

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***H. ITALICUM* EKSTRAKTLARININ VE *H.*
ITALICUM EKSTRAKTLARI YÜKLÜ
KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİN YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Zeynep Yağmur KARAGÜLLEOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA

Eş Danışman

Prof. Dr. Serap ACAR

Mart, 2025

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***H. ITALICUM* EKSTRAKTLARININ VE *H. ITALICUM*
EKSTRAKTLARI YÜKLÜ KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Zeynep Yağmur KARAGÜLLEOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması
10.03.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen
Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Serap ACAR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Sezen CANIM ATEŞ, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “*H. italicum* Ekstraktlarının ve *H.italicum* Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Zeynep Yağmur KARAGÜLLEOĞLU

İmza



Annem'e...

TEŞEKKÜR

Kendimi ve kariyerimi aradığım bu yolculukta yeni bir adım atmam konusunda bana destek olan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA'ya, bana inanıp Yüksek Lisans sürecim boyunca yaşadığım çeşitli durumlarda benimle sevinip benimle üzülen saygıdeğer eş danışmanım Prof. Dr. Serap ACAR'a, Yıldız Teknik Üniversitesi'ne ilk adım attığım andan itibaren peşini bırakmadığım canım yol göstericim Arş. Gör. Fatma Şayan POYRAZ'a, pes ettiğimde beni ayağa kaldıran yapabileceğime benden çok inanan canım Sinan ÜNAL'a ve canım Bahar KÖKLÜ'ye, öğrenmenin asla tükenmediğini, hayatta gitmek istediğim ya da bazen gitmek zorunda olduğum yollarda çaba sarf ettikçe aydınlığı görebileceğimi öğreten, benden önce ikinci Yüksek Lisans eğitimini tamamlayan ve bana hayatın her anında ilham olan biricik annem Hicran'a, yapabileceğimi kimi zaman fısıltıyla kimi zaman bağırarak da olsa hatırlattığım için kendime kalbimden teşekkür ederim.

Zeynep Yağmur KARAGÜLLEOĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	4
2 GENEL BİLGİLER	5
2.1 <i>H. italicum</i>	5
2.1.1 <i>H. italicum</i> 'un Kimyasal Bileşimi	6
2.1.2 <i>H. italicum</i> Etki Mekanizması ve Fitoterapik Kullanımı	9
2.2 Yara	11
2.2.1 Yara İyileşmesi	13
2.2.2 Standart Yara İyileşme Süreci	16
2.2.3 Yara İyileşmesinde Kullanılan Doğal Polimerler	18
2.2.4 Kitosan Polimeri ve Yara İyileşmesi	20
2.2.5 Kitosan Nanopartiküller ve Yara İyileşmesi	24
2.3 Nanopartiküller	27
2.3.1 Polimerik Nanopartiküllerin Laboratuvar Ölçeğinde Hazırlanması ..	29

2.3.2 İyonik Jelasyon Yöntemi.....	32
2.4 Nanopartikül Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler.....	33
2.4.1 UV-Vis Spektrofotometre.....	34
2.4.2 Nanopartikül Boyutunun Belirlenmesi ve Zeta Potansiyeli Ölçümü.....	34
2.4.3 FT-IR.....	35
2.4.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	36
2.4.5 Hücre Kültürü.....	36
2.4.6 MTT Testi.....	38
2.4.7 Yara İyileşmesi Prosesi.....	39
2.4.8 PCNA Analizi.....	39
3 MATERYAL METOD	41
3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	41
3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler	42
3.2.1 Nanopartikül Hazırlama İşlemlerinde Kullanılan Çözeltiler.....	42
3.2.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler.....	42
3.3 Deneysel Metotlar	43
3.3.1 <i>H. italicum</i> Ekstraktlarının Elde Edilmesi ve Kalibrasyon Eğrileri..	43
3.3.2 <i>H. italicum</i> Ekstraktlarının Karakterizasyonu.....	46
3.3.3 İyonik Jelasyon Yöntemi ile Kitosan Nanopartikül Sentezi.....	49
3.3.4 İyonik Jelasyon ile <i>H. italicum</i> Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Sentezi.....	49
3.3.5 Boş Ekstrakt Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	50
3.3.6 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	53
4 BULGULAR	57
4.1 <i>H. italicum</i> Ekstraktlarının UV-Vis Spektrofotometre Analizi Sonuçları ve Kalibrasyon Eğrileri	57

4.2 <i>H. italicum</i> Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin FT-IR Analizi	59
4.3 <i>H. italicum</i> Ekstraktlarının Antioksidan Aktivite Sonuçları	62
4.4 <i>H. italicum</i> Ekstraktlarının L929 Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksosite Analizi	64
4.5 <i>H. italicum</i> Ekstraktlarının Yara İyileşmesi Analizi Sonuçları.....	65
4.6 <i>H. italicum</i> Ekstraktlarının PCNA Analizi Sonuçları	70
4.7 <i>H. italicum</i> Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Analizleri	71
4.8 <i>H. italicum</i> Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin FT-IR Analizi	73
4.9 <i>H. italicum</i> Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin SEM Analizi ..	75
4.10 <i>H. italicum</i> Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Antioksidan Aktivite Sonucu.....	76
4.11 <i>H. italicum</i> Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin L929 Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksosite Analizi	78
4.12 <i>H. italicum</i> Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Yara İyileşmesi Analizi Sonucu	81
4.13 <i>H. italicum</i> Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin PCNA Analizi Sonuçları	83
5 SONUÇ	85
KAYNAKÇA	92
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	102

SİMGE LİSTESİ

°C	Derece santigrat
rpm	Devir/dakika
δ	Delta
g	Gram
kg	Kilogram
$\lambda_{\max}$	Maksimum dalga boyu
μl	Mikrolitre
mL	Mililitre
mg	Miligram
mV	Milivolt
nm	Nanometre
ζ	Zeta Potansiyeli
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

AA	Asetik asit
AEC	(3-Amino-9-etilkarbazol)
Ca	Kalsiyum
CDC	Center for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi)
CNP	Kitosan nanopartikül
CO ₂	Karbondioksit
CS	Kitosan
dH ₂ O	Deiyonize Su
DL	İlaç yükleme kapasitesi
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC ₅₀	Yarı Maksimal Etkili Konsantrasyon
ECM	Hücre Dışı Matriks
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
ELS	Elektroforetik ışık saçılımı
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi)
FT-IR	Fourier dönüşüm infrared spektroskopisi

HCl	Hidroklorik asit
HRP	Horseradish Peroksidaz
IC ₅₀	Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
mM	Milimolar
M.Ö.	Milattan Önce
M.S.	Milattan Sonra
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
Na	Sodyum
NaOH	Sodyum hidroksit
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su
PCNA	Proliferatif hücre nükleer antijeni
PDI	Polidispersite indeksi
Pec	Pektin
pH	Potansiyel hidrojen
PLA	Poli(laktik asit)
RNA	Ribonükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SFE	Süper kritik ekstraksiyon
SHX	Soxhlet ekstraksiyon
sp.	Species (Tür)
subsp.	Subspecies (Alttür)
TPP	Tripolifosfat
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Işık Spektroskopisi
UY	Uçucu Yağ
Z-Ave	Ortalama partikül boyutu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	<i>H. italicum</i> bitkisi.....	6
Şekil 2.2	<i>H. italicum</i> uçucu yağının en yaygın monoterpenlerinin kimyasal yapıları sırasıyla: a) α -pinen, b) nerol, c) neril asetat.	6
Şekil 2.3	M.S. 1. yüzyılda Yunan Pedanius Dioscorides tarafından kaleme alınan 'De Materia Medica'	9
Şekil 2.4	Yara iyileşme süreci (temsili).....	13
Şekil 2.5	Kitinin kimyasal yapısı.....	20
Şekil 2.6	Kitosan eldesinin şematik gösterimi	21
Şekil 2.7	Kitinin polimorfik formlarının şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.8	Kitosan nanopartiküllerin kullanımının şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.9	Nanopartikül sentezinin temel iki kategorisi.....	29
Şekil 2.10	Kitosan ve çapraz bağlayıcı arasında gerçekleşen iyonik jelasyon reaksiyonu	32
Şekil 2.11	L929 hücre hattı mikroskop görüntüsü (x5 büyütme).....	38
Şekil 2.12	Yara iyileşme prosesine bir örnek.....	39
Şekil 3.1	DPPH'ın zayıf A-H ile reaksiyonu sonucunda DPPH-H'nin eldesi	47
Şekil 3.2	<i>H.italicum</i> ekstraktlarının antioksidan aktivite analizi için kullanılan 96 kuyulu mikrolaka.....	47
Şekil 3.3	Tripan mavisi ile canlılık tespiti, Thoma lamında hücre sayımı	54
Şekil 4.1	Üç farklı yöntem ile elde edilen ekstraktların karşılaştırılmalı olarak 332 nm'de UV-Vis spektrumları absorban-dalga boyu grafiği	57
Şekil 4.2	Soxhlet ekstraksiyon sonucu elde edilen <i>H. italicum</i> ekstraktının kalibrasyon eğrisi	58
Şekil 4.3	Süper kritik CO ₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen <i>H. italicum</i> ekstraktının kalibrasyon eğrisi	58
Şekil 4.4	Su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen <i>H. italicum</i> uçucu yağının kalibrasyon eğrisi	59
Şekil 4.5	<i>H. italicum</i> 'un süper kritik CO ₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların FT-IR analiz sonucu	59
Şekil 4.6	<i>H. italicum</i> 'un sohxlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların FT- IR analiz sonucu	60
Şekil 4.7	<i>H. italicum</i> 'un su buharı distilasyonu sonucu elde edilen uçucu yağının FT-IR analiz sonucu	61
Şekil 4.8	<i>H. italicum</i> ekstraktlarının antioksidan aktivite-konsantrasyon grafiği	62
Şekil 4.9	Süper kritik CO ₂ ekstraktı ve uçucu yağ DPPH analiz karşılaştırması .	64
Şekil 4.10	L929 Fibroblast hücre hattı (x5 büyütme).....	64

Şekil 4.11 L929 Fibroblast hücre hattında MTT sonucunda oluşan formazan kristal yapıları (24 saat / 500 µg/ml).	65
Şekil 4.12 Üç farklı ekstraktın 24. saat % hücre canlılığı-konsantrasyon grafiği .	66
Şekil 4.13 Üç farklı ekstraktın 48. saat % hücre canlılığı-konsantrasyon grafiği .	67
Şekil 4.14 Üç farklı ekstraktın çizik açılan hücrelere uygulanması ve kontrol ile kıyaslanması	68
Şekil 4.15 0., 6., 12. ve 24. saat hücre görüntülerinden elde edilen yara iyileşmesi ölçümleri.....	69
Şekil 4.16 Üç farklı ekstraktın PCNA mikroskop görüntüleri (x100 büyütme)....	70
Şekil 4.17 <i>H. italicum</i> ekstraktları yüklü nanopartiküllerin ve kitosanın FT-IR spektrumları.....	75
Şekil 4.18 Süper kritik CO ₂ ekstraktı yüklü nanopartiküllere ait 50.000X büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü	75
Şekil 4.19 Kitosan nanopartiküllerin 1-500µl/ml konsantrasyon aralığındaki antioksidan aktivite çalışma verileri.....	76
Şekil 4.20 L929 Fibroblast hücre hattında MTT sonucunda oluşan formazan kristal yapıları (24 saat / 10 µg/ml / 500 µg/ml).	78
Şekil 4.21 Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin 24. saat % hücre canlılığı-konsantrasyon grafiği.....	79
Şekil 4.22 Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin 48. saat % hücre canlılığı-konsantrasyon grafiği.....	80
Şekil 4.23 Üç farklı ekstrakt yüklü nanopartiküllerin çizik açılan hücrelere uygulanması ve kontrol ile kıyaslanması	82
Şekil 4.24 0., 6., 12. ve 24. saat hücre görüntülerinden elde edilen ölçümler.....	83
Şekil 4.25 Üç farklı ekstrakt yüklü nanopartikülün PCNA mikroskop görüntüleri (x100 büyütme)	84

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 <i>Helichrysum</i> türleri ve içerdikleri ana bileşikler	7
Tablo 2.2 <i>Helicium</i> türleri ve terapötik kullanımları (Okaiyeto ve Oguntibeju, 2021).....	10
Tablo 2.3 Yara durumlarını gösteren sınıflandırma	12
Tablo 2.4 Yara iyileşmesinin 4 fazı	15
Tablo 2.5 Yara iyileşmesini etkileyen faktörler	17
Tablo 2.6 Doğal polimerler ve etki mekanizmaları	18
Tablo 2.7 Yara iyileşme mekanizmalarına ilişkin adımlar	26
Tablo 2.8 Sınıflandırma kriterlerine göre nanopartiküller.....	28
Tablo 2.9 Aşağıdan yukarıya yaklaşım ve yukarıdan aşağıya yaklaşımın karşılaştırılması	31
Tablo 2.10 DLS ve ELS ölçümlerinin teorik karşılaştırılması.....	35
Tablo 3.1 SHX, SFE ve UY ekstraksiyonunun karşılaştırılması	45
Tablo 3.2 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlar.....	45
Tablo 3.3 0,1 mg/ml stok solüsyondan hazırlanan ekstraktlar	46
Tablo 3.4 96 kuyulu mikropalakaya bileşenlerin yerleşim şeması	48
Tablo 4.1 <i>H. italicum</i> ekstraktlarının absorbans değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan % antioksidan aktivite değerleri	63
Tablo 4.2 Üç farklı ekstraktın 24. saat IC ₅₀ değerleri	66
Tablo 4.3 Üç farklı ekstraktın 48. saat IC ₅₀ değerleri.....	67
Tablo 4.4 Üç farklı ekstrakt uygulanan L929 fibroblast hücre hatlarında yara iyileşme yüzdeleri	69
Tablo 4.5 Üç farklı ekstraktın proliferasyon yüzdeleri.....	71
Tablo 4.6 Kitosan nanopartikül sentezinde kullanılan parametreler	71
Tablo 4.7 Sentezlenen nanopartiküllere ilişkin veriler	73
Tablo 4.8 Absorbans değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan % antioksidan aktivite verileri	77
Tablo 4.9 Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin 24. saat IC ₅₀ değerleri	80
Tablo 4.10 Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin 48. saat IC ₅₀ değerleri	81

Tablo 4.11 Üç farklı ekstrakt yüklü nanopartikül uygulanan L929 fibroblast hücre hatlarında yara iyileşme yüzdeleri.....	83
Tablo 4.12 Üç farklı ekstrakt yüklü nanopartiküllerin proliferasyon yüzdeleri....	84



***H. italicum* Ekstraktlarının ve *H. italicum* Ekstraktı Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi**

Zeynep Yağmur KARAGÜLLEOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA

Eş-Danışman: Prof. Dr. Serap ACAR

H. italicum; uçucu yağlar, flavonoidler, diterpenler ve çeşitli fenolik bileşenler gibi kimyasal komponentler ihtiva eden 30-70 cm aralığında uzayabilen aromatik bir çalı türü bitkidir. *H. italicum* uçucu yağı ve çeşitli yöntemlerle elde edilen ekstraktları; anti-inflamatuar, antioksidan ve hücre yenileme özellikleri sebebi ile yara iyileştirme uygulamalarında kullanımı öngörülmektedir. *H. italicum* yara çevresindeki inflamasyonu azaltmak suretiyle iyileşmeyi teşvik etmektedir, içeriğinde bulunan antioksidan bileşenler sayesinde yara çevresindeki serbest radikallerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır, fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. *H. italicum* bitkisinden temin edilen ekstraktların kimyasal yapısı gereği zayıf çözünürlüğe sahip ve canlı sistemlerde biyoyararlanımı düşüktür. Bu sebeple doğal polimer kullanılmak suretiyle nanopartiküler sistemlere entegre edilmesi hedeflenmiştir.

Bir glikoz türevi olan β -(1,4) bağlantılı *N*-asetilglukozaminin uzun zincirli bir polimer olan kitinin ana türevi olan kitosan, 1-4 glikozidik bağla bağlanan glukozamin ve *N*-asetilglukozamin birimlerinin bir kopolimeridir. Kitosan (CS) polimeri; karides, yengeç, kalamar ve kerevit gibi canlılardan temin edilebilen

doğal polimer olup, mevcut çalışma kapsamında hidrofilik özelliği, biyouyumluluğu, biyobozunurluğu ve toksik olmaması gibi özellikleri sebebi ile tercih edilmektedir. Mevcut çalışma kapsamında nanopartikülün doğal polimer olan kitosan türevli nanopartikül olarak seçilmesinin temel sebebi antimikrobiyal aktivitesi ve hızlandırılmış yara iyileştirme özelliğidir. Sentezlenen kitosan nanopartiküllerin biyokimyasal aktiviteleri şu şekilde sıralanabilir: (i) fibroblast aktivasyonu, (ii) tip IV kollajen sentezinin uyarılması ve (iii) düzenli kollajen birikimine yardımcı olan ve yara bölgesinde artan düzeyde doğal hyaluronik asit sentezini uyarıcı *N*-asetil- β -D-glukozamini serbest bırakılması.

Mevcut çalışma, biyoyararlanımı düşük olan moleküllerin etkinliklerini arttırmaya yönelik doğal bileşenler ihtiva eden biyoteknolojik sistemlerin tasarlanabileceğini gösteren bir araştırma niteliğindedir.

Biyoyararlanımı ve çözünürlüğü düşük fakat organizma için faydalı *H. italicum* ekstraktları ile topikal formülasyonlara uyarlanmaya uygun yara iyileşmesinde etkili nanopartiküler sistemlerin temin edilmesi sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, *H. italicum*, kitosan, nanopartikül, yara iyileşmesi.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of *H. italicum* Extracts and *H. italicum* Extract-Loaded Chitosan Nanoparticles on Wound Healing

Zeynep Yağmur KARAGÜLLEOĞLU

Department of Biotechnology

Master of Science

Supervisor: Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA

Co-supervisor: Prof. Dr. Serap ACAR

H. italicum is an aromatic shrub that grows between 30 and 70 cm in height, containing chemical components such as essential oils, flavonoids, diterpenes, and various phenolic compounds. The essential oil and extracts obtained through different methods from *H. italicum* are proposed for use in wound healing applications due to their anti-inflammatory, antioxidant, and cell regeneration properties. *H. italicum* promotes healing by reducing inflammation around the wound, eliminates free radicals in the wound environment due to its antioxidant components, and accelerates wound healing by enhancing fibroblast cell proliferation. However, extracts derived from *H. italicum* possess low solubility and poor bioavailability in living systems due to their chemical structure. Therefore, this study aims to integrate these extracts into nanoparticulate systems using natural polymers.

Chitosan, a derivative of chitin, which is the main polymer of β -(1,4)-linked N-acetylglucosamine, is a copolymer consisting of glucosamine and N-acetylglucosamine units connected via 1-4 glycosidic bonds. Chitosan (CS)

polymer is a natural polymer derived from organisms such as shrimp, crabs, squid, and crayfish. In the present study, chitosan was chosen for its hydrophilic nature, biocompatibility, biodegradability, and non-toxic properties. The primary reason for selecting chitosan-based nanoparticles as the nanoparticulate system in this study is their antimicrobial activity and accelerated wound healing properties. The biochemical activities of the synthesized chitosan nanoparticles can be summarized as follows: (i) activation of fibroblasts, (ii) stimulation of type IV collagen synthesis, and (iii) release of *N*-acetyl- β -D-glucosamine, which promotes regular collagen deposition and stimulates the synthesis of natural hyaluronic acid in the wound area.

This study demonstrates that biotechnological systems containing natural components can be designed to enhance the efficacy of molecules with poor bioavailability. Nanoparticulate systems effective in wound healing and suitable for topical formulations were developed using *H. italicum* extracts, which are beneficial for the organism but exhibit low solubility and bioavailability.

Keywords: Antioxidant activity, chitosan, *H. italicum*, nanoparticles, wound healing.

1.1 Literatür Özeti

Helichrysum italicum (*H. italicum*), aromatik özellikleri ve biyolojik aktiviteleri nedeniyle geleneksel tıpta uzun süredir kullanılan bir bitki olarak literatürde yer almaktadır. Antik dönemlerden bu yana, *H. italicum*'un çeşitli terapötik etkileri literatürde rapor edilmiştir. Yunanca kökenli olan *Helichrysum* ismi, güneş anlamına gelen “*helios*” ve altın anlamına gelen “*chryos*” kelimelerinden türetilmiştir ve bu kelime bitkinin parlak sarı çiçeklerini ifade etmektedir. Tarih içinde ortaya çıkarılan çeşitli eserlerde *H. italicum*'un tedavilerde kullanımına yer verilmiştir. Bu bilgiler, *H. italicum*'un geleneksel tedavide ne denli önemli bir yer tuttuğunu ortaya koymaktadır. Günümüzde reçeteli çeşitli topikal formülasyonlarda da yer almakta ve bu sayede geleneksel kullanım sınırlarından çıkarak doğrudan tedavi amaçlı kullanılabilmektedir (Viegas vd., 2014)

H. italicum'un kimyasal kompozisyonu; fenolik bileşikler, flavonoidler, terpenoidler ve antioksidan özelliklere sahip diğer fitokimyasallardan oluşmaktadır. Literatürde, *H. italicum*'un anti-inflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal ve yara iyileştirici etkilerine dair birçok çalışma yer almaktadır. Özellikle, fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin serbest radikallerin etkisini azaltarak oksidatif stresi önlediği ve doku yenilenmesini desteklediği literatürde yer almaktadır (Węglarz vd., 2022).

