anlamlı farklar bulundu. Çalışmanın 3., 5. ve 7. günlerinde çalışma gruplarının hidroksiprolin düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı farklar bulundu. MDA ve TAS düzeylerinde 14. günde, TOS ve OSİ düzeylerinde 3. günde, GPx düzeylerinde 3. ve 14. günde, FGF düzeylerinde ise 7. ve 14. günde çalışma grupları arasında istatistiksel anlamlı farklar bulundu. MPO, IL-6, GM-CSF, MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde çalışmanın 3., 5., 7. ve 14. gününde, TNF- α düzeylerinde 7. ve 14. gününde, IL-1 düzeylerinde ise 3., 5., 7. gününde çalışma grupları arasında farklar bulundu. MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonunda çalışmanın 3., 5., 7. ve 14. gününde çalışma grupları arasında istatistiksel anlamlı farklar bulundu.

Sonuç: Ekstraktının yara iyileşmesinde planimetrik, immünohistokimyasal, biyokimyasal ve genomik bulgulara göre alternatif bir tedavi olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Aynisefa çiçeği, *Calendula officinalis*, Tam katmanlı deri yarası, Yara iyileşmesi.

ABSTRACT

INVESTIGATION of WOUND HEALING EFFECTS of CALENDULA (*Calendula officinalis*) EXTRACT in MICE

OZTURAN Y. A. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Veterinary Surgery Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2024.

Objective: The present study aimed to investigate the effects of calendula flower extract on wound healing in BALB/c mice.

Materials and Methods: A total of 72 male BALB/c mice, 6-8 weeks old, were divided into 3 study groups, each consisting of 24 mice: CAL (calendula flower extract), PBS (physiological saline solution), and NEGCON (no treatment). Four symmetric wounds were created on the dorsal area of the mice, and treatments were applied topically daily. Wound areas were measured using millimeter paper, and on days 1, 3, 5, 7, and 14 and wound tissues were collected for immunohistochemical, biochemical, and genomic analyses.

Results: Statistically significant differences in wound areas were found between the study groups on days 3, 7, and 14. Intergroup differences in fibroblast counts were significant on days 3, 5, 7, and 14, while macrophage counts differed significantly on days 5, 7, and 14. In hydroxyproline levels, significant differences were found on days 3, 5, and 7. Significant differences in MDA and TAS levels were found on day 14, TOS and OSI levels on day 3, GPx levels on days 3 and 14, and FGF levels on days 7 and 14. MPO, IL-6, GM-CSF, MMP-2, and MMP-9 levels differed significantly on days 3, 5, 7, and 14, TNF- α levels on days 7 and 14, and IL-1 levels on days 3, 5, and 7. Statistically significant differences in MMP-2 and MMP-9 gene expression were observed on days 3, 5, 7, and 14.

Conclusion: It has been concluded that the extract is an alternative treatment for wound healing based on planimetric, immunohistochemical, biochemical, and genomic findings.

Keywords: Calendula flower, *Calendula officinalis*, Full-layer skin wound, Wound healing.

1. GİRİŞ

Yara iyileşmesi, dokunun hasar görmesi sonucu bütünlüğünün bozulduğu ve dört ana aşamaya ayrılan karmaşık bir süreçtir (Jia ve diğerleri, 2008; Behm ve diğerleri, 2012). Bu aşamalar birbirleriyle bağlantılıdır, ancak farklı özelliklere sahiptir. Hem sistemik hem de lokal faktörler yara iyileşmesini etkileyebilmektedir. Bu sürecin temel bileşenleri arasında büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler gibi moleküler sinyal maddeleri yer almaktadır (Munger ve Sheppard, 2011; Behm ve diğerleri, 2012). Enfeksiyonlar, metabolik hastalıklar, yaranın konumu ve beslenme durumu gibi çeşitli faktörler bu süreci olumsuz etkileyerek yara iyileşmesini engelleyebilmektedir (Balsa ve Culp, 2015). Bu nedenle, yara iyileşmesi ile ilgili sorunlar dikkatlice ele alınmalı ve olumsuz etkilere neden olan faktörler belirlenmelidir.

Yara türleri, geniş bir sınıflandırmaya sahipken yara iyileştirici ajanların basit cerrahi kesilerden karmaşık ve kronik yaralara kadar birçok farklı yara türünde etkili olması beklenmektedir (Balsa ve Culp, 2015). Tarih boyunca insanlar doğadan birçok tıbbi tedavi yöntemi keşfetmişlerdir ve bu tedaviler arasında şifalı bitkiler (şifalı olan veya olduğu düşünülen bitkiler) önemli bir yer tutmaktadır. Bu bitkilerin farklı kısımları (çiçeklerden gövdelere, yapraklardan tohumlara kadar olan bölümleri) çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Russo ve diğerleri, 2009). Özellikle yara iyileşmesi alanında bitki özleri ve ekstraktları yüksek iyileştirici potansiyelleri nedeniyle sıkça tercih edilmektedir (Thakur ve diğerleri, 2011; Maver ve diğerleri, 2015; Criollo-Mendoza ve diğerleri, 2023). Günümüzde modern ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kökenlidir ve bu bitkisel ilaçların yaklaşık %30'u yara tedavilerinde kullanılmaktadır (Abou Auda, 2011; Lania ve diğerleri, 2019). Bitkisel ürünlerin kullanımı giderek artmaktadır (Jokinen ve Sipponen, 2016). Bu ürünlerin birçoğu minimum yan etkileri ve ekonomik olmaları nedeniyle tercih edilmektedir (Maver ve diğerleri, 2015). Bu bitkisel ürünler aynı zamanda güvenilir olmalarıyla da öne çıkmaktadırlar (Thakur ve diğerleri, 2011). Terapötik olarak bitki ekstraktlarında bulunan aktif bileşenler, sentetik ilaçlarla benzer etkilere sahip olabilmektedir (Russo ve diğerleri, 2009). Sentetik ilaçların olumsuz etkileri araştırmacıları yara iyileşmesi gibi topikal uygulamaların yapıldığı alanlarda doğal bileşiklere yönlendirmiştir (Jokinen ve Sipponen, 2016).

Doğa binlerce yıldır tıbbi tedavilerin kaynağı olmuştur ve bitki kaynaklı tedaviler dünya genelinde sağlık hizmetlerinin önemli bir bileşeni olmaya devam etmektedir (Maver ve

diğerleri, 2015). Asya, Afrika, Orta Doğu ve Latin Amerika gibi bölgelerde yerel bitkiler, hayvanlar ve doğal ürünlerden elde edilen geleneksel ilaçlar, yara bakımının temelini oluşturmaktadır (World Health Organization, 2013). Küresel yara bakım pazarının 2021'de 15,84 milyar dolardan 2028'e kadar %6,6'lık yıllık büyüme oranıyla 24,01 milyar dolara ulaşması tahmin edilmektedir (Grand View Research, 2021). Tıbbi olarak kullanılan en az 170 topikal yara bakım ürünü bulunmasına rağmen bu ürünlerle ilgili iyi tasarlanmış, randomize kontrollü çalışmalara olan ihtiyaç devam etmektedir (Jokinen ve Sipponen, 2016). Yara iyileşme sürecinin etkin bir şekilde yönetilmesinde, ağrının minimal seviyede tutulması ve yara onarımı ile rejenerasyonun uygun bir şekilde gerçekleştirilmesi doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle yara iyileşmesinin hızlı ve etkili bir şekilde tamamlanması ilgili canlının yaşam kalitesini artırabilir. Yara iyileşmesi alanındaki bilimsel çalışmaların sürekli olarak ilerlemesi sağlık alanında önemli bir rol oynayarak gelecekte daha olumlu sonuçlara ulaşılmasına yardımcı olacaktır (Maver ve diğerleri, 2015).

Calendula officinalis (Aynısefa bitkisi), Orta Avrupa ve Akdeniz'e özgü Asteraceae/Compositae familyasına ait bir çiçektir (Givol ve diğerleri, 2019) ve 18. yüzyıldan beri tıbbi amaçlarla kullanıldığı belirtilmiştir (D. Silva ve diğerleri, 2021). *C. officinalis*'in içinde bulunan ikincil metabolitlerin yara iyileşmesini pozitif yönde etkileyen çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Givol ve diğerleri, 2019). *Calendula officinalis* terpenoidler ve terpenler (bisabolol, farradiol, kamazulen, arnidiol, esterler), karotenoidler (rubiksantin ve likopen yapıları), flavonoidler (kuersetin, isorhamnetin ve kaempferolaglikonlar) ve çoklu doymamış yağ asitleri (kalendik asit) gibi çeşitli biyoaktif bileşikler içermektedir (Neukiron ve diğerleri, 2004; Parente ve diğerleri, 2012; Agatonovic-Kustrin ve diğerleri, 2015; Jadoon ve diğerleri, 2015). Bitkinin anjiyojenik, vasküler rejenerasyon, analjezik, antimikrobiyal, antioksidan ve immünomodülatör olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu da bildirilmiştir (Preethi ve diğerleri, 2009; Parente ve diğerleri, 2012; Efstratiou ve diğerleri, 2012; Khairnar ve diğerleri, 2013). *Calendula officinalis*'in içeriğinde bulunan triterpenoidlerin, bitkide önemli bir anti-inflamatuvar ve anti-ödematöz bileşik olduğu ve ayrıca fibroblast uyarıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir (Fronza ve diğerleri, 2009). Bu bitki içindeki diğer önemli ikincil metabolit grubu ise flavonoidlerdir. Bu bileşiklerin lipoksijenaz enzimlerini ve mast hücrelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Middleton ve diğerleri, 2000). Avrupa Birliği Sağlık Ajansı (EMA) tarafından düzenlenen bir raporda, Aynısefa bitkisi çiçeğinin hayvanlar üzerinde düşük toksisiteye sahip olduğu hem oral hem de

topikal uygulamaların tek doz toksisite testleri ve tekrarlı doz çalışmaları ile değerlendirildiği bildirilmiştir (European Medicines Agency, 2018).

Givol ve diğerleri (2019), *Calendula officinalis* bitkisinin deri yaralarında kullanılmasına dair yapılan çalışmaların hala belirsizlikler taşıdığını, literatürde bu konuda boşluklar olduğunu ve haliyle daha fazla çalışma yapılması gerektiğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar *Calendula officinalis* bitkisinin kimyasal bileşen analizinin eksik olduğunu da belirtmişlerdir (Givol ve diğerleri, 2019).

Sunulan tez çalışması, sağlıklı BALB/C ırkı erkek farelerde tam katmanlı deri yaralarının iyileşme sürecinde aynisefa çiçeği (*Calendula officinalis*) ekstraktının etkinliğini planimetrik, immünohistokimyasal, biyokimyasal ve genomik açılardan değerlendirmeyi amaçlamaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

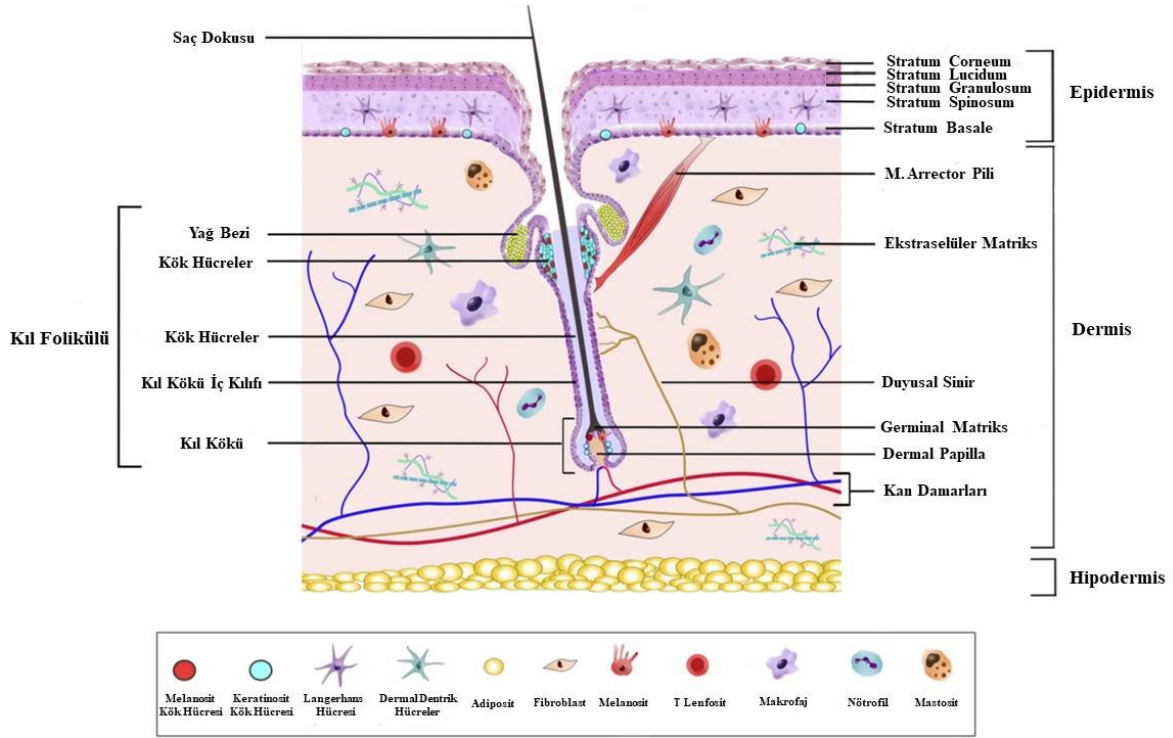
Deri, vücudu çevresel etmenlere karşı koyan, vücut ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturan en büyük düz organdır. Ultraviyole ışınlarının neden olduğu DNA hasarını engelleme, sıcaklık düzenlemesi (ter bezleri, kıl ve tüyler, kan akışı), duyu (sinirler, vibrissae) ve bağışıklık (Langerhans hücreleri) sistemlerine ilişkin hayati fonksiyonları yerine getirmektedir (Croveti ve diğerleri, 2004; Theoret, 2009; Romanovsky 2014; Medellin-Luna ve diğerleri, 2019; Sullivan ve Myers, 2022). Deri ekleri (kıllar, toynaklar, pençe ve tırnaklar) ise iletişime (kedilerde kılların dikleşmesi, kuşlarda kur yapma gösterisi) ve harekete (kuşların uçuş tüyleri, atların toynakları) katkıda bulunmaktadır (Souci ve Denesvre, 2021).

Deri antijen sunucu hücreler (langerhans hücreleri, dendritik hücre alt tipleri, makrofajlar), yerleşik T hücreleri, monositler, mast hücreleri ve nötrofiller gibi çeşitli bağışıklık hücrelerini barındırmaktadır (Nestle ve diğerleri, 2009; Combadiere ve Liard 2011; Matejuk, 2018). Langerhans hücreleri derinin epidermis katmanı içinde yer alırken, diğer bağışıklık hücreleri dermis katmanı içinde bulunmaktadır (Sullivan ve Myers, 2022). Bu hücreler deride immünolojik dengeyi sürdürürler, bazen istilacı patojenlere karşı koruyucu bir yanıt başlatırken, bazen de yabancı antijenlere karşı dengeyi sağlarlar (Nestle ve diğerleri, 2009; Guttman-Yassky ve diğerleri, 2019).

Deri epidermis, dermis ve hipodermis (subkutan doku) olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır (Şekil 1; Souci ve Denesvre, 2021; Sullivan ve Myers, 2022). Epidermis cildin en dış tabakasıdır. Epidermis melanositler (melanin pigmenti üretimi), Langerhans hücreleri (bağışıklık fonksiyonu), Merkel hücresi (duyusal fonksiyon) ve keratinositlerden oluşan tabakalı düz epitelyum olarak tanımlanmaktadır (Souci ve Denesvre, 2021; Sullivan ve Myers, 2022). Keratinositler epidermis hücrelerinin yaklaşık %90'ını oluşturur ve bu katman kan damarlarından yoksundur (Venus ve diğerleri, 2010; Kolarsick ve diğerleri, 2011; McLafferty ve diğerleri, 2012). Epidermis içerisinde çeşitli görevleri bulunan beş ayrı katmandan oluşur (Şekil 1). Bu katmanlar sırasıyla en derinde stratum basale, onun üzerinde stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum ve en dışta ise stratum corneum'dan oluşmaktadır (Johnstone ve diğerleri, 2005; Z. Zhang ve Michniak-Kohn, 2012; Roger ve diğerleri, 2019). Epidermis ile dermis arasında bazal membran bölgesi bulunur ve bu iki katmanı sıkıca birbirine bağlamaktadır. Avasküler epidermise destek sağlamaktadır (Souci ve Denesvre, 2021; Sullivan

ve Myers, 2022). Dermis hücreler ve ekstraselüler matriksten (lifler ve glikozaminoglikanlar) oluşan, fibroblastlar, makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri ve adipositleri barındıran bir katmandır (Venus ve diğerleri, 2010). Dermis katmanı esnek bir yapıya sahiptir ve ekkrin, apokrin, sebaceöz ve seruminöz bezler gibi diğer yapıları içerir (Venus ve diğerleri, 2010; McLafferty ve diğerleri, 2012). Dermis de epidermis gibi iki farklı katmana (retiküler ve papiller) ayrılmıştır (Venus ve diğerleri, 2010; Z. Zhang ve Michniak-Kohn, 2012). Retiküler katman derinin dayanıklılığını ve esnekliğini sağlayan kollajen ve elastik liflerden oluşan güçlü bir bağ dokusu oluşturur. Papiller katman ise üstte bulunan epidermis'in beslenmesi için gerekli olan damar ve sinir yapılarını içerir (McLafferty ve diğerleri, 2012; Z. Zhang ve Michniak-Kohn, 2012). Dermisin baskın hücre tipi fibroblasttır, fibroblastlar deriye esneklik kazandıran kollajen ve elastik lifleri üretmektedir (Thulabandu ve diğerleri, 2018). Bu hücreler bağ dokusu matriks proteinlerini sentezlerler, parçalarlar ve yapısal ekstraselüler matriks ile bazal membran çerçevesini oluşturan bir dizi proteini üretirler. Dermis epidermis ve dermis arasındaki etkileşimi teşvik eden çözünebilir işaretleyicileri sentezleyen yapıları (büyüme faktörleri ve sitokinler) barındırmaktadır. Bu yapılar arasında keratinosit büyüme faktörleri 1 ve 2, trombosit türevli büyüme faktörü-A, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve granülosit/makrofaj koloni uyarıcı faktör gibi önemli bileşenler bulunur. Büyüme faktörleri ve sitokinler fibroblastların parakrin ve otokrin etkileşimlerine olanak sağlamaktadır. Papiller dermis ve retiküler dermis farklı özelliklere sahip, farklı fibroblast alt popülasyonlarını içermektedir (Thulabandu ve diğerleri, 2018; Sullivan ve Myers, 2022).

En dip tabaka olan hipodermis (subkutan doku) ise genellikle yağ hücrelerinden oluşur ve koruyucu bir dolgu, yalıtım ve enerji depolama görevlerini üstlenir (Şekil 1; Souci ve Denesvre, 2021).



Şekil 1. Derinin kesitsel görüntüsü ve barındırdığı hücreler (Souci ve Denesvre, 2021'den alınmıştır).

Deri bileşenleri farklı embriyolojik kökenlere aittir. Epidermis ve dermis tabakaları sırasıyla ektoderm ve mezoderm kökenlidir. Epidermal keratinositler ektoderm kökenli iken dermal fibroblastlar mezoderm ve nöral krest kökenlidir. Melanositler nöral krestten köken almaktadır. Langerhans hücreleri deriden köken alan kemik iliğinden farklılaşan CD34+ hücrelerin bir alt popülasyonundan gelmektedir. Deride yer alan bezler (ter ve yağ bezleri) ve deri ekleri (kıl, tüyler, tırnaklar ve pençeler) gibi epidermal yapılar embriyolojik dönemde dermal fibroblastlarla hücre etkileşimleri yoluyla oluşmaktadır (Souci ve Denesvre, 2021; Sullivan ve Myers, 2022).

Derinin morfolojik yapısı ve kalınlığı cins, tür, ırk, cinsiyet, yaş ve vücut bölgelerine göre değişiklik göstermektedir (Souci ve Denesvre, 2021). Farklı memeli türleri ve vücut bölgeleri arasında derinin genel yapısı aynı görülmektedir, ancak interfoliküler epidermis denilen belirli bir bölgede hücrelerin sayısı türden türe değişebilmektedir (Senoo, 2013). Epidermiste katman başına düşen hücre sayısı türe göre değişebilmektedir (Souci ve Denesvre, 2021). Fare, köpek ve kedi gibi hayvanların tüylü deri bölgelerinde stratum spinosum katmanı 1 veya 2 hücre tabakasından oluşurken, insanlar ve büyük hayvanlarda bu sayı 4'e kadar çıkabilmektedir (Mauldin ve Peters-Kennedy, 2016). Epidermis gibi derinin en dışında yer alan ve daha fazla

korunmaya ihtiyaç duyan katmanlar doğal olarak daha kalındır. Köpeklerin tüylü deri bölgeleri sadece 1 veya 2 katmandan oluşurken patilerinin stratum spinosumu 20 katman olabilmektedir (Mauldin ve Peters-Kennedy, 2016; Souci ve Denesvre, 2021). İnsanlarla diğer evcil ve laboratuvar memelileri arasındaki temel farklar deri ekleri ile ilgilidir. Tüylerin kürk veya tüy örtüsü oluşturması, bazı evcil hayvanlarda dokunsal fonksiyona sahip kıllar bulunması temel farklar arasında yer almaktadır (Souci ve Denesvre, 2021). Tüyler sürekli olarak dökülüp yenilenir ve bu döngü türe göre değişkenlik gösterebilmektedir. Tüylerin büyüme evresi süresi insan saçında ve sakalında 4-7 yıl sürerken farelerde sadece birkaç haftada tamamlanmaktadır (Souci ve Denesvre, 2021).

2.1. Yara

Yara vücudun farklı bölgelerindeki dokuların çeşitli nedenlerle zarar görmesi sonucu hem hücresel hem de anatomik bütünlüğün bozulması anlamına gelir (Arab ve diğerleri, 1994; Lazarus ve diğerleri, 1994; Maver ve diğerleri, 2015). Dokular kendi direnç sınırlarının üzerinde mekanik ve şimik etkilere maruz kaldıklarında anatomik yapıların ayrılması ve normal bütünlüğünün bozulması gibi sonuçlarla karşılaşmaktadır (Samsar ve Akın, 2003). Yaralanmalar basit epitel düzenin bozulmasından kas, damar, sinir, tendon ve hatta iç organlar ile kemik dokusuna kadar uzanan daha derin doku hasarlarını içerebilmektedir (Robson ve diğerleri, 2001). Yaraların sonucu olarak hücrelerde ve dokularda değişiklikler şekillenerek hasarlı bölgede hücrelerin ve dokuların işlevsel bütünlüğü bozulmaktadır (Ghosh ve Gaba, 2013; Ambika ve Nair, 2019). Bir dokunun zarar görmesi durumunda vücut doku kaybını ve enfeksiyonu engellemek için yaranın hızlı bir şekilde onarılmasını sağlamak amaçlı bir dizi olayı başlatır (Amadeu ve diğerleri, 2003). Derinin hasar gördüğü durumlarda iyileşme süreci epitelizasyon, granülasyon dokusu oluşumu ve yara dokusunun kontraksiyonunu içermektedir (Martin ve Leibovich, 2005; Pazyar ve diğerleri, 2014).

2.1.1. Yaraların Sınıflandırılması

Yaraların sınıflandırılmaları yaranın süresine, oluşum nedenine (predispoze faktör ve etiyoloji), kontaminasyon derecesine ve deri hasarının şiddetine bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir (Mickelson ve diğerleri, 2016). Yaranın sınıflandırılması herhangi bir yara

tedavisi için izlenmesi gereken yönetim yaklaşımının türüne rehberlik etmeye yardımcı olabilmektedir (Brown, 2012; Hosgood, 2012).

Akut yaralar travma veya cerrahi müdahale sonrasında meydana gelen doku kayıplarıyla karakterize yaralar olarak tanımlanmaktadır. Bu tür yaralar normal şartlarda düzenli ve zamanında iyileşme eğiliminde olan anatomik ve fonksiyonel bütünlüğün yeniden kazanıldığı yaralardır. İyileşme süreci genellikle 5-10 gün arasında tamamlanır, ancak bazı durumlarda bu süre 30 güne kadar uzayabilmektedir (Velmar ve diğerleri, 2009). Kronik yaralar anatomik ve fonksiyonel iyileşme sürecinde aksamaların olduğu, düzensiz ilerleyen ve zamanında tedavi edilemeyen yaralardır. Kronik yaraların oluşumu metabolik hastalıklar, bağışıklık düzeyi, ilaç kullanımı, basınç, arteriyel ve venöz yetmezlik, yanıklar ve vaskülit gibi çeşitli faktörlere bağlı olabilmektedir. Bu nedenlerle kronik yaraların iyileşme süreci birkaç aydan birkaç yıla kadar değişebilmektedir. Bazı durumlarda ise bu yaralar hiçbir zaman tamamen iyileşmeyebilmektedir (Lazarus ve diğerleri, 1994; Velmar ve diğerleri, 2009; Han ve Ceilley, 2017).

Yaralar oluşum nedenlerine göre sıyrık, delinme, laserasyon, soyulma, termal yanıklar ve dekübit ülserler olarak sınıflandırılabilir (Hosgood, 2012). Sıyrık yaraları genellikle künt travma veya kesme kuvveti nedeniyle oluşan kısmi kalınlıkta epitelyal yaralanmalardır. Sıyrıklar genellikle ağrılı ve az miktarda kanama ile karakterizedir, hızla epitelizasyon ile iyileşirler (Hosgood, 2012; Hettlich ve diğerleri 2018). Delinme yarası bir nesnenin dokulara nüfuz etmesi sonucu derin doku kontaminasyonu ve hasarı ile küçük bir deri açıklığının bulunduğu yaralardır. Bu tür yaralanmalar ısırık yaraları, ateşli silah yaralanmaları ve sivri veya kemik gibi yabancı cisimlerin neden olduğu yaralardır (Hosgood, 2012; Hettlich ve diğerleri 2018). Yırtılma yaraları (laserasyon) deri kenarlarının keskin bir şekilde kopmuş olduğu yaralardır, kas ve tendon gibi derin dokulara kadar uzanabilmektedirler. Laserasyonlar genellikle minimal periferik travma ile yara kenarlarında ilişkilidir. Yara dudakları birbirinden ayrılır ve yara düzeyinin üzerine çıkarsa veya avülse olursa, kan akışının eşzamanlı olarak kesilmesi nedeniyle geniş doku alanları ölü hale gelebilir (Hosgood, 2012; Hettlich ve diğerleri 2018). Soyulma yaralanmaları genellikle distal uzuvlarda, silindir veya sıkma tarzı yaralanmalar veya sert bir yüzeye sürtünme sonucu meydana gelmektedir. Soyulma yaralanmalarında anatomik olarak deri katmanı deri altı dokulardan ayrılmıştır (Resim 1). Fizyolojik olarak deri yüzeyi genellikle sağlamdır, ancak altta yatan deri altı dokuları ve kan desteği ile ayrılmış veya avülse olmuştur. Bu durum deride gecikmiş nekrozla sonuçlanmaktadır (Hosgood, 2012; Hettlich ve diğerleri 2018). Termal yanıklar doğrudan ısı

veya kimyasal (asit ve baz) teması sonucu veya derinin ısıya çok yaklaşması sonucu meydana gelir. Bu tür yanıklar, yangınlar, asidik ve bazik maddelerle temas, ısıtıcılar, elektrik kabloları, ısı lambaları, sıcak sıvılar ve kötü niyetli saldırılar gibi çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilirler. Termal yanıklar deride farklı derinliklerde doku hasarına neden olabilirler (Nguyen ve diğerleri, 1993). Yanıklar derinliklerine göre genellikle yüzeysel, derin ve tam kalınlıkta yanıklar olmak üzere sınıflandırılır. Yanık vakalarında metabolik rahatsızlıklar, yara enfeksiyonu ve sepsis de gözlemlenebilmektedir (Hosgood, 2012; Hettlich ve diğerleri 2018). Dekübital ülserler deri ve yumuşak dokuların kemik çıkıntıları ile sert yüzeyler arasında sıkışması sonucu oluşan deri kaybına neden olan yaralanmalardır. Bu tür ülserler genellikle yatan veya hareketsiz durumdaki hayvanlarda görülmektedir (Hosgood, 2012; Hettlich ve diğerleri 2018).

Yaralar kontaminasyon derecesine göre dört farklı grupta sınıflandırılmaktadır. Birinci sınıf yaralar (temiz) herhangi bir iltihaplanma belirtisi (eksudat) olmayan yaralardır ve kendiliğinden iyileşirler (Brown, 2012; Hosgood, 2012). İkinci sınıf yaralar ise temiz-kontamine olarak adlandırılırlar, düşük düzeyde kontaminasyona sahiptirler. Üçüncü sınıf yaralar kontamine olarak adlandırılır ve genellikle gastrointestinal sistem gibi kanalların sızıntılarını içerirler. Dördüncü sınıf yaralar kirli veya enfekte olarak kabul edilir. Bu yaralar genellikle travmatik yaraların yetersiz tedavisinden, irin oluşumundan ve enfeksiyon varlığından kaynaklanmaktadır. Dokuların canlılığını kaybetmesi de dördüncü sınıf yaralara sebep olabilmektedir (Brown, 2012; Hosgood, 2012; Onyekwelu ve diğerleri, 2017).

2.2. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi hem insanlar hem de hayvanlar için ortak bir özellik olan, vücudun herhangi bir bölgesindeki yaraları iyileştirme yeteneğini ifade etmektedir. Vücudun herhangi bir yerinde yaraların iyileşme ve doku onarım süreçleri sürekli olarak devam eder (Ghosh ve Gaba, 2013). Her ne sebeple olursa olsun canlı bir organizmada doku bütünlüğü bozulduğunda bu iyileşme yeteneği en kısa sürede devreye girer ve doku bütünlüğü yeniden kurulur. Yaralanmaya tepki verme ve doku onarma kabiliyeti çok hücreli organizmaların temel özelliğidir (Gurtner ve diğerleri, 2008). Deri yaralandığında organizma hızla tepki verir. Yaranın oluşması sonrası ilk görülen tepki yaklaşık 5-10 dakika süren vazokonstriksiyondur. Takiben vazodilatasyon gerçekleşir ve bölgeye kan ve hücrelerin taşınmasını sağlar. Yaralı bölgedeki damarların iç yüzeyi 30-60 dakika içerisinde lökositlerle kaplanır. Damar endotel hücreleri arasındaki boşluklardan sıvı ve büyük moleküller yaralı bölgeye sızar ve sonraki 3

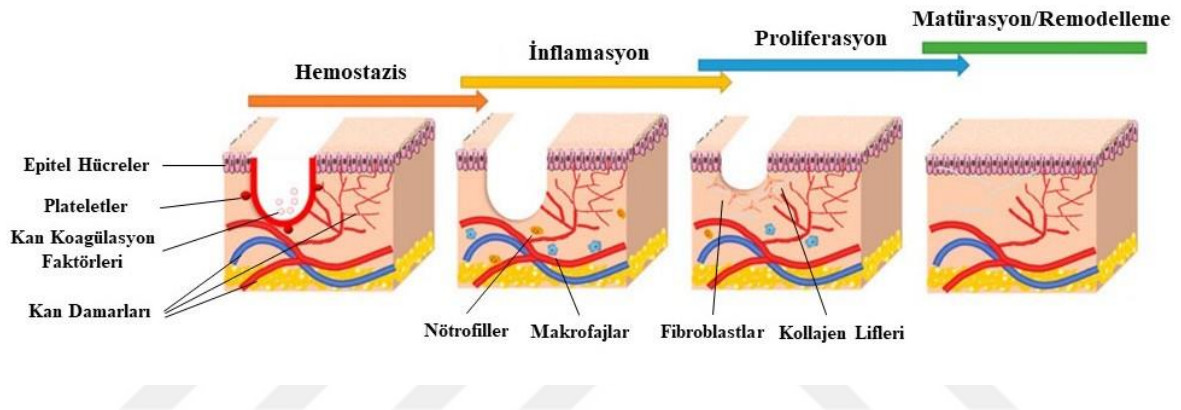
gün içinde bu sızıntının miktarı artar. Kemotaktik faktörlerin etkisi altında lökositler yara bölgesine doğru göç ederler. Başlangıçta polimorfonükleer hücreler baskındır ancak bu hücreler kısa ömürlüdür ve 5. günde yara bölgesinde mononükleer hücreler baskın hale gelir (Tablo 1). Erken iyileşme süreci yaralanmadan sonraki 3-5 gün içinde fibroblastların ve endotel hücrelerinin çoğalmasıyla başlar ve granülasyon dokusunun oluşumunu tetikler. Tam katmanlı açık yaralarda genellikle yaralanmadan sonraki 4-5 gün içinde yeterli granülasyon yatağı mevcut olduğunda epitelizasyon başlar. Yaklaşık bir hafta sonra bazı fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşür ve bu dönüşüm de iyileşmeyi hızlandırır. Miyofibroblastların kasılması yaranın boyutunu küçültür. Fibrin şeritleri çözülmeye başladığında fibroblastlar tarafından oluşturulan kollajen de biriktirilir. Kollajen yaranın güçlenmesine yardımcı olmak için sürekli olarak yeniden yapılanmaya devam eder (Tablo 1; Hosgood, 2012).

Tablo 1. Yara iyileşmesi aşamalarında gerçekleşen hücresel ve biyofizyolojik olaylar.