H. italicum'un yara iyileştirici özellikleri üzerine yapılan çalışmalarda, bu bitkiden elde edilen uçucu yağların ve ekstraktların fibroblast proliferasyonunu desteklediği, inflamasyonu azalttığı ve yara bölgesindeki granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırdığı açıklanmaktadır. Ancak, *H. italicum* ekstraktlarının düşük çözünürlük ve düşük biyoyararlanım özellikleri, bu biyolojik etkilerin etkin bir şekilde kullanılmasını sınırlamaktadır. Bu nedenle, *H. italicum*'un biyoyararlanımını

artırmaya yönelik yenilikçi taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Mevcut tez kapsamında söz konusu hususa değinilmektedir.

Nanopartiküller, modern farmasötik uygulamalarda biyoaktif bileşenlerin çözünürlük ve biyoyararlanım problemlerini çözmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Kitosan nanopartiküller; biyoyumluluğu, biyobozunurluğu ve antimikrobiyal özellikleri sayesinde doğal polimer bazlı taşıyıcı sistemlerin öncüsü olarak kabul edilmektedir. Kitosan nanopartiküllerinin, temel yapı polimerinin kitosan olması sebebi ile antioksidan ve anti-inflamatuar etkilerle yara iyileşme süreçlerine önemli katkılar sunabileceği gerçekleştirilen literatür taramasından yola çıkılarak öngörülmüştür.

Literatürde *H. italicum*'un kimyasal kompozisyonu, biyolojik aktiviteleri ve terapötik potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar, bu bitkinin yara iyileşmesi gibi uygulamalar için güçlü bir aday olduğunu göstermektedir. Kitosan nanopartiküllere yüklenerek *H. italicum*'un biyoyararlanımının artırılması ve biyolojik etkinliğinin optimize edilmesi hem literatüre katkı sağlayacak hem de yara tedavisinde yenilikçi bir çözüm sunacaktır.

1.2 Tezin Amacı

Mevcut tez çalışmasının temel amacı, *H. italicum* bitkisinden elde edilen ekstraktların, doğal bir polimer olan kitosan nanopartiküller ile enkapsüle edilmesi yoluyla yara iyileşme süreçlerinde kullanılabilecek yenilikçi ve etkili bir biyoteknolojik sistem geliştirmektir. Hazırlanan biyoteknolojik sistem kullanılarak hazırlanan topikal formülasyon tezin yan amaçları arasında yer almaktadır. Bitkisel kaynaklı bileşenlerin farmasötik potansiyeli, düşük çözünürlük ve biyoyararlanım gibi kısıtlayıcı faktörler nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Bu eksikliklerin karşısında ise bitkisel kaynakların kuvvetli tedavi edici etkenler barındırması argümanı yer almaktadır. *H. italicum*'un fenolik bileşikler, flavonoidler ve antioksidan özellikler gibi biyolojik olarak aktif içerikleri, inflamasyonun azaltılması, oksidatif stresin önlenmesi ve fibroblast hücre proliferasyonunun desteklenmesi gibi yara iyileşmesine doğrudan katkı sağlayabilecek özelliklere sahip olduğu literatür taramasında elde edilen bilgilerdir.

Bu çalışmada, *H. italicum* ekstraktlarının bu faydalı özelliklerinin, kitosan nanopartiküllerle birlikte kullanıldığında daha etkili bir şekilde yara bölgesine iletebileceği öngörülmüş ve çalışmanın bu bağlamda sürdürülmesi hedeflenmiştir.

Kitosan, doğada kolay erişilebilir bir biyopolimer olup biyouyumluluk, biyobozunurluk ve antimikrobiyal özellikleri sayesinde farmasötik ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanıma oldukça uygun olarak değerlendirilmektedir.

Mevcut tez çalışmasında kitosanın, *H. italicum* ekstraktlarının çözünürlük problemini en aza indirerek biyoyararlanımı artıracak ve yara iyileşme süreçlerinde daha etkili bir sonuç sunacak hedeflenmiştir. Bunun yanı sıra, kitosan nanopartiküllerin; anti-inflamatuar etkilerinin, yara bölgesindeki mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesine ve granülasyon dokusu oluşumunun hızlanmasına katkıda bulunacağı öngörülmektedir. *H. italicum* ekstraktları ile kitosan nanopartiküllerin kombinasyonu, özellikle çeşitli ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılmak sureti ile seçilmesi sonucunda sağlanan kombinasyon, literatürde henüz sınırlı sayıda çalışmanın ele aldığı bir konudur. Bu nedenle, *H. italicum*'un biyolojik etkilerinin kitosan nanopartiküller ile optimize edilmesi, yara iyileşme süreçlerinde hem ekstraktların hem de nanopartiküllerin sinerjik bir şekilde kullanılmasını sağlayabilir.

Bu tür bir yaklaşımın yalnızca yara iyileştirici etkiler sunmakla kalmayıp, aynı zamanda doğal ürünlerin klinik etkinliğini artırmak için sürdürülebilir ve güvenli bir yöntem sağlayabileceğini ortaya koymak da amaçlanmaktadır. Bu bağlamda, mevcut tez çalışması kapsamında; çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak *H. italicum* bitkisinden elde edilen ekstraktların kimyasal profillerinin belirlenmesi, fenolik ve flavonoid içeriklerinin analiz edilmesi, antioksidan aktivite kapasitelerinin değerlendirilmesi, iyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanopartiküllerin sentezlenmesi; boyut, zeta potansiyeli, yüzey morfolojisi ve yük kapasitesi gibi fizikokimyasal özelliklerinin detaylı olarak incelenmesi, *H. italicum* ekstraktlarının kitosan nanopartiküllerine entegre edilmesi ve bu sistemlerin hem fiziksel hem de biyolojik özelliklerinin karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile fibroblast proliferasyonu, sitotoksite ve tip IV kollajen sentezine olan etkilerinin araştırılması ve ayrıca, antioksidan aktivite ve

inflamasyon baskılama kapasitelerinin test edilmesi temel metodolojik amaçlarımız arasında yer almaktadır.

Çalışmanın nihai hedefi, yara iyileşmesi alanında kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerine yenilikçi bir alternatif sunmak ve doğal ürünlerin biyoteknolojik uygulamalara entegrasyonu için bir model geliştirmektir. Bu yaklaşım, yara iyileştirme süreçlerini hızlandırmanın yanı sıra, enfeksiyon riskini azaltan ve doku yenilenmesini teşvik eden etkili bir tedavi sistemi sunmayı amaçlamaktadır. Ayrıca, bu çalışma, biyoteknolojik yaklaşımlar ile doğal bileşenlerin klinik etkinliklerini artırmak için bir çerçeve sunarak, literatüre önemli bir katkı sağlamayı hedeflemektedir.

1.3 Hipotez

Mevcut tez çalışmasının tasarım aşamasında temel hipotez, *H. italicum* bitkisinden farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktların, doğal bir polimer olan kitosandan üretilen nanopartiküllere yüklenmesiyle yara iyileşme sürecindeki biyolojik etkinliğin artırılabilceğini deneysel olarak ortaya koymaktır.

Çalışmada, farklı yöntemlerle hazırlanan ekstraktların antioksidan aktivitelerinin, sitotoksosite seviyelerinin, proliferasyon yeteneklerinin ve yara iyileştirme özelliklerinin; kitosan nanopartiküllere yüklendiğinde gelişim göstereceği ve farmasötik kullanıma daha uygun hale geleceği öngörülmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 *H. italicum*

Helichrysum Miller cins adı, bitki türlerinin genellikle parlak sarı renkte infloresanslara sahip olmalarından dolayı, Yunanca güneş anlamında "*helios*" ve altın anlamında "*chryos*" kelimelerinden türetilmiştir. *Helichrysum* ailesinde yer alan bitkilerin tıbbi kullanımlarına dair en eski bilgilerden biri, Eresos'lu Yunan Theophrastus'un "*Historia Plantarum*" adlı eserinde (M.Ö. 3-2. yüzyıl) yer almaktadır. Bu metinde, "*Heleiachrysos*"un bal ile karıştırılarak yanık tedavisinde ve zehirli hayvanların ısırıklarında kullanılabileceği anlatılmaktadır (Lourens vd., 2008).

Antik Roma Dönemi'ne ait olan Yunanlı Pedanius Dioscorides'in 1555 yılında yayınlamış olduğu "*De Materia Medica*" adlı eserinin dördüncü kitabında ise, *Helichrysum* çiçeklerinin şarapta bekletilmiş dekoksiyonunun idrar söktürücü özelliklere sahip olduğu ve idrar yolu bozuklukları, yılan ısırıkları, siyatik ve fıtık tedavisinde kullanılabilir olduğu açıklanmıştır (Pedanius vd., 1555). Bu bilgiler ışığında *Helichrysum* ailesinde yer alan türler çeşitli tedavi yaklaşımlarında kullanılmaya uygun görülmüştür. Aynı ailede yer alan bitkiler morfolojik olarak birbirine benzemektedir. Eski kaynaklar değerlendirildiğinde *Helichrysum*'un birçok türü arasındaki büyük benzerliklerin, bitkilerin doğru bir şekilde tanımlanmasında zorluklar meydana getirdiği ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple literatür taramalarında *Helichrysum*'un tüm türleri kapsayacak şekilde anıldığı görülmektedir. Şekil 2.1'de görülen *H. italicum*, 30-70 cm yüksekliğinde aromatik bir çalıdır. Mayıs ve haziran aylarında çiçek açar ve çiçekleri genellikle sarıdır. *H. italicum* türü; kuru, kumlu ve taşlı bölgelerde doğal olarak yetiştirme yeteneğine sahiptir çünkü bir kserofit bitkisidir (Primitivo vd., 2022). Kserofit terimi, su eksikliği olan ortamlarda hayatta kalabilme yeteneğine sahip bitkiler için

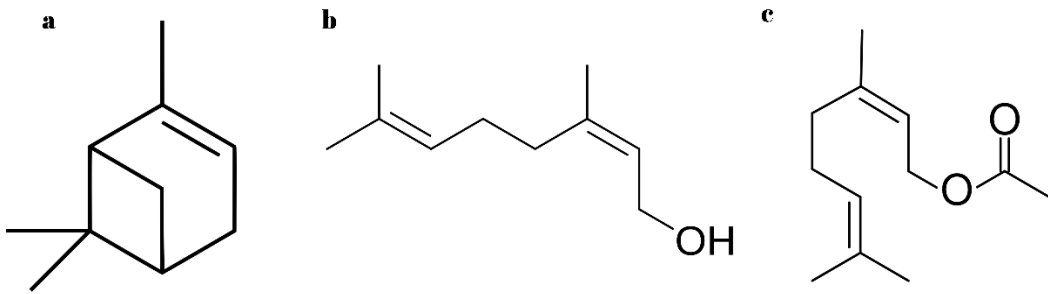
kullanılmaktadır. Bu özellik sayesinde *H. italicum* deniz seviyesi ile 2.200 m arasında geniş bir rakım aralığında gelişim gösterebilmektedir.



Şekil 2.1 *H. italicum* bitkisi

2.1.1 *H. italicum*'un Kimyasal Bileşimi

H. italicum'un kimyasal bileşimi kapsamında tanımlanan ana bileşikler arasında (şekil 2.2); γ -kurkumen, neril asetat (turunçgil yağlarında bulunan bir terpenoid), α -pinen, nerol, neril propanoat sıralanabilmektedir (Maksimovic vd., 2017). Ek olarak *H. italicum*; 3,4-dikafeoilkinik asit, klorojenik asit, 3,5-dikafeoilkinik asit ve kaempferol 3-O-glukopiranosit gibi çeşitli fenolik bileşikler içermektedir (Furlan ve Petty, 2023).



Şekil 2.2 *H. italicum* uçucu yağının en yaygın monotermenlerinin kimyasal yapıları sırasıyla: a) α -pinen, b) nerol, c) neril asetat.

H. italicum ekstraktları; su buharı distilasyonu, soxhlet ekstraksiyon (SHX) ve süper kritik CO₂ ekstraksiyonu (SFE) gibi yöntemlerden biri ile elde edilebilmektedir. *H. italicum*'un kimyasal profili, kullanılan ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak değişebilmektedir. Gerçekleştirilen literatür taramasında, %45 ila %20 etanol arasında değişen etanol-su karışımları kullanılarak elde edilen

ekstraktların en yüksek biyoaktif metabolit konsantrasyonlarına sahip olduğu belirlenmiştir (Furlan ve Petty, 2023). Söz konusu bitkinin kimyasal profilinin; gerçekleştirilen ekstraksiyon profiline göre değişkenlik göstermesi mevcut tez çalışması kapsamında karşılaştırmalı deneylerin gerçekleştirilmesini mümkün kılmıştır.

Bitkilerin yetiştirildikleri toprağın mevsimsel özellikleri, ekim alanlarının güneş alma süreleri gibi etmenlerin kimyasal bileşenlerde meydana getirdiği farklılıkların yanı sıra aynı bölgede aynı şartlar altında yetişen bitki türünün de kullanımında farklılıklar söz konusu olabilmektedir. *H. italicum*'un farklı kısımlarından (örn. çiçek, yaprak, kök) elde edilen ekstraktlarda bulunan ana kimyasal bileşikler farklılık gösterebilmektedir. Tablo 2.1'de *H. italicum*'un farklı kısımlarından elde edilen ekstraktlarda bulunan bileşikler açıklanmaktadır. Aşağıda sunulan tabloda hem farklı taksonlara, hem de farklı taksonların farklı bitkisel bölümlerine yer verilmektedir. Farklı taksonların farklı bölgelerinden elde edilen ekstraktlar da kategorize edilmiş ve son olarak ana bileşenlerde sınıflandırılmıştır. Ayrıca, *H. italicum*'un genetik değişkenliğinin, ekstraksiyon prosedürüne kıyasla kimyasal profil üzerinde daha az etkiye sahip olduğu da belirlenmiştir. Mevcut çalışmalarda ve piyasada yer alan ürünlerde *H. italicum*; tıp, kozmetik ve gıda dahil olmak üzere çeşitli alanlarda potansiyel uygulamaları olan çoklu komponentten oluşan bir kimyasal bileşim sergilemektedir.

Tablo 2.1 *Helichrysum* türleri ve içerdikleri ana bileşikler

Taksonlar	Bitki Bölümü	Ekstrakt Türü	Ana Bileşik Türleri
<i>Helichrysum italicum</i>	Asteraceae	Uçucu yağ, su, etanol	Terpenoidler (nerolidol, α -pinene, β -selinene), flavonoidler, fenolik asitler
<i>Helichrysum stoechas</i>	Asteraceae	Uçucu yağ, su, metanol	Terpenoidler, flavonoidler (kuersetin, kaempferol), fenolik asitler (kafeik asit)

Tablo 2.1 *Helichrysum* türleri ve içerdikleri ana bileşikler (devamı)

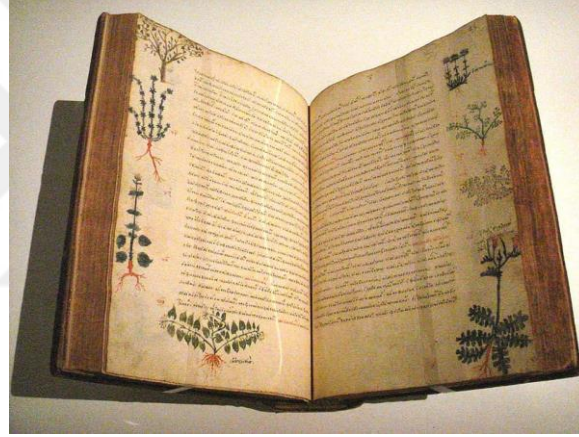
Taksonlar	Bitki Bölümü	Ekstrakt Türü	Ana Bileşik Türleri
<i>Helichrysum arenarium</i>	Asteraceae	Su, metanol, etanol	Flavonoidler (apigenin, luteolin), kumarinler, fenolik asitler (örn. klorojenik asit)
<i>Helichrysum odoratissimum</i>	Asteraceae	Uçucu yağ, su, etanol	Terpenoidler (γ -kurkumen, α -kopaen), flavonoidler, fenolik bileşikler
<i>Helichrysum bracteatum</i>	Asteraceae	Su, metanol	Flavonoidler (apigenin, kaempferol), fenolik asitler (kafeik asit, klorojenik asit)
<i>Helichrysum splendidum</i>	Asteraceae	Uçucu yağ, etanol, su	Terpenoidler (α -pinen, limonen), flavonoidler, fenolik asitler
<i>Helichrysum petiolare</i>	Asteraceae	Su, metanol, etanol	Flavonoidler (luteolin, kaempferol), terpenoidler, fenolik asitler (ferulik asit)

H. italicum'un eşitli ekstraktlarının üretilebileceği ve elde edilen ürünlerin kimyasal bileşimiyle farklı kimotiplere ayrılabilmesi bildirilmektedir. Kimotipler görünüşte neredeyse aynı olan ancak farklı ana bileşenlere sahip uçucu yağlar üreten aynı cins bitkiler için kullanılan bir terimdir. *Helichrysum italicum subsp. italicum*'dan üç kimotip bulunmaktadır. İlk kimotip; neril asetat, neril propanoat ve α -pinen gibi monoterpen içeriği yüksek yüzdeli birleşenlerden oluşmaktadır; ikinci kimotip yüksek miktarda geraniol ve geranil asetat içermektedir ve üçüncü kimotip ise büyük oranda seskiterpenlere sahiptir (Zheljazkov vd., 2022).

Alt tür olan *Helichrysum italicum subsp. microphyllum*'un iki ana kimotipi mevcuttur. İlk kimotip nerol, neril asetat, neril propionat, linalool ve limonen gibi birleşenler içerirken; ikinci kimotip ise γ -kurkumen ve rosifoliol gibi yüksek miktarda bileşenlere sahiptir (Manci vd., 2011).

2.1.2 *H. italicum* Etki Mekanizması ve Fitoterapik Kullanımı

H. italicum bitkisinin terapötik etkisinin keşfedilip, tıbbi olarak kullanılması M.Ö. 3. ve 2. yüzyıla dayanmaktadır. Eresoslu Yunan Theophrastus'un 'Historia Plantarum' adlı eserinde ve M.S. 1. yüzyılda Yunan Pedanius Dioscorides tarafından kaleme alınan 'De Materia Medica' adlı eserde (şekil 2.3) *H. italicum*'un idrar söktürücü olarak kullanımı ayrıca siyatik ve fitik tedavisinde etkisi açıklanmaktadır (Viegas vd., 2014). Ayrıca Rönesans Dönemi'nde ise Hollandalı Botanikçi Herman Boerhaave tarafından 1727'de histeri tedavisi için kullanıldığı açıklanmaktadır (Scholer vd., 2018). Geçmişten günümüze ulaşan yazılı kaynaklarda bitkisel tedavilere önem verilmesi modern tıbbın bugün geldiği durumun ön gösterimi sayılabilir. Günümüzde aromaterapik, organik içerikli bitki özlü kremler oldukça sık tercih edilmektedir.



Şekil 2.3 M.S. 1. yüzyılda Yunan Pedanius Dioscorides tarafından kaleme alınan 'De Materia Medica'

Tarih içerisinde bitkinin tıbbi kullanım kökeni incelendiğinde tür olarak özelleştirilmemiş, yani genel kapsamlı *Helichrysum* ailesi için yapılan açıklamalar literatürde yer almaktadır. *Helichrysum*'un çok karmaşık bir cins olarak kabul edilmesi ve bazı türler ile arasında büyük benzerlikler bulunması sebebi ile türlerin doğru tanımlanması zaman almıştır. Mevcut tez çalışması kapsamında söz konusu bitkinin tercih edilmesinin başlıca sebebi de ülkemizde oldukça yaygın bir şekilde yetişmesi ve yetiştirilmek amacı ile ek bir çaba sarf edilmesinin gerekmemesidir.

Dünya genelinde birçok *Helichrysum* türleri yetiştirilmektedir ve bu türler çeşitli çalışmalar ile tıbbi terapötik uygulamalara modifiye edilmiştir. Tablo 2.2'de *Helichrysum sp.*'nin etnofarmakolojik kullanım örnekleri sunulmaktadır. Bahsi

geçen tabloda da gösterildiği üzere bitkinin terapötik kullanımı, tercih edilen bitkisel bölüm ve yetiştigi bölgeye göre farklılık göstermektedir. Örneğin üzerinde sıkça çalışılan *Helichrysum graveolens* türü Türkiye’de ‘diabetes mellitus’ endikasyonu için ve yara iyileştirmeye yönelik kullanılmıştır. İspanyol halk tıbbında özellikle *Helichrysum stoechas* anti-inflamatuar ve yara iyileştirici özellikleri sebebi ile diş ağrısı ve ürolojik durumlarda kullanılmıştır. *H. italicum*’dan üretilen uçucu yağ ise yara iyileşmesi başta olmak üzere diğer cilt rahatsızlıkları (örn. hematom ve yara izleri gibi) için aromaterapik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Tablo 2.2 *Helicium* türleri ve terapötik kullanımları (Okaiyeto ve Oguntibeju, 2021)

Tür Adı	Yıl	Bölge	Terapötik Kullanımı	Bitki Bölümü	Hazırlama Yöntemi
<i>Helichrysum italicum</i>	2020	Akdeniz Bölgesi	Antimikrobiyal, anti-inflamatuar	Çiçek, yaprak	Uçucu yağ ekstraksiyonu, su buharı distilasyonu
<i>Helichrysum stoechas</i>	2018	Avrupa	Antioksidan, yara iyileşmesi	Çiçek	Metanol ekstraksiyonu
<i>Helichrysum arenarium</i>	2019	Doğu Avrupa	Antiinflamatuar, karaciğer koruyucu	Çiçek	Su ekstraksiyonu, etanol ekstraksiyonu
<i>Helichrysum odoratissimum</i>	2021	Güney Afrika	Antimikrobiyal, antioksidan	Çiçek, yaprak	Uçucu yağ ekstraksiyonu
<i>Helichrysum bracteatum</i>	2017	Avustralya	Anti-inflamatuar, yara iyileşmesi	Çiçek, yaprak	Su ekstraksiyonu
<i>Helichrysum splendidum</i>	2022	Güney Afrika	Antimikrobiyal, anti-inflamatuar	Çiçek, yaprak	Uçucu yağ ekstraksiyonu, etanol ekstraksiyonu

2.2 Yara

Yara; deri, mukoz membranlar ve organ dokuları dahil olmak üzere biyolojik dokunun bütünlüğüne verilen zarar olarak tanımlanmaktadır. Çeşitli travma türlerinin sebep olduğu yaralar enfeksiyon, boyut ve yayılım açısından farklılık göstermektedir.

Mevcut enfeksiyonun yayılması yani daha fazla alana ilerlememesi için uygun şekilde pansuman yapıldığından emin olmak başlıca gerekliliktir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Center for Disease Control and Prevention, kısaca CDC), yaraların temizliğini ve durumunu doğru bir şekilde tanımlayabilmek ve gerekli tedavilerin uygulanabilmesi için tablo 2.3'te de gösterilen dört yara durumunu sınıflandıran tanımlamalar yapmıştır. Söz konusu tanımlar aşağıdaki gibidir:

1. sınıf yaralar: Temiz kabul edilmektedir. Enfekte değildir, inflamasyon yoktur ve birincil olarak kapalıdır. Bu yaraların boşaltılması gerekiyorsa kapalı drenaj yöntemi gerekmektedir. Söz konusu yaralar; solunum, sindirim, genital veya idrar yollarında yayılım ve oluşum göstermemektedir.

2. sınıf yaralar: Temiz-kontamine olarak kabul edilmektedir. Bu yaralarda olağandışı kontaminasyon söz konusu değildir. 2. sınıf yaralar; solunum, sindirim, genital veya idrar yollarında oluşum ve yayılım gösterebilmektedir.

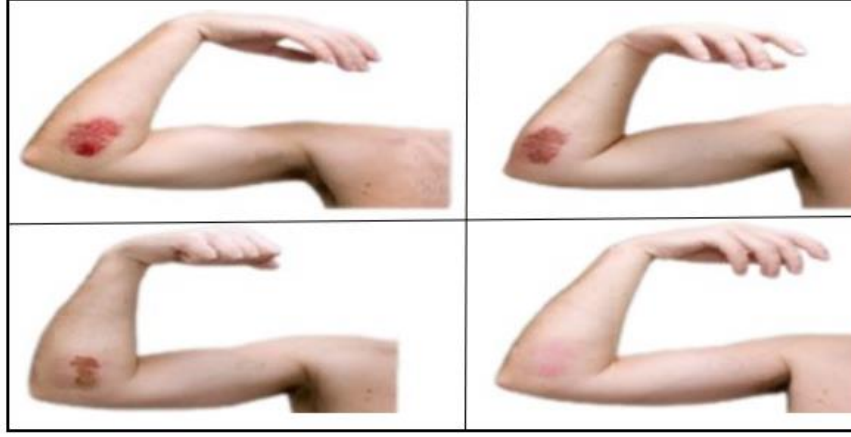
3. sınıf yaralar: Kontamine olarak kabul edilmektedir. Bu sınıfa mensup yaralar, steril tekniklerin zarar görmesinden veya gastrointestinal sistemden yaraya sızıntıdan kaynaklanabilecek taze, açık yaralardır. Ek olarak, akut veya cerrahi enflamasyonun olmamasıyla sonuçlanan kesiler, 3. sınıf yaralar olarak kabul edilmektedir.

4. sınıf yaralar: Kirli-enfekte olarak kabul edilmektedir. Bu yaralar tipik olarak travmatik yaralar için yanlış uygulamadan kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra ilerlemiş komplikasyonlar sonucu da oluşabilmektedir. 4. sınıf yaralar cansızlaşmış bir doku tipi göstermektedir ve hücre onarımı oldukça sınırlı görülmektedir. Bu görüntü en yaygın olarak iç organlarda meydana gelen yaralarda veya ameliyat sahasında bulunan mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonlar sonucu oluşan yaralarda görülmektedir.

Tablo 2.3 Yara durumlarını gösteren sınıflandırma

Sınıf	Tanım	Örnekler
1. Sınıf (Yüzeyel)	Sadece deri yüzeyini etkiler ve derinin üst tabakasında yer alır. İyileşme genellikle hızlıdır.	Süperfisyal yanıklar, küçük kesikler, yüzeysel yaralanmalar
2. Sınıf (orta-yüzeysel)	Deride fazla sayıda dokuyu etkileyen yaralardır, ancak kas veya kemik gibi derin dokulara ulaşmaz.	Derin kesikler, yüzeysel ülserler, birinci derece yanıklar
3. Sınıf (Derin)	Derin dokuları da etkileyen ve kas, kemik veya iç organlara ulaşabilen yaralardır.	Penetran yaralar, ikinci ve üçüncü derece yanıklar, açık kırıklar
4. Sınıf (Kronik)	Uzun süre iyileşmeyen yaralardır. Genellikle altta yatan bir hastalık veya enfeksiyonla ilişkilidir.	Diyabetik ülserler, basınç yaraları, venöz staz ülserleri

Yara iyileşmesi, hücresel yapıların ve doku katmanlarının onarılmasını içeren karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Yara iyileşme sürecinin bir örneği şekil 2.4'te gösterilmektedir. Yaranın görünümüne ve büyüklüğüne bağlı olarak nekrotik, kabuklu, granüle, epitelize veya enfeksiyöz olarak yara çeşitleri sayılabilmektedir. Kapalı yaralar; kontüzyon (çürük), hematoma, sıyrıklardan kaynaklanır ve yumuşak dokuya, küçük kan damarına veya dokunun derin katmanlarına zarar vermektedir. Açık yaralar; yırtılmaları, kesici aletlerle oluşturulan yaraları, cerrahi yaraları, böcek ısırıklarını, radyonekrozu, nörovasküler ve metabolik yaraları da içermektedir (Schultz vd., 2011). Ayrıca yara süresine bağlı olarak akut veya kronik yaralar sınıflandırılabilir. Akut ve kronik yaralar, daha sonra yara iyileşme sürecini etkileyen tedavi yaklaşımını belirlemektedir. Kronik yaralar ise genellikle derinin iç katmanlarına zarar vererek onarımda gecikmelere neden olmaktadır. Sayılan tüm bu yara çeşitleri ve bu çeşitlerin durumları göz önünde bulundurulduğunda yaraların birçok inflamatuvar hastalık türü ile doğrudan ilişkili olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 2.4 Yara iyileşme süreci (temsili)

2.2.1 Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, doku hasarına karşı doğal bir fizyolojik reaksiyondur. Yara iyileşmesi çok sayıda hücre tipi, sitokinler ve vasküler sistem arasındaki karmaşık etkileşimi içermektedir. İnflamatuar hücreler, anjiyogenezi, trombozu ve yeniden epitelizasyonu teşvik etmek için sitokinler salgılamaktadır (Cioce vd., 2024). Fibroblastlar ise iskele görevi görecek hücre dışı bileşenleri serbest bırakmaktadır.

Yara iyileşmesi dört adımdan oluşan dinamik bir süreçtir (tablo 2.3). Bu aşamalar: (i) hemostaz, (ii) inflamasyon, (iii) proliferasyon ve (iv) doku yeniden şekillenmesi olarak sıralanmaktadır. Bu fazlar ve bunların biyofizyolojik işlevleri, uygun sırada, doğru zamanda ve belirli bir süre boyunca optimal bir yoğunlukta devam etmelidir.

İlk aşama, bir yaralanma ve hemostaz karşısında anında tepki verilmesidir. Bu aşamada trombositler ve inflammatuar hücreler yara bölgesinde birikmektedir ve hücre dışı matriks (ECM) kollajenlerine bağlanmakta ve ardından fibronektin gibi bölgesel kanlanmayı arttıran pıhtılaşma faktörlerinin salınmasını uyarmaktadır (Ridiandries vd., 2018). Bu işlem pıhtılaşma ve vazokonstriksiyon (kan damarlarında meydana gelen daralma) olarak adlandırılır ve özetle bu işlem yara bölgesindeki kanamanın önlenmesini sağlamaktadır.

İkinci aşamaya inflammatuar aşama adı verilir ve yaralanmanın hemen ardından başlar. İnflamasyon aşaması 24 saat ila 4-6 gün arasında gerçekleşmektedir. İlk aşamada gerçekleşmesi söz konusu olan fibrin pıhtısı oluşumunun ardından ikinci aşama olan inflamasyonda kompleman sistemi aktivasyonu meydana gelmektedir (Muire vd., 2020). Nötrofiller, pıhtılaşma nedeniyle yara bölgesine göç etmektedir.

İnflamatuvar faz; hemostaz, kemotaksis ve artan damar geçirgenliği ile karakterize edilmektedir (Li vd., 2007). Daha fazla hasar oluşmasına engel olmak suretiyle parametreleri sınırlandırmakta ve yarayı kapatarak, hücresel atıkları ortadan kaldırıp hücre göçünü teşvik etmektedir. İnflamatuvar faz hemostaz ve kemotaksis ile başlamaktadır. Hem beyaz kan hücreleri hem de trombositler daha fazla aracı hücre ve sitokin salgılayarak iltihaplanma sürecini hızlandırmaktadır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün yanı sıra, diğer faktörler de kolajen bozulmasını, fibroblastların dönüşümünü, yeni damarların büyümesini ve yeniden epitelizasyonu teşvik etmektedir (Bartold ve Ivanovski, 2000).

Yara bölgesinde kan monositleri ve lenfositlerin doku makrofajlarına farklılaştığı; büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, fibroblastların, endotel hücrelerin ve keratinositlerin aktive olduğu bilinmektedir. Bu sayede söz konusu inflamatuvar aşamada nötrofiller ve makrofajlar tarafından yara yatağından tüm dış lezyonlar ve doku artıkları uzaklaştırılmakta ve enfeksiyon engellenmektedir (Wilkinson ve Hardman, 2020). Ek olarak sitokin ve enzimler sayesinde fibroblastlar ve miyofibroblastlar uyarılır ve damar geçirgenliğindeki artış (eksüda) yoluyla yara iyileşmesi için gerekli nem elde edilmektedir. Nem, özellikle yatak yaralarında kontrol altında tutulması gereken bir parametredir. Hafif ve orta derecede nemli bir ortamda friksüyon ve yırtılma ihtimali artmaktadır (Darby vd., 2014).

Yaralanmadan 2-3 gün sonra başlayan ve yara kapanana kadar devam eden üçüncü aşamaya proliferasyon evresi denmektedir. Epitelizasyon meydana gelir ve yeni granüler doku oluşmaktadır. Granüler doku yeni bir ECM geliştirmek üzere yara bölgesinde büyümeye başlar (Sorg vd., 2017). Fibroblast çoğalması ve kollajen birikimi bu aşamada meydana gelen temel olaylardır. Ayrıca, anjiyogenez süreci, yara bölgesine yeterli oksijen ve besin desteği sağlanmasını mümkün kılar. Bu evredeki hücresel ve biyokimyasal aktiviteler, yara dokusunun sağlam ve dayanıklı bir yapı kazanmasına katkıda bulunur.

Son aşama olan yeniden modelleme/onarım aşamasında ise, ECM'nin bileşiminin değiştiği ve kollajen tip III'ün yerini tip I'in aldığı rejenerasyon ve olgunlaşma meydana gelmektedir (Singh., 2023). Bu, yeni dokunun gerilme mukavemetinde bir artışa yol açmaktadır (Diller ve Tabor, 2022). Ayrıca, ECM'nin yeniden düzenlenmesi, hücre dışı sinyal yollarının stabilize olmasını ve dokunun mekanik

dayanıklılığının artmasını sağlar. Bu süreç, yara iyileşmesinin tamamlanması ve normal doku fonksiyonunun yeniden kazanılması için kritik bir adımdır.

Tablo 2.4 Yara iyileşmesinin 4 fazı

Faz	Tanım	Ana Olaylar ve Süreçler
Hemostaz Fazı	Yaranın hemen ardından gerçekleşen başlangıç aşamasıdır. Kanamanın durdurulması sağlanır.	Kan damarlarının kasılması trombosit agregasyonu ve pıhtı oluşumu, koagülasyon faktörlerinin aktivasyonu.
İnflamasyon Fazı	Yaranın iyileşme sürecinin başlangıç aşamasıdır. Yara bölgesinde inflamatuvar yanıt başlar.	Kan damarlarının genişlemesi ve permeabilitesinin artması, inflamatuvar hücrelerin (nötrofiller, makrofajlar) yara bölgesine göçü.
Proliferasyon Fazı	Yaranın iyileşme sürecinde ikinci aşamadır. Yeni doku oluşumu başlar.	Fibroblastların, kollajen ve diğer ekstraselüler matriks bileşenlerinin sentezi, kan damarlarının yeniden yapılanması, granülasyon dokusunun oluşumu.
Rejenerasyon Fazı	Yaranın iyileşme sürecinin son aşamasıdır. Yeni doku oluşumu devam eder ve yara alanı iyileşir.	Hücre proliferasyonu, doku yenilenmesi, epitel hücrelerinin yeniden yapılanması, doku iyileşmesi ve yara kontraksiyonu.

Tüm süreçler aynı anda ama senkronize bir şekilde gerçekleşmektedir. Serotonin ve histamin gibi araçlar trombositlerden salınarak hücreler arası iletişimi artırmaktadır (Davidson vd., 1985). Trombosit kaynaklı büyüme faktörü fibroblastları çeker ve dönüştürücü büyüme faktörüyle birlikte fibroblastların

bölünmesini ve çoğalmasını artırır; söz konusu durumda fibroblastlar da kolajen sentezlemektedir (Rodrigues vd., 2019). Bir yaralanma meydana geldiğinde ilk aşama lenfatik sıvı ve kanın dışarı akmasıdır. Bu işlem sırasında yeterli hemostaz sağlanmaktadır. Hemostaz hem dış hem de iç pıhtılaşma yollarını etkinleştirerek kan kaybının durdurulmasını sağlamaktadır. Nötrofiller, monositler ve endotel hücreleri gibi inflamatuvar hücreler, trombosit aktivasyonu ile oluşturulan fibrin iskelesine yapışır (Dehghani ve Panitch, 2020). Nötrofiller hücre artıklarının ve bakterilerin fagositozunu sağlayarak yaranın dekontaminasyonunu sağlamaktadır. Çoğalma veya granülasyon aşaması ayrı bir zamanda gerçekleşmez, arka planda her zaman devam etmektedir.

2.2.2 Standart Yara İyileşme Süreci

Yara iyileşmesini etkileyebilecek birçok faktör vardır. Söz konusu etki faktörleri tablo 2.5'te görülen bir veya daha fazla aşamaya müdahale etmektedir. Yara iyileşmesine müdahale edilmesi durumu doku onarımının yanlış veya bozuk olmasına neden olmaktadır. Akut yaralar ve kronik yaralar dahil olmak üzere, bozulmuş iyileşme sergileyen yaralar, genellikle normal iyileşme aşamalarında ilerleyememişlerdir. Bu tür yaralar sıklıkla ertelenmiş, tamamlanmamış veya koordinasyonsuz bir iyileşme süreci nedeniyle patolojik bir enflamasyon durumuna girmiştir (Zhao vd., 2016). Kronik yaralar; iskemi (özellikle beyine giden kan akışının zayıflaması), diyabet, venöz staz hastalığı, basınçla sebepli ülserler olarak sıralanabilmektedir.

Onarımı etkileyen faktörler lokal ve sistemik olarak kategorize edilmektedir. Lokal faktörler, yaranın kendi özelliklerini doğrudan etkileyen faktörler olarak tanımlanırken; sistemik faktörler, kişinin iyileşme yeteneğini etkileyen genel sağlık veya hastalık durumu şeklinde tanımlanmaktadır (Ernstmeyer ve Christman, 2023). Bu faktörlerin çoğu birbiriyle ilişkilidir ve sistemik faktörler, yara iyileşmesini etkileyen lokal etkiler yoluyla hareket etmektedir (Guo ve Dipietro, 2010). Lokal faktörlere örnek olarak enfeksiyon, yara kenarlarının kanlanma durumu ve yabancı cisimlerin varlığı verilebilir. Sistemik faktörler arasında diyabet, beslenme yetersizlikleri ve bağışıklık sisteminin durumu önemli rol oynamaktadır. Bu faktörlerin etkileşimi, yara iyileşmesinin hızını ve kalitesini belirlemede kritik bir öneme sahiptir.

Tablo 2.5 Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Yerel Faktörler	Sistemik Faktörler
Yara temizliği ve debridman	Beslenme durumu
Yara yatağının nem dengesi	Kan dolaşımı ve oksijenasyon
Enfeksiyon kontrolü	İmmün durum
Yara doku rejenerasyonu	Metabolik durum (örneğin, diyabet)
Yara bölgesinde kan akımı	Hormonal faktörler (örneğin, kortizol seviyeleri)
Yara bölgesinde oksijen seviyeleri	Medikal durum (örneğin, kanser, kronik hastalıklar)

Yara iyileşmesini etkileyen yerel faktörler (yani yaranın kendisiyle ilgili faktörler) ve sistemik faktörler (yani tüm vücutla ilgili faktörler) olarak özetlemektedir. Yara iyileşmesinin etkili bir şekilde gerçekleşmesi için hem yerel hem de sistemik faktörlerin uygun şekilde yönetilmesi önem arz etmektedir.

Hastanelerde yer alan yara bakım ünitelerinde karşılaşılan durumlarda yara bakımları pasif kapama ve aktif kapama sistemleri ile gerçekleştirilmektedir. Pasif kapama ürünlerine; kompozit örtüler (Prete vd., 2023), hidrokolloid örtüler, yapılandırıcı topikal formülasyonlar, alginat örtüler, greftler örnek verilebilir. Aktif kapama uygulamaları ise kök hücre tedavisi, topikal oksijen tedavisi şeklinde örneklendirilebilir (Froelich vd., 2023). Tüm bu uygulamaların ortak özellikleri; bakteriyel enfeksiyonlardan koruma, ısı ve sıvı kaybını önleme, kompresyon sağlama, çevre dokulara zarar vermeme şeklinde sıralanabilir.

Topikal (örn. jel, krem) tedavi ediciler söz konusu yara örtüleri gibi uygulamalar ile eş zamanlı veya topikal oksijen uygulaması ile takipli şekilde yara yüzeyine uygulanabilir (Stan vd., 2021). Söz konusu sinerjik uygulamaların yara iyileşme sürecini hızlandıracağı ön görülmektedir. Topikal uygulamaların eşlik ettiği tedavi

şekilleri veya doğrudan topikal uygulamalar ile gerçekleştirilen tedavi şekilleri mevcut tez çalışmasının başlıca amaçları arasında yer almaktadır. Son ürün olarak hazırlanmak istenen topikal krem formunda uygulanabilen, vazelin tabanlı bir formülasyondur.