İyileşme Aşaması	Hücresel ve Biyofizyolojik Olay	Oluşma Zamanı
Hemostazis	Vazokonstriksiyon Platelet kümeleşmesi, degranülasyon ve fibrin oluşumu (trombüs)	1. gün
İnflamasyon	Nötrofil infiltrasyonu Monosit infiltrasyonu ve makrofajların farklılaşması Lenfosit infiltrasyonu	1-5. gün
Proliferasyon/Reperasyon	Re-epitelizasyon Anjiyogenez Kollajen Sentezi Ekstraselüler matriks oluşumu	5-21. gün
Matürasyon/Remodelleme	Kollajen remodellemesi Vasküler matürasyon ve avaskülarizasyonu	21. gün-2 yıl

Yara iyileşmesi doku travmasını takip eden lokal hücreler, damarlar ve hücreler arası matriksi içeren karmaşık bir dizi olayı kapsar (Tablo 1; Şekil 2; Richardson ve diğerleri, 2013; Martin ve Nunan, 2015). İyileşme sürecinin başlaması, yönetimi ve sürdürülmesi için sitokinler ve büyüme faktörleri gerekmektedir. Yara iyileşmesi hemostazis, inflamasyon, proliferasyon (reperasyon) ve olgunlaşma (remodelleme) aşamaları olmak üzere dört aşamada meydana gelmektedir (Şekil 2; Hosgood, 2006; Li ve diğerleri, 2007; Wilhelm ve diğerleri, 2017). Herhangi bir yaranın düzgün bir şekilde iyileşmediği bir durumda yara iyileşme sürecini

anlamak ve yaranın bir sonraki aşamaya ilerlemesi için neyin gerektiğini belirlemek önemlidir (Harding ve diğerleri, 2002; J. R. Davidson, 2015). Yara iyileşme aşamaları genellikle lineer bir zaman çizelgesinde ayrı ayrı ele alınan farklı aşamalar olarak tartışılmakla birlikte, gerçekte bu aşamalar birbiri ile örtüşen zaman dilimlerinde gerçekleşir. Yara iyileşme aşamalarında, her bir bölümden önceki iyileşme aşamasının tamamlanmış olması gerekliliği ile birlikte, sıklıkla aynı anda birden fazla iyileşme aşaması gözlemlenir (Lux, 2022). Yara iyileşmesinin her aşaması; büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler gibi yara iyileşmesi araçlarını içeren mikroskobik olaylar serisidir (Mickelson ve diğerleri, 2016; Lux, 2022).



Şekil 2. Yara iyileşme fazları sırasında meydana gelen olaylar (Li ve diğerleri, 2022'den alınmıştır).

2.2.1. Yara İyileşmesinin Sınıflandırılması

Yara iyileşmesi iyileşme türüne bağlı olarak beş farklı kategoriye ayrılmaktadır. Bu kategoriler iyileşme sürecinin özelliklerine göre tanımlanmıştır; birinci derece (primer), ikinci derece (sekonder), karışık, kabuk altı ve anormal granülasyon veya sikatrizasyon olarak sıralanmaktadır (Samsar ve Akın, 2003).

Birinci derece (primer) iyileşme, yara oluşumunu takip eden 12-24 saat içinde yara kenarlarının uygun materyallerle (dikiş ipliği, doku yapıştırıcısı vb.) birleştirildiği bir iyileşme türüdür (Enoch ve Leaper, 2008). Primer iyileşme yaranın yeni ve aseptik olduğu, kanamanın kontrol altına alındığı, yarada yabancı cisim bulunmadığı ve doku kaybının yaşanmadığı yaralarda şekillenmektedir. Bu şartlar sağlandığında yara kenarları arasında bulunan kapiller ve lenf damarlarından sızan eksudat organize bir şekilde bölgeyi doldurur. Hücresel aktivitelerin

dengesi korunur ve yara hızla iyileşmeye doğru ilerler (Samsar ve Akın, 2003; Enoch ve Leaper, 2008).

İkinci derece (sekonder) yara iyileşmesi; travma, yanıklar, doku kayıplı yaralanmalar veya bazı cerrahi prosedürler sonrasında yara kenarlarının uygun şekilde birleştirilemediği, bölgenin kangrene uğradığı veya anemik olduğu durumlarda oluşmaktadır. Bu tür yaralanmalardan 24 saat sonra yara kenarlarında konjesyon ve irinleşme gözlemlenebilir. Açık ve tam katmanlı yaralarda re-epitelizasyon mümkün olmadığı için yara kenarlarında bağ doku ve kan hücrelerinin birikimi sonucu granülasyon dokusu oluşur. Granülasyon dokusunun büyümesiyle yara yüzeyi yavaşça deri düzeyine ulaşır ve kontraksiyona uğrayarak kapanır. Sekonder iyileşme süreci spontan bir iyileşme sürecine sahiptir ve iyileşme daha yavaş gerçekleşir. Yeni oluşan derinin dermis katında ter bezleri, yağ bezleri ve kıl folikülleri bulunmaz. Bu durum yara bölgesine bağlı olarak bazı doku fonksiyonlarında kısıtlamalara neden olabilir (Samsar ve Akın, 2003; Enoch ve Leaper 2008).

Karışık iyileşme yaranın bazı bölgelerinde yara kenarlarının doğrudan birleştiği yerlerde primer, birleşmediği yerlerde ise granülasyon dokusu oluşturarak sekonder iyileşme gözlenen iyileşme türüdür. Her iki iyileşme türü (primer ve sekonder) aynı anda gözlemlenir (Samsar ve Akın, 2003).

Kabuk altı iyileşme yalnızca yüzeysel yaralarda görülmektedir (Resim 1). Yaranın yüzeyinde bulunan eksudat kuruyarak kabuk oluşturur ve bu kabuk altında sikatrizasyon süreci gerçekleşir (Resim 1). Eitelizasyon tamamlandıktan sonra kabuk kendiliğinden düşer (Resim 1; Samsar ve Akın, 2003).



Resim 1. Bir farede gözlemlenen kabuk altı iyileşme.

Anormal granülasyon veya sikatrizasyon, maddi doku kaybı yaşanan yaralarda veya primer iyileşmenin sağlanamadığı yaralarda gözlemlenen bir durumdur. Bu tür durumlarda

dokuda hiperplazik veya hipoplazik yapılar görülmektedir. Hiperplazik yapı, iyileşme dokusunun yara yüzeyine ulaştıktan sonra normalden fazla büyüyerek kabarık çıkıntılar oluşturması ile meydana gelir. Bu durum yaranın normal düzeyde iyileşmesini engelleyerek bazen estetik veya fonksiyonel sorunlara yol açabilir (Samsar ve Akın, 2003). Bu nedenle anormal granülasyonun veya sikatrizasyonun nedenlerinin ve tedavi yöntemlerinin belirlenmesi önemlidir.

2.2.2. Yara İyileşmesinin Aşamaları

Yara iyileşmesi temel olarak dört başlıkta incelenmektedir. Her bir aşama birbiri ile bağlantılı olup yara iyileşmesi sırasında birbiri içine geçen karmaşık bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Hosgood, 2012; Souci ve Denesvre, 2021).

2.2.2.1. Hemostazis Aşaması

Deri yaralanmasının ardından intravasküler sıvı ve kan sızması ile yerel lenfatik drenajın tıkanması sonucu inflamasyon belirtileri (rubor, tumor, dolor ve calor) şekillenir (Li ve diğerleri, 2007). Yaralanmadan sonra hasarlı hücrelerden histamin, serotonin ve katekolaminler gibi vazoaaktif bileşikler salınır. Bu bileşikler geçici bir damar daralması (vazokonstriksiyon) ve ardından sıvıların ve hücrelerin yaralanmış ekstravasküler bölgeye geçmesine izin veren bir damar genişlemesi (vazodilatasyon) oluşturur (Cross ve Mustoe, 2003; Hosgood, 2006). Yaralanma sonrası subendotelyumun hasarı platelet agregasyonunu ve yapışmasını etkinleştiren kollajen ve doku faktörlerinin aktive olmasına neden olur (Li ve diğerleri, 2007; P. Wang ve diğerleri, 2018). Plateletler serotonin, tromboksan A₂ gibi maddeleri ve fibrinojen, fibronektin, von Willebrand faktörü VIII kompleksi gibi yapışkan proteinleri salgırlar. Bu proteinler lokal trombin ile daha fazla platelet agregasyonunu teşvik ederek plateletlerden oluşan bir tıkaç meydana getirirler. Trombin fibrinojeni fibrine dönüştürerek fibrin pıhtısını oluşturur. Bu pıhtı mikroorganizmalara karşı bir bariyer sağlar, hücre bağlanması için bir matriks iskeleti olarak hizmet eder ve büyüme faktörleri deposu olarak işlev gösterir (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001; Cross ve Mustoe, 2003; Werner ve Grose, 2003; Li ve diğerleri, 2007).

2.2.2.2. İnflamasyon Aşaması

Hemostaz ile oluşan fibrin pıhtısı fibronektin, aktive edilmiş faktör XIII ve geçici bir ekstrasellüler matriks görevi gören fibrin içerir. Trombositler, lökositlerin kemotraksiyonundan sorumlu bir dizi büyüme faktörünü serbest bırakır (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001; Cross ve Mustoe, 2003; Hosgood, 2006; Li ve diğerleri, 2007). Trombositlerin salgıladığı vazoaktif bileşikler, endotel hücrelerinin lökosit çekilmesine ve geçişine izin vermesine neden olur. Bu faktörlerin tümü lökositlerin ve diğer hücrelerin yara yatağına göç etmesi, lökositlerin ve bağ dokusu hücrelerinin geçici ekstrasellüler matrikse yapışmasını içeren bir dizi olay için önemlidir. Yaralanmadan birkaç saat sonra lökositlerin ve nötrofillerin yara bölgesine girişi başlar (Werner ve Grose, 2003; Li ve diğerleri, 2007; P. Wang ve diğerleri, 2018). Nötrofilleri takiben monositler ve lenfositler yara bölgesine gelirler. Nötrofil hücre yüzeyindeki integrin reseptörleri hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerini teşvik eder ve nekrotik kalıntılar ile mikroorganizmaların fagositoz yapmasını sağlar (Cross ve Mustoe, 2003; Li ve diğerleri, 2007; Martin ve Nunan; 2015; P. Wang ve diğerleri, 2018). Nötrofillerin fonksiyonları proteinazların, reaktif ve toksik oksijen türlerinin salınımı ile sağlanır. Bu ürünler aynı zamanda yaralı hücreleri, denatüre olmuş ekstrasellüler matriks ve bakteri ürünlerini parçalarlar (Cross ve Mustoe, 2003; Werner ve Grose, 2003; Hosgood, 2006). Nötrofiller yara bölgesini temizlemenin yanı sıra makrofaj, keratinosit ve fibroblast büyüme faktörlerini aktive eden sitokinleri de salgılar (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001).

Monositler nötrofillerin ardından yara bölgesine girerler ve makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar sonraki yara iyileşme aşamalarında baskın hücre tipidir. Yabancı madde veya patojenin sürekli olarak bulunması makrofajların çoğalmasına yol açar. Bu durum kronik inflamasyonun bir göstergesidir (Hosgood, 2006). Makrofajlar nekrotik kalıntıların, mikroorganizmaların ve apoptotik nötrofillerin fagositozundan sorumludur. Büyüme faktörlerinin üreticileri olarak yara iyileşmesinde önemli bir rol oynarlar (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001; Cross ve Mustoe, 2003; Werner ve Grose, 2003; Li ve diğerleri, 2007; Martin ve Nunan, 2015). Üretilen büyüme faktörleri ve sitokinler hücre göçünü, hücre çoğalmasını, ekstrasellüler matriksin üretimini ve bakımını sağlar (Li ve diğerleri, 2007). Bu geçici ekstrasellüler matriks inflamasyon aşaması boyunca nötrofillerin ve makrofajların etkisi ile değişime uğrar ve granülasyon dokusunun oluşumunda rol oynar (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001; Hosgood, 2006; Li ve diğerleri, 2007). Sağlıklı bir yara bölgesinde hemostazın ve inflamasyon aşamasının tamamlanması genellikle 72 saat sürer. Yara kontaminasyonu

varlığında nötrofillerin bölgede uzun süreli olarak kalması nedeniyle yara iyileşmesinde gecikme olabilir (Li ve diğerleri, 2007; P. Wang ve diğerleri, 2018).

2.2.2.3. Proliferasyon (Reperasyon, Onarım) Aşaması

İnflamasyon aşamasından onarım aşamasına geçiş yaradaki inflamasyon hücrelerinin sayısının azalmasıyla gerçekleşir; ancak monositler yara bölgesine göç etmeye ve makrofajlara dönüşmeye devam ederler (Cross ve Mustoe, 2003; Schultz ve diğerleri, 2003). Bu aşama üç hücre tipinin (fibroblastlar, endotel hücreleri ve keratinositler) çoğalmasının önemi nedeniyle proliferasyon aşaması olarak da adlandırılır. Sağlıklı bir yarada yaralanmadan 3-5 gün sonra aktive olan makrofajlar tarafından uyarılan olaylar dizisi yoluyla geçici ekstraselüler matriks granülasyon dokusuna dönüşür. Bu aşamada, geçici ekstraselüler matriks fibroblastlar ve endotel hücrelerinin göçüne izin vererek fibroplazi ve anjiyogenezin gerçekleşmesine olanak tanır (Hosgood, 2006; Li ve diğerleri, 2007). Fibroplazi fibroblastların birikmesine ve dermal matriks oluşumuna neden olurken, anjiyogenez yeni kapiller damarların oluşumunu sağlar. Anjiyogenez sonucu dokunun karakteristik granülasyon görünümü şekillenir (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001; Schultz ve diğerleri, 2003; Li ve diğerleri, 2007). Fibroblastlar aktive makrofajlar tarafından yaraya çekilir ve daha fazla fibroblast göçünü, çoğalmasını ve integrinlerin ekspresyonunu uyarmak için makrofajlar mediatörler salgılar (Schultz ve diğerleri, 2003; Cross ve Mustoe, 2003; Hosgood, 2006; Li ve diğerleri, 2007). İntegrinler birçok farklı hücrenin yüzeyinde bulunan göçü, çoğalmayı ve hücre sinyali kontrol etmek için işlev gören transmembran reseptörlerdir. İntegrinler, büyüme faktörlerini uyararak birçok sinyal yolunu etkinleştirirler (Stupack ve Cheresch, 2004; Li ve diğerleri, 2007; DiPersio ve diğerleri, 2016). Fibroblastlar yaraya girdikten sonra kollajen, elastin ve proteoglikanlar dahil olmak üzere protein sentezi yapar ve kollajeni çapraz bağlayan lysil oksidaz salgılar (Cross ve Mustoe, 2003; Schultz ve diğerleri, 2003; Li ve diğerleri, 2007). Bazı fibroblastlar yara kontraksiyonu için önemli olan miyofibroblastlara dönüştürülür (Li ve diğerleri, 2007). Bu bölgede hasarlı matriks proteinleri bulunabilir; bunlar yeni oluşturulan kollajenin, elastinin ve proteoglikanların uygun bütünleşmesini sağlamak için bölgeden uzaklaştırılmalıdır. Bu amaçla fibroblastlar hasarlı matriks proteinlerini uzaklaştıran proteinazları üretirler. Proteinazlar onarım aşamasındaki tüm başlıca hücre tipleri tarafından salgılanan matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinin üyeleridir (Schultz ve diğerleri, 2003; Hosgood, 2006). Kollajen tip III, fibroblastlar tarafından erken yara iyileşme sürecinde granülasyon dokusu oluşturmak için üretilen baskın kollajendir. Zamanla

kollajen III, kollajen I ile değiştirilir ve dermal matriks kompozisyonu ve montajını düzenleyen kollajen VI'nın üretimi meydana gelir. Daha sonra geçici ekstraselüler matriksin yerini bu yeni kollajen matriksi alır ve anjiyogenez süreci başlar (Liekens ve diğerleri, 2001; Werner ve Grose, 2003; Li ve diğerleri, 2007; Rousselle ve diğerleri, 2019). Anjiyogenez makrofajların salgıladığı sitokinler, doku travması sonucu oluşan düşük oksijen miktarı, laktik asit ve büyüme faktörleri ile tetiklenerek hasarlı dokuların yakınında bulunan damar endotel hücrelerinin yaraya göç etmesiyle başlar (Liekens ve diğerleri, 2001; Werner ve Grose, 2003; Li ve diğerleri, 2007). Proteinazlar depolanan büyüme faktörlerini serbest bırakmak için ekstraselüler matriksi parçalar (Carmeliet, 2000). Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), vaskülogenez ve anjiyogeneze katkı sağlayarak yara iyileşme hızını etkilemektedir. Endotelyal hücreler üzerinde etkili olan baskın faktör VEGF'dir. Bu faktör hücre çoğalması için mitojeniktir ve integrin reseptörlerini kullanarak daha fazla endotelyal göç ve dallanmayı oluşturur (Carmeliet, 2000; Stupack ve Cheresch, 2004; Li ve diğerleri, 2007). Anjiyogenez VEGF gibi aktivatörlerin yanı sıra proliferasyon ve göçün inhibitörleri olan angiostatin, endostatin ve antitrombin III gibi maddeler tarafından da kontrol edilmektedir (Carmeliet, 2000). Endotelyal hücreler birbiri ardına gelen sıralar oluşturur ve sonunda bir lümen oluşturmak üzere bir araya gelir (Carmeliet, 2000; Hosgood, 2006). Anjiyogenez besin ve oksijen sağlayarak yara bölgesinin yüksek metabolik ihtiyacını destekler (Schultz ve diğerleri, 2003). Bu yeni damarlar remodelleme sürecinde hipoplazi geçirerek apoptozise uğrar. Granölasyon dokusu proliferasyon aşamasında soluk ve sürecin başlangıcına göre daha ince bir görünümdedir (Carmeliet, 2000; Armstrong ve Bornstein, 2003; Hosgood, 2006).

Permeabilite bariyerini yeniden sağlayan re-epitelyalizasyon, bitişik keratinositlerin yaraya göç etmesi ile başlar. Yüzeysel yaralarda kıl folikülleri, tırnaklar, yağ bezleri ve deri ekleri gibi bölgelerden keratinositler hızla yara bölgesine göç eder (Hosgood, 2006; Li ve diğerleri, 2007; Sorg ve diğerleri, 2017). Tam katmanlı yaralarda re-epitelizasyon yaranın içini dolduran granölasyon dokusu oluşana kadar şekillenemez (Sorg ve diğerleri, 2017). Keratinositlerin göçü yaranımayı takip eden 24 saat içinde başlar, ancak gözle görölür hale gelmesi yaranımadan 4 ve/veya 5 gün sonra meydana gelmektedir (Hosgood, 2006; Li ve diğerleri, 2007).

Keratinositler göçleri esnasında şekil değiştirmeye başlarlar. Bu şekil değiştirmede, hücreler düz ve uzun bir forma dönüşerek lamellipodia (epitel dil) adı verilen sahte ayak benzeri uzantılar oluşturur. Aynı zamanda hücre-matriks ve hücre-hücre bağlantılarını kaybederek keratinositlerin sitoplazmasında aktin filamentleri oluştururlar (Li ve diğerleri, 2007; Sorg ve

diğerleri, 2017). Keratinositler bu lamellipodia uzantılarını kullanarak yaraya doğru ilerlerler. Lamellopodia adı verilen bu yapılar keratinositlerin fibronektin ile zenginleştirilmiş matriksten çıkmasına olanak tanır. Keratinositler yaranın merkezine ulaştığında göçleri temas inhibisyonu nedeniyle durur ve hücreler arası ve hücre-matriks bağlantıları yeniden kurulur (Li ve diğerleri, 2007; Sorg ve diğerleri, 2017). MMP-1 (matriks metalloproteinaz-1) varlığı keratinositlerin bazal membranının çözülmesine ve kollajen I ile sıkı bağlantılar kurmasına izin verir (Rohani ve Parks, 2015). Yaranın merkezi en yüksek çoğalma indeksine ve en düşük hücre tabakası sayısına sahiptir. Keratinosit göçünü, çoğalmayı ve re-epitelizasyon sürecini uyaran çeşitli araçlar bulunmaktadır (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001; Schultz ve diğerleri, 2003; Li ve diğerleri, 2007). Keratinositler bazal tabaka ile yeniden temas kurduklarında orijinal döşeme taş desenine sahip şekline geri dönerler ve epidermal tabakalaşma meydana gelir (Hosgood, 2006; Sorg ve diğerleri, 2017). Re-epitelizasyonun ardından bazal membran yeniden oluşur ve kollajen IV'ün üç boyutlu örgüsü ile doldurulur (Li ve diğerleri, 2007).

2.2.2.3.1. Kontraksiyon

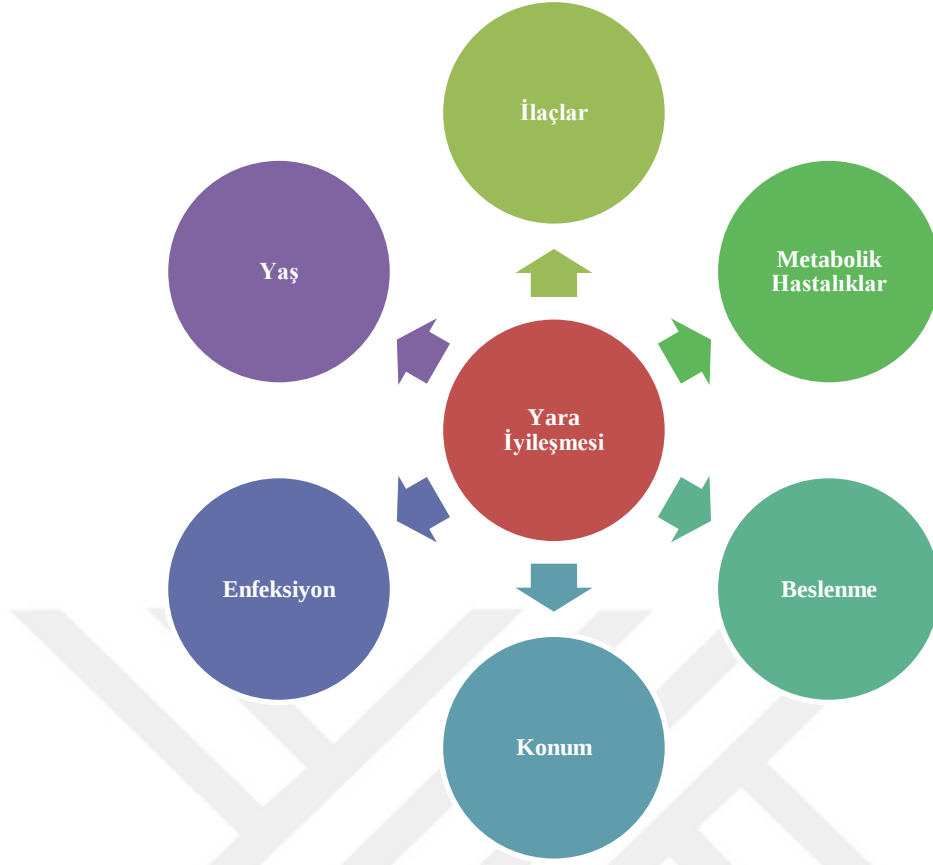
Miyofibroblastlar yaranın kontraksiyonunda önemli bir rol oynarlar. Miyofibroblastlar dermal fibroblastlardan oluşur. Alfa (α) düz kas aktin hücrelerinden farklılaşan dermal fibroblastlar yaralanmayı takip eden süreçte transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) tarafından uyarılarak miyofibroblastları meydana getirir (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001; Li ve diğerleri, 2007; Sorg ve diğerleri, 2017). Miyofibroblastlar yara kontraksiyon çizgileri ile hizalanır ve yara kontraksiyonu deri gerilim çizgileri yönünde şekillenir (Li ve diğerleri, 2007). Miyofibroblastlar intrasellüler aktinin fibronektin ve kollajen ile integrinler aracılığıyla etkileşime girmesini sağlamak için uzar. Miyofibroblast daha sonra geri çekilir, kollajeni hücreye doğru çeker ve kontraksiyonu sağlar (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001; Cross ve Mustoe, 2003; Li ve diğerleri, 2007; Sorg ve diğerleri, 2017). Miyofibroblastın uzaması ve kısılması 5-hidroksitriptamin, anjiyotensin, vazopressin, bradikinin, epinefrin ve norepinefrin tarafından düzenlenir (Li ve diğerleri, 2007). Yara kontraksiyon hızı kollajen örgü konsantrasyonu ile ters, hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Bell ve diğerleri, 1981). Yaklaşık iki hafta sonra zirveye ulaşan yara kontraksiyonu tam katmanlı yara iyileşmesi için önemlidir (Li ve diğerleri, 2007). Yara kenarlarına fazla gerilim uygulanması yara kontraksiyonunu engeller. Bölgedeki nekrotik dokuların varlığı kontraksiyon ve epitelizasyonu engelleyen mekanik bir engel oluşturur (Schultz ve diğerleri, 2003).

2.2.2.4. Matürasyon (Remodelleme) Aşaması

Yara iyileşmesinin en son aşamasında fibrin pıhtısı sonunda hücreli bir yara izine dönüşene kadar dokunun remodellemesi gerçekleşir (Cross ve Mustoe, 2003; Li ve diğerleri, 2007). Bu evrenin belirgin özellikleri apoptozis ve kollajenin yeniden şekillenmesidir. Endotelial hücrelerin ve miyofibroblastların apoptozisi, granülasyon dokusunun hücreli içeriğinin azalmasına ve yaranın yara izine dönüşmesine sebep olur (Cross ve Mustoe, 2003; Schultz ve diğerleri, 2003; Hosgood, 2006). Endotelial hücrelerin apoptozisi yaranın daha normal bir damar yoğunluğuna sahip olduğu ve anjiyogenezisin azalmasıyla yara renginin kırmızıdan daha az pigmentli bir hale geldiği bir yara izini şekillendirir (Schultz ve diğerleri, 2003; DiPersio ve diğerleri, 2016; Sorg ve diğerleri, 2017). Bu aşamada birçok büyüme faktörünün konsantrasyonu azalsa da TGF- β , kollajen I ve III üretimini uyarak yara izi oluşumunda önemli rol oynar (Cross ve Mustoe, 2003). Kollajen III'ün yıkımı ve kollajen I'in artan üretimi, matriks metalloproteinazlar ile doku inhibitörleri arasındaki karmaşık etkileşimle düzenlenir (Visse ve Nagase, 2003; Chakraborti ve diğerleri, 2003). Kollajen fibrilleri daha kalın demetler oluşturarak yaranın gerilim mukavemetini artırmak için aşamalı ve yavaş bir şekilde çapraz bağ oluşturmaya başlar (Lux, 2022). Bu aşamanın sonucunda çoğunlukla kollajen I içeren, ek deri yapıları (kıl ve bezler) içermeyen hücreli bir yara izi oluşur (Cross ve Mustoe, 2003; Werner ve Grose, 2003; Hosgood 2006; Li ve diğerleri, 2007). Yara iyileşmesinin remodelleme aşamasında herhangi bir aksaklığa uğraması, aşırı yara izi oluşumuna veya kronik yara iyileşmesine sebep olabilmektedir (Yamaguchi ve Yoshikawa, 2001; C. R. Tsai ve diğerleri, 2018).

2.3. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Zayıf veya gecikmiş yara iyileşmesinin çeşitli nedenleri bulunmaktadır. Bunlar Şekil 3'te özetlenmiştir. Bu nedenlerin belirlenmesi için hastanın tıbbi geçmişinin, doku biyopsilerinin/kültürlerinin, kan analizlerinin ve tanısal görüntüleme yöntemlerinin eksiksiz incelenmesi gerekir (Şekil 3; Morton ve Phillips, 2016).



Şekil 3. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler.

2.3.1. Yaş

Yaşlanma cildin iyileşme fonksiyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. Yaşın ilerlemesiyle yara iyileşmesi sırasında inflamasyon fazının uzaması ve reaktif oksijen türlerinin üretiminde artış gözlenmektedir. Bu değişimler iyileşme sürecinde fazla miktarda protein bozunumuna sebep olarak kronik yara gibi komplikasyonlara yol açabilmektedir (Khalid ve diğerleri, 2022).

2.3.2. Enfeksiyonla İlişkili Faktörler

Enfeksiyon dokulardaki bakteri yoğunluğunu, ağrı, eritem, ödem ve irinli eksudat gibi enfeksiyonla ilişkilendirilen belirtileri içermektedir (Cutting ve White, 2005). Bakteriler yıkımlayıcı virülans faktörleri ile yapışma ve fagositozu önleyici faktörleri salgılayarak nötrofil lizisine neden olur. Nötrofillerin lizisi yara içerisine sitotoksik maddelerin salımı ile doku

nekrozuna sebep olur ve nötrofillerin normal işlevlerinin bozulmasına neden olur (Percival ve diğerleri, 2010). Bakterilerin varlığı kronik yaralara neden olabilmektedir (Caldwell, 2020). Köpek ve kedilerde cerrahi bölge enfeksiyonlarının en yaygın bakterileri yaygın fırsatçı patojenler olan Staphylococcus türleridir (Turk ve diğerleri, 2015; Garcia Stickney ve Thieman Mankim, 2018). Hipotansiyon ve dokulardaki oksijen eksikliği köpek ve kedilerin cerrahi bölge enfeksiyonları için risk faktörleri arasındadır (Hosgood, 2012; Turk ve diğerleri, 2015). Ayrıca, özellikle inflamasyon ve erken onarım aşamalarında yaranın dış çevresel kontaminasyonlara karşı korunmaması enfeksiyona ve yara iyileşmesinde gecikmelere neden olabilir (Lux, 2022).

2.3.3. İlaçlar

Yara iyileşmesi üzerinde olumsuz etkilere sahip olan ilaçlar arasında kortikosteroidler, kemoterapötikler, immünsüpresif ajanlar ve nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİD'ler) bulunmaktadır. NSAİD'lerin kemirgenlerde, tavşanlarda ve köpeklerde kemik iyileşmesini baskıladığını rapor eden birçok makale bulunmaktadır (Barry, 2010; Gallaher ve diğerleri, 2019). İmmünsüpresif ajanlar hayvanlarda immün sistem kökenli hastalıklar ve neoplazi dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için kullanılmaktadır. Kemoterapinin iyileşme üzerindeki etkileri ilacın sınıfı ve dozu gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Beyene ve diğerleri, 2020). Kemoterapi; fibroblastlar gibi hızla bölünen hücreleri etkilediğinden yara iyileşme sırasında kullanımından kaçınılması önerilmektedir (Laing, 1990). Kortikosteroidlerin sitokinler, kemotaksis, mitojenik uyarılar, nötrofil infiltrasyonu yapışma ve kemotaksisi, fibroblast göçü ve kollajen birikimi üzerine negatif etkileri bulunmaktadır (Busti ve diğerleri, 2005; Wang ve diğerleri, 2013). Doza ve tedavi süresine bağlı olarak kortikosteroid kullanımı klinik olarak yara ayrılması, gecikmiş iyileşme ve enfeksiyona yol açabilmektedir (Busti ve diğerleri, 2005). Kortikosteroid kullanımından kaçınılamadığı durumlarda A vitamini takviyesi önerilmektedir (Lux, 2022). Yara iyileşmesi sürecinde, hayvanın kullanmakta olduğu ilaçların duraklatılması veya yeniden değerlendirilmesi gerekebilir (Souci ve Denesvre, 2021).

2.3.4. Metabolik Hastalıklar

Diabetes mellitus, hiperadrenokortisizm, hipotiroidizm gibi, üremiye sebep olan kronik ve akut böbrek yetmezlikleri yara iyileşmesini karmaşık hale getiren etkenler arasında yer

almaktadır (Lux, 2022). Diabetes mellitusun sebep olduğu hiperglisemi; fibroblast ve lökositlerin askorbik asit taşınımını bozmaktadır (Baltzis ve diğerleri, 2014; Beyene ve diğerleri, 2020). Askorbik asit kollajen sentezi, hücre mitozu ve monosit göçü için gereklidir (Williams ve Barbul, 2003; Wild ve diğerleri, 2010). Hiperadrenokortisizm ve hipotiroidizm postoperatif yara enfeksiyonu riskini artırabilmektedir (Nicholson ve diğerleri, 2002). Akut ve kronik böbrek yetmezlikleri anjiyogenez ve fibroblast proliferasyonunu engelleyerek granülasyon dokusunun geç şekillenmesine sebep olmaktadır (Maroz ve Simman, 2013; Beyene ve diğerleri, 2020). Metabolik hastalığı olan hayvanların yara bakımları ilgili hastalık göz önünde bulundurularak uygun bir şekilde desteklenmeli/yönetilmelidir (Lux, 2022).

2.3.5. Beslenme

Malnütrisyon veya besin maddelerinin eksikliği uzamış inflamasyon aşamasına, fibroblast proliferasyonunda ve kollajen sentezinde azalmaya sebep olarak yara dokusunun dayanıklılık direncini azaltabilmekte ve enfeksiyon riskini artırabilmektedir (Williams ve Barbul, 2003; Arnold ve Barbul, 2006). Yaranın boyutuna orantılı olarak yaranın varlığı katabolik metabolizmayı hızlandırmaktadır (Williams ve Barbul, 2003; Wild ve diğerleri, 2010). Yetersiz beslenme durumlarında tüm yara iyileşme aşamaları için gereken protein, yağ ve karbonhidrat eksikliği iyileşmeyi geciktirmektedir (Beyene ve diğerleri, 2020). Glukoz; lökositler ve fibroblast gibi hücreler için enerjinin başlıca kaynağıdır ve diyetle alınan karbonhidratlar bunun önemli bir kaynağını oluşturur (Williams ve Barbul, 2003). Yetersiz protein alımı; iyileşme sürecinde gecikmeye ve fibroplazide aksamaya yol açmakta, yara enfeksiyon riskini ise arttırmaktadır (Williams ve Barbul, 2003; Beyene ve diğerleri, 2020). Elektrolitler, mineraller (bakır ve çinko) ve vitaminler yara iyileşmesindeki yardımcı faktörler olarak işlev görmektedirler (Lux, 2022). Magnezyum; protein oluşumu, kollajen sentezi ve doku büyümesi için gereklidir (Williams ve Barbul, 2003; Arnold ve Barbul, 2006).