2.2.3 Yara İyileşmesinde Kullanılan Doğal Polimerler

Doğal polimerler; hidrofiliklikleri, biyouyumlulukları, toksik olmamaları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, bulunabilirlikleri ve ekonomik verimlilikleri nedeniyle tıbbi ve farmasötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Aloe vera (Le vd., 2023), kitosan (Edo vd., 2024), kurkumin (Sohn vd., 2021), bal (Yasin vd., 2023), keratin, pektin (Zhang vd., 2022) ve propolis (Şuran vd., 2021) gibi bazı doğal polimerler doğal antibakteriyel aktiviteye sahiptir ve bu özellikleri onları yara pansuman uygulamaları başta olmak üzere tıbbi kullanım için ideal hale getirmektedir. Tablo 2.6’da sayılan doğal polimerlerin etki mekanizması ve özellikleri sunulmaktadır.

Tablo 2.6 Doğal polimerler ve etki mekanizmaları

Doğal Polimer Adı	Özellikleri	Etki Mekanizmaları
Kitosan	Biyouyumlu, biyobozunur, antimikrobiyal	Antimikrobiyal etki, hemostatik etki, hücre proliferasyonunu teşvik eder, büyüme faktörlerinin salınımını artırır.
Aljinat	Biyouyumlu, biyobozunur, yüksek jelleşme kapasitesi	Nemli iyileşme ortamı sağlar, hemostatik etki, hücre göçünü ve granülasyon dokusunu teşvik eder.
Hiyaluronik Asit	Biyouyumlu, biyobozunur, nem tutma kapasitesi yüksek	Nemli iyileşme ortamı sağlar, hücre göçünü ve proliferasyonunu teşvik eder, inflamasyonu azaltır.
Kolajen	Biyouyumlu, biyobozunur, hücre yapışmasını destekler	Hücre yapışmasını ve proliferasyonunu teşvik eder, yeni doku oluşumunu destekler, hemostatik etki.

Tablo 2.6 Doğal polimerler ve etki mekanizmaları (devamı)

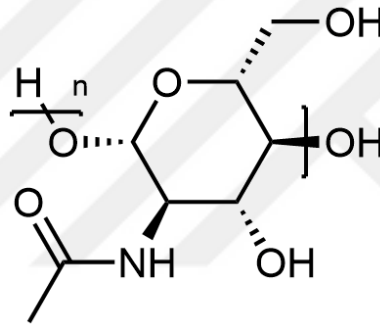
Doğal Polimer Adı	Özellikleri	Etki Mekanizmaları
Fibrin	Biyouyumlu, biyobozunur, hücre yapışmasını destekler	Doğal yara iyileşme sürecini taklit eder, hücre yapışmasını ve proliferasyonunu teşvik eder, hemostatik etki.
Selüloz	Biyouyumlu, biyobozunur, yüksek mekanik dayanıklılık	Nemli iyileşme ortamı sağlar, yara yüzeyini korur, biyobozunma ile kontrollü salınım sağlar.
Dekstran	Biyouyumlu, biyobozunur, suda çözünür	Hücre proliferasyonunu teşvik eder, inflamasyonu azaltır, nemli iyileşme ortamı sağlar.
Keratin	Biyouyumlu, biyobozunur, iyi mekanik özellikler	Hücre yapışmasını ve proliferasyonunu teşvik eder, yeni doku oluşumunu destekler, antimikrobiyal etki sergiler.
Elastin	Biyouyumlu, biyobozunur, esnek	Doku elastikiyetini artırır, hücre proliferasyonunu ve göçünü teşvik eder, yeni doku oluşumunu destekler.
Propolis	Antimikrobiyal, antienflamatuvar, antioksidan	Antimikrobiyal etki, inflamasyonu azaltır, hücre proliferasyonunu teşvik eder, yeni doku oluşumunu destekler.
Bal	Antibakteriyel, antioksidan, nemlendirici	Antibakteriyel etki, nemli iyileşme ortamı sağlar, inflamasyonu azaltır, hücre proliferasyonunu teşvik eder.

Yara iyileşmesinde, çeşitli yara yönetim stratejileri söz konusudur. Pansuman en sık kullanılan yara iyileştirme ve bakım yöntemlerindendir. Yara pansumanlarının hazırlanmasında birçok doğal ve sentetik polimer kullanılmaktadır. Doğal polimerler, erişim kolaylığı, toksik olmaması ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı

kullanılabilirliği sebebi ile sentetik polimerlerin yanı sıra tercih edilmektedir. Doğal polimerlerin kullanımını destekleyici nitelikte birkaç örnek şu şekildedir; kitosanın makrofaj fonksiyonunu etkilemesi ve bu sayede yara onarım sürecini hızlandırması (Sheokand vd., 2023; Zhang vd., 2023), aljinatın kanayan yaralarda hemostatik özellikler göstermesi (Liu vd., 2023), kolajenin ise çok miktarda su depolayabilme ve biyotaklit yeteneği sebebi ile yara tedavisinde kullanıldığı söylenebilir (Liu vd., 2020).

2.2.4 Kitosan Polimeri ve Yara İyileşmesi

Kitin ($C_8H_{13}O_5N$) bir glikoz türevi olan β -(1,4) bağlantılı *N*-asetil glukozaminin uzun zincirli bir polimeridir. Kitinin ana türevi olan kitosan, 1-4 glikozidik bağla bağlanan glukozamin ve *N*-asetil glukozamin birimlerinin bir kopolimerleridir (Elieh-Ali-Komi ve Hamblin, 2016).

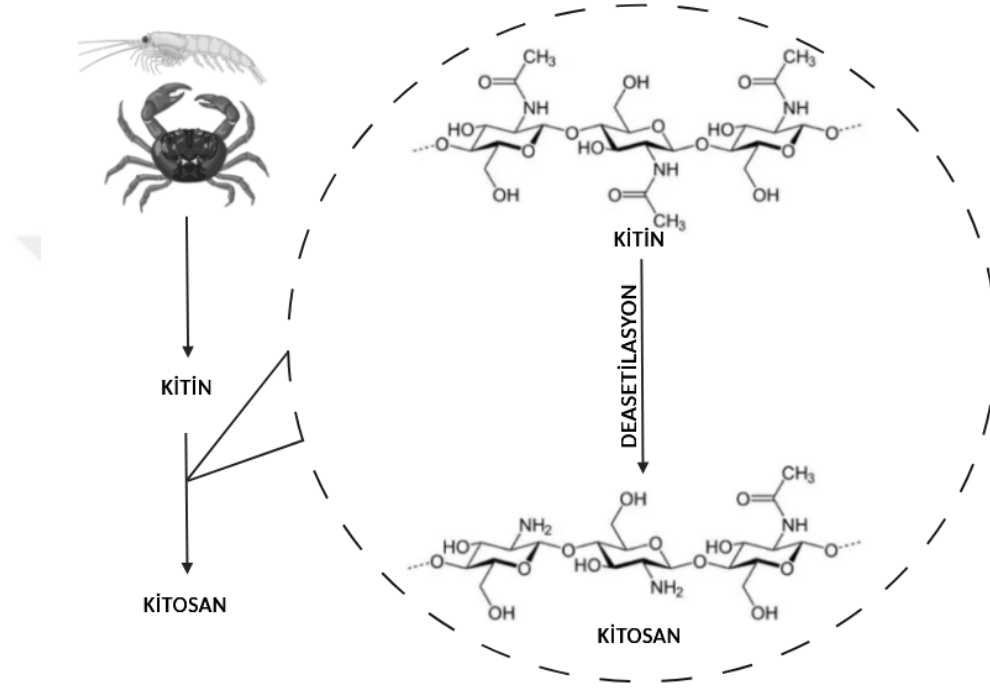


Şekil 2.5 Kitinin kimyasal yapısı

Kitin, doğada bulunan azotlu polisakkaritlerden biridir. Yengeç, istakoz ve karides gibi kabuklularda bulunan sert, yarı saydam bir maddedir. Kitin ayrıca istiridye ve kalamarda yüksek miktarda bulunmaktadır. Eklem bacaklıların dış iskeletlerinin ve bazı mantarların hücre duvarlarının temel bileşenidir.

Kitosan, şekil 2.5'te de gösterildiği gibi kitinin deasetilasyonu (şekil 2.6) ve bu deasetilasyonun derecesi ile karakterize edilerek elde edilmektedir. Fonksiyonel materyaller olarak kitin ve kitosan benzer özelliklere sahiptir. Kitin, genellikle çözünmeyen bir malzemedir ancak çözünür polimer olan kitosanı oluşturmak amacı ile deasetilasyona tabii tutulmaktadır (Piekarzka vd., 2023). Bu süreç, kitin molekülünde bulunan asetil gruplarının uzaklaştırılması yoluyla gerçekleştirilir ve sonuçta çözünür bir polimer olan kitosan elde edilir. Fonksiyonel materyaller olarak hem kitin hem de kitosan biyoyumlulukları, biyobozunabilirlikleri ve

antibakteriyel özellikleri sayesinde çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Özellikle kitosan, çözünürlüğü ve reaktivitesi nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemler, yara iyileştirici malzemeler ve çevre koruma uygulamaları gibi alanlarda kitinden daha üstün bir performans sergilemektedir. Deasetilasyon derecesi, kitosanın özelliklerini doğrudan etkileyen bir parametre olup, kitosanın uygulama alanlarının çeşitliliğini belirleyen önemli bir faktördür.

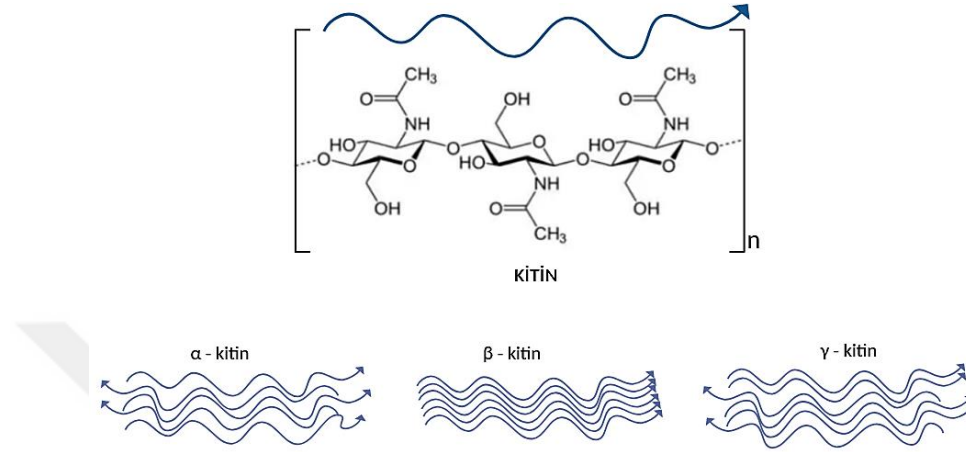


Şekil 2.6 Kitosan eldesinin şematik gösterimi

Kitin ve kitosaan oldukça yüksek biyoyumluluğa sahip biyopolimerlerdir. Bu özellikleri sebebi ile ilaç dağıtımı (Desai vd., 2023) doku mühendisliğinde hazırlanan iskeleler, biyoaktif pansumanlar gibi klinik uygulamalara yönelik kullanımlarına oldukça sık rastlanmaktadır (Azuma vd., 2014). Mevcut tez çalışmasında nanopartikülün kitosaan nanopartikül (CNP) kullanılmasının temel sebebi kitosaanın antimikrobiyal aktivitesi ve hızlandırılmış yara iyileştirme özelliğidir. Yüksek yara iyileştirme potansiyeline sahip kitin ve kitosaan, yara yönetimi için ilgi çekici biyopolimerlerden biridir.

Çeşitli kitin kaynakları, yapıları ve kitin içerikleri bakımından farklılık göstermektedir. Kitinin şekil 2.7’de de gösterildiği gibi α , β ve γ olmak üzere üç polimorfik forma sahiptir (Sulthan vd., 2023). En bol ve kolay erişilebilir form α -kitindir ve termodinamik olarak da karardır (Faria vd., 2016). Kitosaanın yara

iyileştirme sürecine katkısı, fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezini artırma yeteneği ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, kitin ve kitosanın biyobozunabilir yapısı, uzun süreli biyolojik güvenlik sunar ve toksik birikim riskini azaltır. Bu nedenle, kitosan nanopartiküller hem geleneksel yara yönetiminde hem de yenilikçi biyomedikal uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir.



Şekil 2.7 Kitinin polimorfik formlarının şematik gösterimi

Kabuklar, diğer iki ana bileşen olarak proteinler (%20-40) ve kalsiyum karbonat (%20-50) ile kitin (%15-40) içermektedir. Kitin üretiminin diğer olası kaynakları arasında yengeç, istiridye, böcekler ve mantarlar yer almaktadır. Selüloz, dekstran, pektin, aljinik asit, agar, agaroz ve İrlanda yosunu gibi doğal olarak mevcut olan polisakkaritlerin çoğu nötr veya asidik yapıdadır (Pellis vd., 2022). Buna karşın kitin ve kitosan oldukça bazik polisakkaritlerdir. Kitin oldukça hidrofobiktir, suda ve genel organik çözücülerde çözünmez; ayrıca oldukça kristalli yapısı da zayıf çözünürlüğünden sorumludur. Formik, asetik, laktik, pirüvik ve oksalik asitler gibi bazı organik asitler sıklıkla çözünmeyi kolaylaştırmak için kullanılmaktadır.

Kitin ve kitosanın biyoyoumlulukları yüksektir ve kabul edilebilir biyobozunma ürünleri olarak literatürde yer almaktadır (Simpson vd., 2019). Kitin ve kitosan yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Kitin ürünleri toksik ve alerjik olarak sınıflandırılmamaktadır; bunun sebebi bu biyopolimerin doğal olarak biyoyoumlu, biyobozunabilir olmasıdır. Kitin, daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi doğada kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarında, böceklerin dış iskeletlerinde ve mantar hücre duvarlarında bulunur ve bu nedenle biyolojik sistemlerle uyum içinde evrimleşmiştir. Ayrıca, kitin ve türevi olan kitosan, immünojenik tepkilere neden olmayan yapıları nedeniyle bağışıklık sistemi tarafından tolere edilebilmektedir.

Moleküler yapıları, zararlı metabolitlerin birikimine veya toksik ara ürünlerin oluşumuna yol açmaz. Özellikle kitosanın, deasetilasyon sürecinden sonra toksisitesinin oldukça düştüğü ve biyolojik sistemlerde kolayca parçalanarak metabolize edilebildiği bilinmektedir. Bu özellikleri, kitin ürünlerini güvenli biyomalzemeler haline getirir ve medikal uygulamalarda geniş kullanım alanı sağlamaktadır. Kitin ve onun deasetillenmiş formu olan kitosan hemostatik etki göstermektedir. Hemostatik etki yara iyileşmesi bölümünde de açıklandığı gibi mevcut tez çalışması kapsamında oldukça büyük önem arz etmektedir. Söz konusu özellik biyopolimerlerin kan pıhtılaşmasını destekleyici özelliklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Hemostatik etki, kanamanın durdurulması sürecinde kan damarlarının büzülmesi, trombositlerin bir araya gelerek pıhtı oluşturmaları ve fibrin oluşumu ile sağlanmaktadır. Kitin ve kitosan, özellikle kitosan, pozitif yüklü amin grupları içermektedir. Bu gruplar, kan plazmasındaki negatif yüklü hücrelerle (örn. trombositler ve kırmızı kan hücreleri) elektrostatik etkileşimler kurarak trombosit aktivasyonunu ve agregasyonunu teşvik eder. Bu süreç, kanın pıhtılaşma mekanizmasını hızlandırır ve kanamanın daha hızlı kontrol altına alınmasına yardımcı olur. Ayrıca, kitosanın yüksek yüzey alanı ve yapısal özellikleri, trombositlerin yapışmasını kolaylaştırır ve yara bölgesinde daha etkili bir hemostatik bariyer oluşumu sağlanır. Bu nedenle kitin ve kitosan, medikal alanda yara örtüleri, bandajlar ve cerrahi malzemeler gibi hemostatik ürünlerin geliştirilmesinde sıkça kullanılmaktadır. Kitin ve kitosan filamentler, toz, granül, sünger ve kompozit olarak halen kullanılmaktadır. Kitosan filamentleri, biyobozunabilir dikiş iplikleri olarak cerrahi uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu dikişler, yara iyileşmesi sırasında doğal olarak parçalanır ve çıkarılmasına gerek kalmaz. Kitosan tozları, özellikle diş hekimliğinde kanamayı durdurmak için kullanılmaktadır. Ayrıca, açık yaralar üzerine serpilerek hemostatik etki sağlamak amacıyla da yaygın olarak tercih edilir. Kitin ve kitosan granülleri, yara iyileşmesi sırasında kontrol edilen ilaç salımı sağlamak için kullanılmaktadır. Örneğin, antibiyotik veya büyüme faktörlerini içeren kitosan granülleri, enfekte yaraların tedavisinde etkilidir. Kitosan süngerleri, cerrahi müdahalelerde kanamayı kontrol altına almak ve yara iyileşmesini hızlandırmak için kitosan tozlarına benzer şekilde kullanılmaktadır. Bu süngerler, yüksek sıvı emme kapasitesine sahip olup biyobozunabilir özellikleri sayesinde vücutta güvenle kullanılabilir. Kitosan, diğer biyopolimerler veya seramik malzemelerle birleştirilerek doku

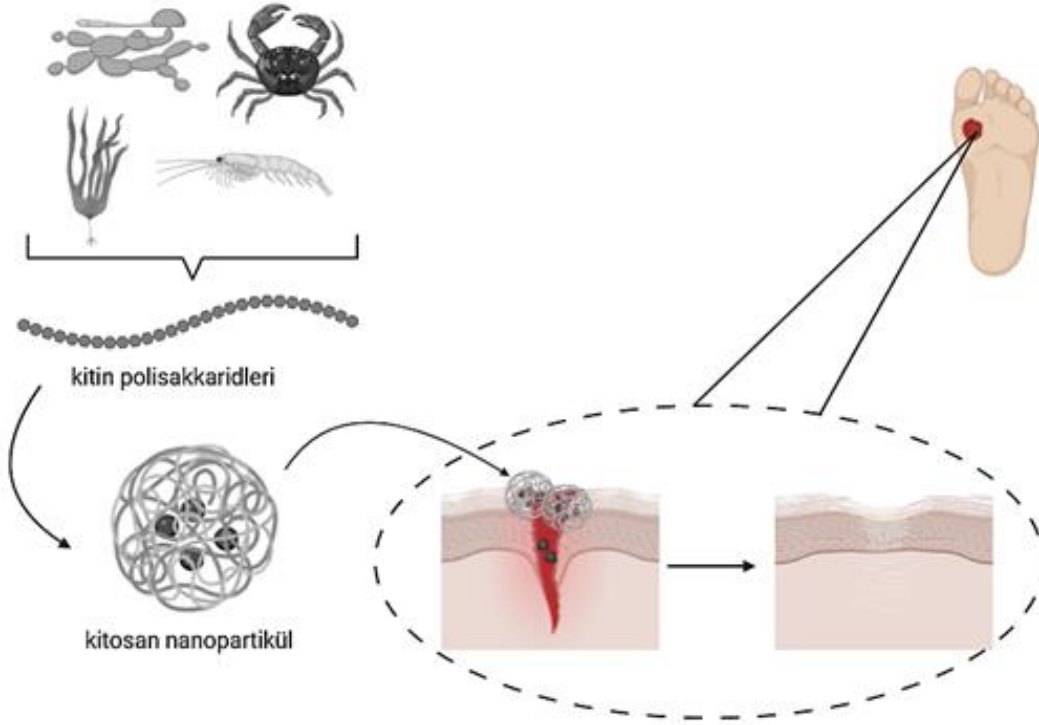
mühendisliği uygulamalarında kullanılan biyomalzemeler hazırlanmasında da kullanılmaktadır. Örneğin, kitosan-hidroksiapatit kompozitleri, kemik rejenerasyonu için ideal bir matris sağlamaktadır. Kitin ve kitosan bazlı materyallerin yara iyileşmesindeki ana biyokimyasal aktiviteleri polimorfonükleer hücre aktivasyonu, fibroblast aktivasyonu, sitokin üretimi, dev hücre göçü ve tip IV kollajen sentezinin uyarılmasıdır (Mezzana, 2008). Kitin ve kitosan, fibroblast proliferasyonunu başlatan, düzenli kollajen birikimine yardımcı olan ve yara bölgesinde artan düzeyde doğal hyaluronik asit sentezini uyaran *N*-asetil- β -D-glukozamini serbest bırakmak için yavaş yavaş depolimerize olmaktadır (Feng vd., 2021). Tıbbi uygulamalarda sık kullanılmasının bir diğer sebebi de vücut sıvılarında bulunan lizozim ve *N*-asetil glukozaminidaz gibi enzimlerin etkisi altında parçalanmaya yatkınlıklarından kaynaklanmaktadır. Kitoligomerler adı verilen bozunma ürünleri, makrofajları uyarabilir ve kollajen birikimini olumlu yönde etkileyebilir, böylece yara iyileşme sürecini hızlandırmaktadır (Arjun vd., 2023). Kitinin monomerik birimi *N*-asetilglukozamin, yara onarımında önemli olan hücre dışı bir molekül olan hyaluronik asit oluşumunu sağlamaktadır (Sharma ve Kishen, 2024). Bu nedenle kitin, hızlı dermal rejenerasyonu ve hızlandırılmış yara iyileşmesini teşvik etmek için uygun özelliklere sahiptir. Bu bağlamda mevcut çalışma kapsamında nano yapının temel bileşeni olarak tercih edilmiştir.

2.2.5 Kitosan Nanopartiküller ve Yara İyileşmesi

İlaç etken maddeler ve biyolojik maddeler için taşıyıcı olarak kullanılması da kitin ve kitosanın ilgi gören bir kullanımıdır. Literatürde kitosan nanopartiküllerin özellikle hedef etken maddelerin ilaç salımını, geçirgenliğini ve stabilitesini iyileştirdiği yönünde çalışmalar söz konusudur (Feng vd., 2021; Jhaveri vd., 2021). CNP sentezinin ilk adımları Calvo ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada parçacık boyutu ve dağılımının kontrolü olarak kitosan:TPP oranına odaklanılmaktadır (Calvo vd., 1997). Bununla birlikte, yaygın olarak kullanılan bu yöntem, kitosan ve TPP arasında kontrol edilemeyen molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanma eğilimidir (Bavel vd., 2023), bu da CNP'lerin toplanmasına, aşırı büyümesine ve yüksek çoklu dağılımına neden olmaktadır.

Kitosan nanopartiküller spesifik markerlar ile işlevselleştirilebilir ya da bir dizi terapötik madde ile hedeflenen dağıtıma izin verebilmektedir. Farmasötik kullanımları için kitosan; flavonoidler gibi faydalı kimyasal bileşiklerin alımını

arttırmak için uygulanabilmektedir. Örneğin, çay polifenollerinin kitosan nanopartiküllerine dahil edilmesinin, fenollerin emilimini ve biyoyararlanımını arttırdığına ilişkin çalışmalar mevcuttur. Şekil 2.8’de gösterildiği gibi CNP’ler etken madde taşıyabilen ve yara iyileşmesinde kullanılan doğal polimer türevli nanopartiküllerdir. Mevcut tez çalışmasında da seçilen biyoaktif bileşen kitosan nanopartiküller ile taşınmaktadır.



Şekil 2.8 Kitosan nanopartiküllerin kullanımının şematik gösterimi

Kitosan nanopartiküller, genellikle ilgilenilen polimer birimlerinin zıt yüklü bir molekül ile elektrostatik etkileşimler yoluyla çapraz bağlandığı iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanmaktadır (Motiei vd., 2020). Bahsi geçen kitosan nanopartikül sentezi için tripolifosfat (TPP) gibi bir anyonik çapraz bağlayıcı kullanılmaktadır. Mevcut çalışma kapsamında da çapraz bağlayıcı olarak TPP kullanımı tercih edilmiştir. Kitosan nanopartiküllerinin stabilitesi, çapraz bağlayıcı moleküller ve çevresel faktörlerle yakından ilişkilidir. TPP ile oluşturulan çapraz bağlar, nanopartiküllerin boyut, yüzey yükü ve morfolojik özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Nanopartikül sentezi sırasında pH ve iyonik kuvvet gibi parametrelerin dikkatlice optimize edilmesi, bu etkileşimlerin kontrol edilmesine ve nanopartiküllerin stabilitesinin artırılmasına katkı sağlayabilir. Kitosan nanopartiküllerin yara iyileştirme mekanizması tablo 2.7’deki gibi açıklanabilir:

Tablo 2.7 Yara iyileşme mekanizmalarına ilişkin adımlar

Adım	Açıklama
Antimikrobiyal Etki	Kitosan nanopartiküller yara bölgesindeki patojen mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilir. Bu, kitosanın doğal olarak antimikrobiyal özelliklere sahip olmasından kaynaklanır. Kitosan, pozitif yüklü amino grupları içerir ve negatif yüklü bakteri hücrelerine bağlanarak hücre duvarını bozar, bakteriyel büyümeyi inhibe eder ve enfeksiyon riskini azaltır (Yılmaz vd., 2020).
Hücre Proliferasyonu Teşviki	Kitosan nanopartiküller yara bölgesindeki hücre proliferasyonunu teşvik edebilir. Bu, kitosanın hücrelerin çoğalmasını ve yenilenmesini destekleyen uygun bir ortam sağlamasından kaynaklanır. Kitosan, hücrelerin adhezyonunu artırabilir ve büyüme faktörlerinin salınımını uyarabilir, böylece doku yenilenmesini hızlandırır.
Anti-inflamatuar Etki	Kitosan nanopartiküller inflamasyonu azaltabilir ve yara bölgesindeki inflamatuvar yanıtı kontrol altına alabilir. Kitosanın anti-inflamatuar etkisi, inflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltarak ve inflamasyon sürecini düzenleyerek gerçekleşir (Le vd., 2023). Bu, yaranın etrafındaki doku hasarını azaltır ve iyileşme sürecini hızlandırır.
Yara Yatağının Nem Dengesi	Kitosan nanopartiküller yara yatağının nem dengesini koruyabilir ve nemli bir iyileşme ortamı sağlayarak hızlı ve etkili bir iyileşme sağlayabilir. Kitosan, hidrofilik özelliklere sahiptir ve suyun emilimini artırabilir, böylece yara yüzeyinin nemli kalmasını sağlar (Ma vd., 2022). Nemli bir ortam, hücre migrasyonunu, doku yenilenmesini ve yara iyileşmesini destekler.
Biyoyapışkanlık	Kitosan nanopartiküller yara yüzeyine yapışarak bir bariyer oluşturabilir ve dış etkenlerin yara bölgesine girmesini engelleyebilir. Bu, kitosanın yüksek yapışkanlık özelliğinden kaynaklanır. Yara üzerinde bir bariyer oluşturarak, kitosan nanopartiküller yaranın iyileşme sürecini korur ve dış etkenlerin yaraya zarar vermesini önler.

2.3 Nanopartiküller

Nanoteknoloji, atom ve molekül gruplarının nanometre seviyesinde manipüle edildiği ortaya çıkan bir disiplinlerarası bilimdir. Nanoteknoloji kavramı ilk olarak 1959 yılında Richard Feynman tarafından ortaya atılmıştır. Terim, 1974 yılında Taniguchi tarafından tanıtılmış, stratejileri ise 1986 yılında E. Drexler tarafından tanımlanmıştır (Szczyglewska vd., 2023). Nanoteknolojinin eczacılık, fizik, biyoloji ve malzeme bilimi gibi alanlarda geniş bir potansiyeli vardır ve bunların bir araya gelmesi sağlık hizmetlerine katkıda bulunmaktadır.

Nanoteknoloji kavramı, sağlık araştırmalarında son otuz yıldır incelenmiş olsa da terapötik faydalar henüz tam olarak gerçekleştirilemediğinden, halen erken gelişim aşamasında olduğu düşünülmektedir. Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde; nanoteknolojinin özellikle ilaç taşıma ve tanıdaki uygulamalarda sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Nanoteknoloji ilaç taşıma, görüntüleme ve hatta cerrahide hayati bir rol oynayabilir. Nanopartikül sistemler, proteinler, reseptörler, DNA ve RNA gibi biyolojik moleküllerin boyutuna benzer bir boyut aralığına sahip olduğu için bu alanlarda önemli bir potansiyel taşımaktadır (Manzanares ve Ceña, 2020). Nanopartiküller, ilaç taşıma sistemleri ve tanı uygulamalarında, özellikle hastalık tedavisi ve tanısında sağladıkları birçok avantajlı özellik nedeniyle tercih edilmektedir. Ayrıca, nanopartiküllerin geniş yüzey alanı-hacim oranı, aktif hedefleme için spesifik moleküllerin bağlanmasına imkân sağlamaktadır. Spesifik antikorlar veya peptitler ile yüzey modifikasyonu yapılarak doku hedeflemesi gerçekleştirilebilir, bu da spesifik olmayan hedef dışı toksisite riskini azaltır (Sun vd., 2023). Ayrıntılı olarak açıklanan avantajlar göz önünde bulundurularak, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) bazı nanopartikül formülasyonlarını hastalık tedavisinde kullanılmak üzere onaylamıştır. FDA'nın yalnızca bazı nanopartikül formülasyonlarını onaylamasının temel sebebi, bazı deneysel nanopartikül sistemlerin spesifik olmayan inflamatuvar yanıtlar oluşturduğu ve immünomodülatör özelliklere sahip olduğunun bilinmesidir (Mitchell vd., 2021).

Nanopartiküllerin kontrollü salım mekanizmaları ve biyoyumluluk özellikleri, bu sorunların üstesinden gelinmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca, onaylanan nanopartikül formülasyonları, hedef bölgedeki ilaç etkinliğini artırırken sistemik yan etkileri önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu özellikleri, nanopartikülleri geleneksel

ilaç taşıma yöntemlerine kıyasla daha güvenli ve etkili hale getirmektedir. Güvenlik ve etkililik parametrelerinin yanı sıra nanopartiküller boyut, şekil, yapı gibi sınıflandırma kriterlerine göre tablo 2.8’de görüldüğü gibi sınıflandırılabilir. Söz konusu bu sınıflandırma sonucu meydana gelen ürünler güvenlik ve etkinlik ile birlikte değerlendirildiğinde çok daha iyi sonuç alınması beklenmektedir. Nanopartikül içeren formülasyonların güvenli olarak kabul edilmesi ilerleyen süreçlerde kullanım sıklığının artabilmesi için önemli bir sınırlayıcı etkidir. Doğrudan bir tedavi edici ürün olmasının yanında destekleyici tedavi unsuru olması için de aynı sınırlılıklar söz konusudur.

Tablo 2.8 Sınıflandırma kriterlerine göre nanopartiküller

Kriterler	Kategori	Özellikler
Boyut	Nano boyut aralığı	<100 nm: Altın nanopartiküller, gümüş nanopartiküller. 100-500 nm: Poli(laktik asit) nanopartiküller. >500 nm: Karbon nanotüp.
Şekil	Şekil	Küresel: Altın nanopartiküller, gümüş nanopartiküller. Silindirik: Titanyum dioksit nanopartiküller. Yassı: Grafen oksit nanopartiküller.
Yapı	Yapı	Düzgün yapı: Altın nanopartiküller, gümüş nanopartiküller. Kaba yapı: Silika nanopartiküller. Poröz yapı: Poli(laktik asit) nanopartiküller.
Yüzey Özellikleri	Yüzey yükü	Negatif yük: Poli(laktik asit) nanopartiküller. Pozitif yük: Altın nanopartiküller. Nötr yük: Karbon nanotüp.
	Yüzey fonksiyonelleştirme	Amino fonksiyonel gruplar: Kitosan nanopartiküller. Karboksil gruplar: Grafen oksit nanopartiküller. Sulfhidril gruplar: Gümüş nanopartiküller.
	Hidrofiliklik/hidrofobiklik	Hidrofilik: Poli(laktik asit) nanopartiküller. Hidrofobik: Karbon nanotüp.
	Biyouyumluluk	Biyouyumlu: Titanyum dioksit nanopartiküller. Biyouyumsuz: Silika nanopartiküller.

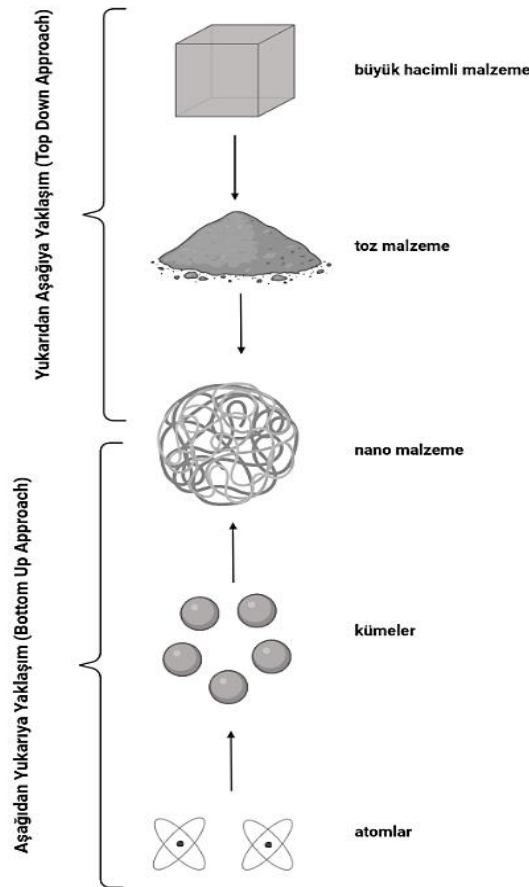
Tablo 2.8 Sınıflandırma kriterlerine göre nanopartiküller (devamı)

Kriterler	Kategori	Özellikler
	Hedefe yönlendirilmiş ilaç salınımı	Hedefe yönlendirilmiş ilaç salınımı: Kitosan nanopartiküller. Hedefe yönlendirilmemiş ilaç salınımı: Poli(laktik asit) nanopartiküller.
	Hedefe yönlendirilmiş hücre hedefleme	Hedefe yönlendirilmiş hücre hedefleme: Altın nanopartiküller. Hedefe yönlendirilmemiş hücre hedefleme: Silika nanopartiküller.

2.3.1 Polimerik Nanopartiküllerin Laboratuvar Ölçeğinde Hazırlanması

Nanopartikül sentezi şekil 2.9’da da gösterildiği gibi temelde iki kategoriye ayrılmaktadır:

1. Aşağıdan yukarıya yaklaşım (İng.: bottom up approach)
2. Yukarıdan aşağıya yaklaşım (İng.: top down approach)



Şekil 2.9 Nanopartikül sentezinin temel iki kategorisi

Nanopartiküllerin sentezi ile ilgili en önemli nokta sentez işlemi sona erip boyut ölçümü sağlandığında üretilen nanopartiküllerin boyutlarının, 1-100 nm aralığında olmasıdır. Nanopartikül sentezi için seçilen yöntemi etkileyen değişkenlerden birkaçı; şekil, saflık, verim, boyut dağılımı, yüzey modifikasyonları şeklinde sıralanabilir (Harish vd., 2022). Endüstriyel ölçekli üretim ve küçük ölçekli laboratuvar sentezi, çeşitli yaklaşımlar gerektirebilmektedir.

Büyük hacimli malzemelerden nanoyapılar üretilmesi amacı ile yukarıdan aşağıya yaklaşım veya boyut küçültme teknikleri kullanılabilmektedir. Miktar olarak fazla malzemenin sentezlenebilmesinden dolayı yukarıdan aşağıya yaklaşım uygun üretim prosedürleri kapsamında tercih edilmektedir. Bu yaklaşımda, aşağıdan yukarı yaklaşıma kıyasla boyut ve şekil kontrolü daha zordur. Yukarıdan aşağıya üretim yaklaşımında, hücre içi veya hücre dışı biyolojik engellerin aşılması gibi biyolojik fonksiyonlar için gerekli malzeme özelliklerinin hedeflenmesi temel amaçtır (Waheed vd., 2022). Yukarıdan aşağıya yaklaşımın tercih edilmesinin önemli sebeplerinden biri, üretilen malzemelerin kolaylıkla değiştirilebilir unsurlara sahip olmasıdır. Parçacık imalatında kullanılan polimer bileşimi, oluşturulan parçacıkların boyutu, şekli ve kapsüllenmiş aktif ilaç veya görüntüleme maddeleri değiştirilebilen unsurlardan birkaçıdır. Değiştirilebilen unsurlar sayesinde, parçacık yapısı-aktivite ilişkileri doğrudan incelenebilir veya farklı patolojilerin ve hastalıkların hedeflenmesine olanak sağlayabilmektedir. Bununla birlikte, yukarıdan aşağıya üretim yaklaşımının, büyük üretime ölçeklendirilmesi aşağıdan yukarıya yaklaşıma kıyasla daha zor olarak nitelendirilmektedir.

Aşağıdan yukarı yaklaşım kapsamında sentezlenen nanoyapılar; atom, molekül veya molekül kümesi gibi daha küçük başlangıç materyallerin bir araya gelmesi sonucunda oluşmaktadır. Van der Waals kuvvetleri ve elektrostatik etkileşimler sayesinde bahsi geçen atomlar veya moleküller nanometre boyutunda parçacıklar halinde birleşebilmektedir (Chai vd., 2022). Aşağıdan yukarıya yaklaşımın temel avantajları geniş bir yelpazede nanopartiküllerin üretilmesi ve üretilen nanopartiküllerin daha homojen bir partikül boyutu dağılımına sebep olmasıdır. Bu yaklaşım kapsamında gerçekleştirilen reaksiyonlar, koşulları ve reaksiyon içindeki malzemelerin özellikleri kontrol edilebildiği için hem laboratuvar hem de endüstriyel ölçekte tercih edilmektedir. Bahsi geçen özellikler sayesinde kendi kendine birleşme ile üretim ölçeği büyütülebilir, partikül iç yapısı üzerinde kontrol

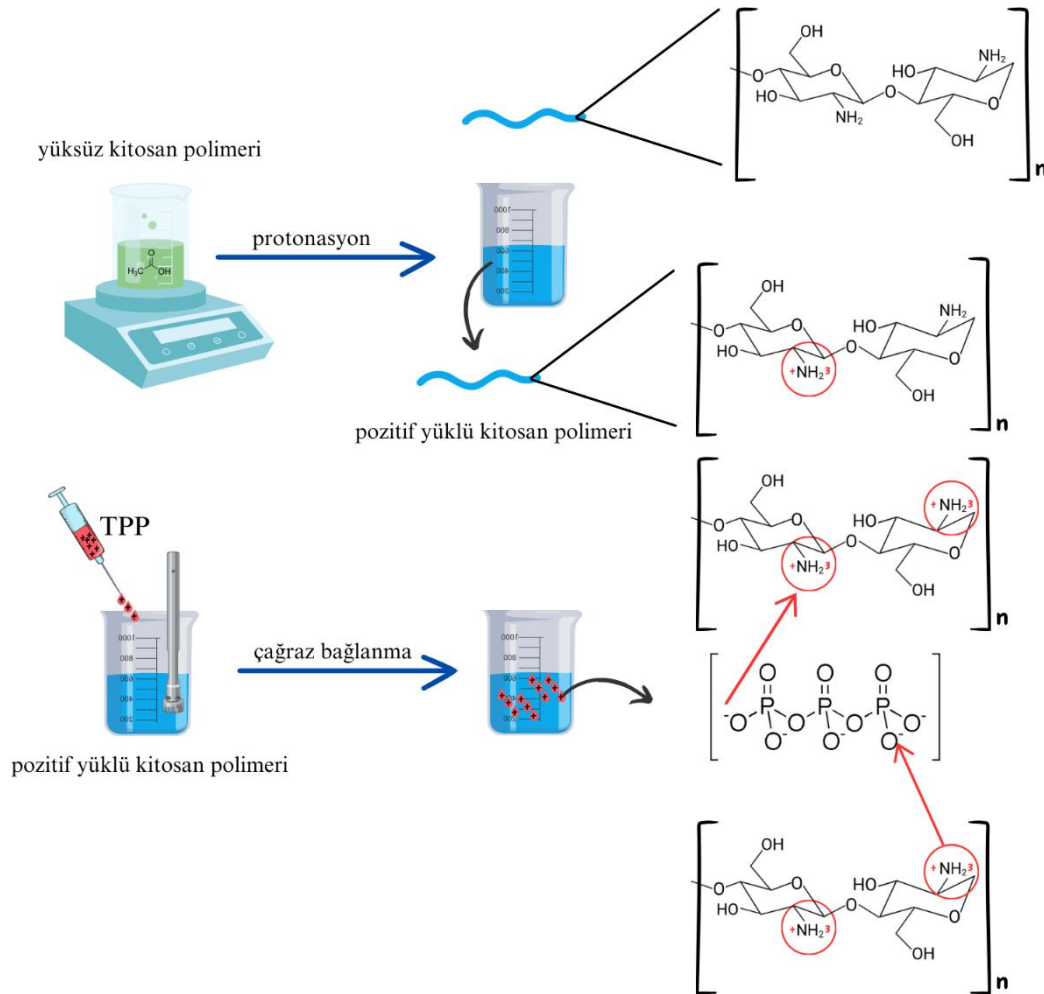
sağlanabilir. Fakat pH, çözücü, sıcaklık ve tuz miktarı gibi işleme koşulları; sentez sonucunda nano yapının sahip olduğu şekil veya morfoloji aralığı açısından sınırlamalara neden olabilmektedir (Quintanilla-Sierra vd., 2019). Her iki yaklaşım da parçacık boyutu ve parçacık şeklinde büyük bir öneme sahiptir. Yaklaşımlar arasındaki farklılıklar tablo 2.9'daki gibi özetlenebilmektedir. Sebebi, biyolojik etkinliği belirleyen çeşitli etkileşimlerde sentezlenen nanopartiküllerin anahtar faktör olarak belirlenmesidir. Literatür taraması kapsamında elde edilen bilgiler ışığında, dolaşım süresinin ve biyolojik dağılımın parçacık morfolojisinden büyük ölçüde etkilendiği sonucu elde edilmiştir.