Vitamin A eksikliği, yara iyileşmesinin inflamasyon aşamasında B ve T hücrelerinin işlevini ve antikor üretimini bozar. Proliferasyon ve remodelleme aşamalarındaki epitelizeasyon, kollajen sentezi ve granülasyon dokusunun gelişimini azaltır (Stadelmann ve diğerleri, 1998). B vitaminleri lökosit oluşumunda ve yara iyileşmesinin anabolik süreçlerinde yer alan enzimlerin koenzim kısmıdır. Tiamin, riboflavin, piridoksin ve kobalaminler kollajen sentezi için gereklidir (Russell, 2001). B vitamini eksiklikleri antikor üretimini ve beyaz kan hücresi

fonksiyonlarını olumsuz etkileyerek yaraların enfeksiyon riskini artırır (Williams ve Barbul, 2003). C vitamini hücre göçü ve dönüşümü, kollajen sentezi, antioksidan yanıt ve anjiyogeneze yer alarak yara iyileşmesinde rol oynar (Casey, 2003; Harris ve Fraser, 2004). D vitamini dokuların yapısal bütünlüğü ve epitel bariyerin madde taşınımında rol oynar (Kalava ve diğerleri, 2011; Zhang ve diğerleri, 2013). Çoğu vitamin yara iyileşmesinde olumlu etkiler gösterse de, E vitamininin kollajen sentezi, antioksidan aktivite ve inflamasyon aşamasını olumsuz etkileyebildiği belirtilmiştir (Mazzotta, 1994).

Mineraller; antioksidan özellikleri ve enzimlerin yapısal taşları olmaları ile yara iyileşme sürecine dahil olur. Çinko, yara iyileşmesinin inflamasyon aşamasında epitel ve fibroblast hücrelerinde DNA replikasyonu için gereklidir, lenfosit aktivasyonunu artırır ve antikor üretimini teşvik ederek enfeksiyon riskini azaltır (Todorovic, 2002). Ayrıca, proliferasyon ve remodelleme aşamalarında enzimlerin aktivitesini uyararak kollajen üretimini, fibroblast proliferasyonunu ve epitelizasyonu destekleyerek sürece katkıda bulunur (Harris ve Fraser, 2004; Lansdown ve diğerleri, 2007). Demir, dokulara oksijen taşıyarak doku perfüzyonu ve kollajen sentezi için gereklidir; eksikliğinde yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasında bölgesel/lokal iskemi, kollajen üretiminin bozulması ve iyileşen yara dokusunun dayanıklılığında azalma görülür (Todorovic, 2002).

2.3.6. Yaranın Konumu

Yaranın konumu enfeksiyon, yaranın açılması, gecikmiş veya yetersiz iyileşme gibi komplikasyonlara yatkınlığa neden olabilmektedir. Kemik çıkıntıları üzerinde yer alan yaralarda dokuların sıkışması sonucu iskemi ve avasküler nekroz şekillenebilmektedir (Swaim ve diğerleri, 1996). Basınç yaraları tuber ischiadicum, olecranon, tuber calcanei, femurun trochanter mayoru, scapula akromiyonu, lateral humerus epikondili, lateral tibial kondili, lateral malleolus, 5. parmakların yan yüzleri ve sternum bölgelerinde sıklıkla görülmektedir (Lux, 2022). Eklem üzerindeki yaralar (özellikle ekstensiyon yüzeylerindeki yaralar) sıkça hareket halindedir. Bu yaralar gerilme, sıkıştırma ve kayma kuvvetlerine maruz kalmaktadır. Aşırı hareket iyileşmeyi olumsuz etkileyebilir ve bu nedenle iyileşme sürecini desteklemek için splint veya alçı uygulaması faydalı olabilmektedir (Lux, 2022).

2.4. Yara İyileşmesinin Değerlendirilmesi ve Takibi

Yara iyileşmesi takibi, iyileşme sürecinin anlaşılması, sürecin aksamasına yol açan nedenlerin tespiti, terapötik etkinliğin yönetimi için; dolayısıyla kaliteli bir iyileşme için önemlidir. Yara iyileşme sürecinde meydana gelen değişimler, belirli parametreleri analiz eden yöntem ve tekniklerle takip edilir. İyileşmeyi değerlendirmek için kullanılan takip yöntemleri, nitel ve nicel protokolleri içerir ve bu yöntemlere doku tamamen iyileşinceye kadar devam edilmelidir (Grey ve diğerleri, 2006; Robson ve Barbul, 2006). Yara iyileşmesindeki ölçümler; yaranın büyüklüğü, yara tabanının içerdiği bileşenlerin biyokimyasal ve genomik yöntemlerle takibi ve yara dokusunun histolojik yapısını içermektedir (Masson-Meyers ve diğerleri, 2020). Bu yöntem ve teknikler üç ana başlık altında toplanabilir:

2.4.1. Planimetrik Ölçümler

Yara iyileşmesi yara kapanma hızı olarak da bilinir. Yara boyutunda (genellikle yüzey alanı) meydana gelen değişikliklerin ölçülmesi ve takip edilmesi yara iyileşme hızını nicelleştirir. Bu teknik klinik ve araştırma alanlarında kullanılan ekonomik ve erişilebilir bir yöntemdir (Masson-Meyers ve diğerleri, 2020).

Yara yüzey alanı çeşitli yöntemlerle ölçülebilir (Williams, 2000; Papazoglou ve diğerleri, 2010). Bunlar arasında bir cetvelle yara alanının uzunluk ve genişliğinin ölçülmesi, yara yüzeyinin üzerine şeffaf bir film yerleştirilerek yara çevresinin çizilerek ölçülmesi, yara yüzeyinin dijital fotoğraflarının görüntü yazılımları ile analizinin yapılması gibi birçok farklı yöntem bulunmaktadır (Koschwanez ve Broadbent, 2011; Andrade ve diğerleri, 2011; Tan ve Wahli, 2013; Okuma ve diğerleri, 2015). Bu yöntemlere alternatif olarak yara iyileşmesinin değerlendirilmesi amacıyla optik koherens tomografi, konfokal lazer tarama mikroskopisi ve diffüz yakın-infrared spektroskopisi gibi alternatif teknikler de kullanılabilmektedir (Weingarten ve diğerleri, 2012; Tsai ve diğerleri, 2013; Sattler ve diğerleri, 2013; Greaves ve diğerleri, 2014). Bu tür yöntemler klinik iyileşmeyi gösteren non-invazif yöntemler olarak tanımlanmıştır (Masson-Meyers ve diğerleri, 2020).

2.4.2. İmmünohistokimyasal ve Histolojik Ölçümler

Yara alanında gerçekleştirilecek immünohistokimyasal ve histolojik incelemeler, tedavi sürecinde iyileşme ilerlemesini değerlendirmek, iyileşmeyen yaraların morfolojik değişikliklerini irdelemek, oluşan yeni dokunun kalitesini incelemek için oldukça faydalı bir araçtır (Romanelli ve diğerleri, 2013; Planz ve diğerleri, 2015). Bu amaçla yara bölgesindeki sağlıklı yara kenarlarından ve hasarlı bölgeden alınan biyopsi örneklerinin incelenmesi önemlidir (Romanelli ve diğerleri, 2013). Bu örnekler, immünohistokimyasal ve histolojik inceleme için gömme, kesme ve boyama gibi işlemlere tabi tutulur (Thavarajah ve diğerleri, 2012). Farklı boyamalar sayesinde yara iyileşmesinin farklı aşamalarında görev alan beyaz kan hücreleri (makrofajlar, mast hücreleri, lenfositler ve nötrofiller), kan damarları, fibrosit ve fibroblastlar, farklı tip kollajenler gibi birçok hücre ve yapı belirlenerek ortaya çıkarılabilir (Masson-Meyers ve diğerleri, 2020). İmmünohistokimyasal yöntemlerle yara iyileşmesinde rol oynayan moleküler yüzey belirteçleri, sitokin ve büyüme faktörleri belirlenebilir. Parafine gömülü doku kesitlerine çeşitli immünohistokimyasal boyalar uygulanarak antikorların hedef antijenlere bağlanması ve çeşitli maddelerin tespiti mümkün hale gelir (Masson-Meyers ve diğerleri, 2020). İmmünohistokimyasal analizlerin tercihi, bütçe, güvenilirlik, duyarlılık, sinyal-gürültü oranı ve kullanım kolaylığı gibi faktörlere bağlı olarak değişebilir (Andrade ve diğerleri, 2011, 2015; de Avila Santana ve diğerleri, 2013; Terra ve diğerleri, 2015). Yara iyileşmesinin immünohistokimyasal yöntemlerle izlenmesi incelenen iyileşme aşamasına bağlı olarak farklı belirteçlerin izlenmesine imkân tanır. Bu yöntemle, fibroblast, makrofaj, kollajen I, III ve IV, interlökinler, TGF- β , VEGF gibi birçok belirteci tespit etmek ve tayin etmek mümkündür (Fronza ve diğerleri, 2014; Masson-Meyers ve diğerleri, 2016).

2.4.3. Biyokimyasal ve Genomik Ölçümler

Yara iyileşmesinin farklı aşamalarında gerçekleşen olayları takip etmek yara dokularından alınan biyopsi örneklerinde biyobelirteçlerin biyokimyasal ve genomik yöntemlerle ölçülmesi ile mümkündür (Masson-Meyers ve diğerleri, 2020). Laboratuvar ortamında ELISA (enzim bağlı immünosorbent analizi) ve real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) gibi spesifik yöntemler kullanılarak doku örneklerinden (homojenatlardan) veya hücre kültürü süpernatantlarından gen ekspresyonları, antikorlar veya

antijenler gibi analitlerin (biyobelirteçler) miktarı/varlığı ölçülerek yara iyileşmesindeki olaylar nicelleştirilmektedir (Mori ve diğerleri, 2004; Masson-Meyers ve diğerleri, 2020). Yara iyileşmesinde eritrosit sedimentasyon hızı ve C-reaktif protein gibi geleneksel yöntemlerle yapılan analizlerin yeterince iyi çıktılar sunmadığı belirtilmiştir (Patel ve diğerleri, 2016). Bu sebeple sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, proteinazlar, kollajenler, matriks metalloproteinazların, miyeloperoksidaz ve oksidatif stres belirteçleri gibi biyobelirteçlerin ölçümünün önemli olduğu belirtilmiştir (Fronza ve diğerleri, 2014; Masson-Meyers ve diğerleri, 2016, 2020).

Sitokinler bağışıklık hücreleri başta olmak üzere hücrelerin yönetimi ve modülasyonunu sağlamak için salgılanan nispeten düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Yara iyileşmesinde temel rol oynayan sinyal molekülleri arasında interlökinler, lenfokinler ve interferonlar gibi sitokinler bulunur. Pro-inflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6, TNF- α , vb.) yara iyileşme sürecinde hücre proliferasyonu, immün yanıtın düzenlenmesi, matriks proteinlerinin üretimi ve fibroblastların yara bölgesine yönlendirilmesi gibi önemli görevler üstlenir (Werner ve Grose, 2003).

Kemokinler hücrelerin yara bölgesine göçünde önemli rol oynayan, molekül ağırlığı düşük kemotaktik sitokinlerdir. Bu moleküller yara içindeki endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, nötrofiller ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanır. Yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasında, neoanjiogenezin teşviki ve düzenlenmesinde, re-epitelizasyon ve granülasyon nedeniyle hızla büyüyen hücrelere gerekli besin maddelerinin sağlanmasında rol oynarlar (Kufareva ve diğerleri, 2015; Ridiandries ve diğerleri, 2018).

Hücre ve doku oluşumunu sağlayan büyüme faktörleri yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasının başlatılmasından sorumludur. Yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörleri arasında; platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüşüm büyüme faktörleri (TGF- α , TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörler (GM-CSF) yer almaktadır (Trenrove ve diğerleri, 1999; Olczyk ve diğerleri, 2014).

Proteinazlar ve proteinaz inhibitörleri yaraların koordineli ve zamanında iyileşmesinden sorumlu olan hücre dışı matriksin parçalanmasını ve biriktirilmesini sağlar. İyileşmeyen yaralarda proteinaz miktarının arttığı, proteinaz/inhibitör dengesinin bozulduğu, proteolizin ve ekstraselüler matriksin sürekli olarak parçalanması sonucu yara iyileşmesinin geciktiği

raporlanmıştır (Demidova-Rice ve diğerleri, 2012; McCarty ve Percival, 2013; Diagn ve Gupta, 2016).

Matriks metalloproteinazlar çinko ve kalsiyuma bağımlı olan bir grup endopeptidazdır (Ligi ve diğerleri, 2016). Yara iyileşmesinin inflamasyon, proliferasyon ve remodelleme aşamalarını yönlendiren sitokin ve kemokinlerin aktivitesini enzimatik olarak etkinleştirir, hücre yüzeyinden ayırarak uygun hale getirir ve düzenlerler. Aynı zamanda hücreler arası etkileşimlerin ve hücre-dışı matriksin bir parçası olan proteinlerin parçalanmasını da sağlar (Caley ve diğerleri, 2015; Jablonska-Trypuc ve diğerleri, 2016).

Glisin, prolin ve hidroksiprolin gibi amino asitlerden oluşan bağ dokunun temel protein bileşeni kollajendir. Kollajen sentezi için demir ve C vitamini gibi kofaktörlerle gerçekleşen lizin ve prolinin hidroksilasyonu gereklidir (Guo ve Dipietro, 2010). Kollajenin parçalanması serbest hidroksiprolin ve peptitlerin açığa çıkmasına neden olur. Bu nedenle hidroksiprolin ölçümü dokudaki kollajen dönüşümünün bir biyobelirteci olarak kabul edilir (Shimanker ve diğerleri, 2013; Amirthalingam ve diğerleri, 2015).

Miyeloperoksidaz (MPO) enzimi peroksidaz-siklooksijenaz süper ailesinin bir üyesi olarak polimorfonükleer nötrofillerin sitoplazmatik granüllerinde bulunur ve ROS (reaktif oksijen türleri) oluşturarak doğal bağışıklık savunma mekanizmalarına katılır (Andrade ve diğerleri, 2011; Caetano ve diğerleri, 2015). MPO enzimi analizi ile doku içinde nötrofillerin mobilizasyonunu ve birikimi tahmin edebilir ve yara iyileşmesinin inflamatuvar aşaması da değerlendirilebilir (Rodero ve Khosrotehrani, 2010; Fronza ve diğerleri, 2014; Nauseef, 2014).

Hücrel stres ve antioksidan aktivite/savunma mekanizmalarının yara iyileşme aşamalarında incelenmesi ve izlenmesi araştırmalarda tercih edilebilir (Rasilainen ve diğerleri, 2002). Bu mekanizmaların belirteçleri arasında malondialdehit (MDA) ve hidrojen peroksit bulunur (Andrade ve diğerleri, 2011; Leite ve diğerleri, 2015). Malondialdehit lipid peroksidasyonunun bir yan ürünüdür ve oksidatif hasarın belirtecidir. Hidrojen peroksit ise hücrel stresin bir belirteci olarak oksidatif dengenin bozulması sonucu oluşan hücrel metabolizma ürünüdür (Moon ve Shibamoto, 2009).

2.5. Yara Tedavisi Maliyeti ve Bitkisel Alternatifler

Yara bakımı, maliyeti ve prevalansı açısından sağlık hizmetlerinin önde gelen endişelerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 8,2 milyonun

üzerinde insanın yara tedavisi gördüğü ve bakım maliyetlerinin 28,1-96,8 milyar Amerikan doları arasında değiştiği raporlanmıştır (Sen, 2019). Küresel yara bakımı pazarı 2018'de 18,4 milyar ABD doları olarak değerlendirilmiş ve 2019'dan 2026'ya kadar olan dönemde yıllık bileşik büyüme oranı (CAGR) %3,9 olarak tahmin edilmiştir (Sen, 2019). Kronik yara tedavisinin sağlık hizmetlerinde en büyük finansal yükü oluşturduğu, sadece ABD'de yılda 25 milyar ABD dolarından fazla harcamaya sebep olarak 6,5 milyon insanı etkilediği belirtilmiştir (Chen ve diğerleri, 2020).

Yara tedavileri geleneksel ve modern yaklaşımlar olmak üzere iki ana kategori altında değerlendirilmektedir. Geleneksel tedaviler genellikle bitki ve hayvan kaynaklı bileşikler, canlı organizmalar ve geleneksel pansumanlar gibi yöntemleri içermektedir (Choi ve diğerleri, 2018). Milyonlarca insan için Asya, Afrika, Orta Doğu ve Latin Amerika'da yerel bitkiler, hayvanlar ve doğal ürünlerden elde edilen geleneksel ilaçlar, yara bakımının temelini oluşturmaktadır (World Health Organization, 2013). Modern tedaviler ise greftler, biyomühendislik ürünü doku nakilleri ve hücre/büyüme faktörü gibi tedavileri içermektedir (Pereira ve Bártolo, 2016). Modern sentetik ilaçlarda görülen alerji, direnç gelişimi ve maliyet gibi sıkıntılar sebebiyle bilim insanları yara iyileştirici alternatif yaklaşımların kullanımını modern teknolojiyle doğrulamaya çalışmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) geleneksel tıbbı, farklı kültürlerin yerel bilgi, beceri ve uygulamalarının toplamı olarak tanımlamaktadır (World Health Organization, 2013). Bu tıbbi yaklaşımlar; sağlığı koruma, fiziksel ve zihinsel hastalıkları önleme, teşhis etme, iyileştirme veya tedavi etme amacıyla kullanılan bilgi ve deneyimlerden oluşmaktadır (Majumdar ve Sangole, 2016). Sanayileşmiş ülkelerde tahmini olarak genel yetişkin nüfusun %30 ila %50'sinin çeşitli tamamlayıcı ve alternatif tıp tedavilerini kullandığı raporlanmıştır (Eisenberg ve diğerleri, 1998; Sparber ve Wootton, 2001).

Bitki özleri tarih boyunca yara iyileştirmede yüksek potansiyele sahip oldukları için tercih edilmiştir (Pazıyar diğerleri, 2014; Maver ve diğerleri, 2015). Birçok geleneksel kültürde kesikleri, yaraları ve yanıkları tedavi etmek için birçok bitki kullanılmaktadır (Budovsky ve diğerleri, 2015; Yuan ve diğerleri, 2016). Dünya nüfusunun yaklaşık %65'i sağlık hizmetlerinde bitkisel tedavileri kullanmaktadır (Lania ve diğerleri, 2019). Geleneksel yöntemler içinde yer alan ve hastalıkları iyileştirmede kullanılan bitkilerin biyoaktif bileşenlerini tanımlamak amacıyla modern bilim eşliğinde kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır (Thakur ve diğerleri, 2011; Prasad ve Tyagi, 2015; Choi ve diğerleri, 2018; Lania ve diğerleri, 2019). Bitkilerin yara iyileşmesindeki potansiyellerini belirlemek ve kanıtlamak amacıyla bitki bileşenlerinin organizmada yarattığı etkiler ayrıntılı bir şekilde araştırılmaktadır (Nayak ve diğerleri, 2011).

Farmakolojik olarak güvenli olduğu saptanan bitkilerin tedavi amacıyla kullanımından önce klinik çalışma ve denemelerde test edilmesi gerekmektedir (Prasad ve Tyagi, 2015). Günümüzde görülen antibiyotik kullanımı suistimali sebebiyle antimikrobiyal ilaçların etkinliğinde azalma, bakteri, mantar ve virüs enfeksiyonlarının tedavisinde başarısızlıklarla karşılaşmaktadır. Bu nedenle bitkisel tedaviler gibi alternatif, yeni, daha az maliyetli ve güvenli tedavi yöntemleri araştırılmakta ve ilgi çekmektedir (Tiwari ve diğeri, 2013). Bin dokuz yüz kırk (1940) ile 2002 yılları arasında geliştirilen yeni antikanser ilaçların yaklaşık %54'ü doğal ürünlerden türetilmiştir (Yuan ve diğeri, 2016). Mevcut tüm farmasötik ürünlerin yaklaşık %73'ünün doğal ürünlerden elde edilen bileşenleri içerdiği belirlenmiştir (Wangchuk, 2018). Bitkisel kaynaklı yeni tedaviler farklı deri ve yara enfeksiyonlarında tedavi mekanizmalarını ve etkinliklerini değerlendirmek amacıyla çalışılmaktadır (Thakur ve diğeri, 2011). Etnobotanik ve etnofarmakolojik çalışmalar farklı kültür ve bölgelerde etkili tedavi yöntemlerini bir araya getirmektedir (Hosseini ve diğeri, 2017). Klinik kullanımda en az 170 farklı topikal yara bakım ürünü bulunsa da (Lohi ve diğeri, 2010) bu ürünlerle ilgili iyi tasarlanmış çalışmaların yetersiz sayıda olduğu belirtilmiştir (Harding ve diğeri, 2002; Fonder ve diğeri, 2008).

2.6. *Calendula officinalis* (Aynısefa Bitkisi)

Calendula officinalis sarı ve turuncu renge sahip, Asya, Avrupa, Çin, Amerika Birleşik Devletleri ve Hindistan'da yaygın olarak kullanılan bir bahçe bitkisidir ve tıbbi amaçlar için oldukça popülerdir (Resim 2).



Resim 2. *Calendula officinalis* bitkisinin fiziki görünümü (Zhang ve diğerleri, 2024'den alınmıştır).

Asteraceae ailesine aittir ve yurt dışında Afrika Marigold, Calendula, Common Marigold, Garden Marigold, Marigold, Pot Marigold gibi birçok farklı isimle anılmaktadır (Shahane ve diğerleri, 2023). Ülkemizde de bu bitki çeşitli isimlerle adlandırılmaktadır. Bunlar arasında aynısefa, altuncuk, kandil çiçeği, sefa çiçeği, sarıpat, şamdan çiçeği, ölü çiçeği, tıbbi nergis, portakal nergisi, çingene zamanı ve öküzgözü gibi isimler bulunmaktadır (Baytop, 1999; Deniz ve diğerleri, 2010).

Calendula officinalis (Aynısefa bitkisi), içerdiği ikincil metabolitler nedeniyle gıda ve ilaç endüstrisinde önemli bir yere sahiptir (Pedram Rad ve diğerleri, 2019; Savic Gajic ve diğerleri, 2022). *Calendula* cinsine ait yaklaşık 25 tür bulunmaktadır ve bunlar arasında *C. officinalis*, *C. arvensis*, *C. tripterocarpa*, *C. stellata* ve *C. suffruticose* en yaygın olanlardır (Fallahi ve diğerleri, 2020). *Calendula officinalis* *Calendula* cinsinin en çok incelenen türlerinden biridir ve 12. yüzyıldan beri tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Basch ve diğerleri, 2006; Gu ve diğerleri, 2022). *Calendula* adı her ayın ilk gününü temsil eden Latince "calends" teriminden gelmektedir (Shahane ve diğerleri, 2023). Aynısefa bitkisi çiçeklerinin sabah açıp akşam solması nedeniyle "güneş otu" olarak da adlandırıldığı bilinmektedir (Shahane ve

diğerleri, 2023). Bu geleneksel bitki uzun bir süredir küçük yanıklar, yaralar ve deri sorunlarının tedavisinde kullanılmıştır (Shahane ve diğerleri, 2023). *Calendula officinalis* kendiliğinden tohumlanan yıllık bir bitki türüdür ve 30-60 cm yüksekliğe ulaşmaktadır. Sıcak ve nemli iklim koşullarının hâkim olduğu bölgelerde bulunmaktadır (Ashwlayan ve diğerleri, 2018). Bitkinin sapında 5-7 cm boyutunda bileşik bir çiçek başı bulunur. Bu çiçek başı çok sayıda sivri uçlu lanset şeklindeki sepalın epikaliksiyle kaplıdır ve iç kısmında sarı-turuncu tüplü çiçekler bulunur (Resim 2; Basch ve diğerleri, 2006; Almeida ve diğerleri, 2022). Dış epidermin apikal bölgesinde normositik stomalar, korolla, kaplama ve bezli tüyler, uzunlamasına sklerenkimatöz hücreler, kahverengi pigment içeren ovaryum duvarlarının parçaları, polen taneleri, stigma parçaları ve lifli parçalar bulunur (Arora ve diğerleri, 2013).

Calendula officinalis çeşitli farmakolojik özelliklere sahip birçok sekonder metaboliti içermektedir. Bu metabolitler arasında triterpenoidler, flavonoidler, kumarinler, kinonlar, uçucu yağ, karotenoidler ve amino asitler bulunur (Tablo 2; Tablo 3; Muley ve diğerleri, 2009). *Calendula officinalis*'den elde edilen ekstraktların anti-inflamatuvar, hepatoprotektif, renoprotektif, anti-ödematöz, antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve immünostimulan özellikler barındırdığı bildirilmiştir (Shahane ve diğerleri, 2023). Bitkinin içerdiği triterpenoidler anti-inflamatuvar, anti-ödematöz ve fibroblast uyarıcı etkiler sağlamaktadır. (Fronza ve diğerleri, 2009). Bağışıklık ve inflamasyonla ilişkili olan 5-lipoksijenaz, siklooksijenaz-2 ve C3-konvertaz enzimlerini inhibe etmektedir (Kapil ve Sharma, 1995; Dzubak ve diğerleri, 2006). İçeriğinde bulunan flavonoidlerin anti-inflamatuvar, anti-ödematöz ve güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu da bildirilmiştir (Middleton ve diğerleri, 2000). *Calendula officinalis* uygun dozaj ve diğer farmakolojik endikasyonlar dikkate alındığında güvenli bir terapötik ajan olarak kabul edilmektedir (Basch ve diğerleri, 2006). Bazı toksikolojik çalışmalar *Calendula officinalis*'in biyokimyasal ve fiziksel parametreler açısından akut ve subakut kullanımının güvenliğini kanıtlamıştır (Silva ve diğerleri, 2007; Mishra ve diğerleri, 2018). Avrupa İlaç Ajansı'na (EMA) göre *Calendula officinalis* bitkisel bir tıbbi ürün olarak sınıflandırılmış ve LD 50 (letal doz 50) değerinin 20 mL/kg olduğu rapor edilmiştir (European Medicines Agency, 2018).

Tablo 2. Çeşitli *Calendula* türlerinin ana bileşenleri ve yüzdeleri (Jan ve diğerleri, 2017).

Tür	Ana Bileşen	Yüzde
<i>Calendula suffruticosa</i>	α -linolenik asit	24,20
<i>Calendula arvensis</i>	d-kandinen	15,1
<i>Calendula officinalis</i>	α -kadinol	64
<i>Calendula stellata</i>	Linalool	34,40
<i>Calendula tripterocarpa</i>	Fenolik bileşikler	11,22

Tablo 3. *Calendula officinalis*'te bulunan çeşitli kimyasal bileşenler (Shahane ve diğerleri, 2023).

Bitki Kısım	Kimyasal Bileşen Grubu	Aktif Bileşen
Çiçek	Terpenoidler	ψ -Tarakasteol, lupeol
		Eritrodiol
		Calendulosid
		Calendua glikozit A ve B
	Flavonoidler	Kornulasik asit asetat
		Kalendoflavosit izokuersitrin, rutin
		İzohamnetin, kuersetin
		Narsisin, izohamnetin -3-O- β -D glikozit
	Kumarinler	Skopoletin, umbelliferon, eskuletin
		Oplopanon, kubenol, metil linoleat
Yapraklar	Uçucu Yağlar	Limonel, nerolidol, palustron p-simen, nonanal, sabinen, karvakrol, α - pinen, t-muurolol, geraniol
Kök	Kuionlar	α - tokoferol, plastokinon, filokinon, ubikinon
	Terpenoidler	Kalendulosid B

Givol ve diğerleri (2019) tarafından yapılan bir sistematik derlemede *Calendula officinalis*'in deri yaraları üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Givol ve diğerleri, 2019). Bu derlemenin sonuçlarına göre, bu konuyla ilgili yapılan araştırmalarda bazı kısıtlamaların bulunduğu vurgulanmıştır. Yapılan çalışmalar, elde edilen bitki özütünün içerik analizi eksikliği, kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin açıkça belirtilmemesi, kullanılan metodolojiler arasındaki büyük farklar, deney hayvanlarının kullanımı konusundaki eksik ayrıntılar ve çalışma sonuçlarını belirleyecek ölçümlerin her çalışmada farklılık göstermesi gibi kısıtlamaları içermektedir (Givol ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, *Calendula officinalis*'in yara iyileşmesi üzerindeki etkinliğini kesinleştirmek için büyük ölçekli, iyi tasarlanmış, rastgele kontrollü çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır. Shahane ve diğerleri (2023) tarafından yapılan derleme çalışmasında Aynısefa bitkisi çiçeğinin türlerine ve bitki kısımlarının ekstraksiyon yöntemlerine bağlı olarak elde edilen ekstrakt bileşiminde farklılıklar olduğu ortaya konmuştur (Tablo 2 ve Tablo 3; Shahane ve diğerleri, 2023). Bu farklılıklar yara iyileşmesi üzerinde

değişen etkilere neden olabilmektedir (Shahane ve diğerleri, 2023). Ayrıca bitkinin hangi bölgede ve ne zaman toplandığı gibi faktörler bitkinin içerdiği bileşenlerin tür ve miktarını etkileyebilmektedir (Ayran ve Kan, 2023). Bu durumda *Calendula officinalis*' in bileşimi ve yara iyileşmesi üzerindeki etkileri bitki türü, ekstraksiyon yöntemi, toplama yeri ve ekim zamanı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Etik Kurul İzni, Hayvan Materyali ve Temini

Sunulan tez çalışması Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) 29.09.2021 tarihli ve 64583101/2021/130 sayılı izin alınarak, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

Çalışma hipotezini test etmek için gereken minimum örneklem büyüklüğünü belirlemek amacıyla %80 güç seviyesi, 0,40 etki büyüklüğü ve 0,05 yanılma düzeyi dikkate alınarak güç analizi yapıldı (G Power, Universitat Dusseldorf: Psychologie). Çalışma sürecinde karşılaşılabilecek hayvan kayıpları da göz önüne alınarak her bir grupta 24 hayvan olacak şekilde toplam 72 hayvan çalışmaya dahil edildi.

Çalışmada kullanılan hayvan materyalini oluşturan BALB/C ırkı erkek fareler Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Farelere yapılan cerrahi uygulamalar, yara bakımları ve numune örneklerinin toplanması işlemleri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

3.1.1.1. Hayvanların (BALB/C) Barınma ve Bakım Koşulları

Çalışmanın materyalini 6-8 haftalık yaşta, canlı vücut ağırlığı $37,87 \pm 4,03$ gram (ortalama ağırlık $\pm$ standart sapma) olan 72 adet BALB/C ırkı erkek fare oluşturdu. Yetmiş iki adet fare ($n= 72$) sütten kesildikten bir hafta sonra (4 haftalık yaş) her bir kafeste bir adet fare olacak şekilde tip-1 polipropilen kafeslere (Radon Medikal, Ankara, Türkiye) yerleştirildi. Çalışma sonuna kadar fareler bireysel kafeslerde barındırıldı (Resim 3). Farelerin bakım ortamı 12 saat aydınlık/12 saat karanlık, ortam sıcaklığı $22 \pm 2^\circ\text{C}$, nem oranı ise % 50-55 olacak şekilde düzenlendi. Altlık materyali olarak tozsuz, kalın meşe odunu talaşı kullanıldı. Farelerin beslenmesi ad libitum olarak standart fare yemi (Fare rasyonu, Korkuteli Tarım Gıda, Antalya,

Türkiye) ve musluk suyu ile sağlandı. Oda sıcaklığı ve nemi dijital veri kaydedici (Hasvet datalogger, Antalya, Türkiye) ile kayıt altına alındı. Farelerin yem ve su miktarları günlük olarak kontrol edildi, eksilmeler tamamlandı. Farelerin altlıkları günlük olarak değiştirildi.



Resim 3. Çalışma sürecinde bireysel kafeslenmiş farelerin görünümü.

3.1.2. Bitki (Aynısefa Bitkisi, *Calendula officinalis*) Temini

Çalışmada kullanılan Aynısefa bitkisi çiçeği Tarım ve Orman Müdürlüğü tarafından işletme kayıt belgesine sahip olan, gıda üretimi yapan, 9 ° 51 ' - 40 ° 55 ' kuzey enlemleri ile 35 ° 27 ' - 37 ° 39 ' doğu boylamları arasında bulunan bölgede faaliyet gösteren ticari bir firmadan (By Organik, Tokat, Türkiye) güneşte kurutulmuş halde temin edildi. Kurutulmuş çiçekler 2022 Mayıs ayı hasatına aitti.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Fareler her grupta 24 adet fare; 1. grup AYSEF (sulu Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktı, n=24), 2. grup FTS (fizyolojik tuzlu su %0,9 NaCl, n=24) ve 3. grup NEGKON (negatif kontrol/tedavi uygulanmayan, n=24) olarak rastgele 3 çalışma grubuna ayrıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Farelerin çalışma gruplarına ayrılması ve uygulamalar.

Çalışma Grupları	n	Uygulanan Tedavi	Uygulama
1. grup AYSEF	24	Sulu Aynısefa Bitkisi Çiçeği Ekstraktı	Eksizyonel tam katmanlı yara
2. grup FTS	24	Fizyolojik Tuzlu Su (%0,9 NaCl, Pozitif Kontrol)	Eksizyonel tam katmanlı yara
3. grup NEGKON	24	Negatif Kontrol (Tedavi Uygulanmayacak)	Eksizyonel tam katmanlı yara

3.2.2. Aynısefa Bitkisi (*Calendula officinalis*) Çiçeğinin Gaz Kromatografi-Mass Spektrometri (GC-MS) Analizi

Bitki [Aynısefa bitkisi (*Calendula officinalis*) çiçeği] ekstraktının içeriğinin/kimyasal bileşenlerinin ve miktarlarının tayini gaz kromatografi/mass spektrometri analiz yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu analiz için GC-MS cihazı (8890 GC System, Agilent Technologies, Santa Clara, Amerika Birleşik Devletleri; (Resim 4) kullanıldı.



Resim 4. Çalışmada kullanılan GC-MS cihazı ve numunelerin cihaza yerleştirilmesi.

Cihaz enjektör sıcaklığı 350°C olarak ayarlandı, taşıyıcı gaz olarak helyum gazı (1 mL/dakika) kullanıldı. Analizler sırasında cihaz fırın sıcaklık programı aşamalı olarak 40°C 'den 150°C 'ye 4 derece/dakika, 150°C 'den 180°C 'ye 3 derece/dakika, 180°C 'den 230°C 'ye 2 derece/dakika ve 230°C 'den 280°C 'ye 1 derece/dakika hızında ulaştırıldı. Enjeksiyon modu $10:1$ bölünmüş olup, enjeksiyon hacmi $1\text{ }\mu\text{l}$ olarak belirlendi. Elektron iyonizasyonu ile oluşturulan iyonlar, kütle-yük oranlarına göre ayrılarak dedektörde kaydedildi ve veriler bilgisayarda toplandı (Tunca-Pinarli ve diğerleri, 2023). Bileşik tanımlaması, elde edilen verilerin en güncel NIST ve Wiley veri kütüphanelerindeki tanımlanmış bileşiklerle karşılaştırılmasıyla gerçekleştirildi (Resim 5).