Tablo 2.9 Aşağıdan yukarıya yaklaşım ve yukarıdan aşağıya yaklaşımın karşılaştırılması

Yaklaşım	Aşağıdan Yukarıya Yaklaşımı	Yukarıdan Aşağıya Yaklaşımı
Tanım	Büyük moleküller veya bileşenlerin bir araya getirilmesiyle sentez gerçekleştirilir.	Büyük yapılardan küçük bileşenler oluşturularak nano boyutta sentez yapılır.
Sentez Mekanizması	Başlangıç malzemeleri nano boyuta küçültülerek birleştirilir ve nanopartiküller oluşturulur.	Moleküler birimler kimyasal ve fiziksel yöntemlerle bir araya getirilerek nanopartiküller elde edilir.
Örnek Metotlar	Sol-jel yöntemi, hidrotermal sentez, aerosöl yöntemi, kimyasal sentez gibi yöntemler kullanılır.	Kimyasal çöktürme, sıvı faz ve gaz fazı reaksiyonları, elektron ışını litografisi gibi teknikler kullanılır.
Kontrol Edilebilirlik	Kontrol edilmesi zor olup, üretilen yapıların homojenliği düşük olabilir.	Yüksek kontrol edilebilirlik sağlar, istenen boyut ve şekil elde edilebilir.
Uygulamalar	Yarı iletken üretimi, elektrokimyasal malzemeler, katalizörler.	Nano boyutlu kaplamalar, ilaç taşıyıcıları, biyomedikal görüntüleme, optoelektronik cihazlar, nanoteknolojik malzemeler.

2.3.2 İyonik Jelasyon Yöntemi

İyonik jelasyon yöntemi çalışma kapsamında TPP varlığından, kitosan nanopartikülleri sentezlenmektedir. Calvo ve ekibi 1997 yılında gerçekleştirmiş oldukları çalışmada; pozitif yüklü kitosan amino gruplarının, negatif yüklü fosfat grupları varlığında çapraz bağ oluşturarak hidrojel yapı oluşturduğunu (Rodrigues vd., 2012) ve karışımı her bir reaktif için belirli bir konsantrasyon aralığında sürekli karıştırarak, nanopartiküllerin kendiliğinden ortaya çıktığını gözlemlemiştir (Mikušová ve Mikuš, 2021).



Şekil 2.10 Kitosan ve çapraz bağlayıcı arasında gerçekleşen iyonik jelasyon reaksiyonu

Şekil 2.10’da gösterilen bu yöntemin temel mekanizması, kitosanın pozitif yüklü birincil amin grupları ile negatif yüklü polianyon grupları arasındaki elektrostatik etkileşime dayanmaktadır. TPP ile fiziksel çapraz bağlanma yöntemi, kimyasal bağlanmalara kıyasla olası yan etkileri ve toksisite riskini en aza indirmektedir.

Yüksüz durumda olan kitosanın; asetik asit gibi bir çözücü içerisinde çözündürülerek pozitif yüklenmesi ile iyonik jelasyon yöntemi başlamaktadır. Pozitif yük kazanan kitosan polimerine, çapraz bağlayıcı rol üstlenen TPP gibi anyonik gruplara sahip bir çapraz bağlayıcı, manyetik karıştırıcıda damla damla enjektör aracılığı ile eklenmektedir ve bu işlem sonucunda çapraz bağlı CNP'ler oluşmaktadır. Reaksiyona girmemiş kitosan polimerleri ve fazla çapraz bağlayıcı anyonik grupların uzaklaştırılması amacıyla santrifüjleme ve yıkama işlemleri uygulanır. İyonik jelasyon yöntemi için en çok kullanılan polimerler kitosan ve alginat olarak literatürde yer almaktadır (Hoang vd., 2022). Ek olarak gellan gum, fibrin, kollajen, jelatin, hyaluronik asit, dekstran, pektin ve karboksimetil selüloz gibi diğer polimerler de iyonik jelasyon yönteminde kullanılabilir (Gadziński vd., 2022). Mevcut tez çalışmasında iyonik jelasyon yöntemi için tercih edilen polimer kitosandır.

2.4 Nanopartikül Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

Nanopartikül karakterizasyonu, nanopartiküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirlemek için çeşitli tekniklerin ve yöntemlerin kullanıldığı bir süreçtir. Bu karakterizasyon yöntemleri, nanopartiküllerin boyutu, şekli, yüzey özellikleri ve dağılımı gibi parametreleri değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Mikroskopi teknolojisi, morfolojik özelliklerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir karakterizasyon yöntemidir. Nanopartiküllerin yüzey morfolojisini ve topografisini incelemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) yaygın olarak tercih edilmektedir (Ponce vd., 2012).

Spektroskopik teknikler, UV-Vis spektroskopisi ve Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) olmak üzere iki grupta incelenebilir. UV-Vis spektroskopisi, nanopartiküllerin optik özelliklerini ve absorpsiyon spektrumlarını incelemek için kullanılırken, FT-IR ise nanopartiküllerin kimyasal bağ yapılarını ve fonksiyonel gruplarını belirlemek amacıyla tercih edilmektedir.

Nanopartiküllerin boyutu, özellikle medikal uygulamalar gibi kullanım alanlarına bağlı olarak büyük önem taşımaktadır. Boyut dağılımı ve zeta potansiyeli, dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile belirlenmektedir. DLS yöntemi, ayrıca nanopartiküllerin hidrodinamik çapını belirlemek için de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Carvalho vd., 2018). Zeta potansiyeli analizi, elektroforetik

hareketlilik ile doğrudan ilişkilidir. Nanopartiküllerin yüzey yükü ve elektroforetik hareketliliği, elektroforetik teknikler ile belirlenebilir. Genellikle ± 30 mV değerinin dışındaki zeta potansiyelinin, nanopartiküllerin stabilitesini artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca, zeta potansiyel değeri, etken maddenin nanopartikül yüzeyine adsorbe edilip edilmediğinin belirlenmesine de yardımcı olmaktadır.

2.4.1 UV-Vis Spektrofotometre

UV-Vis spektroskopisi, ultraviyole ve görünür (200-800 nm aralığı) ışık spektrumlarını kullanarak bir örneğin ışığı absorplama veya geçirme özelliklerini inceleyen bir tekniktir (Wiegand vd., 2014). Nanopartikül çalışmalarında UV-Vis spektroskopisi, çeşitli özellikleri belirlemek ve karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

UV-Vis spektroskopisinin temel prensipleri absorpsiyon ve spektrum olarak ikiye ayrılabilir. Bir örnek, belirli dalga boylarındaki ışığı absorbe etmektedir. UV-Vis spektrumu ise nanopartikül örneğinin farklı dalga boylarında ne kadar ışık absorbe ettiğini veya geçirdiğini göstermektedir. Bu spektrum, örneğin kimyasal yapısı ve ortamı hakkında bilgi sağlamaktadır (Rizwan ve Gwenin, 2021).

UV-Vis spektroskopisi, Lambert-Beer Kanunu'na dayanarak nanopartikül çözeltilerinin konsantrasyonunu belirlemek için kullanılabilir. Bu kanuna göre, bir çözeltinin absorpsiyonu, çözeltinin konsantrasyonu ve optik yol uzunluğu ile orantılıdır (Jeong vd., 2007).

UV-Vis spektroskopisi, nanopartiküllerin boyut, şekil, konsantrasyon, kimyasal bileşim, stabilite ve agregasyon gibi çeşitli özelliklerini incelemek için güçlü ve yaygın olarak kullanılan bir teknik olarak çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu yöntem, hızlı ve hassas ölçümler sağlayarak nanopartikül araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır.

2.4.2 Nanopartikül Boyutunun Belirlenmesi ve Zeta Potansiyeli Ölçümü

Zeta ölçüm cihazı, dinamik ışık saçılımı (DLS) ve elektroforetik ışık saçılımı (ELS) prensiplerine dayanan bir cihazdır ve partikül boyutu ile zeta potansiyelini ölçmek için kullanılmaktadır (Bhattacharjee, 2016). Zeta ölçüm cihazı ile partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümü hakkında karşılaştırmalı bilgiler tablo 2.10'da verilmiştir. Nanopartiküllerin zeta potansiyelleri yüzey absorpsiyonuna ilişkin ayrıntılı bilgi sağlamaktadır.

Tablo 2.10 DLS ve ELS ölçümlerinin teorik karşılaştırılması

Özellik	Parçacık Boyutu Ölçümü	Zeta Potansiyeli Ölçümü
Prensip	Dinamik Işık Saçılımı (DLS)	Elektroforetik Işık Saçılımı (ELS)
İşleyiş Mekanizması	Brownian hareketi nedeniyle hareket eden partiküllerin saçtığı ışık analiz edilir	Elektrik alan altında hareket eden yüklü partiküllerin saçtığı ışık analiz edilir
Ölçüm Süreci	1. Çözelti hazırlanır	1. Çözelti hazırlanır
	2. Lazer ışını gönderilir	2. Elektrik alan uygulanır
	3. Saçılan ışık toplanır ve otokorrelasyon fonksiyonu hesaplanır	3. Partiküllerin hareketi ve saçılan ışık izlenir
Veri Analizi	Otokorrelasyon fonksiyonu kullanılarak partiküllerin hidrodinamik çapı belirlenir	Elektroforetik hareketlilik ölçülür ve zeta potansiyeli hesaplanır
Elde Edilen Bilgiler	Partiküllerin ortalama boyutu (hidrodinamik çap) ve dağılımı	Partiküllerin yüzey yükü ve elektrostatik stabilitesi
Avantajlar	- Hızlı ve tekrarlanabilir ölçümler	- Yüzey yükü ve stabilite hakkında bilgi sağlar
	- Çeşitli çözeltilerde kullanılabilir	- Agregasyon eğilimi ve kolloidal stabiliteyi değerlendirir
	- Nanometre boyut aralığındaki partiküller için uygundur	- Kolloid, emülsiyon ve nanopartikül süspansiyonlarının analizinde yaygın olarak kullanılır
Uygulama Alanları	Farmasötik endüstri, nanoteknoloji, gıda endüstrisi, malzeme bilimi	Farmasötik endüstri, nanoteknoloji, gıda endüstrisi, malzeme bilimi

2.4.3 FT-IR

FT-IR, nanopartikül araştırmalarında önemli bir analiz tekniğidir ve nanopartiküllerin kimyasal, yüzey ve yapısal özelliklerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ma vd., 2021). FT-IR spektrumları, örneğin

nanopartiküllerin içerdiği kimyasal grupları, kaplama malzemelerini, yüzey modifikasyonlarını ve etkileşimlerini belirlemek için değerli bilgiler sağlamaktadır. Bu teknik, özellikle nanopartikül sentezi, kaplama, fonksiyon kazandırma ve etkileşim çalışmalarında önemli bir araçtır ve nanoteknoloji, malzeme bilimi, biyoteknoloji ve çevre bilimi gibi çeşitli alanlarda geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Nanopartiküllerin özelliklerinin anlaşılması ve kontrol edilmesi, çeşitli endüstriyel ve biyomedikal uygulamalarda ilerlemeler sağlamak için kritiktir ve FT-IR, bu hedefe ulaşmada değerli bir araç olarak kabul edilmektedir. FT-IR'ın nanopartikül çalışmalarında kullanımı şu şekilde listelenebilir: Nanopartiküllerin kimyasal bileşimini belirlemek için kullanılabilir, nanopartiküllerin yüzey özellikleri, reaktifler veya kaplama maddeleri kullanılarak değiştirilebilir, FT-IR, yüzey modifikasyonu işlemlerinin etkinliğini ve sonuçlarını değerlendirmek için kullanılabilir (Ran vd., 2021). Nanopartiküllerin diğer bileşenlerle etkileşimlerini değerlendirmek için de FT-IR kullanılabilir (Mourdikoudis vd., 2018) ayrıca nanopartiküllerin iç yapıları ve kristallikleri de FT-IR ile değerlendirilebilir (Oh vd., 2005).

2.4.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), nanopartikül çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir görüntüleme tekniğidir. SEM, yüksek çözünürlüklü 3 boyutlu görüntüler elde etmek için kullanılmakta ve nanopartiküllerin morfolojisi, boyutu, şekli ve dağılımı gibi özelliklerini incelemek için ideal kabul edilmektedir (Ersen vd., 2015). Bu teknik, özellikle nanopartikül sentezi ve karakterizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. SEM ile elde edilen görüntüler, nanopartiküllerin topografik detaylarını ve yüzey özelliklerini belirlemeye yardımcı olmaktadır (Rydz vd., 2019). Ayrıca, nanopartiküllerin etkileşimleri, agregasyon durumu ve dağılımı gibi özelliklerin değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır.

2.4.5 Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar ortamında kontrollü koşullar altında büyütülmesi ve çoğaltılması süreci olarak tanımlanmaktadır. Hücre kültürü, primer hücre kültürleri ve sürekli bölünebilen hücre hatları olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır (Verma vd., 2020). Kültür ortamı genellikle besin maddeleri, vitaminler, amino asitler, serum, büyüme faktörleri ve hormonlar içermektedir.

Hücreler, çeşitli ek içeriklere sahip besi ortamlarında optimal büyümenin sağlanabilmesi için 37°C, %5 CO₂ ve nemli bir ortamda inkübe edilmektedir (Hudu vd., 2016) ve inkübasyon işlemi özel etüvlerde, inkübatörlerde gerçekleştirilmektedir. Hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştığında pasajlanarak yeni kültür kaplarına aktarılmaktadır, *in vitro* çalışmalara hazırlık sürecinde oldukça önemli bir adım pasajlamadır (Guo vd., 2023). Uzun süreli saklama için hücreler, %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren fetal sıgır serumu (FBS) ile dondurularak -80 °C'de veya sıvı azotta muhafaza edilmektedir. Hücre kültürü çalışmaları ilaç keşfi, toksisite testleri, genetik araştırmalar, kanser araştırmaları ve biyomateryal değerlendirmelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmalar, *in vivo* sistemlerin karmaşıklığını (Aoki vd., 2005) tam olarak yansıtmaya da kontrollü ve tekrarlanabilir sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında hücre sayımı yapmak; kültürdeki hücre yoğunluğunu belirlemeye yardımcı olur, bu da deneysel prosedürlerde gerekli hücre sayısının temin edilmesini ve aşırı veya yetersiz hücre yoğunluğunun önlenmesini mümkün kılar. Aynı zamanda, farklı deneyler arasında tutarlılığı sağlamak için de önemlidir; aynı hücre sayısıyla başlamak, deney sonuçlarının karşılaştırılabilir olmasını sağlamaktadır. Hücre sayımı, hücrelerin sağlık durumu ve canlılığı hakkında bilgi verir. Tripan mavisi gibi boyalar kullanılarak yapılan sayımlarda, canlı hücreler renksiz, ölü hücreler ise mavi olarak görülmektedir. Bu sayede hücre kültürünün genel durumu ve uygun besleme koşulları değerlendirilebilmektedir.

Hücrelerin büyüme hızını ve çoğalma oranını takip etmek için de hücre sayımı yapılır. Bu bilgiler, hücre kültürünün optimal büyüme koşullarını belirlemek ve gerektiğinde ayarlamalar yapmak için kullanılmaktadır. Ayrıca, spesifik deneyler için gerekli olan hücre sayısını belirlemek amacıyla da hücre sayımı yapılmaktadır. Örneğin, sitotoksisite ve genotoksisite testleri için belirli bir hücre sayısına ihtiyaç duyulur ve bu sayı, hücre sayımı ile belirlenir. Son olarak, hücrelerin belirli bir yoğunluğa ulaştığında geçişi veya alt kültürlenmesi gerekmektedir. Hücre sayımı, bu geçişlerin doğru zamanlamasını sağlar ve hücrelerin aşırı büyümesinin veya besin tükenmesinin önüne geçmektedir.

2.4.5.1 L929 Fibroblast Hücre Hattı

L929 fibroblast hücre hattı (şekil 2.11), fare bağ dokusundan türetilmiş ve biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır. Bu fibroblast hücreleri, monolayer olarak büyür ve hızlı proliferasyon göstermektedir (Torabi vd., 2023). Genellikle DMEM ortamında %5-10 FBS eklenerek kültüre edilmek suretiyle sitotoksikite testleri, genetik ve biyokimyasal araştırmalar, kanser araştırmaları, immünoloji çalışmaları ve viral üretim gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır. L929 hücreleri, genellikle 37°C, %5 CO₂ ortamında inkübe edildikten sonra belirli bir yoğunluğa ulaştığında pasajlanmaktadır (Liu vd., 2023). Söz konusu hücre hattının avantajları arasında kolay kültürlenebilirlik ve hızlı çoğalma yer almaktadır.



Şekil 2.11 L929 hücre hattı mikroskop görüntüsü (x5 büyütme)

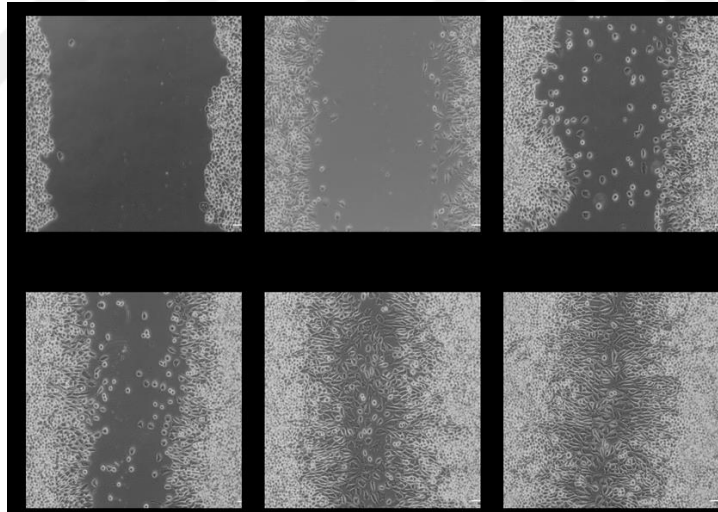
2.4.6 MTT Testi

Hücre kültüründe MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi, hücrelerin metabolik aktivitesini ve hücre canlılığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir biyolojik testtir (Freimoser vd., 1999). Bu test, hücrelerin içinde bulunan mitokondriyal indirgenmiş tetrazolium tuzunu indirgeyerek formazan adı verilen renkli bir ürüne dönüştürmesi prosesine dayanmaktadır. Canlı hücrelerin metabolik aktivitesi arttıkça, MTT tuzu formazana dönüşür ve bu da mor renkli bir ürün oluşturur. MTT testi, hücrelerin canlılığını belirlemek, hücreler üzerindeki toksik etkileri değerlendirmek, ilaç keşfi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Riss vd., 2016). Ölçüm sonuçları, spektrofotometrik yöntemlerle belirlenir ve hücrelerin renk değişimine dayalı olarak optik

yoğunlukları ölçülür. MTT testi, hücre kültüründe yaygın olarak kullanılan bir teknik olup, hücrelerin biyolojik yanıtlarını ve etkileşimlerini değerlendirmede değerli bir araçtır.

2.4.7 Yara İyileşmesi Prosesi

Hücre kültüründe şekil 2.12’de de sunulan yara iyileşme deneyi hücrelerin migrasyon yeteneklerini değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu deneyde, bir hücre monolayeri oluşturulur ve daha sonra bir pipet ucu yardımı ile hücre tabakasının ortasında bir yara (yarık veya boşluk) oluşturulmaktadır (Cappiello vd., 2018). Ardından, hücrelerin bu boşluğu kapatma ve iyileşme yetenekleri izlenir. Yaralı bölge, belirli aralıklarla mikroskop altında görüntülenerek ve kaydedilerek, hücrelerin yara alanını ne kadar hızlı kapattığı gözlemlenir. Bu yöntem, hücre migrasyonunun yanı sıra hücre proliferasyonunu ve yara iyileşme süreçlerini değerlendirmek için de kullanılabilir (Kauanoca vd., 2021). Yara iyileşme deneyi kanser metastazı, doku onarımı, hücresel göç mekanizmaları ve ilaçların etkilerinin değerlendirilmesi gibi birçok biyolojik sürecin çalışılmasında önemli bir araçtır.



Şekil 2.12 Yara iyileşme prosesine bir örnek

2.4.8 PCNA Analizi

Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA), DNA replikasyonu ve tamirinde kritik bir rol oynayan, hücre siklusunun S fazında sentezlenen ve hücre çoğalmasıyla ilişkili bir proteindir. İlk olarak Miyachi ve ekibi tarafından 1978’de tanımlanan PCNA (Miyachi vd., 1978), daha sonra Mathews ve arkadaşları (1984) tarafından siklin ile aynı protein olduğu gösterilerek bu isimle anılmaya başlanmıştır.

(Mathews vd., 1984). PCNA, DNA polimeraz- δ 'nın kofaktörü olarak DNA sentezini düzenlerken, hücre siklusunun kontrolü ve düzenlenmesi ile ilgili diğer proteinlerle de etkileşim içerisinde. PCNA'nın ekspresyon düzeyi hücre çoğalması ve DNA sentezi ile doğrudan orantılıdır; G1 fazında sentezi başlar, S fazında maksimum seviyeye ulaşır ve G2/M fazında azalır. Bu özellikler, PCNA'yı hücre proliferasyonu için ideal bir belirteç haline getirmiştir. PCNA düzeyleri, immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilerek hücre çoğalması değerlendirilir. Proliferasyonun belirlenmesi için PCNA antikoru ve histokimyasal kitler kullanılarak hücreler boyanır; antikorlarla işaretlenmiş hücreler ışık mikroskopunda incelenir ve rastgele seçilen alanlarda proliferasyon düzeyleri hesaplanır. Bu analiz, hücrelerin proliferatif aktivitesini ölçmek ve hücresel süreçleri anlamak için önemli bir yöntemdir.

3

MATERYAL METOD

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazlar aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

- Hassas Terazı – Shimadzu
- Saf Su Cihazı – Sartorius
- Manyetik Karıştırıcı – Variomag Mono
- Vorteks – Velp Scientifica
- pH Metre - Hanna
- Ultrasonik Su Banyosu – Bandelin Sonorex
- Peristaltik Pompa – Masterflex Core Palmer
- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı – IKA
- Santrifüj Cihazı – Beckman Coulter Allegra X-30 R
- UV-Vis Spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- Zeta Sizer – Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- FT-IR – Thermo Scientific Nicolet iS10
- Liyafilizatör – Telstar Cryodos
- Invert Mikroskop – Olympus
- CO₂ İnkübatör – Biosan, ES20
- Biyogüvenlik Kabini – Hedlab XPROII
- Mini Santrifüj Cihazı – Hermle Z 206 A
- Floresan Mikroskop – ZEISS AxioVert01

- Elisa Reader – BioTek PowerWave XS2
- Elektroforez Tankı – Cleaver Scientific nanoPAC-300P
- Taramalı Elektron Mikroskobu – ZEISS EVO LS10

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

3.2.1 Nanopartikül Hazırlama İşlemlerinde Kullanılan Çözeltiler

3.2.1.1 Asetik Asit Çözeltisi

Hacimce %1 asetik asit çözeltisi ultra saf su ile hazırlanmıştır. Stok olarak 50 ml %1'lik asetik asit çözeltisi hazırlamak amacı ile 50 ml saf su şilifli balona mezür yardımı ile ölçülerek eklenmiştir. Ardından cam pipet ile 0,5 ml asetik asit ölçülerek şilifli balona eklenerek manyetik karıştırıcıda tam karışma sağlanmıştır.

3.2.1.2 Kitosan Çözeltisi

Düşük molekül ağırlıklı kitosan ve hazırlanmış olan %1'lik asetik asit çözeltisi kullanılarak stok halde 50 ml 4 mg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. 200 mg düşük molekül ağırlıklı kitosan tartılarak behere alınmış ve üzerine 50 ml %1'lik asetik asit çözeltisi eklenmiştir. Manyetik balık yardımı ile manyetik karıştırıcıda ısı olmaksızın bir gece karışma sağlanmıştır. Homojen hale gelen kitosan çözeltisi 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak 4,8 pH'a ayarlanmıştır. 4,8 pH'a ayarlanan 4 mg/ml kitosan çözeltisi 0,45 µm şırınga filtresi ile filtrelenmiştir.

3.2.1.3 TPP Çözeltisi

2 mg/ml konsantrasyondaki TPP çözeltisi ultra saf su stok olarak 10 ml hazırlanmıştır. 10 ml TPP çözeltisi için 20 mg TPP tartılmış ve behere alınmış, ardından behere 20 ml ultra saf su eklenmiş ve manyetik karıştırıcı ile tam karışma sağlanmıştır. Elde edilen 2 mg/ml konsantrasyondaki homojen TPP çözeltisi 0,22 µm şırınga filtresi ile filtrelenmiştir.

3.2.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

3.2.2.1 DMEM/F12 Besiyeri Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen besiyeri içerisine, toplam hacmin %1'i oranında 200 mM Penisilin-Streptomisin ve L-Glutamin ilave edildi. L929 Fibroblast hücreleri için

%10 FBS eklenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sırasında bu tamamlanmış besiyeri kullanılmıştır.

3.2.2.2 Hücre Dondurma Solüsyonu Hazırlanması

Hücre dondurma solüsyonu, %90 tamamlanmış besiyeri ve %10 DMSO içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu solüsyon, küçük hacimlere bölünerek stoklanmış ve -20°C’de saklanmıştır.

3.2.2.3 MTT Solüsyonu Hazırlanması

MTT solüsyonu, 0,6 mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için, 6 mg MTT molekülü 10 ml PBS’te çözülerek filtreden geçirilmiştir. Hazırlanan solüsyon, +4°C’de karanlık bir ortamda saklanmıştır.

3.3 Deneysel Metotlar

3.3.1 *H. italicum* Ekstraktlarının Elde Edilmesi ve Kalibrasyon Eğrileri

Kuru formda aktardan temin edilen *H. italicum* bitkisinin çiçek kısımlarından soxhlet ekstraksiyonu, süper kritik CO₂ ekstraksiyonu ve su buharı distilasyonu olacak şekilde 3 farklı metot ile ekstraktlar elde edilmiştir.

Soxhlet ekstraksiyonu: Soxhlet aparatının içine sıkıştırılmış bir biçimde temin edilen bitki yerleştirilmiştir. Bitki materyali ekstraksiyon aparatının yaklaşık üçte birini dolduracak şekilde ayarlanmıştır. Organik çözücü olarak etanol tercih edilmiştir. Çözücü uygun bir konsantrasyonda ayrı bir kapta hazırlanmıştır. Soxhlet aparatının üst kısmına kondansatör takılmıştır ve alt kısımdaki rezervuara hazırlanan çözücü doldurulmuştur. Isıtıcı kullanılarak ekstraksiyon kabı ısıtılmış ve çözücünün buharlaşması sağlanmıştır. Buharlaşan çözücü, kondansatör aracılığıyla soğutucuya yönlendirilmiş ve yoğunlaşarak tekrar ekstraksiyon kabına geri dönmesi sağlanmıştır. Bu döngü, çözücünün bitki materyali ile periyodik olarak temas etmesini sağlanmıştır. Ekstraksiyon işlemi tamamlandığında, çözücü ve bitki materyali karışımını bir toplama kabına alınmıştır. Organik çözücü, vakum altında buharlaşarak geri kazanılabilir veya daha fazla işleme tabi tutulabilir. Elde edilen ekstrakt, istenilen analizler veya uygulamalar için uygun saklama koşullarında muhafaza edilmiştir.

Süper kritik CO₂ ile ekstraksiyonu: *H. italicum* bitkisinin süper kritik CO₂ ile ekstraksiyonu, bitki materyalinden hedeflenen bileşiklerin verimli ve etkili bir şekilde çıkarılmasını sağlayan modern bir ekstraksiyon yöntemidir. *H. italicum* bitkisinin kurutulmuş veya taze formu aktardan temin edilmiştir. SFE işlemi için yüksek basınç ve yüksek saflıkta CO₂ kullanılmış ve CO₂ üretici cihazdan temin edilmiştir. SFE cihazında kullanılan ekstraksiyon hücresi, bitki malzemesinin yerleştirileceği bir hazne içermektedir. İşlem basınç, sıcaklık ve CO₂ akış hızı gibi parametreleri içermekte olup, bu parametreler ekstraksiyon verimini ve bileşiklerin çözünürlüğünü etkilemektedir. *H. italicum* bitkisi ekstraksiyon hücresine yerleştirilmiştir. CO₂, yüksek basınç altında sıcaklığın üzerinde tutularak süper kritik halde muhafaza edilmiştir. Süper kritik CO₂, bitki materyalinin içinden geçerken hedeflenen bileşikleri çözmemektedir. CO₂'nin basıncın azalmasıyla normal haline dönmesi sağlanmış, böylece ekstrakte edilen bileşikler çözülmüştür. Elde edilen ekstrakt, uygun bir toplama kabında toplanmış ve uygun saklama koşullarında muhafaza edilmiştir.

Su buharı distilasyonu: *H. italicum* bitkisinde uçucu yağ eldesi için *H. italicum* bitkisinin kurutulmuş formunun tercih edilmesi uçucu yağ ekstraksiyon işlemini kolaylaştıran etmenlerden biri olmuştur. Su buharı distilasyonu yöntemi için uygun clevenger düzeneği hazırlanmıştır. Söz konusu düzeneğin genellikle uçucu yağ elde etme işlemlerinde tercih edilmektedir. Cihazın su ve bitki malzemesini koyulabilen kısımları temizlenmiştir. Distilasyon kabının alt kısmına bitki malzemesi su ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Distilasyon kabına uygun miktarda saf su eklenmiş, su bitki malzemesinin uçucu yağını buharlaştırmak için kullanılmıştır. Distilasyon kabı ısıtılmış ve su kaynama noktasına gelene kadar ısıtma işlemi devam ettirilmiştir. Bu sırada bitki malzemesinden uçucu yağ buharlaşmaya başlamıştır. Buharlaşan su ve uçucu yağ buharları, distilasyon kabında ayrı kısımlara yönlendirilmektedir. Bu kısımlarda, buharların yoğunlaşması ve tekrar sıvıya dönüşmesi sağlanmıştır. Elde edilen sıvı, uçucu yağ ve hidrodistilasyon suyu karışımını içermektedir. Bu karışımdan, su ve yağın ayrılması için, ayırma hunisi kullanılmıştır. Elde edilen uçucu yağ uygun bir koyu renkli cam şişeye aktarılıp; serin, kuru ve ışıktan uzak bir yerde muhafaza edilmiştir. Açıklanan bu üç ekstraksiyon yöntemin karşılaştırılması seçicilik, yöntem gibi parametreler göz önünde bulundurularak tablo 3.1’de sunulmuştur.

Tablo 3.1 SHX, SFE ve UY ekstraksiyonunun karşılaştırılması

Karşılaştırma Parametreleri	SHX	SFE	UY
Yöntem	Geleneksel	Modern	Geleneksel
Çözücü	Organik Çözücüler	CO ₂	Su buharı
Çevre Dostu	Hayır	Evet	Evet
Seçicilik	Orta	Yüksek	Orta
Termal Bozunma	Olabilir	Düşük	Düşük
İşlem Süresi	Uzun	Kısa	Orta-Uzun

3.3.1.1 Farklı Konsantrasyonlarda *H. italicum* Ekstraktlarının Hazırlanması**Tablo 3.2** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlar

Konsantrasyon	Hazırlanışı
0,05 mg/ml	50 µl Ekstrakt + 950 µl EtOH
0,1 mg/ml	100 µl Ekstrakt + 900 µl EtOH
0,25 mg/ml	250 µl Ekstrakt + 750 µl EtOH
0,5 mg/ml	500 µl Ekstrakt + 500 µl EtOH
0,75 mg/ml	750 µl Ekstrakt + 250 µl EtOH
1 mg/ml	1000 µl Ekstrakt

Kuru formda elde edilen tüm *H. italicum* ekstraktlarından 1 mg/ml ve 0,1 mg/ml stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok solüsyon kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ekstraktlar tablo 3.2’de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

0,1 mg/ml stok solüsyondan farklı konsantrasyonlarda *H. italicum* ekstraktlarının hazırlanması tablo 3.3'te gösterilmektedir.

Tablo 3.3 0,1 mg/ml stok solüsyondan hazırlanan ekstraktlar

Konsantrasyon	Hazırlanışı
0,0010 mg/ml	10 µl Ekstrakt + 990 µl EtOH
0,0025 mg/ml	25 µl Ekstrakt + 975 µl EtOH
0,0050 mg/ml	50 µl Ekstrakt + 950 µl EtOH
0,0075 mg/ml	75 µl Ekstrakt + 925 µl EtOH
0,01 mg/ml	100 µl Ekstrakt + 900 µl EtOH
0,1 mg/ml	1000 µl Ekstrakt

Suda çözünürlüğü oldukça düşük olan *H. italicum* ekstraktlarının etanol karşı kalibrasyon eğrisi değerlerini belirleyebilmek için 0,001 mg/ml ve 0,01 mg/ml konsantrasyonları aralığında çözeltiler hazırlanmıştır (0,001- 0,002- 0,003- 0,004- 0,005- 0,006- 0,007- 0,008- 0,009- 0,01 mg/ml). Çözeltilere ait $\lambda_{\max}$ değeri UV-Vis spektroskopisinde belirlenerek farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin UV şiddetlerinden kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır.

3.3.2 *H. italicum* Ekstraktlarının Karakterizasyonu

3.3.2.1 *H. italicum* Ekstraktlarının UV-Vis Spektrofotometre Analizi

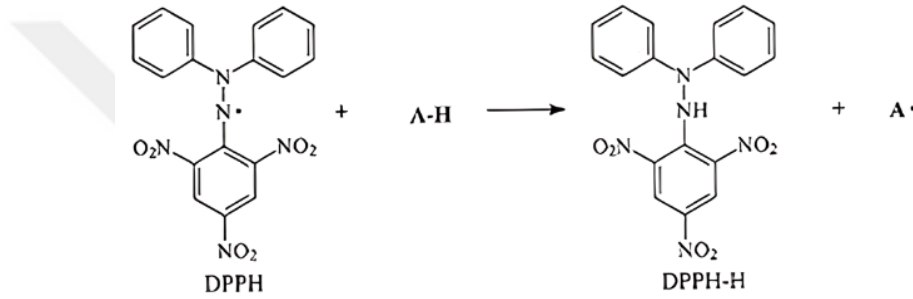
H. italicum ekstraktları 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. EtOH ile blank alınarak her bir ekstrakt örneğinin 200-800 nm aralığında spektrumu alınmıştır.

3.3.2.2 *H. italicum* Ekstraktlarının FT-IR Spektrofotometre Analizi

H. italicum ekstraktlarının içerdiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grupları inceleyebilmek amacı ile FT-IR spektrofotometre analizi yapılmıştır. Bu analiz FT-IR spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 700 ila 4000 cm^{-1} aralığında değişen FT-IR spektrumları elde edilmiştir.

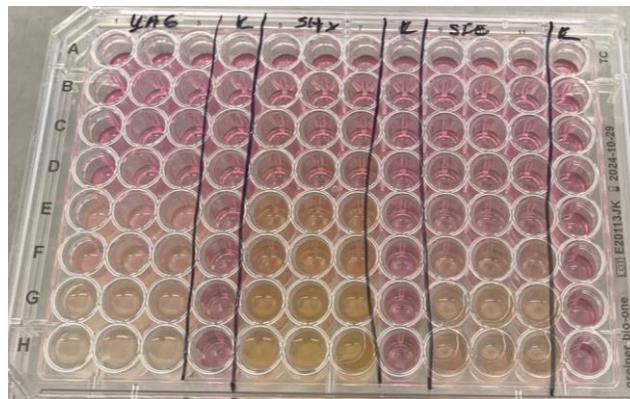
3.3.2.3 *H. italicum* Ekstraktlarının DPPH Antioksidan Aktivite Analizi

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) analizi bitki ekstraktı için en yaygın kullanılan antioksidan aktivite ölçüm analizidir. Bu analizde, zayıf AH bağına sahip bir molekül veya antioksidan stabil bir serbest radikal DPPH ile reaksiyona girerek molekülün renginin değişimine neden olmaktadır. Serbest radikal DPPH, 517 nm'de güçlü bir absorbans sağlayarak, mor bir renk elde etmek için tek bir elektronla etkileşime girmektedir. *H. italicum* ekstraktlarında bulunan antioksidan, daha düşük hidrojen miktarı nedeniyle DPPH'dan daha düşük absorbansa sahip olan DPPH-H'yi oluşturmak üzere DPPH ile reaksiyona girmektedir (şekil 3.1).



Şekil 3.1 DPPH'nin zayıf A-H ile reaksiyonu sonucunda DPPH-H'nin eldesi

DPPH-H formuna kıyasla radikaldir çünkü emilen elektron sayısı arttıkça renk bozulmasına veya sarı bir renk meydana gelmesine neden olmaktadır. Renk giderme aşaması, indirme kapasitesini önemli ölçüde etkilemektedir.



Şekil 3.2 *H.italicum* ekstraktlarının antioksidan aktivite analizi için kullanılan 96 kuyulu mikroparka

Tablo 3.4 96 kuyulu mikroplakaya bileşenlerin yerleşim şeması

	0,0010	0,0025	0,0050	0,0075	0,01	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1
	SXH + EtOH	SXH + EtOH	SXH + EtOH	SXH + EtOH	SXH + EtOH	SXH + EtOH	SXH + EtOH	SXH + EtOH	SXH + EtOH	SXH + EtOH	SXH + EtOH
K	SXH + DPPH	SXH + DPPH	SXH + DPPH	SXH + DPPH	SXH + DPPH	SXH + DPPH	SXH + DPPH	SXH + DPPH	SXH + DPPH	SXH + DPPH	SXH + DPPH
	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH
K	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH	UY + EtOH
	SFE + EtOH	SFE + EtOH	SFE + EtOH	SFE + EtOH	SFE + EtOH	SFE + EtOH	SFE + EtOH	SFE + EtOH	SFE + EtOH	SFE + EtOH	SFE + EtOH
K	SFE + DPPH	SFE + DPPH	SFE + DPPH	SFE + DPPH	SFE + DPPH	SFE + DPPH	SFE + DPPH	SFE + DPPH	SFE + DPPH	SFE + DPPH	SFE + DPPH

K: kontrol, SXH: soxhlet, UY: su buharı distilasyonu, SFE: süper kritik ekstraksiyon

DPPH analizi için takip edilen ayrıntılı adımlar şu şekildedir: DPPH ile numunelerin hazırlanmasında 100 µL numune ve 100 µL DPPH çözeltisi kullanılmıştır. Etanol ile numunelerin hazırlanmasında ise 100 µL numune ve 100 µL etanol kullanılmış, şekil 3.2’de ve tablo 3.4’te görüldüğü gibi 96 kuyulu mikroplakaya yerleştirildikten sonra karanlık ortamda 30 dk bekletilmiştir. Sonrasında 517 nm’deki absorbans değerleri okundu ve antioksidan aktivitesi eşitlik 3.1’deki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Antioksidan Aktivite} = [(A_k - A_0)/A_k] \times 100 \quad (3.1)$$

A_k : Kontrol numunesinin absorbans değeri- A_0 : Numunenin absorbans değeri

3.3.3 İyonik Jelasyon Yöntemi ile Boş Kitosan Nanopartikül Sentezi

Tez çalışmasında kullanılan kitosan nanopartiküller iyonik jelasyon metodu ile sentezlenmiştir. Kitosan nanopartikül sentezine başlamadan önce gerekli solüsyon ve çözeltiler hazırlanmıştır. Öncelikle hacimce %1'lik asetik asit çözeltisi distile su kullanılarak hazırlanmış ve asetik asit çözeltisi çözücü olarak kullanılarak 4 mg/ml konsantrasyonda düşük molekül ağırlıklı kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Homojen yapının oluşması amacı ile asetik asit 60 °C'ye ısıtılmış ve karışma bir gece 750 rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde devam ettirilmiştir. Homojen yapıda olan kitosan- asetik asit solüsyonun pH'ı 3,8 olarak belirlenmiş ve 1 N NaOH solüsyonu kullanılarak pH 4.8'e yükseltilmiştir. pH'ı ölçülen çözelti 0,45 µm'lik şırınga filtresi ile filtrelenmiştir.