Resim 5. GC-MS analizi sonuçlarının NIST-Wiley kütüphanelerinde karşılaştırılması.

3.2.3. Aynısefa Bitkisi (*Calendula officinalis*) Çiçeğinin Ekstraktının Hazırlanması

Temin edilen bitki çiçeğinin İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Laboratuvarında Aynısefa bitkisinin (*Calendula officinalis*) çiçeği olduğu teyit edildi. Daha sonra yine aynı laboratuvarda (İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Laboratuvarı) bu bitkinin çiçeğinden su ekstraktı hazırlandı. Bu amaçla çiçekler öğütücü kullanılarak ince toz haline getirildi. Öğütülen bu çiçek tozundan 7,5 gram alınarak 150 mL saf su ile 96 saat boyunca 140 rpm hızda çalkalanmaya (Wishshake SHO-2D, Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Almanya) bırakıldı ve sulu bir çözelti hazırlandı (Resim 6).



Resim 6. Aynısefa bitkisi çiçeği çözeltisinin çalkalanmaya bırakılması.

Çalkalama işleminden sonra katı kalıntıları ayırmak için çözelti Whatman No. 1 filtre kâğıdı ile süzüldü (Resim 7). Süzülen sıvı döner cam balon buharlaştırma şişesinde (BÜCHI, Labortechnik AG, Postfach, İsviçre) toplandı. Steril çözelti elde etmek amacıyla elde edilen sıvı 0,45 μm por büyüklüğüne sahip membran filtreden (MF-Millipore, Merck, İstanbul, Türkiye) geçirildi.



Resim 7. Sulu Aynısefa bitkisi çiçeği çözeltilerinin filtre kağıdından süzdürülmesi.

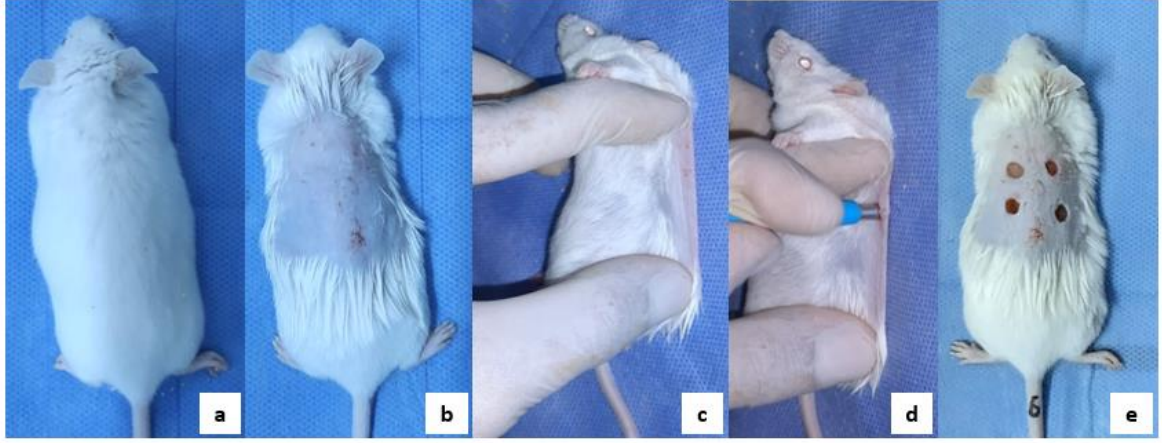
Filtrasyon işlemini takiben dondurularak (-80°C) buz haline getirilen karışımın içerisindeki su liyofilizatör (HyperCOOL HC3110, LaboGene, Lillerod, Danimarka) kullanılarak uzaklaştırıldı. Suyun uzaklaştırılması ile çalışmada kullanılmak istenen Aynısefa bitkisi (*Calendula officinalis*) çiçeğinin ekstraktının kuru maddesi elde edildi. Kuru madde tartılarak üzerine saf su eklendi, cam tüplere aktarıldı, sonra cam balon içerisinde su kalma ihtimaline karşı tekrar dondurulup tekrar liyofilize edildi ve son aşamada tekrar edildi (Tunca-Pinarlı ve diğerleri, 2023). Böylece topikal uygulamaya hazır, 150 mL saf suda çözdürülmüş 7,50 g Aynısefa bitkisi çiçeği tozu ile %5'lik steril Aynısefa bitkisi çiçeği su ekstraktı edildi (Resim 8).



Resim 8. İşlemler sonucu elde edilen %5’lik steril Aynisefa bitkisi çiçeği su ekstraktı.

3.2.4. Farelerde Tam Katmanlı Deri Yaralarının Oluşturulması

İki haftalık adaptasyon sürecini takiben farelerde yara oluşturma işlemi gerçekleştirildi. Anestezi amacıyla 90 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketasol® 10%, Interhas, Ankara, Türkiye) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (Xylazinbio® %2, Bioveta, Ankara, Türkiye) karışımı 8,6 mL %0,9 fizyolojik tuzlu su çözeltisi (%0,9 NaCl, Polifarma®, Tekirdağ, Türkiye) ile karıştırılarak 10 mL anestezi stok solüsyon elde edildi. Anestezi stok solüsyon farelere vücut ağırlığına 0,01 mL/g dozda intraperitoneal enjeksiyon yolla uygulandı (Wixson ve Smiler, 1997; Hawk ve diğerleri, 2005; Flecknell, 2009). Anestezinin ardından fareler operasyon masasında sternal pozisyona getirilerek dorsal alanda bulunan kılları jilet ile uzaklaştırıldı (Resim 9a-b). Tıraşlanan deri %70’lik etil alkol solüsyonu ile temizlenerek bölgenin antisepsisi sağlandı. Fareler sağ taraflarına yatırıldı, dorsal deri sol elin işaret ve baş parmağı ile zemin arasına katlanarak sağlam bir şekilde tutuldu (Resim 9c). Katlanmış deri üzerine, sağ elde tutulan steril 4 mm çaplı biyopsi punch yerleştirildi ve bastırıldı. Böylece deri, deri altı bağ doku ile panniculus carnosus kasını kapsayan bu dokular uzaklaştırılarak, 4 adet simetrik tam katmanlı deri yarası oluşturuldu (Moreira ve diğerleri, 2015; Masson-Meyers ve diğerleri, 2020; Wu ve Landen, 2020; Resim 9d-e).



Resim 9. Yaraların oluşturulma aşamaları. a: Farelerin sternal pozisyona getirilmesi, b: Farelerin dorsal bölgesinin tıraşlanması ve alkolle antisepsisinin sağlanması, c: Dorsal derinin katlanması, d: dorsal deride yaraların oluşturulması, e: Oluşturulan deri yaralarının görünümü.

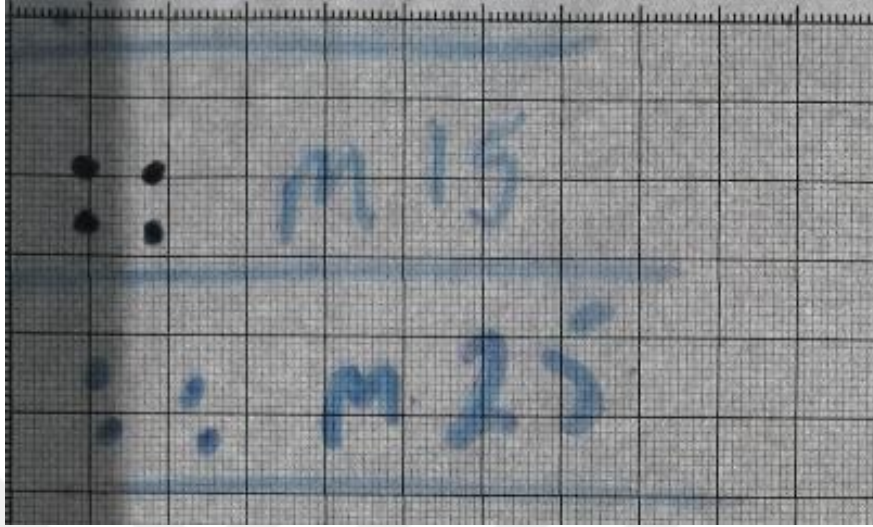
3.2.5. Çalışma Gruplarında Tam Katmanlı Deri Yaralarında Tedavilerin Uygulanması

Tablo 4'te de belirtildiği üzere 1. ve 2. gruba ait deneklerin yara bölgelerine topikal ajanlar (ilaç/tedavi) pamuklu bir çubuk kullanılarak uygulandı [1. grup AYSEF (sulu Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktı), 2. grup FTS (fizyolojik tuzlu su %0,9 NaCl)]. Pamuklu çubuğun ucu önce aktif bileşene batırıldı ve her farede yara yüzeyini kaplayana kadar bir kez yaralara uygulandı. Tedaviler 14 gün boyunca, günde bir kez ve aynı saatte uygulandı. Kontrol grubu olan 3. gruba [3. grup NEGKON (negatif kontrol/tedavi uygulanmayan)] herhangi bir uygulama yapılmadı. Tüm farelerin genel sağlık durumu günlük olarak takip edildi.

3.2.6. Planimetrik Ölçümler

Çalışmanın 1., 3., 5., 7., ve 14. günlerinde planimetrik ölçümlerin yapılabilmesi için fareler izofluran (Isoflurane USP®, Adeka İlaç, İstanbul, Türkiye) ile kısa süreli inhalasyon anestezisine (izofluran emdirilmiş bir pamuk içeren kapalı bir kaba yerleştirilerek) alındı. Fareler sternal pozisyona getirilerek yaraları üzerine yerleştirilen şeffaf asetatlı kâğıt üzerine yara alanları çizildi. Çizim işleminden sonra her fareye kendi çalışma grubunda uygulanan

topikal ajan sürölerek kafeslerine geri yerleştirildi. Çizimler şeffaf asetatlı kâğıttan milimetrik kâğıda aktarıldı (Resim 10).



Resim 10. Şeffaf asetatlı kâğıtta yer alan çizimlerin milimetrik kâğıda aktarılması.

Milimetrik kağıtlarda yer alan yara çizimleri dijital bir kumpas (AS-309-06-1, Asimeto, İstanbul, Türkiye) yardımı ile ölçüldü (Keast ve diğerleri, 2004; Langemo ve diğerleri, 2008; Nichols, 2015). Her bir ölçüm gününde (1., 3., 5., 7. ve 14. günler) ölçülen yara alanı hesaplaması aşağıda yer alan denklem kullanılarak (Nichols, 2015) hesaplandı ve kaydedildi:

“Yara Alanı = Birbiri ile 90° açıyla kesişen yaranın en uzun boyu × Yaranın en geniş eni”

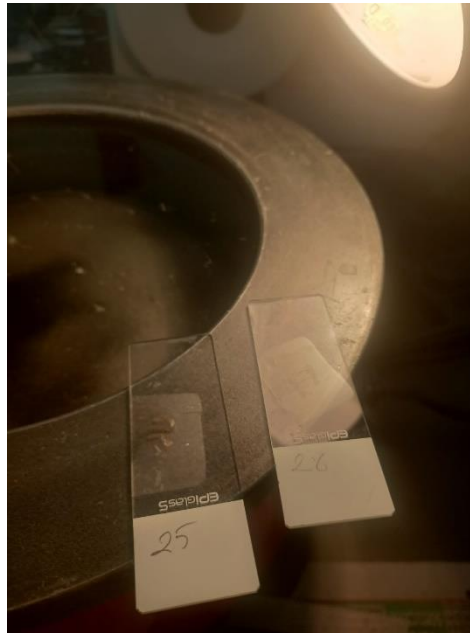
3.2.7. Ötenazi ve Dokuların Toplanması

Çalışmada 1., 3., 5., 7. ve 14. günlerde toplanan dokularda immünohistokimyasal, biyokimyasal ve genomik incelemeler yapıldı. Çalışmanın 1. gün dokularını, çalışmanın ilk günü, yara oluşturulması ile elde edilen dokular oluşturdu (ötenazi uygulanmadı). Takiben 3., 5., 7. ve 14. günlerde yara dokusu toplamak amacıyla her çalışma grubundan rastgele (SPSS® 23.0, IBM Corp., Armonk, Amerika Birleşik Devletleri) 6’şar fare ötenazi edildi ve bu farelerin yara dokuları toplandı.

Farelerin ötenazisi, anestezi için kullanılan ksilazin/ketamin kombinasyonunun dört katı dozda (40 mg/kg ksilazin hidroklorür ve 360 mg/kg ketamin hidroklorür) intraperitoneal yolla uygulanması ile gerçekleştirildi (Charbonneau ve diğerleri, 2010). Toplanan dokuların bir kısmı immünohistokimyasal incelemeler için falkon tüplere, diğer kısmı biyokimyasal ve genomik incelemeler için eppendorf tüplere aktarıldı. Toplanan doku örnekleri analizleri için -80°C'de saklandı (Moreira ve diğerleri, 2015; Wu ve Landen, 2020).

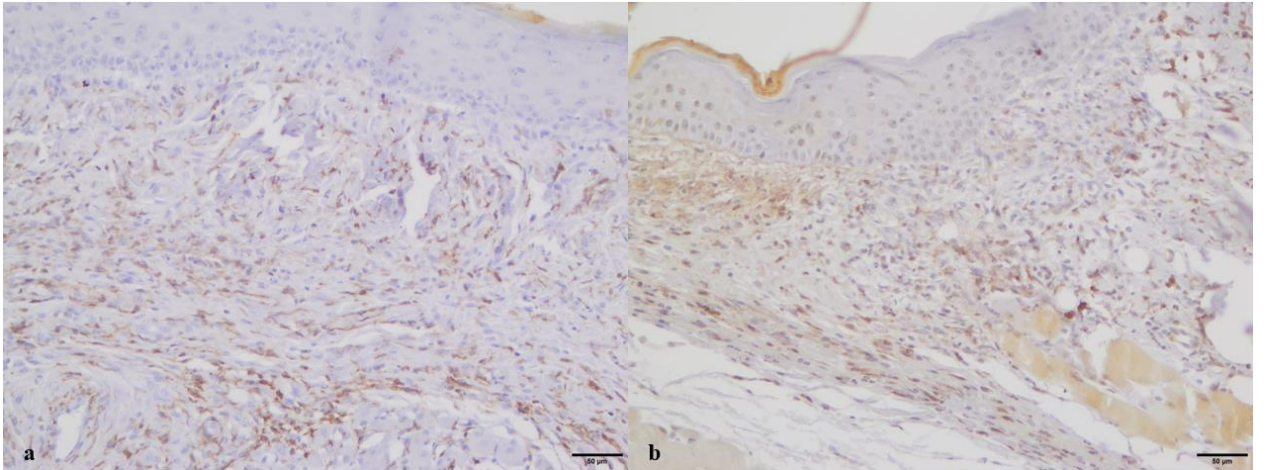
3.2.8. İmmünohistokimyasal Analizler

Alınan deri örnekleri %10 formalin solüsyonunda tespit edilerek rutin yöntemler ile takip edildi. Bu amaçla, 24 saat boyunca akan suda yıkanan dokular trimlenerek doku takip cihazında (Leica TP1020) farklı derecelerde alkol serileri ve devamında ksilolden (Katalog no: TK.090270, Tekkim Kimya, Bursa, Türkiye), geçirilip parafinde bloklandı. Parafin bloklardan sırasıyla hematoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyamalar için her bir bloktan 5-6 µm kalınlığında seri kesitler alındı (Resim 11; Mikrotom, Leica RM 2135) Tüm parafin kesitler ksilene tabi tutularak deparafinize, alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi.



Resim 11. Dokulardan elde edilen kesitlerin gösterimi.

İmmunohistokimyasal analizler için Iba1 ve α -SMA immünoreaktivitesi semikantitatif olarak değerlendirildi. Sayım işlemi için incelenen alanlardaki pozitif hücre sayısı baz alınarak yüksek yoğunlukta reaksiyon görülen alanlar seçildi. Işık mikroskopunda her örnek için, toplam 40x'lik mikroskop büyütmesinde 5 ayrı saha incelendi. Her sahadaki immünopozitif hücre verileri toplanarak ortalaması alındı ve o dokunun verisi olarak belirlendi. Dokuda makrofaj sayısını belirlemek için makrofaj spesifik Iba-1 antikoruna, fibroblast sayısını belirlemek için α -SMA antikoruna kullanıldı. Bu amaçla; deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra peroksidaz aktivitesini önlemek için kesitler %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 30 dakika inkübe edildi. Devamında, kesitler sodyum sitrat (pH: 6.0) solüsyonunda ısıtılma işlemine tabi tutularak antijenik epitopların açığa çıkarılması sağlandı. İstenmeyen antikor bağlanmalarının önüne geçmek için blokaj gerçekleştirildi. Sonrasında kesitler rabbit polyclonal anti-Iba1 (#013-27691, Wako, Japonya), mouse monoclonal anti- α -SMA (#M0851, Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) antikorları ile 1 saat inkübe edildi. Ardından sırasıyla biotinlenmiş sekonder antikor ve HRP ile işaretlenmiş streptavidin ile 30 dakika inkübasyonu (#MRT621, Biocare, Amerika Birleşik Devletleri) takiben kesitler 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ile muamele edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX-51, Tokyo, Japonya) değerlendirildi (Resim 12).



Resim 12. Sayım işlemine hazır hale getirilmiş doku kesitleri. a: Iba1 antikoruna boyanan preparatın görünümü, b: α -SMA antikoruna boyanan preparatın görünümü.

3.2.9. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için toplanan dokularda oksidatif stres belirteçleri [malondialdehit (MDA), oksidatif stres indeksi (OSİ; total oksidan kapasitesi/total antioksidan kapasitesi), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx)], büyüme faktörleri [platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF)], inflamasyon belirteçleri [miyeloperoxidaz (MPO), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlekin 1 (IL-1), interlekin 6 (IL-6), granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF)], matriks metalloproteinaz 2 (MMP-2) ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9) enzimleri, hidroksiprolin (HP), ve total protein miktarı (TP) ölçümleri yapıldı (Patel ve diğerleri, 2016; Masson-Meyers ve diğerleri, 2020).

Dokular çalışılmadan önce tartım işlemleri ve homojenizasyon işlemleri yapıldı ve soğuk zincir sağlanarak dokular ortam ısısından etkilenmeyecek şekilde çalışma planlandı. Dokular -80°C'den çıkarılarak çözünmesi beklendi ve buz içerisinde bekletildi. İlk gün (1. gün) dokuları 6 ayrı eppendorf tüpe ayrılarak havuzlama yapıldı. Dokular pH değeri 7,4 olan %1 PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanarak üzerlerindeki kan temizlendikten sonra tartım işlemi yapılarak her bir eppendorf tüpüne 100 mg doku olacak şekilde aktarıldı. Protein denatürasyonu için %0,1 tween 20 (polisorbat 20), pH değeri 7,4 olan %1 PBS, %0,1 SDS (sodyum dodesil sülfat) ve geri kalan kısmı 1x PBS içeren bir tampon solüsyonu hazırlandı ve dokuların bulunduğu eppendorf tüplerine 500 μ l eklenerek karıştırıldı.

Tampon solüsyonuyla tartım yapılan ve üzerine lizis tampon eklenen dokuları içeren eppendorf tüpler -20°C'de bir gece boyunca donduruldu. Ertesi gün dokular çözünerek buz içerisine alındı ve mekanik bir homojenizatör (Tissue Tearor Variable Speed Homogenizer, Cole-Palmer, Illinois, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak 2000 rpm hızda 10 dakika boyunca buz içerisinde homojenize edildi (Resim 13).



Resim 13. Dokuların homojenizasyon işlemine hazırlanması.

Elde edilen homojenatların üzerine 500 μ l lizis solüsyonu daha eklendi. Homojenatlar 12000 rpm hızda (4°C) 15 dakika boyunca santrifüj (Mikro 200R Zentrifugen, Hettich, Kirchlingern, Almanya) edilerek süpernatantlar elde edildi (Resim 14).



Resim 14. Homojenatların santrifüj edilmesi.

Süpernatantlardan biyobelirteç miktarlarının ölçümü ticari ELISA test kitleri (Sunred Biological Technology, Shanghai, Çin; Protein Colorimetric Assay Kit, Elabscience, Wuhan,

Çin) kullanılarak üretici protokollerine göre enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA) ile ölçüldü. Çalışmada kullanılan ELISA test kitlerinin markası ve katalog numaraları Tablo 5'te sunuldu.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan ticari test kitlerinin marka ve katalog numaraları.

Marka	Katalog Numarası	Biyobelirteç
Sunred	201-02-0543	Hidroksiprolin
Sunred	201-02-0118	Tümör nekrozis faktör-alfa
Sunred	201-02-0192	İnterlökin-1
Sunred	201-02-0050	İnterlökin-6
Sunred	201-02-0437	Miyeloperoksidaz
Sunred	201-02-0347	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
Sunred	201-02-0291	Süperoksit dismutaz
Sunred	201-02-0039	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
Sunred	201-02-0626	Malondialdehit
Sunred	201-02-4151	Total antioksidan kapasite
Sunred	201-02-3840	Total oksidant kapasite
Sunred	201-02-0395	Glutasyon peroksidaz
Sunred	201-02-0275	Fibroblast büyüme faktörü
BTLAB	E0108Mo	Matriks metalloproteinaz-2
BTLAB	E0277Mo	Matriks metalloproteinaz-9
ElabScience	E-BC-K318-M	Total protein

3.2.9.1. Dokularda Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi ile Biyobelirteçlerin Ölçüm Aşamaları

1- Kitler içinden çıkan tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) getirildi.

2- Standart stok çözeltisi her bir ticari test kitinde yer alan miktara (kullanım talimatına) göre dilüe edilerek hazırlandı ve seyreltme işlemine başlamadan önce 15 dakika boyunca nazikçe çalkalanarak bekletildi.

3- Standart stok solüsyonlar ticari test kitleri içinde belirtilen miktarlarda seri seyreltilerek standart solüsyonlar hazırlandı.

4- Her bir ölçüm için belirlenen kuyucuk tasarımına göre, standart kuyucuklarına 50 µl standart solüsyonu, kontrol kuyucuklarına 50 µl ilgili antikor, örnek kuyucuklarına ise 40 µl süpernatant ve 10 µl ilgili fare antikoru eklendi.

5- Örnek ve standart kuyucuklarına (boş kontrol kuyucukları hariç) 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve mikrolakaların üstü plaka kapatma filmi ile kapatılarak karıştırıldı.

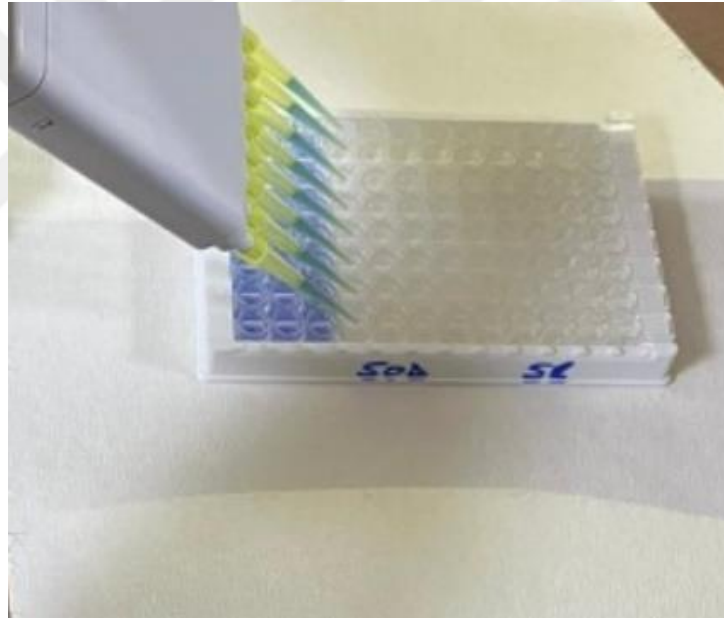
6- Mikrolakalar 37°C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi.

7- Plaka kapatma filmleri kaldırılarak mikrolakalarda yer alan her kuyucuğa 300 µl yıkama tamponu sıkılarak 30 saniye beklenerek 300 µl yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

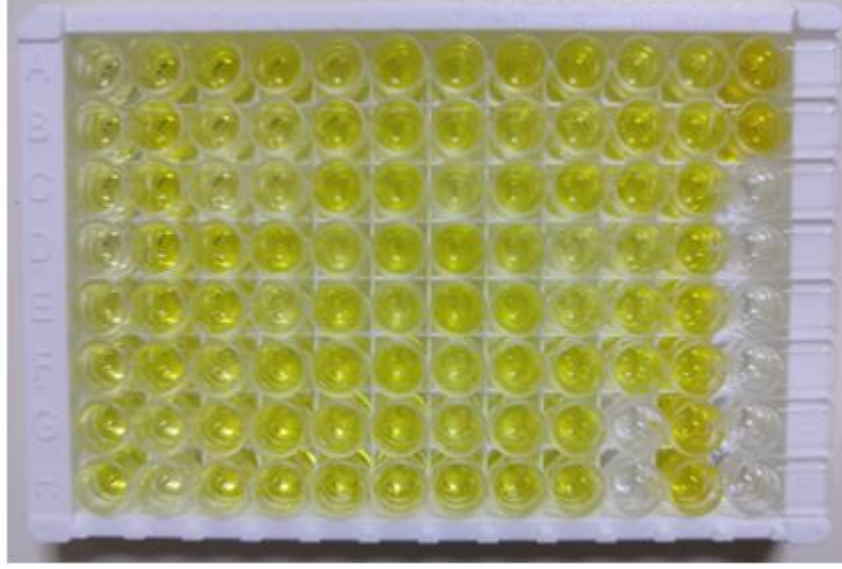
8- Mikrolak kâğıt havlu ile kurulandı.

9- Her kuyucuğa 50'şer µl substrat çözeltisi A ve B eklenerek mikrolakalar plaka kapatma filmi kapatıldı ve 10 dakika boyunca inkübe edildi (Resim 15).

10- Her kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi eklendi ve renk değişimi şekillendi (Resim 16).



Resim 15. Mikrolaka kuyucuklarına substrat çözeltilerinin eklenmesi.



Resim 16. Mikroplaka kuyucuklarına durdurma çözeltisi eklendikten hemen sonra şekillenen renk değişimi.

11- Her kuyucuğun optik yoğunluk değeri durdurma çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika içinde 450 nm dalga boyuna ayarlanmış mikroplaka okuyucu spektrofotometrede (BioTek Epoch, Agilent Technologies, Santa Clara, Amerika Birleşik Devletleri) okutuldu (Resim 17).



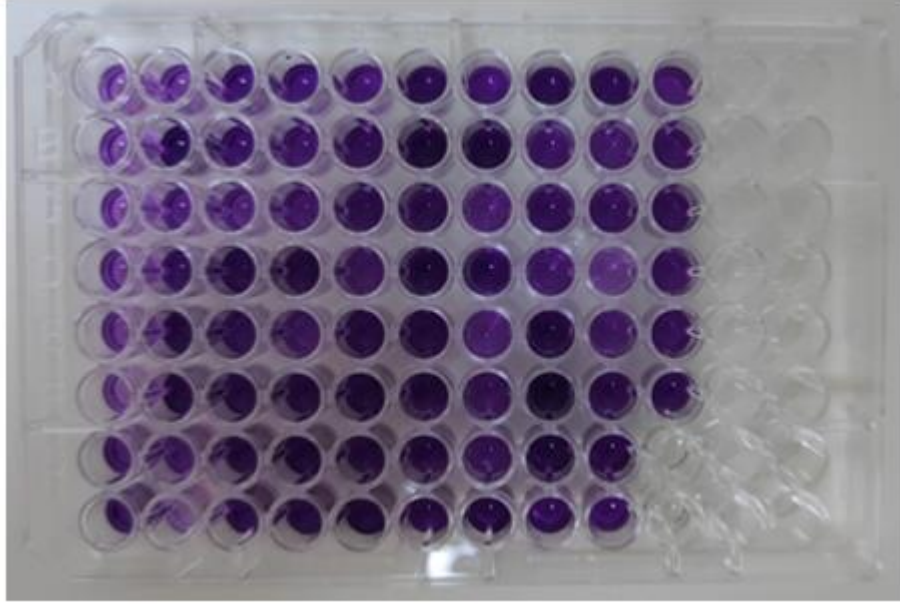
Resim 17. Hazırlanma işlemleri tamamlanmış mikrolakanın mikroplaka okuyucu spektrofotometreye yerleştirilmesi.

Kör kuyucukların optik yoğunluk değeri, tüm örnek ve standart serilere ait optik yoğunluk değerlerinden çıkarıldı. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen net optik yoğunluk değerleri her bir biyobelirteç için CurveExpert ver 1.4 programı kullanılarak standart grafikler oluşturuldu. Tüm ELISA testlerinin standart eğri grafikleri bu programdan elde edilerek ölçülen biyobelirteç değerleri aynı dokudaki protein konsantrasyonuyla orantılı olarak (ng/mg protein) sunuldu. Numuneler ve standartlar çift tekrar olacak şekilde çalışıldı.

3.2.9.2. Dokularda Total Protein Ölçümleri

Protein konsantrasyonlarının ölçümü yapılarak sonuçlar mg protein değerlerine bölünerek hesaplandı. Protein ölçümü BCA protein kiti (Elabscience) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak ölçüldü, aşağıda yer alan adımlar izlendi:

- 1- Kit içinden çıkan tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) getirildi.
- 2- Protein standardı 1 mL protein standart dilüenti ile karıştırılarak 10 mg/mL konsantrasyonunda stok solüsyonu elde edildi.
- 3- Stok solüsyonu 1 mg/mL konsantrasyonda dilüe edildi.
- 4- BCA çalışma solüsyonunun hazırlanması için reaktif A ve reaktif B 50:1 oranında karıştırıldı.
- 5- Standart solüsyondan sırayla 0, 4, 8, 12, 16, ve 20 μL alınarak kuyucuklara ilave edildi. Her kuyucuğa standart diluent eklenerek hacim 10 μL 'ye tamamlandı.
- 6- Doku süpernatantlarından 10 μL alınarak mikrolaktaki diğer kuyucuklara eklendi.
- 7- Her bir kuyucuğa 100 μL BCA çalışma solüsyonu eklendi ve 37°C 'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı (Resim 18).
- 8- Her kuyucuğun optik yoğunluk değeri 562 nm dalga boyuna ayarlanmış mikrolaka okuyucu spektrofotometrede (BioTek Epoch, Agilent Technologies, Santa Clara, Amerika Birleşik Devletleri) okutuldu.



Resim 18. Spektrofotometrik okuyucuya hazır hale getirilmiş BCA protein mikropiğı.

Spektrofotometrede standart çözeltilerin 562 nm dalga boyundaki absorbans değeri kullanılarak ND-1000 v3.5.2 yazılımı yardımıyla standart eğri çizildi. Örnek çözeltilerinin absorbansları üçer kez ölçülerek standart eğri üzerinden konsantrasyonları hesaplandı. Bulunan konsantrasyon değeri dilüsyon faktörü ile çarpılarak protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.10. Genomik Analizler

Matriks metalloproteinaz 2 ve 9'un gen ekspresyon farklılıklarının kantitatif analizi için genomik analizler yapıldı. Elde edilen dokuların bir kısmı ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniğı ile izole edilen genlere ait mesajcı RNA (mRNA) miktarları kantitatif olarak incelendi (Resim 19).



Resim 19. Genomik analizler için ayrılan dokular ve RNA izolasyonu işlemi hazırlığının gösterimi.

Sunulan çalışmada genomik analiz 'SYBR green' metodu ile PCR sırasında oluşan yeni DNA fragmentlerine bağlanan boyanın cihazdaki dedektör tarafından algılanması yoluyla yapıldı.

RNA izolasyonu işlemi ticari bir kit (HY-GRNA-100, Hydra Biyoteknoloji Ar-Ge, Van, Türkiye) yardımıyla kitin kitapçığında yer alan prosedürler izlenerek yapıldı:

- 1- Doku örnekleri steril bistüri ile küçük parçalara kesilerek tartımları yapıldı.
- 2- Çalışmaya buz üzerinde devam edilerek dokunun üzerine 500 μ l guanidin tiyosiyanat içeren liziz tampon solüsyonu eklenerek dokular bistüri ile küçük parçalara bölündü.
- 3- Dokuların üzerine 500 μ l daha liziz tampon solüsyonu eklenerek toplamda 1 mL sıvı içinde dokular tamamen parçalandı.
- 4- Elde edilen homojenatlar mikrotüplere alınarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- 5- Homojenatlar 5 dakika 12.000 rpm hızda sentrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.
- 6- Süpernatantlar mikrotüplere aktararak üzerine 200 μ l kloroform eklendi.

- 7- Süpernatant 20 dakika boyunca hızlıca vortekslendikten sonra 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 8- Süpernatant 10 dakika 12.000 rpm hızda santrifüj edildi.
- 9- Mikrotüpte gözlemlenen üst fazlar dikkatlice yeni bir mikrotüpe aktarıldı.
- 10- Alınan miktarın yarısı kadar absolüt etanol eklendi ve hızlıca karıştırılarak kolona aktarıldı.
- 11- Kolon 12.000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edildi.
- 12- Kolondan geçerek altta kalan etanol atıldı. Filtre üzerine 500 µl yıkama tamponu eklendi.
- 13- Kolon 12.000 rpm hızda 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Altta kalan yıkama tamponu uzaklaştırıldı.
- 14- Filtre üzerine 500 µl ikinci yıkama tamponu eklendi. Oda sıcaklığında ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) 1 dakika boyunca inkübe edildi.
- 15- Kolon 12.000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edildi. Ardından altta kalan ikinci yıkama tamponu uzaklaştırıldı.
- 16- Kolon 12.000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edildi. Ardından altta kalan ikinci yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Kolonun kuruması için 12.000 rpm hızda 2 dakika santrifüj edildi.
- 17- Filtreler RNase içermeyen mikrotüplere aktarıldı. Üzerine 40 µl elution solüsyonu (DEPC içeren su, dietil pirokarbonat) eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 18- Örnekler 2 dakika 12.000 rpm hızda santrifüj edildi.
- 19- Elde edilen total RNA miktarını ve saflığını ölçmek için nanodropta 260/280 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Elde edilen RNA kademeli olarak önce -20°C sonra -80°C 'ye alınarak saklandı.

Total RNA'lardan cDNA izole etmek için ticari olarak üretilen cDNA sentez kiti (A.B.T. cDNA Synthesis Kit, katalog no: C03-01-05, Atlas Biotechnologies, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Test kitinde enzim düzeyleri yeterli gelmediği için reaksiyonlar iki kat mix kullanılarak yapıldı.

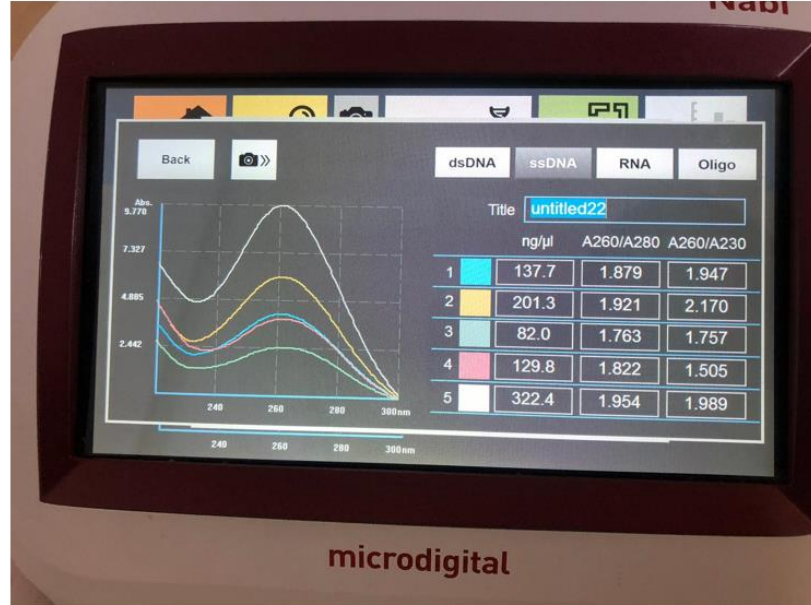
- 1- Bir mikrotüpte 1000 ng/µl ve total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde 4 µl 10x reaksiyon tamponu, 2 µl dNTP mix, 2 µl random hexamer, 2 µl reverse transkriptaz, 0,5 µl RNase inhibitörü, 0,5 µl RNase free su ve 9 µl RNA template ile karıştırılarak master mix hazırlandı.

- 2- Eppendorf tüpler sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 2 saat, 85°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi (Resim 20).



Resim 20. Eppendorf tüplerin inkübatöre yerleştirilip cDNA eldesi için inkübe edilmesi.

- 3- Her bir tüpteki cDNA miktarı nanodropta (Nabi UV/Vis Nano spectrophotometer, Microdigital Co., Ltd, Gyeonggi-do, Güney Kore) ölçüldü (Resim 21).



Resim 21. Elde edilen cDNA miktarlarının nanodropta ölçümü.

- 4- Elde edilen cDNA'lar, qPCR çalışmalarında kullanılabilecek kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi için (qRT-PCR) genler ve primer dizilimleri NCBI veritabanı (BLAST, Primer designing tool, National Institutes of Health) ve Ensembl Gen Bankası (Ensembl genome browser 110) yardımıyla primer çift (forward ve reverse) tasarlanarak ticari bir firmadan temin edildi. Çalışmada kullanılan primerlerin dizilimleri aşağıda sunulmuştur:

MMP-2 Forward primer dizilimi : 5'GGATACCCCAAGCCACTGAC'3

MMP-2 Reverse primer dizilimi : 5' ATTGTACCTGGGACCCCCTT'3

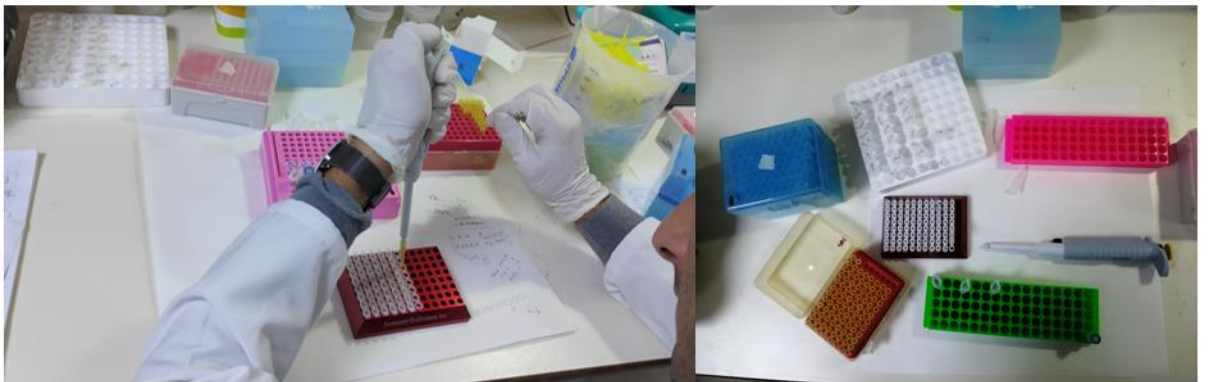
MMP-9 Forward primer dizilimi : 5'TCTAGGCCAGAGGTAACCC'3

MMP-9 Reverse primer dizilimi : 5'AGGAAGGTGGACAAGCGATG'3

GAPDH Forward primer dizilimi : 5'CCCACTCTTCCACCTTCGAT'3

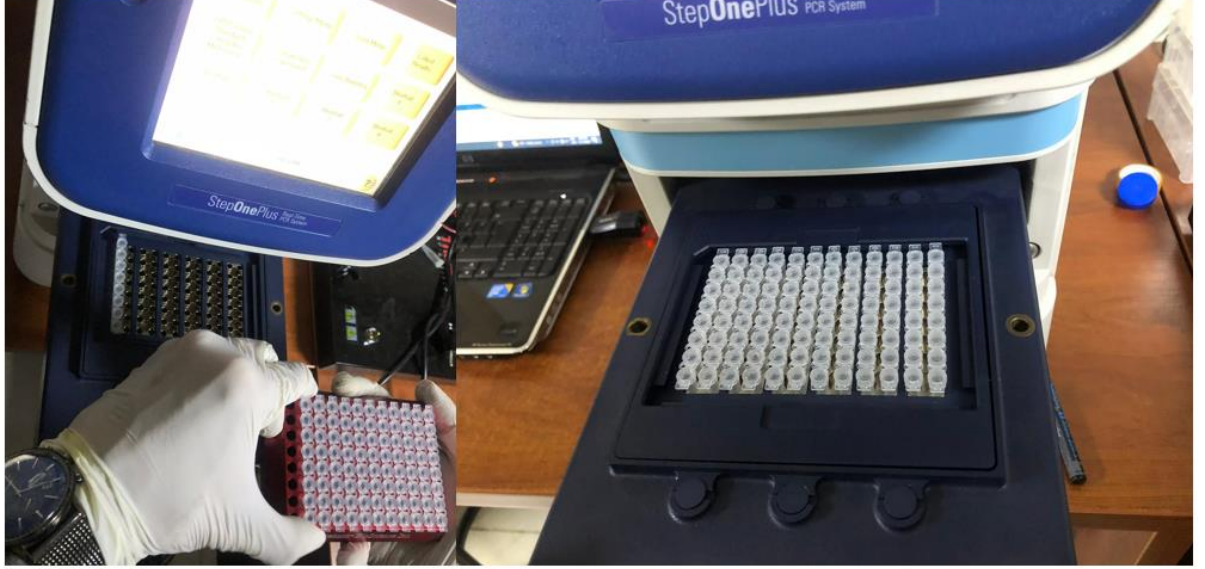
GAPDH Reverse primer dizilimi : 5'GTTTCCCATCCCCACATACC'3

Elde edilen kalıp cDNA'ların MMP-2, MMP-9 ve GAPDH gen ekspresyonlarını ölçmek için cDNA dilue edildi ve ticari test kiti Sybr Green master mix (A.B.T.™ 2X qPCR EVA-Green MasterMix wit ROX, katalog no: Q02-02-01, Atlas Biotechnologies, Ankara, Türkiye) kullanıldı (Resim 22). Test kitinde enzim düzeyleri ekspresyonlarda yeterli gelmediği için reaksiyonlar iki kat mix kullanılarak yapıldı.



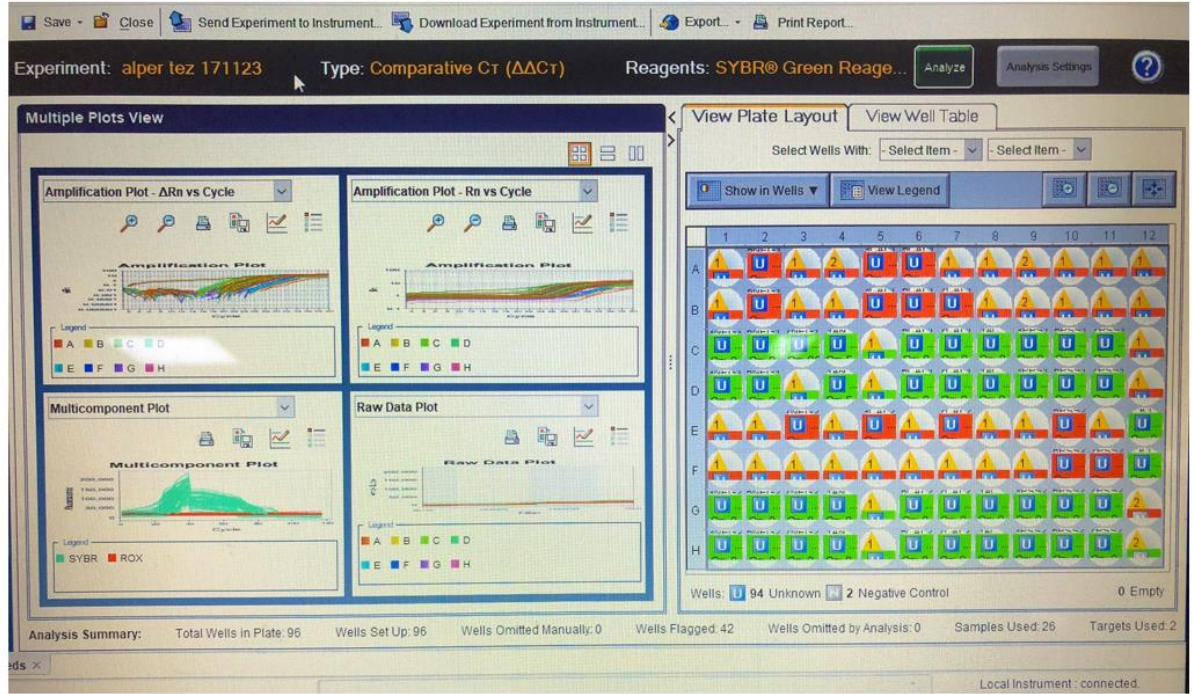
Resim 22. PCR analizi için plakaların hazırlanması.

Kit protokolüne göre her bir tüp içerisinde cDNA, total reaksiyon hacmi 20 µl ve döngü parametreleri 95°C 5 dakika, 95°C 30 saniye, 58°C 1 dakika, 65°C 5 saniye ve 40 döngü olacak şekilde qRT-PCR (StepOnePlus Real-Time PCR, Applied biosystems, Waltham Amerika Birleşik Devletleri) kuruldu (Resim 23, Resim 24).



Resim 23. qRT-PCR analizi için hazırlanan plakaların cihaza yerleştirilmesi.

GAPDH referans gen olarak seçildi ve hesaplamalarda “ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ” formülü kullanılarak ekspresyon farklılıkları hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001; Aksoy ve diğerleri, 2019). Her bir gruba ait birinci gün değerleri başlangıç değeri hesaplanarak çalışma günlerine ait gen ekspresyon kat değişim değerleri hesaplandı.



Resim 24. qRT-PCR için cihazda kurulmuş deney düzeneği görüntüsü.

3.2.11. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler dijital ortama [Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, 2018) programına] aktarıldı. İstatistiksel analizlerde SPSS® 23.0 (IBM Corp., Armonk, Amerika Birleşik Devletleri) paket programı kullanıldı. Elde edilen verilerin dağılımı Kolmogorov Smirnov testi, varyansların homojenliği ise Levene testi ile değerlendirildi. Normal dağılımın tespit edilmediği veriler için Kruskal-Wallis sıralamalı tek yönlü varyans analizi kullandı. Normal dağılımın bulunduğu ve varyansların homojen olduğu durumda One-Way ANOVA testi ile çalışma grupları arası farklılıklar analiz edildi. Gruplar arası farklılıkların tespitini takiben farklılığın hangi gruplar arası olduğunun tespiti için Bonferroni ve Games-Howell çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyon ve protein düzeyleri arasındaki ilişkinin varlığı için Pearson korelasyon testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılığın tespiti amacı ile $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Normal dağılımın tespit edildiği verilerde sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak, normal dağılımın tespit edilmediği verilerde ise ortanca, minimum ve maksimum değerler olarak sunuldu.

4. BULGULAR

4.1. Deney Süreci ve Klinik Muayene Bulguları

Deney süresince günlük kontroller ve uygulamalar herhangi bir aksama olmadan gerçekleştirildi; hiçbir farede anormal bir durum (mortalite veya morbidite, yaralarda enfeksiyon genel durum bozukluğu vb.) görülmedi. Deney çalışma planında yer aldığı şekilde sürdürüldü ve her bir gruba ait deney protokolü 14. günde sonlandırıldı.

4.2. Aynısefa Bitkisi Çiçeğinin GC-MS Analiz Bulguları

Aynısefa bitkisi çiçeği içeriğinin kimyasal analiz sonucu Tablo 6'da sunuldu. Çalışmada kullanılan Aynısefa bitkisi çiçeğinin içeriğinde GS-MS analizi ile 36 farklı kimyasal bileşen belirlendi. Bu bileşenler arasında karboksilik asit ve türevleri, karboksilli esterler, 1,2-aminoalkol, antioksidan bileşikler, aldehitler, seskiterpenoidler, hidrokarbonlar, karboksilik bileşenler, seskiterpenoid alkol, etil esterler, benzofuran, diterpen, alkan hidrokarbon, metil ester, elemen ve yağ asitleri gibi çeşitli kimyasal gruplara ait maddeler tespit edildi (Tablo 6). Bitki içeriğinde bulunan etken maddeler arasında en fazla %12,33'lük bir oranla terpen sınıfına ait seskiterpen grubunda yer alan viridiflorene bulundu.

Tablo 6. Aynısefa bitkisi çiçeğinin GC-MS analiz sonucu.

Altkonma Zamanı (Dakika)	Yüzde Alan (%)	Bileşik Adı	Kimyasal Formülü	Moleküler Ağırlığı (g/mol)
7,104	0,43	2-(Ethylamino)ethanol	C ₄ H ₁₁ O	89,14
8,728	1,36	N,N-Dimethylglycine methyl ester	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,15
10,139	0,57	4-Cyclopentene-1,3-dione	C ₅ H ₄ O ₂	96,08
13,476	0,64	5-Methylfurfural	C ₆ H ₆ O ₂	110,11
44,321	1,09	Copaene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
45,622	1,08	.beta.-Cubebene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
49,515	2,28	(4alpha,5beta,6alpha,7alpha,10alpha)-1-Aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
51,155	2,27	Aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
53,491	5,42	(-)-alpha-Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
54,344	12,33	Viridiflorene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
54,646	2	.alpha.-Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
55,647	4,37	(+)-gamma-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
56,467	7,47	delta-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
56,874	1,89	Cadina-1,4-diene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
57,223	0,92	.alpha.-Amorphene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
61,068	2,11	Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	222,37
62,039	2,3	Oplopenone	C ₁₅ H ₂₄ O	220,35
64,401	2,97	T-Muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O	222,37
64,894	3,91	2-Naphthalenemethanol, decahydro-.alpha.,.alpha.,4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-	C ₁₅ H ₂₆ O	222,37
65,273	3,67	alpha-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222,37
65,887	0,87	Curlone	C ₁₅ H ₂₂ O	218,33
70,195	3,07	Oplopanone	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238,36
73,200	0,86	Ethyl tetradecanoate	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,42
73,638	1,17	Loliolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	196,24
74,192	0,68	Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228,37
75,377	1,94	Neophytadiene	C ₂₀ H ₃₈	278,5
75,844	1,13	6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one	C ₁₈ H ₃₆ O	268,5
78,513	1,44	Nonadecane	C ₁₉ H ₄₀	268,5
79,913	0,96	Methyl palmitate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,5
81,188	0,8	Beta-Elemene	C ₁₅ H ₂₄	204,35
83,281	2,21	Ethyl palmitate	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,5
85,115	13,3	Palmitic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,42
88,081	3,45	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	296,6
90,774	1	Ethyl Linoleate	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308,5
91,078	1,07	Ethyl linolenate	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306,5

4.3. Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulguları

Çalışmada yer alan farelerin ölçüm günlerindeki yara alanlarına ait ortalama ve standart hata değerleri çalışma gruplarına göre başlıklar altında sınıflandırılarak sunuldu. Yara alanı verileri Tablo 7 ve Şekil 4'te gösterildi.

4.3.1. Aynısefa Çiçeği (AYSEF) Grubu Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulguları

Bu çalışma grubunda yer alan farelerin yaralarına 14 gün boyunca her gün steril sulu %5'lik Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktı kulak pamuğu yardımıyla yaranın üstü tamamen kapanıncaya kadar uygulandı. Çalışma grubu içinden 38 numaralı farenin ölçüm günlerinde çekilmiş yara fotoğrafları Resim 25'de sunuldu.

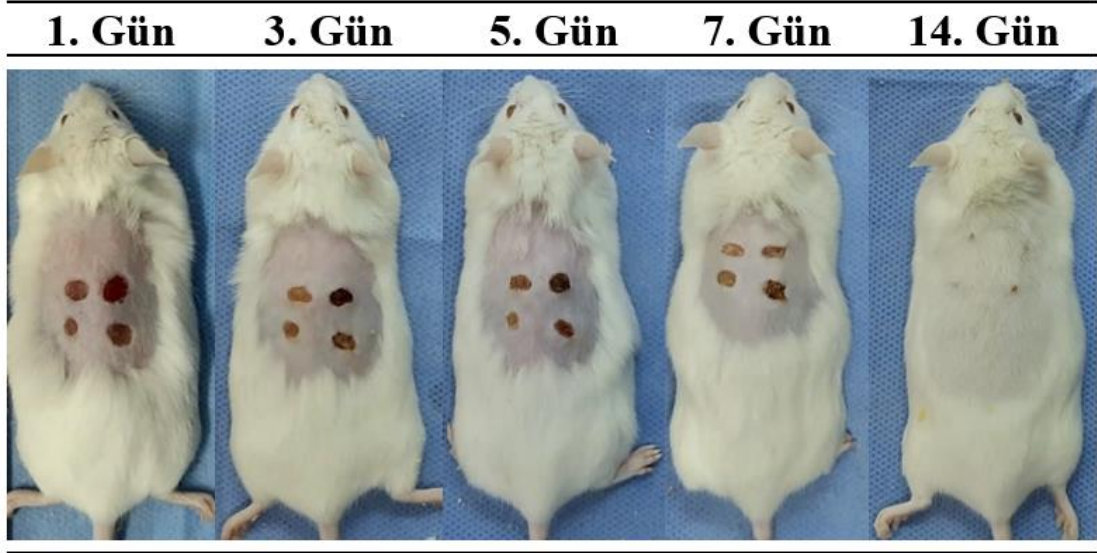


Resim 25. AYSEF çalışma grubundan 38 numaralı farenin çalışma sürecinde yara fotoğrafları.

AYSEF çalışma grubunda yer alan farelerin yaralarının çalışmanın sonlandırıldığı güne (14. gün) kadar olan süreçte tamamen kapanmadığı, yaralarda 3. günden itibaren kabuk oluştuğu ve tıraşlanan bölgede tüylerin 3. günden itibaren uzadığı gözlemlendi. AYSEF grubunda yer alan hayvanların yara alanı ortalama ve standart hata değerleri sırasıyla 1. gün: $15,29 \pm 0,27$; 3. gün: $23,22 \pm 1,13$; 5. gün $19,77 \pm 1,06$; 7. gün: $10,29 \pm 0,37$ ve 14. gün $4,15 \pm 0,13 \text{ mm}^2$ olarak ölçüldü (Şekil 4). AYSEF grubunda yer alan farelerin yara alanlarının 3. gün büyüdüğü, çalışmanın 5., 7., ve 14. gününde ise düzenli olarak küçüldüğü gözlemlendi.

4.3.2. Negatif Kontrol (NEGKON) Grubu Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulguları

Bu grupta yer alan farelerin yaralarına 14 gün boyunca hiçbir uygulama yapılmadı. NEGKON grubundan 17 numaralı fareye ait ölçüm günlerinde çekilmiş yara fotoğrafları Resim 26'da sunuldu.



Resim 26. NEGKON çalışma grubundan 17 numaralı farenin çalışma sürecinde yara fotoğrafları.

NEGKON çalışma grubunda yer alan farelerin yaralarının çalışmanın sonlandırıldığı güne (14. gün) kadar olan süreçte tamamen kapanmadığı, yaralarda 3. günden itibaren kabuk oluştuğu ve tıraşlanan bölgede tüylerin 7. günde uzamaya başladığı gözlemlendi. NEGKON grubunda yer alan hayvanların yara alanı ortalama ve standart hata değerleri sırasıyla 1. gün: $15,40 \pm 0,27$; 3. gün: $15,13 \pm 0,60$; 5. gün $19,59 \pm 0,69$; 7. gün: $13,18 \pm 0,71$ ve 14. gün $8,48 \pm 0,45$ mm² olarak ölçüldü (Şekil 4). NEGKON çalışma grubunda yer alan farelerde çalışmanın 5. gününde yara alanında büyüme gözlemlendi. Çalışmanın 3., 7., ve 14. gününde ise yara alanında küçülme gözlemlendi.

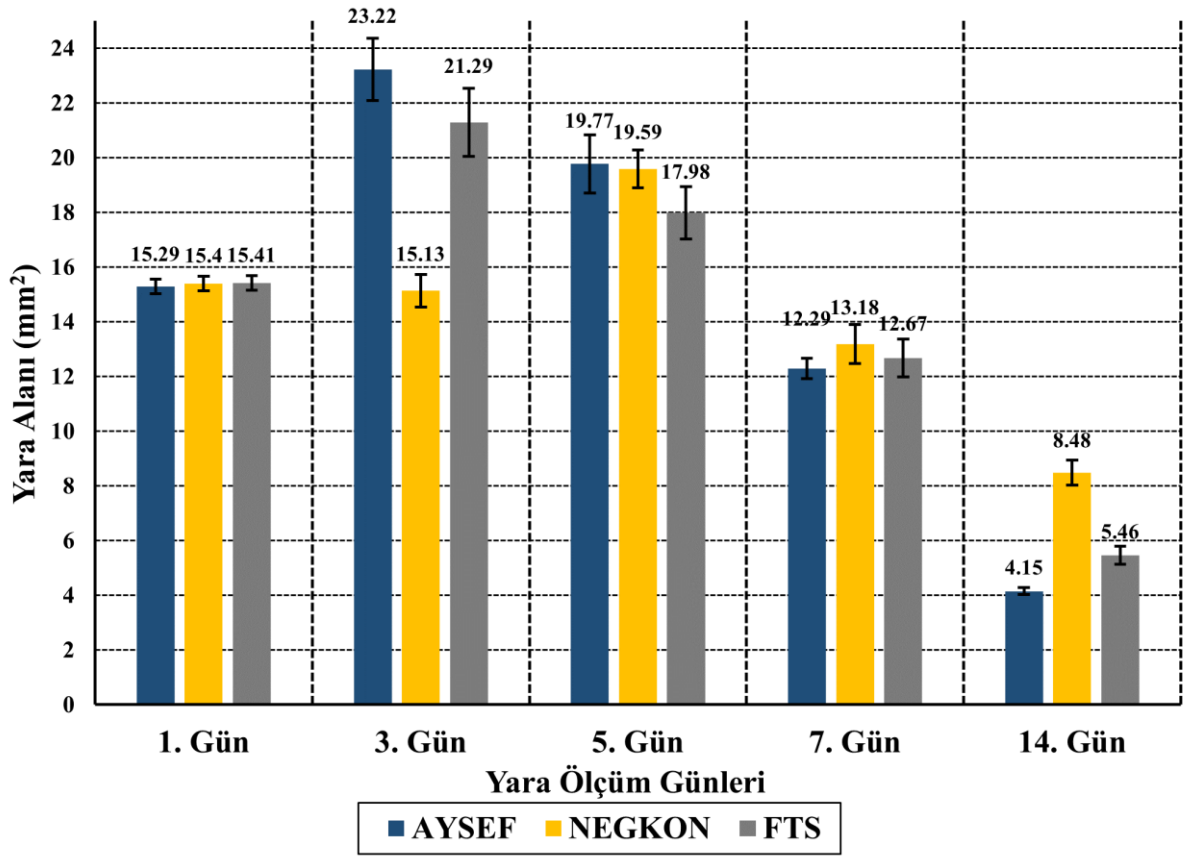
4.3.3. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) Grubu Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulguları

Bu grupta yer alan farelerin yaralarına 14 gün boyunca her gün %0,9'luk NaCl solüsyonu kulak pamuğu yardımıyla yaranın üstü tamamen kapanıncaya kadar uygulandı. FTS grubundan 68 numaralı fareye ait ölçüm günlerinde çekilmiş yara fotoğrafları Resim 27'de gösterildi.



Resim 27. FTS çalışma grubundan 68 numaralı farenin çalışma sürecinde yara fotoğrafları.

FTS çalışma grubunda yer alan farelerin yaralarının çalışmanın sonlandırıldığı güne (14. gün) kadar olan süreçte tamamen iyileşmediği, yaralarda 3. günden itibaren kabuk oluştuğu ve tıraşlanan bölgede tüylerin 5. günden itibaren uzadığı gözlemlendi. FTS grubunda yer alan hayvanların yara alanı ortalama ve standart hata değerleri sırasıyla 1. gün: $15,41 \pm 0,27$; 3. gün: $21,29 \pm 1,24$; 5. gün $17,98 \pm 0,96$; 7. gün: $12,67 \pm 0,70$ ve 14. gün: $5,46 \pm 0,33 \text{ mm}^2$ olarak ölçüldü (Şekil 4). FTS grubunda yer alan farelerin yara alanlarının 3. gün büyüdüğü, çalışmanın 5., 7., ve 14. gününde ise düzenli olarak küçüldüğü gözlemlendi.



Şekil 4. Çalışma gruplarında ölçüm günlerinde yara alanı ölçüm ortalama değerleri (mm²).

4.3.4. Yara Alanlarının Planimetrik Ölçüm Bulgularının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Çalışmanın 1. ve 5. gününde yara alanının planimetrik ölçümlerle takibinde çalışma grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 3. gününde ($p<0,001$) NEGKON çalışma grubu ile AYSEF ve FTS çalışma grupları arasında; çalışmanın 7. gününde ($p=0,002$) AYSEF çalışma grubu ile NEGKON ve FTS çalışma grupları arasında; çalışmanın 14. gününde ($p<0,001$) ise üç grup arasında da istatistiksel düzeyde anlamlı farklılıklar bulundu (Tablo 7).

Tablo 7. Çalışma gruplarının ölçüm zamanları yara alanı değerleri ve istatistiksel karşılaştırmalar (mm²).

Ölçüm Zamanları	Çalışma Grupları			p-değeri
	AYSEF	NEGKON	FTS	
	(n=24)	(n=24)	(n=24)	
	Ortalama±SH	Ortalama±SH	Ortalama±SH	
1. Gün	15,29±0,27	15,40±0,27	15,41±0,27	0,930
3. Gün	23,22±1,13 ^a	15,83±0,60 ^b	21,29±1,24 ^a	<0,001
5. Gün	19,77±1,06	19,59±0,69	17,98±0,96	0,317
7. Gün	10,29±0,37 ^a	13,18±0,71 ^b	12,67±0,70 ^b	0,002
14. Gün	4,15±0,13 ^a	8,48±0,45 ^b	5,46±0,33 ^c	<0,001

AYSEF: Sulu aynısefa çiçeği ekstraktı grubu; NEGKON: Tedavi uygulanmayan/negatif kontrol grubu; FTS: Fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl, izotonik sodyum klorür solüsyonu) grubu; SH: Standart hata. Farklı üst karakter harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları (p<0,05) temsil etmektedir.

4.4. Yara Dokularının İmmunohistokimyasal Analiz Bulguları

Çalışmada yer alan farelerin ölçüm günlerindeki yara dokularına ait fibroblast ve makrofaj sayım bulguları ilgili hücre başlıkları altında özetlendi, ve bu hücrelerin sayım verileri Tablo 8’de sunuldu.

4.4.1. Fibroblast Sayım Bulguları

Çalışma gruplarında yer alan farelerin ölçüm günlerinde alınan yara dokusu fibroblast sayım değerleri Tablo 8’de sunuldu. Tüm çalışma gruplarında fibroblast sayım değerlerinin yara oluşumundan sonraki süreçte (3., 5., 7. ve 14. gün) arttığı gözlemlendi. Çalışmanın 1. gününde çalışma gruplarının fibroblast sayım değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0,05). Çalışmanın 3. gününde AYSEF çalışma grubu fibroblast sayım değerinin FTS çalışma grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı manada (p=0,007) yüksek olduğu; çalışmanın 5. (p=0,003), 7. (p=0,005) ve 14. (p=0,001) gününde ise AYSEF çalışma grubu fibroblast sayım değerinin NEGKON ve FTS çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu (Tablo 8).

4.4.4. Makrofaj Sayım Bulguları

Çalışma gruplarında yer alan farelerden ölçüm günlerinde alınan yara dokularına ait makrofaj sayım değerleri Tablo 8’de sunuldu. Tüm çalışma gruplarında makrofaj sayım değerinin yara oluşumundan sonraki süreçte (3., 5., 7. ve 14. gün) arttığı gözlemlendi. Çalışmanın 1. ve 3. gününde çalışma gruplarının makrofaj sayım değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 5. ($p=0,016$), 7. ($p=0,001$) ve 14. ($p=0,012$) gününde AYSEF çalışma grubu makrofaj sayım değerinin NEGKON ve FTS çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük olduğu bulundu (Tablo 8).

Tablo 8. Ölçüm zamanlarına göre çalışma gruplarında fibroblast ve makrofaj sayım değerleri.

Belirteç	Ölçüm Günleri	Çalışma Grupları			p-değeri
		AYSEF (n=24)	NEGKON (n=24)	FTS (n=24)	
		Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)	
Fibroblast	1	8 (6-12)	8 (5-10)	8 (6-10)	0,598
	3	25,50 ^a (20-28)	16 ^{a,b} (12-26)	13 ^b (10-20)	0,007
	5	37 ^a (34-44)	20 ^b (16-26)	18 ^b (16-24)	0,003
	7	29 ^a (24-32)	21 ^b (16-26)	19 ^b (16-24)	0,005
	14	44 ^a (40-48)	40 ^{a,b} (36-44)	33 ^b (28-36)	0,001
Makrofaj	1	5 (4-7)	5 (4-6)	4,50 (3-7)	0,732
	3	18 (16-24)	21 (18-28)	21 (16-24)	0,345
	5	32 ^a (26-38)	37 ^b (24-40)	46 ^b (36-50)	0,016
	7	30 ^a (16-44)	44 ^b (36-48)	51 ^b (48-54)	0,001
	14	15 ^a (13-18)	18 ^b (16-22)	20 ^b (16-24)	0,012

AYSEF: Sulu aynısefa çiçeği ekstraktı grubu; NEGKON: Tedavi uygulanmayan/negatif kontrol grubu; FTS: Fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl, izotonik sodyum klorür solüsyonu) grubu; SH: standart hata. Farklı üst karakter harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları ($p<0,05$) temsil etmektedir.

4.5. Yara Dokularının Biyokimyasal Analiz Bulguları

Çalışmada kullanılan farelerin dokularının ölçüm günlerine göre biyokimyasal yöntemlerle takip edilen biyobelirteç (hidroksiprolin, oksidatif stres, büyüme faktörleri ve inflamasyon belirteçleri) bulguları ilgili belirteç başlıkları altında özetlendi, ve biyobelirteçlerin düzeyleri Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11 ve Tablo 12’de gösterildi.

4.5.1. Hidroksiprolin (HP) Bulguları

Çalışma gruplarında yer alan farelerden her bir ölçüm gününde alınan yara dokusu örneklerine ait hidroksiprolin düzeyleri Tablo 9’da gösterildi. Tüm çalışma gruplarında HP düzeylerinin 14. gün itibarıyla 1. güne kıyasla azaldığı gözlemlendi. Çalışmanın 1. ve 5. gününde çalışma grupları hidroksiprolin düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 3. gününde AYSEF çalışma grubu HP düzeyinin FTS çalışma grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düzeyde ($p=0,003$) yüksek olduğu; çalışmanın 7. gününde AYSEF çalışma grubu HP düzeyinin NEGKON ve FTS çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel anlamlı düzeyde ($p=0,001$) yüksek olduğu; çalışmanın 14. gününde ise her üç çalışma grubu arasında ($p<0,001$) istatistiksel anlamlı farklılıklar olduğu bulundu (Tablo 9).

Tablo 9. Çalışma gruplarında ölçüm günlerine göre hidroksiprolin düzeyleri (Ortalama $\pm$ SH).

Belirteç	Ölçüm Günleri	Çalışma Grupları			p-değeri
		AYSEF (n=24)	NEGKON (n=24)	FTS (n=24)	
HP (ng/mg protein)	1	236,40 $\pm$ 32,01	236,43 $\pm$ 37,63	235,65 $\pm$ 19,45	0,998
	3	265,20 $\pm$ 20,28 ^a	209,58 $\pm$ 20,55 ^{a,b}	161,92 $\pm$ 7,05 ^b	0,003
	5	173,70 $\pm$ 10,45	149,59 $\pm$ 8,98	154,41 $\pm$ 9,56	0,210
	7	197,07 $\pm$ 12,59 ^a	139,71 $\pm$ 9,84 ^b	140,65 $\pm$ 7,55 ^b	0,001
	14	175,21 $\pm$ 2,99 ^a	144,67 $\pm$ 2,64 ^b	120,11 $\pm$ 4,62 ^c	<0,001

AYSEF: Sulu aynısefa çiçeği ekstraktı grubu; NEGKON: Tedavi uygulanmayan/negatif kontrol grubu; FTS: Fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl, izotonik sodyum klorür solüsyonu) grubu; SH: standart hata; HP: Hidroksiprolin. Farklı üst karakter harfler çalışma grupları arası farklılıkları ($p<0,05$) temsil etmektedir.

4.5.2. Oksidatif Stres Biyobelirteç Bulguları

Çalışma gruplarında yer alan farelerden her bir ölçüm gününde alınan yara dokusu örneklerine ait oksidatif stres belirteç bulguları ilgili belirteç başlığı altında özetlendi, ve biyobelirteçlerin düzeyleri Tablo 10'da sunuldu.

4.5.2.1. Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Çalışmanın 1., 3., 5. ve 7. günlerinde çalışma grupları arasında MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 14. gününde AYSEF çalışma grubuna ait MDA düzeyinin NEGKON ve FTS çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ($p=0,007$) yüksek olduğu bulundu (Tablo 10).

4.5.2.2. Total Oksidan Kapasitesi (TOS) Düzeyleri

Çalışmanın 1., 5. ve 7. gününde çalışma grupları TOS düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 3. ve 14. gününde AYSEF çalışma grubu deneklerde TOS düzeyinin NEGKON ve FTS çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ($p=0,008$) daha düşük olduğu belirlendi (Tablo 10).

4.5.2.3. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) Düzeyleri

Çalışmanın 1., 3., 5. ve 7. gününde çalışma grupları TAS düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 14. gününde AYSEF çalışma grubu TAS düzeyinin NEGKON çalışma grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düzeyde ($p=0,037$) daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 10).

4.5.2.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Düzeyleri

Çalışmanın 1., 5., ve 7. gününde çalışma grupları OSİ düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 3. ($p=0,012$) ve 14. ($p=0,047$) gününde AYSEF çalışma grubu OSİ düzeyinin NEGKON ve FTS çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha düşük olduğu belirlendi (Tablo 10).

4.5.2.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeyleri

Çalışma ölçüm günlerinde (1., 3., 5., 7. ve 14. gün) çalışma grupları SOD düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$; Tablo 10).

4.5.2.6. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Düzeyleri

Çalışmanın 1., 5., ve 7. gününde çalışma grupları GPx düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 3. gününde NEGKON çalışma grubu GPx düzeyinin FTS çalışma grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı bir düzeyde ($p=0,028$) daha yüksek olduğu; çalışmanın 14. gününde ise AYSEF çalışma grubu GPx düzeyinin NEGKON çalışma grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düzeyde ($p=0,029$) daha yüksek olduğu bulundu (Tablo 10).

Tablo 10. Oksidatif stres belirteçlerinin çalışma gruplarında ölçüm günlerine göre düzeyleri (Ortalama $\pm$ SH).

Belirteç	Ölçüm Günleri	Çalışma Grupları			p-değeri
		AYSEF (n=24)	NEGKON (n=24)	FTS (n=24)	
MDA (ng/mg protein)	1	0,72 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,05	0,476
	3	0,66 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,04	0,531
	5	0,49 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,07	0,57 $\pm$ 0,07	0,579
	7	0,56 $\pm$ 0,07	0,44 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,06	0,319
	14	0,89 $\pm$ 0,07 ^a	0,45 $\pm$ 0,01 ^b	0,57 $\pm$ 0,06 ^b	0,007
TOS (nmol/mg protein)	1	0,49 $\pm$ 0,29	0,47 $\pm$ 0,28	0,43 $\pm$ 0,21	0,987
	3	0,21 $\pm$ 0,01 ^a	0,32 $\pm$ 0,04 ^b	0,33 $\pm$ 0,02 ^b	0,019
	5	0,31 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,03	0,119
	7	0,32 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02	0,162
	14	0,18 $\pm$ 0,03 ^a	0,27 $\pm$ 0,02 ^b	0,29 $\pm$ 0,01 ^b	0,008
TAS (U/mg protein)	1	1,50 $\pm$ 0,11	1,43 $\pm$ 0,07	1,47 $\pm$ 0,12	0,916
	3	1,47 $\pm$ 0,10	1,35 $\pm$ 0,11	1,19 $\pm$ 0,06	0,135
	5	1,62 $\pm$ 0,16	1,35 $\pm$ 0,09	1,36 $\pm$ 0,08	0,216
	7	2,03 $\pm$ 0,28	1,39 $\pm$ 0,06	1,99 $\pm$ 0,25	0,108
	14	1,68 $\pm$ 0,05 ^a	1,32 $\pm$ 0,04 ^b	1,52 $\pm$ 0,13 ^{a,b}	0,037
OSİ (TOS/TAS Oranı)	1	0,30 $\pm$ 0,16	0,32 $\pm$ 0,20	0,26 $\pm$ 0,11	0,960
	3	0,15 $\pm$ 0,01 ^a	0,25 $\pm$ 0,04 ^b	0,28 $\pm$ 0,03 ^b	0,012
	5	0,20 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,03	0,146
	7	0,18 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,04	0,907
	14	0,12 $\pm$ 0,02 ^a	0,20 $\pm$ 0,03 ^b	0,21 $\pm$ 0,01 ^b	0,047
SOD (ng/mg protein)	1	4 $\pm$ 0,85	3,78 $\pm$ 0,61	4,34 $\pm$ 0,52	0,844
	3	4,13 $\pm$ 0,24	3,99 $\pm$ 0,51	3,70 $\pm$ 0,38	0,740
	5	3,85 $\pm$ 0,57	4,37 $\pm$ 0,98	3,27 $\pm$ 0,46	0,555
	7	4,92 $\pm$ 0,08	3,23 $\pm$ 0,92	4,48 $\pm$ 0,51	0,159
	14	4,64 $\pm$ 0,60	4,71 $\pm$ 0,68	3,58 $\pm$ 0,43	0,333
GPx (ng/mg protein)	1	4,01 $\pm$ 0,38	4,11 $\pm$ 0,14	4,20 $\pm$ 0,21	0,875
	3	4,80 $\pm$ 0,60 ^{a,b}	5,35 $\pm$ 0,32 ^a	3,55 $\pm$ 0,29 ^b	0,028
	5	3,93 $\pm$ 0,64	4,66 $\pm$ 0,44	3,51 $\pm$ 0,45	0,313
	7	4,32 $\pm$ 0,24	3,93 $\pm$ 0,24	4,61 $\pm$ 0,29	0,206
	14	6,61 $\pm$ 0,60 ^a	4,12 $\pm$ 0,73 ^b	5,63 $\pm$ 0,38 ^{a,b}	0,029

AYSEF: Sulu aynısefa çiçeği ekstraktı grubu; NEGKON: Tedavi uygulanmayan/negatif kontrol grubu; FTS: Fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl, izotonik sodyum klorür solüsyonu) grubu; SH: Standart hata; MDA: Malondihaldehit, OSİ: Oksidatif stres indeksi; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutasyon peroksidaz. Farklı üst karakter harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları (p<0,05) temsil etmektedir.

4.5.3. Büyüme Faktörleri Belirteç Bulguları

Çalışma gruplarında yer alan farelerin ölçüm günlerinde alınan yara dokusu örneklerindeki büyüme faktörleri belirteç bulguları ilgili belirteç başlıkları altında özetlendi, ve büyüme faktörleri biyobelirteç düzeyleri Tablo 11’de sunuldu.

4.5.3.1. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) Düzeyleri

Tüm çalışma gruplarında PDGF düzeylerinin çalışmanın 14. gününde 1. gününe kıyasla arttığı bulundu. Çalışma ölçüm günlerinde çalışma grupları PDGF düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$; Tablo 11).

4.5.3.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) Düzeyleri

Tüm çalışma gruplarında çalışmanın 14. gün FGF düzeylerinin 1. gündeki düzeylerinden daha yüksek olduğu bulundu. Çalışmanın 1., 3. ve 5. gününde çalışma grupları FGF düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 7. ($p=0,025$) ve 14. ($p=0,047$) gününde AYSEF çalışma grubu FGF düzeyinin NEGKON çalışma grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu (Tablo 11).

Tablo 11. Büyüme faktörü belirteçlerinin çalışma gruplarında ölçüm günlerine göre düzeyleri (Ortalama $\pm$ SH).

Belirteç	Ölçüm Günleri	Çalışma Grupları			p-değeri
		AYSEF (n=24)	NEGKON (n=24)	FTS (n=24)	
PDGF (ng/mg protein)	1	0,34 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,03	0,861
	3	0,36 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,146
	5	0,28 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,13	0,27 $\pm$ 0,05	0,298
	7	0,35 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,06	0,944
	14	0,45 $\pm$ 0,13	0,39 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,08	0,766
FGF (pg/mg protein)	1	4,90 $\pm$ 0,60	4,86 $\pm$ 0,97	5,36 $\pm$ 0,73	0,884
	3	8,88 $\pm$ 2,71	5,50 $\pm$ 1,16	9,09 $\pm$ 1,38	0,344
	5	6,42 $\pm$ 0,98	6,30 $\pm$ 2,36	8,30 $\pm$ 1,27	0,635
	7	10,18 $\pm$ 0,90 ^a	6,19 $\pm$ 1,13 ^b	8,87 $\pm$ 0,71 ^{a,b}	0,025
	14	8,95 $\pm$ 0,38 ^a	5,99 $\pm$ 1,13 ^b	6,08 $\pm$ 0,92 ^{a,b}	0,047

AYSEF: Sulu aynısefa çiçeği ekstraktı grubu; NEGKON: Tedavi uygulanmayan/negatif kontrol grubu; FTS: Fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl, izotonik sodyum klorür solüsyonu) grubu; PDGF: platelet kaynaklı büyüme faktörü; FGF: fibroblast büyüme faktörü; SH: Standart hata. Farklı üst karakter harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları ($p<0,05$) temsil etmektedir.

4.5.4. İnflamasyon Biyobelirteç Bulguları

Çalışma gruplarında yer alan farelerin ölçüm günlerinde alınan yara dokusu örneklerindeki inflamasyon belirteç bulguları, belirteçlere göre başlıklar altında özetlendi, ve ilgili biyobelirteç düzeyleri Tablo 12’de sunuldu.

4.5.4.1. Miyeloperoksidaz (MPO) Düzeyleri

Çalışmanın 3., 5., 7. ve 14. gününde çalışma grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0,05$). Çalışmanın 3. ($p=0,004$), 5. ($p<0,001$), 7. ($p=0,001$) ve 14. ($p<0,001$) gününde AYSEF çalışma grubunda ölçülen MPO düzeylerinin NEGKON ve FTS çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlemlendi (Tablo 12).

4.5.4.2. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α) Düzeyleri

Çalışmanın 1., 3., ve 5. gününde çalışma gruplarında ölçülen TNF- α düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Çalışmanın 7. ($p<0,001$) ve 14. ($p<0,001$) gününde ise AYSEF çalışma grubunda ölçülen TNF- α düzeylerinin NEGKON ve FTS çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi (Tablo 12).

4.5.4.3. İnterlökin 1 (IL-1) Düzeyleri

Çalışmanın 1. ve 14. gününde çalışma gruplarında ölçülen IL-1 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 3. ($p=0,021$) ve 5. ($p=0,002$) gününde AYSEF çalışma grubunda ölçülen IL-1 düzeylerinin NEGKON ve FTS gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük olduğu; çalışmanın 7. gününde ise AYSEF çalışma grubunda ölçülen IL-1 düzeyinin FTS grubuna oranla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ($p<0,001$) düşük olduğu belirlendi (Tablo 12).

4.5.4.4. İnterlökin 6 (IL-6) Düzeyleri

Çalışmanın 3. gününde AYSEF çalışma grubunda ölçülen IL-6 düzeyinin FTS grubuna oranla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ($p=0,005$) düşük olduğu; 5. günde her bir grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklılıkların ($p<0,001$) olduğu gözlemlendi. Çalışmanın 7. gününde AYSEF çalışma grubunun IL-6 düzeylerinin NEGKON ve FTS gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ($p=0,007$) düşük olduğu; çalışmanın 14. gününde ise AYSEF çalışma grubunda ölçülen IL-6 düzeyinin NEGKON grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ($p=0,022$) düşük olduğu tespit edildi (Tablo 12).

4.5.4.5. Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF) Düzeyleri

Çalışmanın 1. ve 5. gününde gruplar arasında GM-CSF düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Çalışmanın 3. gününde AYSEF grubunda ölçülen GM-CSF düzeyinin NEGKON çalışma grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ($p=0,016$) düşük olduğu; 7. günde AYSEF grubunun GM-CSF düzeyinin FTS grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ($p=0,018$) düşük olduğu gözlemlendi. Çalışmanın 14. gününde ise AYSEF grubu GM-CSF düzeyinin NEGKON ve FTS çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ($p=0,013$) düşük olduğu belirlendi (Tablo 12).

4.5.4.6. Matriks Metalloproteinaz 2 (MMP-2) Düzeyleri

Çalışmanın 3. ($p<0,001$), 5. ($p<0,001$), 7. ($p<0,001$) ve 14. ($p<0,001$) gününde AYSEF grubu MMP-2 düzeyinin NEGKON ve FTS gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde düşük olduğu bulundu (Tablo 12).

4.5.4.7. Matriks Metalloproteinaz 9 (MMP-9) Düzeyleri

Çalışmanın 3. ($p=0,007$) ve 5. ($p=0,038$) gününde AYSEF grubunda ölçülen MMP-9 düzeyinin NEGKON grubuna oranla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde düşük olduğu bulundu (Tablo 12). Çalışmanın 7. ($p=0,002$) ve 14. ($p=0,002$) gününde ise AYSEF grubunda ölçülen MMP-9 düzeyinin NEGKON ve FTS gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi (Tablo 12).

Tablo 12. İnflamasyon belirteçlerinin çalışma gruplarında ölçüm günlerine göre düzeyleri (Ortalama±SH).

Belirteç	Ölçüm Günleri	Çalışma Grupları			p-değeri
		AYSEF (n=24)	NEGKON (n=24)	FTS (n=24)	
MPO (ng/mg protein)	1	0,36±0,04	0,65±0,32	0,39±0,10	0,543
	3	3,65±0,38 ^a	6,14±0,58 ^b	6,08±0,51 ^b	0,004
	5	3,36±0,34 ^a	7,29±0,46 ^b	6,50±0,40 ^b	<0,001
	7	3,85±0,40 ^a	6,35±0,46 ^b	6,22±0,40 ^b	0,001
	14	2,56±0,32 ^a	6,62±0,77 ^b	8,30±0,45 ^b	<0,001
TNF-α (ng/mg protein)	1	14,13±0,58	14,23±0,45	14,32±0,78	0,976
	3	11,67±1,64	14,30±1,30	12,44±1,51	0,458
	5	10,24±0,90	12,75±2,24	10,46±1,01	0,449
	7	8,24±0,66 ^a	11,74±0,45 ^b	13±0,61 ^b	<0,001
	14	7,30±0,63 ^a	14,66±0,86 ^b	13,81±0,89 ^b	<0,001
IL-1 (ng/mg protein)	1	4,89±0,64	5,29±0,79	4,74±0,52	0,834
	3	4,72±0,10 ^a	5,94±0,27 ^b	5,78±0,42 ^b	0,021
	5	4,12±0,24 ^a	5,38±0,19 ^b	6,55±0,58 ^b	0,002
	7	4,16±0,25 ^a	5,75±0,83 ^{a,b}	8,77±0,51 ^b	<0,001
	14	5,70±0,24	5,34±0,28	5,82±0,42	0,568
IL-6 (ng/mg protein)	1	7,15±0,60	6,68±0,83	6,95±0,59	0,886
	3	11,49±0,63 ^a	14,32±1,11 ^{a,b}	16,05±0,69 ^b	0,005
	5	7,64±0,67 ^a	10,80±0,33 ^b	16,37±0,88 ^c	<0,001
	7	9,20±0,84 ^a	13,71±1,01 ^b	12,83±0,86 ^b	0,007
	14	10,30±0,44 ^a	14,11±1,26 ^b	13,53±0,86 ^{a,b}	0,022
GM-CSF (ng/mg protein)	1	4,13±0,29	3,82±0,45	4,08±0,55	0,808
	3	3,89±0,26 ^a	5,57±0,46 ^b	4,23±0,39 ^{a,b}	0,016
	5	3,29±0,28	4,09±0,19	3,83±0,47	0,256
	7	3,36±0,38 ^a	4,26±0,28 ^{a,b}	4,73±0,23 ^b	0,018
	14	2,72±0,22 ^a	4,45±0,36 ^b	4,64±0,62 ^b	0,013
MMP-2 (ng/mg protein)	1	46,03±1,72	48,36±1,72	46,75±1,71	0,627
	3	31,33±2,57 ^a	44,48±1,39 ^b	47,77±2,48 ^b	<0,001
	5	24,46±1,58 ^a	35,22±1,63 ^b	37,80±1,23 ^b	<0,001
	7	25,15±1,14 ^a	41,71±2,59 ^b	36,04±1,49 ^b	<0,001
	14	27,68±1,22 ^a	47,88±2,33 ^b	52,66±2,61 ^b	<0,001
MMP-9 (ng/mg protein)	1	0,33±0,04	0,33±0,02	0,31±0,02	0,725
	3	0,25±0,01 ^a	0,39±0,03 ^b	0,34±0,03 ^{a,b}	0,007
	5	0,22±0,03 ^a	0,39±0,06 ^b	0,34±0,03 ^{a,b}	0,038
	7	0,21±0,02 ^a	0,41±0,05 ^b	0,39±0,02 ^b	0,002
	14	0,18±0,05 ^a	0,36±0,02 ^b	0,38±0,03 ^b	0,002

AYSEF: Sulu aynısefa çiçeği ekstraktı grubu; NEGKON: Tedavi uygulanmayan/negatif kontrol grubu; FTS: Fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl, izotonik sodyum klorür solüsyonu) grubu; SH: Standart hata; MPO: Miyeloperoksidaz; TNF- α : Tümör nekrozis faktör-alfa; IL-1: İnterleukin 1; IL-6: İnterleukin 6; GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör; MMP-2: Matriks metalloproteinaz 2; MMP-9: Matriks metalloproteinaz 9. Farklı üst karakter harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları (p<0,05) temsil etmektedir.

4.6. Genomik Analiz Bulguları

Çalışmada yer alan farelerin ölçüm günlerine ait qRT-PCR yöntemi ile ölçülen biyobelirteçlerin (MMP-2 ve MMP-9) gen ekspresyon kat değişim değerleri ortalama ve standart hata olarak, ilgili belirteç başlıkları altında özetlendi, ve gen ekspresyon kat değişim değerleri Tablo 13'te sunuldu.

4.6.1. Matriks Metalloproteinaz 2 (MMP-2) Gen Ekspresyon Bulguları

Çalışmanın 3. (p=0,010), 5. (p=0,002), 7. (p=0,003) ve 14. (p=0,006) günlerinde AYSEF grubundaki MMP-2 gen ekspresyonunun kat ortalama değerlerinin NEGKON ve FTS gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi (Tablo 13).

4.6.2. Matriks Metalloproteinaz 9 (MMP-9) Gen Ekspresyon Bulguları

Çalışmanın 3. (p=0,002), 5. (p=0,002), 7. (p=0,011) ve 14. (p=0,011) gününde AYSEF grubundaki MMP-9 gen ekspresyonunun kat ortalama değerlerinin NEGKON ve FTS gruplarına oranla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde düşük olduğu belirlendi (Tablo 13).

Tablo 13. Ölçüm zamanlarına göre çalışma gruplarında MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonu kat değişim değerleri (Ortalama±SH).

Belirteç	Ölçüm Günleri	Çalışma Grupları			p-değeri
		AYSEF (n=24)	NEGKON (n=24)	FTS (n=24)	
MMP-2	3	2,65±0,11 ^a	3,54±0,30 ^b	3,78±0,65 ^b	0,010
	5	1,99±0,17 ^a	12,72±1,46 ^b	13,22±1,37 ^b	0,002
	7	1,99±0,12 ^a	4,46±0,47 ^b	4,43±0,51 ^b	0,003
	14	1,03±0,07 ^a	2,20±0,32 ^b	2,26±0,22 ^b	0,006
MMP-9	3	0,11±0,54 ^a	2,70±0,45 ^b	1,90±0,47 ^b	0,002
	5	0,34±0,13 ^a	1,97±0,24 ^b	1,99±0,34 ^b	0,002
	7	0,54±0,22 ^a	1,66±0,14 ^b	1,79±0,25 ^b	0,011
	14	0,20±0,07 ^a	0,42±0,05 ^b	0,62±0,10 ^b	0,011

AYSEF: Sulu aynısefa çiçeği ekstraktı grubu; NEGKON: Tedavi uygulanmayan/negatif kontrol grubu; FTS: Fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl, izotonik sodyum klorür solüsyonu) grubu; SH: standart hata; MMP-2: Matriks metalloproteinaz 2; MMP-9: Matriks metalloproteinaz 9. Farklı üst karakter harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları (p<0,05) temsil etmektedir.

4.7. MMP-2 Gen Ekspresyonu Kat Değişim ve Protein Düzeylerinin İlişkisi

Çalışmanın 3. gününde gerçekleştirilen ölçümler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki gözlenmedi (r=0,497, p=0,100). Çalışmanın 5., (r=0,828, p=0,001) 7. (r=0,679, p=0,015) ve 14. gününde (r=0,719, p=0,008) doku protein düzeyleri ile gen ekspresyonu kat değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde korelasyonlar gözlemlendi. Çalışma günleri bir bütün halinde, kümülatif olarak değerlendirildiğinde doku protein düzeyleri ile gen ekspresyonu kat değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir ilişki gözlenmedi (r=0,048, p=0,747).

4.8. MMP-9 Gen Ekspresyonu Kat Değişim ve Protein Düzeylerinin İlişkisi

Çalışmanın 7. gününde ölçümler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı (r=0,197; p=0,540). Çalışmanın 3., (r=0,835; p=0,001) 5. (r=0,681; p=0,015) ve 14. gününde (r=0,816; p=0,001) doku protein düzeyleri ile gen ekspresyonu kat değerleri arasında istatistiksel anlamlı düzeyde korelasyonlar gözlemlendi. Çalışma günleri bir bütün halinde, kümülatif olarak değerlendirildiğinde doku protein düzeyleri ile gen ekspresyonu kat değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir korelasyon gözlemlendi (r=0,598; p<0,001).

5. TARTIŞMA

Geleneksel tıp; farklı kùltùrlere özgù teorilere, inançlara ve deneyimlere dayanan bilgi, beceri ve uygulamaların toplamı olarak tanımlanmaktadır (World Health Organization, 2013). Bu uygulamalardan fiziksel ve zihinsel hastalıkların önlenmesi, teşhisi ve tedavisi ile mevcut sağığın sürdürölmesinde faydalanılır (Majumdar ve Sangole, 2016). Bitki kaynaklı materyaller yara iyileşmesinde sıkça kullanılmaktadır (World Health Organization, 2013). Mevcut ilaçların %73'e yakını doğa ve/veya bitkisel kaynaklıdır; bitkisel ürünler az maliyetli ve güvenli alternatif tedaviler sunabilmeleri sebebiyle ilgi çekmektedir (Thakur ve diğerleri, 2011; Tiwari ve diğerleri, 2013; Wangchuk, 2018). Klinik uygulamalarda birçok topikal yara bakım ürünü olmasına rağmen, bu ürünlerin etkinliğini bilimsel olarak irdeleyen yetersiz sayıda araştırma bulunduğı bilinmektedir (Harding ve diğerleri, 2002; Fonder ve diğerleri, 2008; Lohi ve diğerleri, 2010; Givol ve diğerleri, 2019). Aynısefa bitkisi (*Calendula officinalis*) Avrupa İlaç Ajansı tarafından bitkisel tıbbi bir ürün olarak sınıflandırılmıştır (European Medicines Agency, 2018). Bitkinin içerdiği metabolitler ve kimyasal maddelerin farmakolojik etkiler sağladığı ve halihazırda gıda ve ilaç endüstrisinde kullanıldığı bildirilmiştir (European Medicines Agency, 2018; Shahane ve diğerleri, 2023). Givol ve diğerleri'nin (2019) yaptığı sistematik derlemede bu (Aynısefa bitkisi) bitkinin yara iyileşmesinde etkinliğini araştıran çalışmalarda limitasyonların bulunduğı, konu ile ilgili iyi tasarlanmış, kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır (Givol ve diğerleri, 2019). Sunulan tez çalışmasında Aynısefa bitkisi çiçeğinin %5'lik sulu ekstraktının farelerin tam katmanlı deri yaralarındaki etkisinin çok yönlü ve kapsamlı incelemelerle (yara alanı, hidroksprolin düzeyi, oksidatif stres belirteçleri, büyüme faktörü belirteçleri, inflamasyon belirteçleri ve gen ekspresyonu) ortaya konulması amaçlanmıştır. Elde edilen bitki ekstraktının içerdiği kimyasal bileşenler ve miktarları, GC-MS ile detaylı bir şekilde analiz edilmiş ve sunulmuştur. Aynısefa bitkisi çiçeğinin ekstraktının içerdiği kimyasal bileşenlerin saflaştırılarak, ilgili parametrelerdeki etkilerinin daha detaylı bir şekilde incelenmesi ve tedavi sonuçlarının ayrıntılı bir şekilde sunulması konuya katkı sağlayabilir. Böylece, Aynısefa bitkisi çiçeğinin ekstraktının yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin daha anlaşılabilir olacağı ve potansiyel olarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine zemin hazırlayabileceğı düşünölmüştür.

Yara tedavisinde kullanılması düşünölen terapötik ajanların etkinliklerinin belirlenebilmesi için klinik aşamalardan önce laboratuvar hayvanları üzerinde çalışılması

gerekmektedir (Grada ve diğerleri, 2018; Wu ve Landen, 2020). Laboratuvar hayvanlarında yapılacak deneysel uygulamalarda deney dizaynı çalışmanın kalitesini ve sonuçların doğruluğunu etkiler (Johnson ve Besselsen, 2002; Grada ve diğerleri, 2018; Wu ve Landen, 2020). Bu çalışmalarda kullanılan negatif kontrol grubu, ajanın tedavi edici etkisinin olmadığı bir durumu, pozitif kontrol grubu ise ajanın tedavi edici etkisini gösteren bir uygulamayı temsil etmektedir. Her iki kontrol grubunun deneysel çalışmaya dahil edilmesi, sunulan tedavinin etkinliğinin güvenilir bir şekilde araştırılmasına zemin hazırlar. Bu yöntem deneysel çalışmanın güvenilirliğini artırır ve sonuçların daha verimli bir şekilde yorumlanmasını sağlar (Johnson ve Besselsen, 2002). Sunulan çalışmada bu amaçlar göz önünde bulundurularak negatif (tedavi uygulanmayan) ve pozitif (fizyolojik tuzlu su/%0,9 NaCl solüsyonu) kontrol grupları kullanılmıştır. Ayrıca, çalışma hipotezini test etmek için gerekli olan minimum fare sayısı örneklem büyüklüğü hesaplanarak belirlenmiştir. İlk gün (1. gün) dokuları (başlangıç verileri), fareler arasında farklılıkların bulunmadığı ve örneklemin homojen olduğunu test etmek amacıyla toplanmıştır. Yaraların oluşturulmasını takiben çalışmanın 3., 5., 7. ve 14. gününde, yara iyileşmesinin farklı aşamalarını izlemek amacıyla her bir çalışma grubundan immünohistokimyasal, biyokimyasal ve genomik analizler için yara dokusu örnekleri toplanmıştır (Moreira ve diğerleri, 2015; Grada ve diğerleri, 2018; Masson-Meyers ve diğerleri, 2020; Wu ve Landen, 2020). Sunulan tez çalışma düzeninin aynısıfa çiçeği ekstraktının yara iyileşmesine etkisi hakkında güçlü kanıtlar sunduğu düşünülmektedir.

Başarılı yara tedavisinin göstergelerinden biri yaranın kapanmasıdır. Yara kapanıncaya kadar süren iyileşme aşamalarında farklı olaylar gelişir. Bu gelişmeler makroskopik olarak yara alanında değişiklikler meydana getirir (Masson-Meyers ve diğerleri, 2020). Tam katmanlı deri yaralarının iyileşmesinde yara kenarlarında kontraksiyon gerçekleşerek yara alanı merkeze doğru küçülürken, yara yüzeyinde de epitelizasyon ve proliferasyon ile yara bölgesi dolmaya başlar (Swaim ve diğerleri, 2001; Boukovalas ve diğerleri, 2022). Yara alanının düzenli aralıklarla ölçülmesi, iyileşmenin yanı sıra süreçteki olayların takibini sağlamak amacıyla da önemli bir kriterdir (Lait ve Smith, 1998; Nichols, 2015; Boukovalas ve diğerleri, 2022). Yara alanı ölçümü farklı yöntemlerle (planimetrik, optik koherens tomografi gibi özel aletler veya dijital yöntemler) yapılabilir (Lait ve Smith, 1998; Williams, 2000; Papazoglou ve diğerleri, 2010; Koschwanez ve Broadbent, 2011; Andrade ve diğerleri, 2011; Weingarten ve diğerleri, 2012; Tan ve Wahli, 2013; Tsai ve diğerleri, 2013; Sattler ve diğerleri, 2013; Greaves ve diğerleri, 2014; Okuma ve diğerleri, 2015; Nichols, 2015). Sunulan çalışmada literatürde yer alan metodolojiden faydalanılarak yaralar üzerine yerleştirilen şeffaf asetatlı kağıtlara yara

alanları çizilmiş ve milimetrik kağıda aktarılarak kumpasla (planimetrik olarak) ölçülmüştür (Nichols, 2015). Aynısefa bitkisinin yara iyileşmesindeki etkinliğini makroskobik (yara alanı) olarak sunan beş çalışma ile karşılaştırılmıştır (Preethi ve diğerleri, 2009; Parente ve diğerleri, 2012; Shafeie ve diğerleri, 2015; Dinda ve diğerleri, 2016; Gunasekaran ve diğerleri, 2020). Bu çalışmalar bitki ekstraktının topikal uygulamasında yara iyileşmesinin hızlandığını belirtmişlerdir. Bahsi geçen literatürlere benzer şekilde mevcut çalışmanın 7. ($p=0,002$) ve 14. ($p<0,001$) gününde yapılan yara alanı ölçümlerinde en küçük yara alanı AYSEF grubunda bulunmuş ve bu gruptaki deneklerin diğer gruptakilere kıyasla daha hızlı bir iyileşme gösterdiği görülmüştür (Tablo 7). Yara iyileşmesinin inflamasyon aşaması yara oluşumundan sonra 3 gün kadar sürebilir ve bu süreçte yara alanı genişleyebilir (Waldron ve Pope, 2003; Attah ve diğerleri, 2015; Boukovalas ve diğerleri, 2022). Uzamış inflamasyon aşaması yara iyileşmesi için istenmeyen bir durum olmasının yanında patojenlerin engellenmesi ve nekrotik doku yıkımı için önemli bir süreçtir (Eming ve diğerleri, 2014). Yara alanında inflamasyonun sonlanmasıyla birlikte yara büyümesi durur ve yara iyileşmesi inflamasyon aşamasından proliferasyon aşamasına geçişle devam eder (Waldron ve Pope, 2003; Attah ve diğerleri, 2015; Boukovalas ve diğerleri, 2022). Sunulan çalışmada AYSEF ve FTS grubundaki yara alanının 3. günden sonra küçüldüğü ve AYSEF grubunun 3. günde diğer gruplardan daha büyük bir alana sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 7, $p<0,001$). Yara alanlarının 7. ($p=0,002$) ve 14. ($p<0,001$) gün değerleri dikkate alındığında, AYSEF grubunun diğer gruplardan daha hızlı bir küçülme göstermesi, bu grubun inflamasyon aşamasını diğer gruplara göre daha hızlı bir şekilde tamamlayarak proliferasyon aşamasına geçtiğini düşündürmüştür. Literatürde yara tedavisinde topikal fizyolojik tuzlu su uygulanmasının, izotonik bir çözelti olması sebebiyle dokulara hasar vermeden yara iyileşmesini hızlandırdığı raporlanmıştır (Salami ve diğerleri, 2006; Resende ve diğerleri, 2016; Fernandez ve diğerleri, 2022). Benzer şekilde, sunulan çalışmada 3. ve 7. günlerde NEGKON ve FTS grupları arasında istatistiksel farklılıkların bulunması, topikal fizyolojik tuzlu suyun, inflamasyon aşamasının hızlıca tamamlanmasına ve proliferasyon/remodelleme aşamalarında yara iyileşmesine, hiçbir uygulama yapılmamasına kıyasla katkı sağladığını ve iyileşme sürecini hızlandırdığını göstermektedir.

Yara dokusunun immünohistokimyasal yöntemlerle boyanması, fibroblast ve makrofaj gibi hücrelerin sayılmasını sağlayarak yara alanındaki morfolojik değişimlerin izlenmesine olanak tanımaktadır (Romanelli ve diğerleri, 2013; Masson-Meyers ve diğerleri, 2020). Yara dokusunda fibroblast sayısı inflamasyon sürecinin sonlanmasıyla artar ve epitelizasyonun tamamlanmasına kadar mevcudiyetini korur (Aikawa, 2011; Bainbridge, 2013). Makrofajlar,

inflamasyon aşamasında önemli rol oynayan inflamatuvar hücrelerdir. Farelerde yapılan çalışmalarda, akut yaralarda makrofaj sayısının yara oluşumuyla birlikte arttığı, takip eden 2-5 gün boyunca yüksek seviyede kaldığı ve epitelizeasyon aşamasının başlamasıyla birlikte (7. gün ve sonrası) azalmaya başladığı bildirilmiştir (Rodero ve diğerleri, 2013; Aitcheson ve diğerleri, 2021). Makrofajların yara alanında gereğinden uzun süre bulunması yaranın inflamasyon aşamasını uzatarak iyileşmeyi geciktirir (Krzyszczuk ve diğerleri, 2018). Shafeie ve diğerleri (2015) yaptıkları çalışmada, topikal Aynısefa bitkisi uygulamasının yara dokusunda inflamatuvar hücrelerin (makrofaj ve lenfositlerin) sayılarını azaltarak yara iyileşmesine katkı sağladığını belirtmiştir. Çalışmamızın AYSEF grubundaki makrofaj sayım değerlerinin 5. ($p=0,016$), 7. ($p=0,001$), ve 14. ($p=0,012$) günde diğer çalışma gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olması, kullanılan ekstraktın makrofajların sayısını kontrol altında tutarak yara iyileşmesinin inflamasyon aşamasını düzenlediği/uzamasını engellediğine işaretler. Aynısefa bitkisi ekstraktının in vitro ve in vivo çalışmalarda yara dokusunda fibroblast hücre sayısını arttırdığı raporlanmıştır (Fronza ve diğerleri, 2010; Dinda ve diğerleri, 2016). Benzer şekilde sunulan çalışmada yara oluşumundan sonraki süreçte (3., 5., 7. ve 14. gün) fibroblast sayım değerlerinin diğer gruplara göre AYSEF grubunda [farklı p değerleri ile (Tablo 8)] istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durum Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının topikal yara tedavisinde dokuda fibroblast miktarını arttırarak iyileşmeyi hızlandırdığını göstermektedir.

Hidroksiprolin, yara iyileşmesinde granülasyon dokusunun yapısal bileşenlerini güçlendiren ve kollajen dokusunun iyileşme sürecindeki durumu hakkında bilgi sağlayan önemli bir belirteçtir (Kokane ve diğerleri, 2009; Nayak ve diğerleri, 2011). Aynısefa bitkisinin oral (Chandran ve diğerleri, 2008; Preethi ve diğerleri, 2008) ve topikal (Gunasekaran ve diğerleri, 2020) kullanımının hidroksiprolin düzeylerini artırarak ratların eksizyonel (Preethi ve diğerleri, 2008; Gunasekaran ve diğerleri, 2020) ve yanık (Chandran ve diğerleri, 2008) yara iyileşmesine katkı sağladığı bildirilmiştir. Bu sonuçlara benzer şekilde mevcut çalışmada kullanılan BALB/C farelerin tam katmanlı yara iyileşme sürecinde çalışmanın 3. ($p=0,003$), 7. ($p=0,001$) ve 14. ($p<0,001$) gününde AYSEF grubu hidroksiprolin düzeyleri diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur (Tablo 9). Bu durum Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının topikal yara tedavisinde dokuda kollajen miktarını arttırarak iyileştirmeyi hızlandırdığı kanaatini güçlendirmektedir. Çalışmanın 14. gününde, FTS grubunun hidroksiprolin düzeylerinin NEGKON grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olması, yara tedavisinde

topikal fizyolojik tuzlu su uygulamasının yara alanı bulgularına tezat olarak, yaranın proliferasyon/remodelleme aşamalarında doku kollajen miktarını azalttığını göstermektedir.

Hücre metabolizmasının sonucunda reaktif oksijen türleri oluşur. Bu türlerin fizyolojik sınırlar içinde tutulması antioksidanlar tarafından sağlanır ve bu durum dokuların fizyolojik dengesini yansıtır (Gorrini ve diğerleri, 2013; Kauppila ve diğerleri, 2017; Poprac ve diğerleri, 2017; Hameister ve diğerleri, 2020). Reaktif oksijen türlerinin belirli sınırların üzerine çıkması veya antioksidan kapasitenin azalması ile yara iyileşmesinin olumsuz etkilendiği bildirilirken (Pizzino ve diğerleri, 2017; Poprac ve diğerleri, 2017; Hayes ve diğerleri, 2020), bunların belirli sınırlar içinde tutulmasının yara iyileşmesini teşvik edici olduğu da vurgulanmaktadır (J. Park ve diğerleri, 2018; Schwörer ve diğerleri, 2020). Reaktif oksijen türlerinin takibi için birçok oksidatif stres belirteci mevcut iken, yara iyileşmesinde süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve glutatyon peroksidaz (GPx) sıklıkla incelenen antioksidanlar arasındadır (Masson-Meyers ve diğerleri, 2020; Wang ve diğerleri, 2023). Sunulan çalışmada SOD, MDA, GPx, TOS, TAS ve OSI değerleri oksidatif stres belirteci olarak irdelenmiştir (Tablo 10). Literatürde, yara iyileşmesinde oksidatif stresin göstergesi olarak TOS, TAS ve OSI düzeylerini inceleyen çalışmalara rastlanmamıştır. Ancak, bu ölçümlerin kan ve dokularda oksidatif stres düzeyini belirlemede önemli olduğu bildirilmiştir (Vassalle, 2008; Marrocco ve diğerleri, 2017). Sunulan çalışmada, bu belirteçlerin de incelenmesi ilgili parametrelerin yorumlanması bakımından ileride yapılacak yara iyileşmesi çalışmalarına yardımcı olacaktır. AYSEF grubunda 3. günde TOS ($p=0,019$) ve OSI ($0,012$) düzeylerinin diğer gruplara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük bulunması kullanılan Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının inflamasyon ve proliferasyon aşamalarında oksidatif stresi azalttığı izlenimini uyandırmıştır. Çalışmanın 14. gününde AYSEF grubuna ait TOS ($p=0,008$), TAS ($p=0,037$), MDA ($p=0,007$), OSI ($p=0,047$) ve GPx ($p=0,029$) düzeyleri istatistiksel açıdan yüksek bulunmuştur. Bu durum, topikal Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının yara iyileşmesinin proliferasyon-remodelleme aşamalarında oksidatif stres belirteçleri üzerine olumlu etkisi olduğunu ve yara iyileşmesine pozitif katkı sağladığını göstermektedir. Çalışma grupları arasında örneklem günlerinde SOD değerleri arasında herhangi bir fark bulunmamasına karşın, Gunasekaran ve diğerleri (2020) tarafından yapılan bir çalışmada topikal Aynısefa bitkisi çiçeğinin sulu ekstraktının yara iyileşmesinde SOD düzeylerini arttırdığı ve oksidatif strese yol açan yan ürünlerin kontrolünde etkili olduğu bildirilmiştir. Bu çelişkili durumun iki çalışmada kullanılan ekstraktların konsantrasyon farklılığından (sunulan çalışmada: %5; Gunasekaran ve diğerleri, 2020; %10 ve %20'lik konsantrasyonlarda) kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Aynısefa bitkisi çiçeği içinde oksidatif stres üzerine etkili olduğu bildirilen karetenoid, terpenoid, kumarin ve fenolik asit gibi bileşenlerin varlığı bilinmektedir (Cetkovic ve diğerleri, 2003; Preethi ve diğerleri, 2008; Naveed ve diğerleri, 2018; Chamansara ve diğerleri, 2022; Shahane ve diğerleri, 2023). Bu bitki ekstraktının yara iyileşmesi üzerine olan etkilerini araştıran çalışmalarda (Chandran ve diğerleri, 2008; Preethi ve diğerleri, 2008; Gunasekaran ve diğerleri, 2020) kimyasal bileşen analizleri sunulmamış, sunulan çalışmalarda da sadece ana kimyasal bileşen grupları raporlanmıştır (Fonseca ve diğerleri, 2010; Buzzi ve diğerleri, 2016; Givol ve diğerleri, 2019; Shahane ve diğerleri, 2023). Mevcut tez çalışmasında kullanılan bitki içeriğinin ayrıntılı bir şekilde sunulmasının (Tablo 6) literatür bilgiye olumlu katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Oksidatif stres, yara iyileşmesi aşamalarında fizyolojik dengeyi göstermek adına önemli rol oynamaktadır (Cabello-Verrugio ve diğerleri, 2016; Kunkemoeller ve Kyriakides, 2017; Sanchez ve diğerleri, 2018). Literatürde (Givol ve diğerleri, 2019; Shahane ve diğerleri, 2023) ve sunulan çalışmada kullanılan Aynısefa bitkisi içeriğinde (Tablo 6) oksidatif stres üzerine etkisi olan antioksidan bileşiklerinin varlığı kanıtlanmıştır. Çalışmada elde edilen oksidatif stres bulguları ve literatür bilgi bir bütün olarak değerlendirildiğinde, aynısefa bitki çiçeği ekstraktının tam katmanlı deri yaralarının iyileşmesinde oksidatif stres dengesinin düzenlenmesine katkı sağladığı söylenebilir. Bitkinin içerik analizi de sunularak, yara iyileşmesinde farklı konsantrasyonlarda uygulanması ile olumlu sonuçlar ortaya çıkarabilir.

İyileşen yara dokusunda büyüme faktörlerinin görevleri arasında ekstraselüler matriksin sentezi, anjiyogenez, kollajen üretimi, epitelizasyon protein sentezi yer almaktadır (Cowin ve diğerleri, 2001; Hsu ve Chang, 2004; Lee ve diğerleri, 2011; Jaferian ve diğerleri, 2017; Park ve diğerleri, 2017; Ishihara ve diğerleri, 2019). PDGF, FGF, TGF- β ve VEGF insan ve hayvanların yara iyileşmesinde takip edilen büyüme faktörleri arasındadır (Werner ve Grose, 2003; Zarei ve Soleimanejad, 2018; Titan ve diğerleri, 2019). Sunulan çalışmada literatürde yara iyileşmesi sürecinde sıklıkla incelenen PDGF ve FGF (Pierce ve diğerleri, 1995; Werner ve Grose, 2003; Pikula ve diğerleri, 2015; Masson-Meyers ve diğerleri, 2020; Zarei ve Soleimanejad, 2018) düzeyleri irdelenmiştir. Yapılan literatür taramasında Aynısefa bitkisi ile tedavi edilen deri yarası dokularında FGF düzeyi ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamış; VEGF (Parente ve diğerleri, 2012) ve PDGF'nin (Gunasekaran ve diğerleri, 2020) ise iyileşme sürecinde arttığı bildirilmiştir. Sunulan çalışmada VEGF düzeyleri incelenmemiş, PDGF ve FGF düzeyleri ölçülmüştür. AYSEF grubunda PDGF düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmazken, FGF'ye ait 7. (p=0,025) ve 14. gün (p=0,047) değerlerinin diğer gruplara göre

istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 11). Elde edilen sonuçlar, topikal Aynısefa bitkisi çiçeği uygulamasının yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasında FGF sentezini olumlu etkileyerek iyileşmeye katkı sağladığını düşündürmektedir. Çalışmada FGF düzeylerinin sunulması, konu ile ilgili gelecek araştırmalar için karşılaştırma ve/veya tartışma bilgisi sunmaktadır.

Yara iyileşme sürecinde gerçekleşen inflamasyonun patojenlerden korunma ve nekrotik dokuların atılımı için oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Wang ve diğerleri, 2022). Ancak inflamasyonun aşırı ve uzun süreli olması, yara iyileşme sürecinde aksamalara neden olarak yaranın kronikleşmesine ve/veya iyileşmemesine yol açabilir (Eming ve diğerleri, 2014; Wang ve diğerleri, 2022). Yaralarda inflamasyon aşamasının değerlendirilmesinde MPO, TNF- α , IL-1, IL-6, GM-CSF, MMP-2 ve MMP-9 gibi belirteçler incelenmektedir (Fang ve diğerleri, 2007; Eming ve diğerleri, 2014; Komi ve diğerleri, 2020). Literatür bilgide yara iyileşmesinin değerlendirilmesinde kullanılan bu belirteçler sunulan çalışmada da incelenmiştir. Aynısefa bitkisinin anti-inflamatuvar etkisinin literatürde yer aldığı bilinmektedir (Givol ve diğerleri, 2019; Shahane ve diğerleri, 2023). Topikal olarak uygulanan Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının IL-6 ve TNF- α düzeylerini azalttığı ve yara iyileşmesini hızlandırdığı raporlanmıştır (Gunasekaran ve diğerleri, 2020). Çalışmada incelenen tüm inflamasyon belirteçleri, yara oluşumundan sonraki süreçte (3., 5., 7. ve 14. gün) diğer gruplara göre AYSEF grubunda [farklı p değerleri ile (Tablo 12)] istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar, kullanılan Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının topikal uygulamasının yara iyileşmesinde anti-inflamatuvar etkisi olduğunu desteklemektedir. Çalışmanın 5. gününde, FTS grubundaki IL-6 düzeyinin NEGKON ve diğer tedavi gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olması, topikal fizyolojik tuzlu su uygulamasının yara iyileşmesinde IL-6 düzeyini diğer gruplara göre daha geç baskıladığını göstermektedir. Bu bulgunun mevcut çalışma metodolojisi ile açıklanması mümkün olmadığından, gelecek çalışmalarda araştırılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Gen ekspresyonu bir genin talimatı ile yürütülen protein sentezinin gözlemlenebilir hale getirilmesi olarak tanımlanabilir (Gann, 2010) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) gibi yöntemler ile izlenebilmektedir (Rugo ve diğerleri, 1992; Friedhoff ve diğerleri, 1993; Taniguchi ve diğerleri, 1994; Esnault ve diğerleri, 1996; Adam 2020). Yara iyileşmesinde gerekli olan protein sentezi mRNA varlığına ihtiyaç duyar (Buccitelli ve Selbach 2020). Bir proteinin sentezi için gerekli olan gen ekspresyon değerleri ile ilgili protein düzeyinin aynı paralellikte yüksek veya düşük seviyede olmaması normal kabul edilmektedir

(Pradet-Balade ve diğ erleri, 2001; Maier ve diğ erleri, 2009; Vogel ve Marcotte, 2012; Fassbinder-Orth, 2014; Jackson, 2015). İlgili proteinlerin gen ekspresyon değ eri ile birlikte protein konsantrasyonlarının da     lmesinin daha sağlıklı sonuçlar sunduğu bildirilmiştir (Jackson, 2015). Bu nedenle sunulan çalışmada hem MMP-2 ve MMP-9 protein düzeyleri, hem de gen ekspresyon kat değişim değ erleri incelenmiştir. Çalışmada MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyon kat değişim değ erleri ile protein düzeyleri arasında bazı günlerde istatistiksel anlamlı ilişkiler (MMP-2 için 5. günde $r=0,828$, $p=0,001$; 7. günde $r=0,679$, $p=0,015$; 14. günde $r=0,719$, $p=0,008$ ve MMP-9 için 3. günde $r=0,835$, $p=0,001$; 5. günde $r=0,681$, $p=0,015$; 14. günde $r=0,816$, $p=0,001$) gözlenmiştir. Bu bulgu yara iyileşmesinin farklı aşamalarında farklı gen ekspresyon ve/veya protein sentezi mekanizmaların etkili olabileceği kanaatini uyandırmıştır. Bu mekanizmaların açıklanması sunulan çalışmanın metodolojisi ve elde edilen sonuçlarla mümkün değildir. Ancak bu değ erler gelecek çalışmalar için alt yapı oluşturabilir ve ileri çalışmalarda daha ayrıntılı bir şekilde incelenerek ele alınabilir.

Matriks metalloproteinazlar içerisinde bulunan MMP-2 ve MMP-9 yara iyileşmesinde hücrelerin büyümesi, inflamasyon, proliferasyon ve anjiyogenez gibi olaylarda rol alırlar ve bunların aktivitesi ilgili gen ekspresyonları ile düzenlenmektedir (Elkington ve diğ erleri, 2005; Martins ve diğ erleri, 2013). MMP düzeylerindeki artışın yara iyileşmesinin remodelleme aşamasında iyileşmeye katkı sağladığı bilgisinin yanında (Xue ve Jackson, 2015), bu artışın süreci olumsuz etkilediği ve kronik yaralarda MMP gen ekspresyonunu artırdığı da belirtilmektedir (Fray ve diğ erleri, 2003; Smigiel ve Parks, 2018). Literatürde MMP-2 ve MMP-9'un yara iyileşme sürecindeki rolleri hakkında çelişkili sonuçlar olduğu, bu nedenle halen detaylı araştırmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır (Kandhwal ve diğ erleri, 2022). Çalışmada farelerde açılan yaraları takip eden süreçte (3., 5., 7. ve 14. günler) AYSEF grubunun MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyon kat değişim değ erleri diğer gruplara kıyasla [farklı p değ erleri ile (Tablo 13)] istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur. Bu durum uygulanan ekstraktın MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun düzenlenmesinde etkili olduğunu desteklemektedir. Yapılan literatür taramasında topikal uygulanan Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının yara iyileşmesinde gen ekspresyon miktarlarını inceleyen bir çalışmaya rastlanmamış, ancak MMP-2 gen ekspresyonunun yara oluşumunu takiben arttığı ve yara iyileşmesinin 7. gününde pik yaptığını bildiren bir literatüre rastlanmıştır (Jansen ve diğ erleri, 2007). Sunulan  alışmada MMP-2 gen ekspresyonuna ait bu pik değ erin NEGKON ve FTS gruplarında 5. günde gerçekleştiği görülürken AYSEF grubunda böyle bir durum gözlenmemiştir (Tablo 13). Yara iyileşmesinde MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyon miktarları

hakkında daha sağlıklı yorumların yapılabilmesi için Kandhwal ve diğerleri (2022)'nin belirttiği gibi daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanatine varılmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmada %5'lik konsantrasyonda topikal olarak uygulanan Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının yara iyileşmesine katkısı araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının içerik analizi GC-MS ile detaylı bir şekilde sunulmuştur. Topikal Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının yara kapanmasını hızlandığı, yara bölgesinde kollajen miktarını arttırdığı, oksidatif stresi azalttığı, büyüme faktörlerini arttırdığı ve yara iyileşme sürecinde inflamasyon belirteçlerini baskılayarak anti-inflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir. Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonunu baskılayarak inflamasyonu genomik düzeyde de kontrol altına aldığı bulunmuştur. Öte yandan, çalışmada elde edilen bulgular MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonunun yara iyileşmesinin farklı aşamalarında farklı mekanizmaların etkili olabileceği izlenimini uyandırmaktadır. Bu nedenle, gelecekte yapılacak çalışmaların bu konuyu daha detaylı olarak incelemesi gerekmektedir.

Yara tedavisinde topikal bir uygulama yapılmasının veya hiçbir uygulama yapılmamasının her bir yara iyileşme aşaması için özel uygulanan bir tedaviye ihtiyaç olabileceği izlenimini uyandırmıştır. Yara iyileşme aşamalarına göre uygun etken madde seçiminin veya hiçbir uygulama yapılmamasının yara iyileşmesi için faydalı olabileceği düşünülmüş ve bu konuda detaylı metodolojik incelemeler içeren çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmüştür.

Gelecek çalışmalarda, sunulan çalışmanın gereç ve yöntem kısımlarında yer alan bilgilerin haricinde, farklı ekstrakt tiplerinin, doz ve konsantrasyonların, uygulama sıklıklarının, bitkinin farklı uygulama yollarının ve uygulama süresinin, ayrıca farklı yara modellerinde etkinliğinin değerlendirilmesinin literatür bilgiye katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, sunulan tez çalışmasında Aynısefa bitkisi çiçeği ekstraktının yara iyileşme sürecine olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Bitkisel tedavilerin yara iyileşme aşamalarındaki potansiyellerinin araştırılması amacıyla ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abou Auda, M. (2011). An ethnobotanical use of plants in the Middle Area, Gaza Strip, Palestine. *Advances in Environmental Biology*, 5(11), 3681-3688.
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42, 48-53.
- Agatonovic-Kustrin, S., Ortakand, D.B., Morton, D.W., Yusof, A.P. (2015). Rapid evaluation and comparison of natural products and antioxidant activity in calendula, feverfew, and German chamomile extracts. *Journal of Chromatography A*, 1385, 103-110.
- Aikawa, E. (2011). Immunohistochemistry. In P. Ducheyne (Ed.), *Comprehensive Biomaterials*, (pp. 277-290). Elsevier.
- Aitcheson, S.M., Frentiu, F.D., Hurn, S.E., Edwards, K., Murray, R.Z. (2021). Skin Wound Healing: Normal Macrophage Function and Macrophage Dysfunction in Diabetic Wounds. *Molecules*, 26(16), 4917. doi: 10.3390/molecules26164917.
- Aksoy, H., Çevik, Ö., Şen, A., Göğçer, F., Şekerler, T., Şener, A. (2019). Effect of Horse-chestnut seed extract on matrix metalloproteinase-1 and-9 during diabetic wound healing. *Journal of Food Biochemistry*, 43(3), e12758.
- Almeida, V.M., Dias, Ê.R., Souza, B.C., Cruz, J.N., Santos, C.B., Leite, F.H., ... Branco, A. (2022). Methoxylated flavonols from *Vellozia dasypus* Seub ethyl acetate active myeloperoxidase extract: in vitro and in silico assays. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(16), 7574-7583.
- Amadeu, T.P., Coulomb, B., Desmouliere, A., Costa, A.M.A. (2003). Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2(2), 60-68.
- Ambika, A.P. ve Nair, S.N. (2019). Wound healing activity of plants from the convolvulaceae family. *Advances in Wound Care*, 8(1), 28-37.
- Amirthalingam, E., Rodrigues, M., Casal-Dujat, L., Calpena, A.C., Amabilino, D.B., Ramos-López, D., Pérez-García, L. (2015). Macrocyclic imidazolium-based amphiphiles for the synthesis of gold nanoparticles and delivery of anionic drugs. *Journal of Colloid and Interface Science*, 437, 132-139.

- Andrade, T.A.M., Aguiar, A.F., Guedes, F.A., Leite, M.N., Caetano, G.F., Coelho, E.B., ... Frade, M.A. (2015). Ex vivo model of human skin (hOSEC) as alternative to animal use for cosmetic tests. *Procedia Engineering*, 110, 67-73.
- Andrade, T.A.M., Iyer, A., Das, P.K., Foss, N.T., Garcia, S.B., Coutinho-Netto, J., Frade, M.A.C. (2011). The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44, 1036-1047.
- Arab, A., Orakçı, V., Erbilin, M., Şahin, M. (1994) Yara iyileşmesi. *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 1(2), 160-166.
- Armstrong, L.C. ve Bornstein, P. (2003). Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biology*, 22(1), 63-71.
- Arnold, M. ve Barbul, A. (2006). Nutrition and wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7S), 42S-58S.
- Arora, D., Rani, A., Sharma, A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 179.
- Ashwlayan, V.D., Kumar A., Verma, M., Garg, V.K., Gupta, S.K. (2018). Therapeutic potential of *Calendula officinalis*. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 6(2), 149-155.
- Attah, M.O., Ishaya, H.B., Chiroma, M.S., Amaza, D.S., Balogun, S.U., Jacks, T.W. (2015). Effect of *Tamarindus indica* (Linn) on the Rate of Wound Healing in Adult Rabbits. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 14(8), 80-84.
- Ayran, İ. ve Kan, Y. (2023). Konya Ekolojik Şartlarında Kültürü Yapılan Aynısefa (*Calendula officinalis* L.) Bitkisinin Farklı Ekim Zamanlarının Kalite Özellikleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 12(1), 99-104.
- Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*, 22(8), 407–412. doi: 10.12968/jowc.2013.22.8.407.
- Balsa, I.M. ve Culp, W.T. (2015). Wound Care. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 45(5), 1049–1065.
- Baltzis, D., Eleftheriadou, I., Veves, A. (2014). Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Advances In Therapy*, 31, 817-836.
- Barry, S. (2010). Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit bone healing: a

- review. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 23(06), 385-392.
- Basch, E., Bent, S., Foppa, I., Haskmi, S., Kroll, D., Mele, M., ... Yong, S. (2006). Marigold (*Calendula officinalis* L.) an evidence-based systematic review by the natural standard research collaboration. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 6(3-4), 135-159.
- Baytop, T. (1999). *Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün*. Nobel Tıp Kitabevleri.
- Behm, B., Babilas, P., Landthaler, M., Schreml, S. (2012). Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26(7), 812-820.
- Bell, E., Ehrlich, H.P., Buttle, D.J., Nakatsuji, T. (1981). Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, 211(4486), 1052-1054.
- Beyene, R.T., Derryberry, S.L., Barbul, A. (2020). The Effect of Comorbidities on Wound Healing. *The Surgical Clinics of North America*, 100(4), 695–705.
- Boukovalas, S., Aliano, K.A., Leong, M., Murphy, K.D., Phillips, L.G., Norbury, W.B. (2022). Wound healing. In C.M. Jr. Townsend, RD Beauchamp, Evers BM, Mattox KL, (Eds.), *The Biological Basis of Modern Surgical Practice* (21st ed., pp. 119-150). Elsevier.
- Brown, D.C. (2012). Wound Infections and Antimicrobial Use. In K.M. Tobias, S.A. Johnston (Eds.), *Veterinary Surgery: Small Animal* (vol. 1, pp. 135-139). Saunders.
- Buccitelli, C. ve Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 21, 630–644. doi: 10.1038/s41576-020-0258-4.
- Budovsky, A., Yarmolinsky, L., Ben-Shabat, S. (2015). Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 23(2), 171-183.
- Busti, A.J., Hooper, J.S., Amaya, C.J., Kazi, S. (2005). Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 25(11), 1566-1591.
- Buzzi, M. ve de Freitas, F. (2016). Therapeutic effectiveness of a *Calendula officinalis* extract in venous leg ulcer healing. *Journal of Wound Care*, 25, 732–9.
- Cabello-Verrugio, C., Simon, F., Trollet, C., Santibañez, J.F. (2016). Oxidative stress in disease and aging: mechanisms and therapies 2016. *Oxidative Medicine and Cellular*

Longevity, 2017, 4310469. doi: 10.1155/2017/4310469.

- Caetano, G.F., Bártolo, P.J., Domingos, M., Oliveira, C.C., Leite, M.N., Frade, M.A.C. (2015). Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone (PCL) scaffold. *Procedia Engineering*, 110, 59-66.
- Caldwell, M.D. (2020). Bacteria and antibiotics in wound healing. *Surgical Clinics*, 100(4), 757-776.
- Caley, M.P., Martins, V.L., O'Toole, E.A. (2015). Metalloproteinases and wound healing. *Advances in Wound Care*, 4(4), 225-234.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), 389-395.
- Casey, G. (2003). Nutritional support wound healing. (tissue viability supplement). *Nursing Standard*, 17(23), 55-58.
- Cetkovic, G., Djilas S., Canadanovic-Brunet, J., Tumbas, V. (2003). Thin-Layer Chromatography Analysis and Scavenging Activity of Marigold (*Calendula officinalis* L.) Extracts. *Acta Periodica Technologica*, 34, 93–102.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 253, 269-285.
- Chamansara, R., Rashidfarokhi, R., Sakalli, E.A., Öztinen, N., Kosar, M. (2022). Comparison of Commercial *Calendula officinalis* L. Samples with Pharmacopeial Drug: Antiradical Activities and Chemical Profiles. *Journal of Research in Pharmacy*, 26, 809–819. doi: 10.29228/jrp.178.
- Chandran, P.K., Kuttan, R. (2008). Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 43, 58–64. doi: 10.3164/jcbrn.2008043.
- Charbonneau, R., Niel, L., Olfert, E., Von Keyserlingk, M., Griffin, G. (2010). CCAC guidelines on Euthanasia of animals used in science. Canadian Council on Animal Care. <https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Euthanasia.pdf>.
- Chen, L., Cheng, L., Gao, W., Chen, D., Wang, C., Ran, X. (2020). Telemedicine in chronic wound management: systematic review and meta-analysis. *JMIR mHealth and uHealth*, 8(6), e15574.

- Choi, J., Park, Y.G., Yun, M.S., Seol, J.W. (2018). Effect of herbal mixture composed of *Alchemilla vulgaris* and *Mimosa* on wound healing process. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 326-332.
- Combadiere, B. ve Liard, C. (2011). Transcutaneous and intradermal vaccination. *Human Vaccines*, 7(8), 811-827.
- Cowin, A.J., Hatzirodos, N., Holding, C.A., Dunaiski, V., Harries, R.H., Rayner, T.E., ... Belford, D.A. (2001). Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *The Journal of Investigative Dermatology*, 117(5), 1282–1289. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01501.x.
- Criollo-Mendoza, M.S., Contreras-Angulo, L.A., Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E.P., Jiménez-Ortega, L.A., Heredia, J.B. (2023). Wound Healing Properties of Natural Products: Mechanisms of Action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(2), 598.
- Cross, K.J. ve Mustoe, T.A. (2003). Growth factors in wound healing. *Surgical Clinics*, 83(3), 531-545.
- Crovetti, G., Martinelli, G., Issi, M., Barone, M., Guizzardi, M., Campanati, B., ... Carabelli, A. (2004). Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfusion and Apheresis Science*, 30(2), 145-151.
- Cutting, K.F. ve White, R.J. (2005). Criteria for identifying wound infection—revisited. *Ostomy Wound Manage*, 51(1), 28-34.
- Davidson, J.R. (2015). Current concepts in wound management and wound healing products. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 45(3), 537-564.
- de Avila Santana, L., Alves, J.M., Andrade, T.A.M., Kajiwarra, J.K., Garcia, S.B., Gomes, F.G., Frade, M.A.C. (2013). Clinical and immunohistopathological aspects of venous ulcers treatment by Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS). *Ultrasonics*, 53(4), 870-879.
- Demidova-Rice, T.N., Hamblin, M.R., Herman, I.M. (2012). Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Advances in Skin & Wound Care*, 25(7), 304.
- Deniz, L., Serteser, A., Kargioğlu, M. (2010). Uşak Üniversitesi ve yakın çevresindeki bazı bitkilerin mahalli adları ve etnobotanik özellikleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10(1), 57-72.

- Diagn., J. ve Gupta, A. (2016). Wound healing: Assessment by various markers. *Journal of Molecular Biomarkers*, 8(2), 8-10.
- Dinda, M., Mazumdar, S., Das, S., Ganguly, D., Dasgupta, U.B., Dutta, A., ... Karmakar, P. (2016). The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates in vitro and in vivo proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. *Phytotherapy Research*, 30, 1696–707. doi: 10.1002/ptr.5678.
- DiPersio, C.M., Zheng, R., Kenney, J., Van De Water, L. (2016). Integrin-mediated regulation of epidermal wound functions. *Cell and Tissue Research*, 365, 467-482.
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., ... Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*, 23(3), 394-411.
- Efstratiou, E., Hussain, A.I., Nigam, P.S., Moore, J.E., Ayub, M.A., Rao, J.R. (2012). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 18(3), 173-176.
- Eisenberg, D.M., Davis, R.B., Ettner, S.L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M., Kessler, R.C. (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *Jama*, 280(18), 1569-1575.
- Elkington, P.T.G., O’Kane, C.M., Friedland J.S. (2005). The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 142, 12 – 20. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02840.x.
- Eming, S.A., Martin, P., Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr266. doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
- Enoch, S., ve Leaper, D.J. (2008). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 26(2), 31-37.
- Esnault, S., Benbernou, N., Lavaud, F., Shin, H.C., Potron, G., Guenounou, M. (1996). Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma Ž . Ž. IFN-gamma in peripheral blood mononuclear cells PBMC from atopic patients. *Clinical & Experimental Immunology*, 103, 111.
- European Medicines Agency. (2018). *Assessment report on Calendula officinalis L., flos*

(Reference Number: EMA/HMPC/437450/2017). European Medicine Agency Science Medicines Health https://www.europa.eu/en/documents/herbal-references/final-list-references-supporting-assessment-calendula-officinalis-l-flos-revision-1_en.pdf.

- Fallahi, M., Mohammadi, A., Miri, S.M. (2020). The natural variation in six populations of *Calendula officinalis* L.: A karyotype study. *Journal of Genetic Resources*, 6(1), 34-40.
- Fang, Y., Gong, S.J., Xu, Y.H., Hambly, B.D., Bao, S. (2007). Impaired cutaneous wound healing in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor knockout mice. *British Journal of Dermatology*, 157(3), 458-465. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07979.x.
- Fassbinder-Orth, C.A. (2014). Methods for quantifying gene expression in ecoimmunology: From qPCR to RNA-Seq. *Integrative and Comparative Biology*, 54, 396–406. doi: 10.1093/icb/icu023.
- Fernandez, R., Green, H.L., Griffiths, R., Atkinson, R.A., Ellwood, L.J. (2022). Water for wound cleansing. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 9(9), CD003861.
- Flecknell, P. (2009). *Laboratory Animal Anesthesia* (3rd ed.). Academic Press.
- Fonder, M.A., Lazarus, G.S., Cowan, D.A., Aronson-Cook, B., Kohli, A.R., Mamelak, A.J. (2008). Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(2), 185-206.
- Fonseca, Y.M., Catini, C.D., Vicentini, F.T., Nomizo, A., Gerlach, R.F., Fonseca, M.J. (2010). Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 596–601.
- Fray, M.J., Dickinson, R.P., Huggins, J.P., Occleston, N.L. (2003). A potent, selective inhibitor of matrix metalloproteinase-3 for the topical treatment of chronic dermal ulcers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(16), 3514–3525. <https://doi.org/10.1021/jm0308038>.
- Friedhoff, P., Hahn, M., Wolfes, H., Pingoud, A. (1993). Quantitative polymerase chain reaction with oligodeoxynucleotide ligation assayenzyme-linked immunosorbent assay detection. *Analytical Biochemistry*, 215, 9.
- Fronza, M., Caetano, G.F., Leite, M.N., Bitencourt, C.S., Paula-Silva, F.W., Andrade, T.A., ... Faccioli, L.H. (2014). Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *PLoS One*, 9(11), e112297.

- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., Merfort, I. (2009). Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 463-467.
- Gallagher, H.M., Butler, J.R., Wills, R.W., Priddy, L.B., Elder, S.H., Heller, S.M., ... Baumgartner, W. (2019). Effects of short-and long-term administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osteotomy healing in dogs. *Veterinary Surgery*, 48(7), 1318-1329.
- Gann, A. (2010). Jacob and Monod: from operons to EvoDevo. *Current biology: CB*, 20(17), R718–R723. doi: 10.1016/j.cub.2010.06.027.
- Garcia Stickney, D.N. ve Thieman Mankin, K.M. (2018). The impact of postdischarge surveillance on surgical site infection diagnosis. *Veterinary Surgery*, 47(1), 66–73.
- Ghosh, P.K. ve Gaba, A. (2013). Phyto-extracts in wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 760-820.
- Givol, O., Kornhaber, R., Visentin, D., Cleary, M., Haik, J., Harats, M. (2019). A systematic review of Calendula officinalis extract for wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 27(5), 548-561.
- Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(12), 931-947. doi: 10.1038/nrd4002.
- Grada, A., Mervis, J., Falanga, V. (2018). Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 138(10), 2095–2105. doi: 10.1016/j.jid.2018.08.005.
- Grand View Research. (2021). *Advanced Wound Care Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Moist, Antimicrobial, Active), By Application, By End-use (Hospitals, Specialty Clinics, Home Healthcare), By Region, And Segment Forecasts, 2021 – 2028* (Report ID: GVR-4-68038-186-3). Grand View Research. <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-advanced-wound-care-market>.
- Greaves, N.S., Benatar, B., Whiteside, S., Alonso-Rasgado, T., Baguneid, M., Bayat, A. (2014). Optical coherence tomography: a reliable alternative to invasive histological assessment of acute wound healing in human skin?. *British Journal of Dermatology*, 170(4), 840-850.

- Grey, J.E., Enoch, S., Harding, K.G. (2006). Wound assessment. *British Medical Journal*, 332(7536), 285-288.
- Gu, J., Aidy, A., Goorani, S. (2022). Anti-human lung adenocarcinoma, cytotoxicity, and antioxidant potentials of copper nanoparticles green-synthesized by *Calendula officinalis*. *Journal of Experimental Nanoscience*, 17(1), 285-296.
- Gunasekaran, S., Arul, A., Nayagam, J., Natarajan, R. (2020). Wound Healing Potentials of Herbal Ointment Containing *Calendula officinalis* Linn. On the Alteration of Immunological Markers and Biochemical Parameters in Excision Wounded Animals. *Clinical Phytoscience*, 6, 77. doi: 10.1186/s40816-020-00215-7.
- Guo, S.A. ve DiPietro, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321.
- Guttman-Yassky, E., Zhou, L., Krueger, J.G. (2019). The skin as an immune organ: Tolerance versus effector responses and applications to food allergy and hypersensitivity reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 144(2), 362-374.
- Hameister, R., Kaur, C., Dheen, S.T., Lohmann, C.H., Singh, G. (2020). Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108(5), 2073-2087. doi: 10.1002/jbm.b.34546.
- Han, G. ve Ceilley, R. (2017). Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in Therapy*, 34, 599-610.
- Harding, K.G., Morris, H.L., Patel, G. (2002). Healing chronic wounds. *British Medical Journal*, 324(7330), 160-163.
- Harris, C.L. ve Fraser, C. (2004). Institutionalized elderly: the effects on wound healing. *Ostomy/Wound Management*, 50(10), 54-63.
- Hawk, C.T., Leary, S.L., Morris, T.H. (2005). *Formulary for Laboratory Animals* (3rd ed.). Blackwell Publishing.
- Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., Tew, K.D. (2020). Oxidative stress in cancer. *Cancer Cell*, 38(2), 167-197. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.

- Hettlich, B.F., Markwell H.J., Niehaus A.J., Williams, J.M. (2018). Wound Management and Bandaging. In J.M. Bassert, A.D. Beal, O.M. Samples (Eds.), *McCurnin's Clinical Textbook for Veterinary Technicians* (9th ed., pp. 916-952). Elsevier.
- Hosgood, G. (2006). Stages of wound healing and their clinical relevance. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 36(4), 667-685.
- Hosgood, G. (2012). Open Wounds. In K.M. Tobias, S.A. Johnston (Eds.), *Veterinary Surgery: Small Animal* (1 vol., pp. 1210-1120). Saunders.
- Hosseini, Z., Lorigooini, Z., Rafieian-Kopaei, M., Shirmardi, H.A., Solati, K. (2017). A review of botany and pharmacological effect and chemical composition of Echinophora species growing in Iran. *Pharmacognosy Research*, 9(4), 305.
- Hsu, C. ve Chang, J. (2004). Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *The Journal of Hand Surgery*, 29(4), 551-563. doi: 10.1016/j.jhsa.2004.04.020.
- Ishihara, J., Ishihara, A., Starke, R.D., Peghaire, C.R., Smith, K.E., McKinnon, T.A.J., ... Hubbell, J.A. (2019). The heparin binding domain of von Willebrand factor binds to growth factors and promotes angiogenesis in wound healing. *Blood*, 133(24), 2559-2569. doi: 10.1182/blood.2019000510.
- Jablonska-Trypuc, A., Matejczyk, M., Rosochacki, S. (2016). Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup1), 177-183.
- Jackson, J.A. (2015). Immunology in wild nonmodel rodents: An ecological context for studies of health and disease. *Parasite Immunology*, 37, 220–232. doi: 10.1111/pim.12180.
- Jadoon, S., Karim, S., Asad, M.H.H.B., Akram, M.R., Kalsoom Khan, A., Malik, A., ... Murtaza, G. (2015). Anti-aging potential of phytoextract loaded-pharmaceutical creams for human skin cell longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2015.
- Jaferian, S., Soleymaninejad, M., Negahdari, B., Eatemadi, A. (2017). Stem cell, biomaterials and growth factors therapy for hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 1046-1053. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.154.
- Jan, N., Andrabi, K.I., John, R. (2017). Calendula officinalis-an important medicinal plant with potential biological properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences*, 83(4), 769-787.

- Jansen, P.L., Rosch, R., Jansen, M., Binnebösel, M., Junge, K., Alfonso-Jaume, A., ... Mertens, P.R. (2007). Regulation of MMP-2 gene transcription in dermal wounds. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(7), 1762–1767. doi: 10.1038/sj.jid.5700765.
- Jia, Y., Zhao, G., Jia, J. (2008). Preliminary evaluation: the effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 181-189.
- Johnson, P.D. ve Besselsen, D.G. (2002). Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR Journal*, 43, 202–206. doi: 10.1093/ilar.43.4.202.
- Johnstone, C.C., Farley, A., Hendry, C. (2005). The physiological basics of wound healing. *Nursing Standard*, 19(43), 59-67.
- Jokinen, J.J. ve Sipponen, A. (2016). Refined spruce resin to treat chronic wounds: rebirth of an old folkloristic therapy. *Advances in Wound Care*, 5(5), 198-207.
- Kalava, U.R., Cha, S.S., Takahashi, P.Y. (2011). Association between vitamin D and pressure ulcers in older ambulatory adults: results of a matched case–control study. *Clinical Interventions in Aging*, 6, 213-219.
- Kandhwal, M., Behl, T., Singh, S., Sharma, N., Arora, S., Bhatia, S., ... Bungau, S. (2022). Role of matrix metalloproteinase in wound healing. *American Journal of Translational Research*, 14(7), 4391–4405.
- Kapil, A. ve Sharma, S. (1995). Effect of oleanolic acid on complement in adjuvant-and carrageenan-induced inflammation in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 47(7), 585-587.
- Kaupilla, T.E., Kaupilla, J.H., Larsson, N.G. (2017). Mammalian mitochondria and aging: an update. *Cell metabolism*, 25(1), 57-71. doi: 10.1016/j.cmet.2016.09.017.
- Keast, D.H., Bowering, C.K., Evans, A.W., Mackean, G.L., Burrows, C., D'Souza, L. (2004). Contents: MEASURE: A proposed assessment framework for developing best practice recommendations for wound assessment. *Wound Repair and Regeneration*, 12(3), S1-17.
- Khairnar, M.S., Pawar, B., Marawar, P.P., Mani, A. (2013). Evaluation of *Calendula officinalis* as an anti-plaque and anti-gingivitis agent. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(6), 741.
- Khalid, K.A., Nawi, A.F.M., Zulkifli, N., Barkat, M.A., Hadi, H. (2022). Aging and wound

healing of the skin: A review of clinical and pathophysiological hallmarks. *Life*, 12(12), 2142.

- Kokane, D.D., More, R.Y., Kale, M.B., Nehete, M.N., Mehendale, P.C., Gadgoli, C.H. (2009). Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 311-315. doi: 10.1016/j.jep.2009.04.038.
- Kolarsick, P.A., Kolarsick, M.A., Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213.
- Komi, D.E.A., Khomtchouk, K., Santa Maria, P.L. (2020). A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 58(3), 298–312. doi: 10.1007/s12016-019-08729-w.
- Koschwanetz, H.E. ve Broadbent, E. (2011). The use of wound healing assessment methods in psychological studies: a review and recommendations. *British Journal of Health Psychology*, 16(1), 1-32.
- Krzyszczuk, P., Schloss, R., Palmer, A., Berthiaume, F. (2018). The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in Physiology*, 9, 419. doi: 10.3389/fphys.2018.00419.
- Kufareva, I., Salanga, C.L., Handel, T.M. (2015). Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunology and Cell Biology*, 93(4), 372-383.
- Kunkemoeller, B. ve Kyriakides, T.R. (2017). Redox signaling in diabetic wound healing regulates extracellular matrix deposition. *Antioxidants & Redox Signaling*, 27(12), 823-838. doi: 10.1089/ars.2017.7263.
- Laing, E.J. (1990). Problems in wound healing associated with chemotherapy and radiation therapy. *Problems in Veterinary Medicine*, 2(3), 433-441.
- Lait, M.E. ve Smith, L.N. (1998). Wound management: a literature review. *Journal of Clinical Nursing*, 7, 11– 17. doi: 10.1046/j.1365-2702.1998.00133.x.
- Langemo, D., Anderson, J., Hanson, D., Hunter, S., Thompson, P. (2008). Measuring wound length, width, and area: which technique?. *Advances in Skin & Wound Care*, 21(1), 42-45.
- Lania, B.G., Morari, J., Almeida, A.R.D., Silva, M.N.D., Vieira-Damiani, G., Lins, K.D.A., ...

- Velho, P.E.N.F. (2019). Topical essential fatty acid oil on wounds: Local and systemic effects. *Plos One*, 14(1), e0210059.
- Lansdown, A.B., Mirastschijski, U., Stubbs, N., Scanlon, E., Ågren, M.S. (2007). Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration*, 15(1), 2-16.
- Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Margolis, D.J., Percoraro, R.E., Rodeheaver, G., Robson, M.C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2(3), 165-170.
- Lee, S.H., Lee, J.H., Cho, K.H. (2011). Effects of human adipose-derived stem cells on cutaneous wound healing in nude mice. *Annals of Dermatology*, 23(2), 150. doi: 10.5021/ad.2011.23.2.150.
- Leite, S.N., Leite, M.N., Caetano, G.F., Ovidio, P.P., Júnior, A.A.J., Frade, M.A.C. (2015). Phototherapy improves wound healing in rats subjected to high-fat diet. *Lasers in Medical Science*, 30, 1481-1488.
- Li, J., Chen, J., Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 9-18.
- Li, Q., Wang, D., Jiang, Z., Li, R., Xue, T., Lin, C., ... Sun, B. (2022). Advances of hydrogel combined with stem cells in promoting chronic wound healing. *Frontiers in Chemistry*, 10, 1038839.
- Liekens, S., De Clercq, E., Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical pharmacology*, 61(3), 253-270.
- Ligi, D., Mosti, G., Croce, L., Raffetto, J.D., Mannello, F. (2016). Chronic venous disease–Part II: Proteolytic biomarkers in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862(10), 1900-1908.
- Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lohi, J., Sipponen, A., Jokinen, J.J. (2010). Local dressings for pressure ulcers: what is the best tool to apply in primary and second care?. *Journal of Wound Care*, 19(3), 123-127.
- Lux, C.N. (2022). Wound healing in animals: a review of physiology and clinical evaluation. *Veterinary Dermatology*, 33(1), 91–e27.

- Maier, T., Güell, M., Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*, 583, 3966–3973. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036.
- Majumdar, A. ve Sangole, P. (2016). Alternative approaches to wound healing. In V. Alexandrescu (Ed.), *Wound Healing: New insights into Ancient Challenges* (pp. 459), IntechOpen.
- Maroz, N. ve Simman, R. (2013). Wound healing in patients with impaired kidney function. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*, 5(1), 2-7.
- Marrocco, I., Altieri, F., Peluso, I. (2017). Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 32. doi: 10.1155/2017/6501046.6501046.
- Martin, P. ve Leibovich, S.J. (2005). Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 15(11), 599-607.
- Martin, P. ve Nunan, R. (2015). Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, 173(2), 370-378.
- Martins, V.L., Caley, M., O'Toole, E.A. (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and Tissue Research*, 351(2), 255–268. doi: 10.1007/s00441-012-1410-z.
- Masson-Meyers, D.S., Andrade, T.A.M., Caetano, G.F., Guimaraes, F.R., Leite, M.N., Leite, S.N., Frade, M.A.C. (2020). Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International Journal of Experimental Pathology*, 101(1-2), 21–37.
- Masson-Meyers, D.S., Bumah, V.V., Enwemeka, C.S. (2016). Blue light does not impair wound healing in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 160, 53-60.
- Matejuk, A. (2018). Skin immunity. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66(1), 45-54.
- Mauldin, E.A. ve Peters-Kennedy, J. (2016). Integumentary system. In G. Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals* (6th ed., vol. 1, pp. 509). Elsevier.
- Maver, T., Maver, U., Stana Kleinschek, K., Smrke, D.M., Kreft, S. (2015). A review of herbal medicines in wound healing. *International Journal of Dermatology*, 54(7), 740-751.
- Mazzotta, M.Y. (1994). Nutrition and wound healing. *Journal of the American Podiatric*

Medical Association, 84(9), 456-462.

McCarty, S.M. ve Percival, S.L. (2013). Proteases and delayed wound healing. *Advances in Wound Care*, 2(8), 438-447.

McLafferty, E., Hendry, C., Farley, A. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard (through 2013)*, 27(3), 35.

Medellin-Luna, M.F., Castaneda-Delgado, J.E., Martínez-Balderas, V.Y., Cervantes-Villagrana, A.R. (2019). Medicinal plant extracts and their use as wound closure inducing agents. *Journal of Medicinal Food*, 22(5), 435-443.

Mickelson, M.A., Mans, C., Colopy, S.A. (2016). Principles of wound management and wound healing in exotic pets. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 19(1), 33-53.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673-751.

Mishra, A.K., Mishra, A., Pragya, Chattopadhyay, P. (2018). Screening of acute and sub-chronic dermal toxicity of *Calendula officinalis* L essential oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 98, 184–189.

Moon, J.K. ve Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655-1666.

Moreira, C.F., Cassini-Vieira, P., da Silva, M.F., da Silva Barcelos, L. (2015). Skin wound healing model-excisional wounding and assessment of lesion area. *Bio-protocol*, 5(22), e1661-e1661.

Mori, R., Kondo, T., Nishie, T., Ohshima, T., Asano, M. (2004). Impairment of skin wound healing in β -1, 4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. *The American Journal of Pathology*, 164(4), 1303-1314.

Morton, L.M., Phillips, T.J. (2016). Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(4), 589-605.

Muley, B.P., Khadabadi, S.S., Banarase, N.B. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(5).

- Munger, J.S. ve Sheppard, D. (2011). Cross talk among TGF- β signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a005017.
- Nauseef, W.M. (2014). Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cellular Microbiology*, 16(8), 1146-1155.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A.A., Khan, G.J., Shumzaid, M., ... XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 67–74. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.064.
- Nayak, B.S., Kanhai, J., Milne, D.M., Pereira, L.P., Swanston, W.H. (2011). Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* L. leaf for its wound healing activity using three wound models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 419612.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 679-691.
- Neukiron, H., D'Ambrosio, M., Dovia, J., Guerriero, A. (2004). Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochemical Analysis*, 15(1), 30-35.
- Nguyen, T.T., Cox, C.S., Traber, D.L., Gasser, H., Redl, H., Schlag, G., Herndon, D.N. (1993). Free radical activity and loss of plasma antioxidants, vitamin E, and sulfhydryl groups in patients with burns: the 1993 Moyer Award. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 14(6), 602-609.
- Nichols, E. (2015). Wound assessment part 1: how to measure a wound. *Wound Essentials*, 10(2), 51-5.
- Nicholson, M., Beal, M., Shofer, F., Brown, D.C. (2002). Epidemiologic evaluation of postoperative wound infection in clean-contaminated wounds: a retrospective study of 239 dogs and cats. *Veterinary Surgery*, 31(6), 577-581.
- Okuma, C.H., Andrade, T.A.M.D., Caetano, G.F., Finci, L.I., Maciel, N.R., Topan, J.F., ... Rocha-Filho, P.A.D. (2015). Development of lamellar gel phase emulsion containing marigold oil (*Calendula officinalis*) as a potential modern wound dressing. *European*

Journal of Pharmaceutical Sciences, 71, 62-72.

- Olczyk, P., Mencner, Ł., Komosinska-Vassev, K. (2014). The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *BioMed Research International*, 2014, 747584.
- Onyekwelu, I., Yakkanti, R., Protzer, L., Pinkston, C.M., Tucker, C., Seligson, D. (2017). Surgical wound classification and surgical site infections in the orthopaedic patient. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. Global Research & Reviews*, 1(3), e022.
- Papazoglou, E.S., Zubkov, L., Mao, X., Neidrauer, M., Rannou, N., Weingarten, M.S. (2010). Image analysis of chronic wounds for determining the surface area. *Wound Repair and Regeneration*, 18(4), 349-358.
- Parente, L.M., Lino Júnior, R.D.S., Faustino Tresvenzol, L.M., Vinaud, M.C., de Paula, J.R., Paulo, N.M. (2012). Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 375671.
- Park, J., Lee, J.H., Yoon, B.S., Jun, E.K., Lee, G., Kim, I.Y., You, S. (2018). Additive effect of bFGF and selenium on expansion and paracrine action of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 1-17. doi: 10.1186/s13287-018-1058-z.
- Park, J.W., Hwang, S.R., Yoon, I.S. (2017). Advanced growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration. *Molecules*, 22(8), 1259. doi: 10.3390/molecules22081259.
- Patel, S., Maheshwari, A., Chandra, A. (2016). Biomarkers for wound healing and their evaluation. *Journal of Wound Care*, 25(1), 46-55.
- Pazyar, N., Yaghoobi, R., Rafiee, E., Mehrabian, A., Feily, A. (2014). Skin wound healing and phytomedicine: a review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27(6), 303-310.
- Pedram Rad, Z., Mokhtari, J., Abbasi, M. (2019). Preparation and characterization of *Calendula officinalis*-loaded PCL/gum arabic nanocomposite scaffolds for wound healing applications. *Iranian Polymer Journal*, 28, 51-63.
- Percival, S.L., Thomas, J.G., Williams, D.W. (2010). Biofilms and bacterial imbalances in chronic wounds: anti-Koch. *International Wound Journal*, 7(3), 169-175.

- Pereira, R.F., Bartolo, P.J. (2016). Traditional therapies for skin wound healing. *Advances in Wound Care*, 5(5), 208-229.
- Pierce, G.F., Tarpley, J.E., Tseng, J., Bready, J., Chang, D., Kenney, W.C., ... Reid, P. (1995). Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(3), 1336-1350. doi: 10.1172/JCI118169.
- Pikuła, M., Langa, P., Kosikowska, P., Trzonkowski, P. (2015). Stem cells and growth factors in wound healing. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 69, 874-885. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118932.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. doi: 10.1155/2017/8416763.
- Planz, V., Franzen, L., Windbergs, M. (2015). Novel in vitro approaches for the simulation and analysis of human skin wounds. *Skin Pharmacology and Physiology*, 28(2), 91-96.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592–607. doi: 10.1016/j.tips.2017.04.005.
- Pradet-Balade, B., Boulmé, F., Beug, H., Müllner, E.W., Garcia-Sanz, J.A. (2001). Translation control: Bridging the gap between genomics and proteomics?. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 225–229. doi: 10.1016/S0968-0004(00)01776-X.
- Prasad, S. ve Tyagi, A.K. (2015). Traditional medicine: the goldmine for modern drugs. *Advanced Techniques in Biology & Medicine*, 3(1), 1-2.
- Preethi, K.C., Kuttan, G., Kuttan, R. (2008). Antioxidant Potential of an Extract of *Calendula officinalis*. Flowers in Vitro. And in Vivo. *Pharmaceutical Biology*, 44, 691–697. doi: 10.1080/13880200601009149.
- Preethi, K.C., Kuttan, G., Kuttan, R. (2009). Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(2), 113–120.
- Rasilainen, S., Nieminen, J.M., Levonen, A.L., Otonkoski, T., Lapatto, R. (2002). Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by

hydrogen peroxide. *Biochemical Pharmacology*, 63(7), 1297-1304.

- Resende, M.M., Rocha, C.A., Corrêa, N.F., Veiga, R.R., Passos, S.J., Novo, N.F., ... Damasceno, C.A. (2016). Tap water versus sterile saline solution in the colonisation of skin wounds. *International Wound Journal*, 13(4), 526-530.
- Richardson, R., Slanchev, K., Kraus, C., Knyphausen, P., Eming, S., Hammerschmidt, M. (2013). Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(6), 1655-1665.
- Ridiandries, A., Tan, J.T., Bursill, C.A. (2018). The role of chemokines in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3217.
- Robson, M.C. ve Barbul, A. (2006). Guidelines for the best care of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 14(6), 647-648.
- Robson, M.C., Steed, D.L., Franz, M.G. (2001) Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery*, 38, 72- 140
- Rodero, M.P. ve Khosrotehrani, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(7), 643.
- Rodero, M.P., Hodgson, S.S., Hollier, B., Combadiere, C., Khosrotehrani, K. (2013). Reduced Il17a expression distinguishes a Ly6cloMHCIIhi macrophage population promoting wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 783-792. doi: 10.1038/jid.2012.368.
- Roger, M., Fullard, N., Costello, L., Bradbury, S., Markiewicz, E., O'Reilly, S., ... Przyborski, S. (2019). Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of Anatomy*, 234(4), 438-455.
- Rohani, M.G. ve Parks, W.C. (2015). Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biology*, 44, 113-121.
- Romanelli, M., Miteva, M., Romanelli, P., Barbanera, S., Dini, V. (2013). Use of diagnostics in wound management. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 7(1), 106-110.
- Romanovsky, A.A. (2014). Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiologica*, 210(3), 498-507.
- Rousselle, P., Montmasson, M., Garnier, C. (2019). Extracellular matrix contribution to skin

wound re-epithelialization. *Matrix Biology*, 75, 12-26.

- Rugo, H.S., O'Hanley, P., Bishop, A.G., Pearce, M.K., Abrams, J.S., Howard, M., O'Garra, A. (1992). Local cytokine production in a murine model of Escherichia coli pyelonephritis. *The Journal of Clinical Investigation*, 89, 1032.
- Russell, L. (2001). The importance of patients' nutritional status in wound healing. *British Journal of Nursing*, 10(Sup1), S42-S49.
- Russo, R., Autore, G., Severino, L. (2009). Pharmaco-toxicological aspects of herbal drugs used in domestic animals. *Natural product communications*, 4(12), 1934578X0900401230.
- Salami, A.A., Imosemi, I.O., Owoeye, O.O., Salami, A.A., Imosemi, I.O., Owoeye, O.O. (2006). A comparison of the effect of chlorhexidine, tap water and normal saline on healing wounds. *International Journal of Morphology*, 24(4), 673-676.
- Samsar, E. ve Akın, F. (2003). *Genel Cerrahi*. Medipres Matbaacılık.
- Sanchez, M.C., Lancel, S., Boulanger, E., Nevriere, R. (2018). Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic Review. *Antioxidants*, 7(8), 98. doi: 10.3390/antiox7080098.
- Sattler, E., Poloczek, K., Kästle, R., Welzel, J. (2013). Confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography for the evaluation of the kinetics and quantification of wound healing after fractional laser therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(4), e165-e173.
- Savic Gajic, I.M., Savic, I.M., Skrba, M., Dosić, A., Vujadinovic, D. (2022). Food additive based on the encapsulated pot marigold (*Calendula officinalis* L.) flowers extract in calcium alginate microparticles. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(10), e15792.
- Schultz, G.S., Sibbald, R.G., Falanga, V., Ayello, E.A., Dowsett, C., Harding, K., ... Vanscheidt, W. (2003). Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair and Regeneration*, 11, S1-S28.
- Schwörer, S., Berisa, M., Violante, S., Qin, W., Zhu, J., Hendrickson, R.C., ... Thompson, C.B. (2020). Proline biosynthesis is a vent for TGF β -induced mitochondrial redox stress. *The EMBO Journal*, 39(8), e103334. doi: 10.15252/embj.2019103334.
- Sen, C.K. (2019). Human wounds and its burden: an updated compendium of

- estimates. *Advances in Wound Care*, 8(2), 39-48.
- Senoo, M. (2013). Epidermal stem cells in homeostasis and wound repair of the skin. *Advances in Wound Care*, 2(6), 273-282.
- Shafeie, N., Naini, A.T., Jahromi, H.K. (2015). Comparison of different concentrations of Calendula officinalis gel on cutaneous wound healing. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 8, 979–92. doi: 10.13005/bpj/850.
- Shahane, K., Kshirsagar, M., Tambe, S., Jain, D., Rout, S., Ferreira, M.K.M., ... Lima, R.R. (2023). An Updated Review on the Multifaceted Therapeutic Potential of Calendula officinalis L. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(4), 611.
- Shrimanker, M., Patel, N., Modi, H., Dave, R. (2013). A review: screening models for wound healing activity in animals. *American Journal of PharmTech Research*, 3, 2249-3387.
- Silva, D., Ferreira, M.S., Sousa-Lobo, J.M., Cruz, M.T., Almeida, I.F. (2021). Anti-inflammatory activity of calendula officinalis l. Flower extract. *Cosmetics*, 8(2), 1–7.
- Silva, E.J., Gonçalves, E.S., Aguiar, F., Evêncio, L.B., Lyra, M.M., Coelho, M.C.O., ... Wanderley, A.G. (2007). Toxicological studies on hydroalcohol extract of Calendula officinalis L. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(4), 332-336.
- Smigiel, K.S. ve Parks, W.C. (2018). Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights. *Current Rheumatology Reports*, 20(4), 17. doi: 10.1007/s11926-018-0725-5
- Sorg, H., Tilkorn, D.J., Hager, S., Hauser, J., Mirastschijski, U. (2017). Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *European Surgical Research*, 58(1-2), 81-94.
- Souci, L. ve Denesvre, C. (2021). 3D skin models in domestic animals. *Veterinary Research*, 52(1), 21.
- Sparber, A. ve Wootton, J.C. (2001). Surveys of complementary and alternative medicine: Part II. Use of alternative and complementary cancer therapies. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 7(3), 281-287.
- Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., Tobin, G.R. (1998). Impediments to wound healing. *The American Journal of Surgery*, 176(2), 39S-47S.

- Stupack, D.G. ve Cheresch, D.A. (2004). 9 Integrins and Angiogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 64, 208-238.
- Sullivan, J.V. ve Myers, S. (2022). Skin structure and function, wound healing and scarring. In R.D. Farhadieh, N.W. Bulstrode, B.J. Mehrara, S. Cugno (Eds.), *Plastic Surgery-Principles and Practice* (pp. 1-14). Elsevier.
- Swaim, S.F., Hanson, Jr, R.R., Coates, J.R. (1996). Pressure wounds in animals. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 18(3), 203.
- Swaim, S.F., Hinkle, S.H., Bradley, D.M. (2001). Wound contraction: basic and clinical factors. *Compendium*, 23, 20–33.
- Tan, N.S. ve Wahli, W. (2013). Studying wound repair in the mouse. *Current Protocols in Mouse Biology*, 3(3), 171-185.
- Taniguchi, A., Kohsaka, H., Carson, D.A. (1994). Competitive RT-PCR ELISA: a rapid, sensitive and non-radioactive method to quantitate cytokine mRNA. *The Journal of Immunological Methods*, 169, 101.
- Terra, V.A., Souza-Neto, F.P., Frade, M.A.C., Ramalho, L.N.Z., Andrade, T.A.M., Pasta, A.A.C., ... Cecchini, A.L. (2015). Genistein prevents ultraviolet B radiation-induced nitrosative skin injury and promotes cell proliferation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 144, 20-27.
- Thakur, R., Jain, N., Pathak, R., Sandhu, S.S. (2011). Practices in wound healing studies of plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 438056.
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V.K., Elizabeth, J., Rao, U.K., Ranganathan, K. (2012). Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 16(3), 400-405.
- Theoret, C.L. (2009). Tissue engineering in wound repair: the three “R” s—repair, replace, regenerate. *Veterinary Surgery*, 38(8), 905-913.
- Thulabandu, V., Chen, D., Atit, R.P. (2018). Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 7(2), e307.
- Titan, A.L., Foster, D.S., Chang, J., Longaker, M.T. (2019). Flexor tendon: development, healing, adhesion formation, and contributing growth factors. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 144(4), 639e-647e. doi: 10.1097/PRS.0000000000006048.

- Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. (2013). Miracle of herbs in antibiotic resistant wounds and skin infections: Treasure of nature-a review/perspective. *Pharma Science Monitor*, 4(4), 214-248.
- Todorovic, V. (2002). Food and wounds: nutritional factors in wound formation and healing. *British Journal of Community Nursing*, 7(Sup2), 43-54.
- Trengove, N.J., Stacey, M.C., Macauley, S., Bennett, N., Gibson, J., Burslem, ... Schultz, G. (1999). Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair and Regeneration*, 7(6), 442-452.
- Tsai, C.R., Wang, Y., Galko, M.J. (2018). Crawling wounded: molecular genetic insights into wound healing from *Drosophila* larvae. *The International Journal of Developmental Biology*, 62(6-7-8), 479–489.
- Tsai, M.T., Yang, C.H., Shen, S.C., Lee, Y.J., Chang, F.Y., Feng, C.S. (2013). Monitoring of wound healing process of human skin after fractional laser treatments with optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 4(11), 2362-2375.
- Tunca-Pinarli, Y., Benek, A., Turu, D., Bozyel, M.E., Canli, K., Altuner, E.M. (2023). Biological Activities and Biochemical Composition of Endemic *Achillea fraasii*. *Microorganisms*, 11(4), 978.
- Turk, R., Singh, A., Weese, J.S. (2015). Prospective surgical site infection surveillance in dogs. *Veterinary Surgery*, 44(1), 2–8.
- Vassalle, C. (2008). An easy and reliable automated method to estimate oxidative stress in the clinical setting. *Methods in Molecular Biology*, 477, 31–39. doi: 10.1007/978-1-60327-517-0_3.
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
- Venus, M., Waterman, J., McNab, I. (2010). Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, 28(10), 469-472.
- Visse, R. ve Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827-839.

- Vogel, C. ve Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13, 227–232. doi: 10.1038/nrg3185.
- Waldron, D.R. ve Pope, N.Z. (2003). Superficial skin wounds. In D.H. Slatter (Ed.), *Textbook of Small Animal Surgery* (3rd ed., pp. 260–271). Saunders.
- Wang, A.S., Armstrong, E.J., Armstrong, A.W. (2013). Corticosteroids and wound healing: clinical considerations in the perioperative period. *The American Journal of Surgery*, 206(3), 410-417.
- Wang, P.H., Huang, B.S., Horng, H.C., Yeh, C.C., Chen, Y.J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 2(81), 94-101.
- Wang, Z., Qi, F., Luo, H., Xu, G., Wang, D. (2022). Inflammatory Microenvironment of Skin Wounds. *Frontiers in Immunology*, 13, 789274. doi: 10.3389/fimmu.2022.789274.
- Wangchuk, P. (2018). Therapeutic applications of natural products in herbal medicines, biodiscovery programs, and biomedicine. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 8(1), 1-20.
- Weingarten, M.S., Samuels, J.A., Neidrauer, M., Mao, X., Diaz, D., McGuire, J., ... Papazoglou, E.S. (2012). Diffuse near-infrared spectroscopy prediction of healing in diabetic foot ulcers: a human study and cost analysis. *Wound Repair and Regeneration*, 20(6), 911-917.
- Werner, S. ve Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3), 835-870.
- Wild, T., Rahbarnia, A., Kellner, M., Sobotka, L., Eberlein, T. (2010). Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition*, 26(9), 862-866.
- Wilhelm, K.P., Wilhelm, D., Bielfeldt, S. (2017). Models of wound healing: an emphasis on clinical studies. *Skin Research and Technology*, 23(1), 3-12.
- Williams, C. (2000). The Verge Videometer wound measurement package. *British Journal of Nursing*, 9(4), 237-239.
- Williams, J.Z. ve Barbul, A. (2003). Nutrition and wound healing. *Surgical Clinics*, 83(3), 571-596.
- Wixson, S.K. ve Smiler, K.L. (1997). Anesthesia and analgesia in rodents. In D.F. Kohn, S.K.

- Wixson, W.J. White, G.J. Benson (Eds.), *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* (pp. 165-203). Academic Press.
- World Health Organization. (2013). *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096>.
- Wu, J. ve Landen, N.X. (2020). Investigation of skin wound healing using a mouse model. *Molecular Dermatology: Methods and Protocols*, 239-247.
- Xue, M. ve Jackson, C.J. (2015). Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in Wound Care (New Rochelle)*, 4(3), 119–36. doi: 10.1089/wound.2013.0485.
- Yamaguchi, Y. ve Yoshikawa, K. (2001). Cutaneous wound healing: an update. *The Journal of Dermatology*, 28(10), 521-534.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 21(5), 559.
- Zarei, F. ve Soleimaninejad, M. (2018). Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 906-911. doi: 10.1080/21691401.2018.1439836.
- Zhang, N., Huang, K., Xie, P. Deng, A., Tang, X., Jiang, X., ... Wang, Y. (2024). Chloroplast genome analysis and evolutionary insights in the versatile medicinal plant *Calendula officinalis* L.. *Scientific Reports*, 14, 9662.
- Zhang, Y.G., Wu, S., Sun, J. (2013). Vitamin D, vitamin D receptor and tissue barriers. *Tissue Barriers*, 1(1), e23118.
- Zhang, Z. ve Michniak-Kohn, B.B. (2012). Tissue engineered human skin equivalents. *Pharmaceutics*, 4(1), 26-41.