Bir diğer hazırlık aşaması çapraz bağlayıcı çözeltisi hazırlamasıdır. Çapraz bağlayıcı çözeltisi için distile su ile 4 mg/ml'lik TPP çözeltisi hazırlanmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözünmesi sağlanan TPP çözeltisi 0,22 µm'lik şırınga filtresi ile filtrelenmiş, 4 mg/ml konsantrasyonda asetik asit kullanılarak hazırlanan kitosan çözeltisi su dolu buz banyosuna koyulmuş ve sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Sonikasyon işlemi %80 güçte 5 dakika sürdürülmüştür. İşlem sırasında, 4 mg/ml konsantrasyonda 2 ml filtrelenmiş TPP çözeltisi enjektör yardımı ile damlatılarak 10 ml kitosan çözeltisine eklenmiştir.

Sonikasyon altında 5 dakikalık muamele bittikten sonra solüsyon manyetik karıştırıcı üzerinde 1000 rpm'de, 1 saat karışmaya bırakılmıştır. 1 saatlik nanopartikül oluşum aşaması tamamlandıktan sonra 4100 rpm'de 30 dakika 4 °C'de santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Sentezlenen nanopartiküllerin yer aldığı pellet kısım ayrılmış ve diğer çalışmalar için süpernatant kısım falkonlarda muhafaza edilmiştir. Stabilizasyon için ayrılan pellet kısma liyofilizasyon işlemi uygulanmış. Liyofilizasyon işlemi için kitosan nanopartikül sentezlendikten sonra -20 °C'de dondurulmuştur. Ardından liyofilizatör ile toz formuna getirilmiştir.

3.3.4 İyonik Jelasyon ile *H. italicum* Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Sentezi

H. italicum enkapsüle edilmiş kitosan nanopartiküller de iyonik jelasyon metodu ile sentezlenmiştir. Öncelikle hacimce %1'lik asetik asit çözeltisi distile su kullanılarak hazırlanmış, asetik asit çözeltisi çözücü olarak kullanılarak 4 mg/ml

konsantrasyonda düşük molekül ağırlıklı kitosan çözeltisi elde edilmiştir. Homojen yapının oluşması amacı ile asetik asit 60 °C'ye ısıtılmış ve karışma bir gece 750 rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde devam ettirilmiştir. Homojen yapıda olan kitosan- asetik asit solüsyonun pH'ı 3,8 olarak belirlenmiş ve 1 N NaOH ve 1 N HCl ile 4.8'e yükseltilmiştir. pH'ı ölçülen çözelti 0,45 µm'lik şırınga filtresi ile filtrelenmiştir. Filtreleme işleminin ardından SHX, SFE ve UY yöntemleri ile elde edilen *H. italicum* ekstraktları çözücü olarak etanol ile seyreltilerek çözeltiye eklenmiştir. Her bir ekstrakt için nanopartikül sentez prosesi ayrı ayrı uygulanmıştır.

Bir diğer hazırlık aşaması çapraz bağlayıcı çözeltisi hazırlamaktır. Çapraz bağlayıcı çözeltisi için distile su ile 4 mg/ml'lik TPP çözeltisi hazırlanmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözünmesi sağlanan TPP çözeltisi 0,22 µm'lik şırınga filtresi ile filtrelenmiş, 4 mg/ml konsantrasyonda asetik asit kullanılarak ve ölmez otu hazırlanan kitosan çözeltisi su dolu buz banyosuna koyulmuş ve sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Sonikasyon işlemi %80 güçte 5 dakika sürdürülmüş işlem sırasında, 4 mg/ml konsantrasyonda 2 ml filtrelenmiş TPP çözeltisi enjektör yardımı ile damlatılarak kitosan çözeltisine eklenmiştir.

Sonikasyon altında 5 dakikalık muamele bittikten sonra solüsyon manyetik karıştırıcı üzerinde 1000 rpm'de, 1 saat karışmaya bırakıldı. 1 saatlik nanopartikül oluşum aşaması tamamlandıktan sonra 4100 rpm'de 30 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. *H. italicum* ekstraktı yüklü nanopartiküllerin yer aldığı pelet kısım ayrıldı ve diğer çalışmalar için süpernatant kısım muhafaza edildi. Stabilizasyon için ayrılan pellet kısma liyofilizasyon işlemi uygulanmıştır. Liyofilizasyon işlemi için kitosan nanopartikül sentezlendikten sonra -20 °C'de dondurulmuştur. Ardından liyofilizatör ile toz formuna getirildi.

3.3.5 Boş ve Ekstrakt Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. UV-Vis spektroskopisi indirekt bir yöntem olarak, hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitelerini hesaplamak için kullanılmıştır. Zeta ölçüm cihazı ile yapılan analizler nanopartiküllerin boyutunu, dağılımını ve zeta potansiyelini belirlemek için, SEM nanopartiküllerin boyut analizi için ve FT-IR nanopartiküllerin kimyasal bağlarını analiz etmek için

kullanılmıştır. Bu karakterizasyon yöntemleri, nanopartiküllerin özelliklerini detaylı bir şekilde değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır.

3.3.5.1 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

H. italicum ekstraktları yüklü nanopartiküllerin içerisine yüklenen etken madde miktarını belirlemek için enkapsülasyon etkinliği hesaplaması gerçekleştirilmiştir. Söz konusu hesaplama *H. italicum* ekstraktlarının taşıyıcı içindeki konsantrasyonları ile başlangıç maddesinin konsantrasyonları arasındaki fark ile hesaplanmıştır.

Santrifüj ile çöktürme ve su ile nanopartiküllerin yıkanması işlemleri sonrasında elde edilen üst fazlar (supernatant) toplanarak UV-Vis spektroskopisinde ölçüm alındı. Ölçüm sonucunda üst fazda bulunan *H. italicum* ekstrakt miktarı belirlenmiş böylelikle nanopartikül içerisine yüklenmemiş olan ekstrakt miktarı hesaplanmıştır. Belirlenen miktar başlangıçtaki ekstrakt miktarından çıkarılmak suretiyle enkapsüle edilen madde miktarı belirlenmiştir.

Enkapsülasyon etkinliği (%EE) eşitlik 3.2’de verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%EE = 100 \times \frac{\text{Başlangıç etken madde miktarı (mg)} - \text{Serbest etken madde miktarı (mg)}}{\text{Serbest etken madde miktarı (mg)}} \quad (3.2)$$

Enkapsülasyon etkinliğini hesaplamak için kullanılan yukarıda gösterilen formülde belirtilen başlangıç etken madde miktarı, nanopartiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan toplam *H. italicum* ekstraktının miktarını ifade etmektedir; serbest etken madde miktarı ise nanopartiküllerin enkapsüle edemediği veya serbest kalan *H. italicum* ekstraktlarının miktarını temsil etmektedir.

3.3.5.2 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Nanopartikül sentezi işlemi esnasında kullanılan katı madde miktarı gerekli ölçümler alınarak kaydedilir ve sentez sonunda liyofilizatörde kurutularak elde edilen kitosan nanopartikül miktarına oranlanarak reaksiyon veriminin hesaplanması sağlanır.

Reaksiyon verimi (%RV) eşitlik 3.3’te belirtilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%RV = 100 \times \frac{\text{Sentezlenen nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{Sentezde kullanılan polimer miktarı (mg)} + \text{Etken madde miktarı (mg)}} \quad (3.3)$$

3.3.5.3 İlaç Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

Nanopartikül sentezi tamamlandıktan sonra santrifüj işlemine maruz bırakılan sentez solüsyonunun üst fazı kullanılarak ilaç yükleme kapasitesi hesaplanmıştır, söz konusu hesaplama işlemi indirekt bir hesaplama değildir. Sentez sonucu üst fazların toplanması sonucunda UV-Vis spektroskopisi ile enkapsüle edilen madde miktarı, liyofilizatörden alınan kitosan nanopartiküllere oranlanarak ilaç yükleme kapasitesi belirlenmiştir.

İlaç yükleme kapasitesi (%DL) eşitlik 3.4'deki kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%DL = 100 \times \frac{\text{Enkapsüle edilen etken madde miktarı (mg)}}{\text{Elde edilen katı nanopartikül miktarı (mg)}} \quad (3.4)$$

3.3.5.4 Nanopartikül Boyutunun Belirlenmesi ve Zeta Potansiyelinin Hesaplanması

Nanopartiküllerin ortalama parçacık boyutu (Z-Ave), zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri dinamik ışık saçılım yöntemi ile belirlenmiştir. Bu analizler, 4,0 mW gücünde ve 633 nm dalga boyunda He-Ne lazer lambası ile donatılmış bir Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, 0.8872 cP viskozite ve 1.330 kırılma indeksi değerleri kullanılarak, $\pm 0,1$ °C hassasiyetle 25 °C'de yapılmıştır.

3.3.5.5 SEM Analizi

Nanopartiküllere ait yüzey morfolojisi ve şekillerin belirlenmesi amacıyla, Carl-Zeiss EVO LS10 taramalı elektron mikroskobu kullanılarak SEM analizi gerçekleştirildi. Analiz öncesinde, nanopartiküllere yüksek vakum altında altın kaplaması yapılmıştır. Bu işlem, elektron ışınının yüzeyden daha iyi yansımaları sağlamak için yapılmıştır. Nanopartiküller, 5 kV hızlandırma voltajı ve 60.000X büyütme ile detaylı bir şekilde incelendi. Ek olarak, görüntülerin kalitesini ve çözünürlüğünü artırmak için çeşitli kontrast ayarları ve odaklama teknikleri kullanılmıştır. Bu yöntem, nanopartiküllerin yüzey özelliklerini ve morfolojilerini yüksek doğrulukla değerlendirmek için en sık tercih edilen yöntemdir.

3.3.5.6 FT-IR Analizi

H. italicum ekstraktları, kitosan polimeri ve *H. italicum* ekstraktları yüklü polimerik nanopartiküllere ait fonksiyonel grupların tayini Thermo Scientific Nicolet iS10

cihazı, ATR (Attenuated Total Reflectance) modunda gerçekleştirilmiştir. 700 ile 4000 cm^{-1} arasında değişen FT-IR spektrumları alınmıştır.

3.3.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında ATCC'den L929 Fibroblast (ATCC-CCL-01) hücre hatları temin edilmiştir. L929 Fibroblast hücreleri sıvı azotta dondurularak saklanmaktadır. L929 hücre hatları deneysel çalışmaya uygun hale getirilmek için öncelikle sıvı azot tankından çıkarılmış ve hızlı bir şekilde 37°C su banyosunda çözölmeye bırakılmıştır. Çözönen hücreler, 15 ml hacimde tamamlanmış besiyeri içeren bir falkona alınmıştır. Hücrelerin bir araya gelerek toplanması amacı ile 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır ve santrifüj sonucunda meydana gelen süpernatant kısım peletten uzaklaştırılmıştır; süpernatant hacmi kadar taze besiyeri pellet üzerine eklenerek pipetaj yapılmıştır. Söz konusu pipetaj işlemi hücrelerin homojen bir şekilde dağılmasını sağlamak amacı ile gerçekleştirilmektedir.

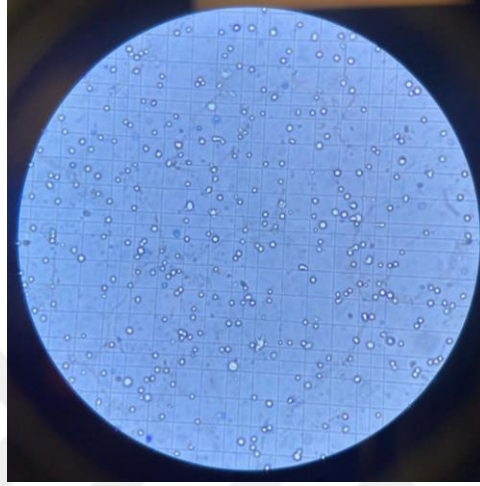
Kültür flaskına 5 ml besiyeri eklenerek 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonunda hücre süspansiyonu ilave edilmiş ve hücrelerin kültür ortamında eşit yayılması için karıştırma işlemi uygulanmıştır. Hücreler 37°C, %5 CO_2 ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

Hücreler ışık mikroskopu ile incelenmiş ve flask yüzeyinin yeterli oranda kaplandığı gözlemlendiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasaj işlemi yapılmadan önce kültür flaskı içerisinde yer alan besiyeri uzaklaştırılmış ve flask PBS tamponu ile yıkanmıştır. Yapışkan yapıda olan hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılabilmesi için tripsin eklenmiştir. Tripsin eklendikten sonra yüzeyden ayrılan hücreler; besiyeri eklenerek tamamlanan bir falkon tüpüne aktarıldıktan sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemine maruz bırakılmıştır. Santrifüj işleminin ardından peletten ayrılan süpernatant falkon içerisinde uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine ise besiyeri eklenerek kalan hücrelerin homojen dağılım göstermesi sağlanarak yeni flaska aktarılmış, yeni kültür flaskları 37°C, %5 CO_2 ortamında inkübasyona bırakılarak kültüre devam edilmiştir.

3.3.6.1 Hücre Sayımı

Mevcut tez çalışması kapsamında pasaj işlemi sırasında hücre peletinden sayım gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı için, eppendorf tüp içerisine besiyeri ile karıştırılmış olan süspanse hücrelerden 20 μl alınmış ve üzerine 20 μl tripan mavisi

boyası eklenerek (1:1 oranında) hafifçe pipetaj yapılmıştır. Boya ve hücre karışımı, Thoma lamında bulunan sayım alanlarına aktarılmış, ışık mikroskobu altında yapılan incelemede, canlı hücreler renksiz, ölü hücreler ise mavi olarak gözlemlenmiştir. İlgili alanlardaki canlı hücre sayısı belirlendikten sonra hücreler, yeni flasklara 1×10^5 hücre/ml yoğunluğunda eklenmiştir. Thoma lamında hücre sayımı yapılırken, ölü ve canlı hücrelerin sayıları kaydedilmiştir.



Şekil 3.3 Tripan mavisi ile canlılık tespiti, Thoma lamında hücre sayımı

1 ml kültür ortamında bulunan hücre sayısı eşitlik 3.5'teki denklem kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$\text{Hücre sayısı} = A \times DF \times 10^4 \quad (3.5)$$

A: Thoma lamının her bir karesinde sayılan ortalama canlı hücre sayısını,

DF: Thoma lamına koymadan önce tripan mavisi ile karıştırılan hücre süspansiyonunun “dilüsyon faktörünü” temsil etmektedir.

3.3.6.2 MTT Yöntemi ile Sitotoksiste Analizi

Farklı konsantrasyonlardaki *H. italicum* ekstraktları ve ekstrakt yüklü nanopartiküller 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrasında MTT sitotoksiste analizi için L929 Fibroblast hücre hatlarına uygulanmıştır. Sitotoksiste analizi için 2 adet 96 kuyucuklu steril pleyt kullanılmış ve tüm kuyucuklara 10^4 hücre/ml konsantrasyonda hücreler eklenmiştir. Prolifere olması amacı ile 24 saat inkübatörde bırakılan hücreler morforlojik olarak incelenmiş ve sitotoksiste analizleri yapılmak üzere *H. italicum* ekstraktları ve optimizasyonu sağlanmış

ekstrakt yüklü nanopartiküller L929 hücre hattına uygulanmak üzere 1- 10- 25- 50- 100- 250- 500 µg/ml konsantrasyonlarda L929 hücre hattına uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak belirlenen hücrelere herhangi bir etken madde eklenmemiştir.

24. ve 48. saatlerde pleytte yer alan kuyucuklardan besiyeri çekilmiş ve 50 µl MTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sona erdiğinde eklenmiş olan MTT solüsyonu mikropipet yardımı ile geri toplanmış ve yerine 100 µl DMSO eklenmiştir. Elisa okuyucu cihazında 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen ölçümlerin her biri için % canlılık oranı hesaplanmıştır. Hücrelerdeki canlılık oranının %50'den daha düşük olması maddenin hücreler için toksik olduğunu göstermektedir. Söz konusu hesaplamanın yapılabilmesi için eşitlik 3.6'daki denklem kullanılmaktadır:

$$\%Canlılık = 100 \times OD_{570e} / OD_{570b} \quad (3.6)$$

OD_{570e} : 570 nm'de örneklerin verdiği absorbans değeri

OD_{570b} : 570 nm'de kontrol grubunun verdiği absorbans değeri.

3.3.6.3 Yara İyileşmesi Analizi

Yara iyileşme analizi, hücre göçünü incelemek için tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. Mevcut tez çalışması kapsamında 24 steril kuyucuklu pleytlere yuvarlak lameller (cover slip) yerleştirilmiş ve her bir lamel üzerine 10⁵ hücre/ml konsantrasyonunda 50 µL L929 hücreleri ekilmiştir. Hücrelerin lamellere yapışması için 20-30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, her kuyucuk üzerine 450 µL besiyeri eklenmiş ve hücreler 24 saatlik inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, her kuyunun ortasından steril bir pipet ucu ile bir çizik çekilerek hücresiz bir alan oluşturulmuştur. Bu çizik, hücrelerin göç ederek boşluğu doldurmasını ve yarayı kapatmasını gözlemlemek amacı ile meydana getirilmektedir. Hücreler, MTT testi sonu değerlerine göre belirlenmiş IC₅₀ değerlerinde *H. italicum* ekstraktları ile muamele edilmiştir. Hücrelerdeki yaranın kapanma miktarı belirli saat aralıklarında fotoğraflanarak kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Bu süreç, hücre göçünün dolayısıyla yara iyileşme kapasitesinin değerlendirilmesini sağlamaktadır.

3.3.6.4 PCNA Analizi

L929 hücrelerinin proliferasyon düzeyleri, PCNA antikoru ve Invitrogen Histostain Plus Broad Spectrum kiti (Cat: 85-9043) kullanılarak immunohistokimyasal yöntemle belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan hücreler metanol ile fikse edildikten sonra, her bir örnek 5 dakika boyunca PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında örnekler bloklayıcı solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiş, bloklayıcı işleminin ardından her bir örneğe 1/150 oranında PBS içerisinde hazırlanmış PCNA primer antikoru eklenmiştir ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler, 5 dakika boyunca üç kez 1x PBS ile yıkanmış böylelikle fazla antikorun uzaklaştırılması sağlanmıştır.

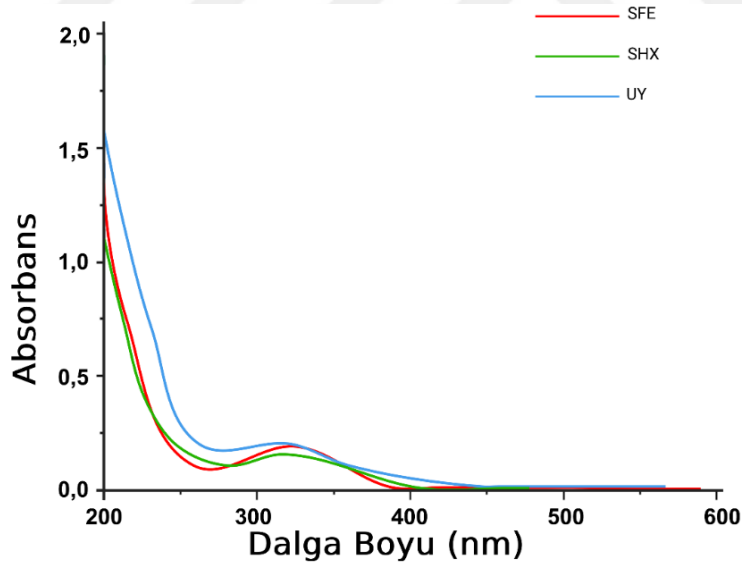
Yıkama işleminden sonra, örnekler biyotinlenmiş sekonder antikor uygulanmış ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Sekonder antikor bağlanmasının ardından örnekler tekrar 5 dakika boyunca üç kez 1x PBS ile yıkanmıştır. Bu işlemi takiben Streptavidin-Peroksidaz (HRP) uygulanmış ve örnekler oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilerek tekrar 1x PBS ile üç kez yıkanmıştır. Son aşamada, örnekler AEC (3-Amino-9-etilkarbazol) kromojeni ilave edilerek 10-20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve PCNA ile işaretlenen hücrelerin boyanması sağlanmıştır.

Reaksiyon, musluk suyu ile durdurularak boyanmamış hücreleri ayırt edebilmek amacıyla hematoksin ile zıt boyama yapılmıştır. Hazırlanan örnekler, lameller üzerine kapatma medyumunu ile sabitlenerek edilerek ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mikroskopik değerlendirme, rastgele seçilen 10 farklı alanda gerçekleştirilmiş ve işaretlenmiş (pozitif) ve işaretlenmemiş (negatif) hücrelerin sayımı yapılarak proliferasyon düzeyleri hesaplanmıştır.

4.1 *H. italicum* Ekstraktlarının UV-Vis Spektrofotometre Analizi

Sonuçları ve Kalibrasyon Eğrileri

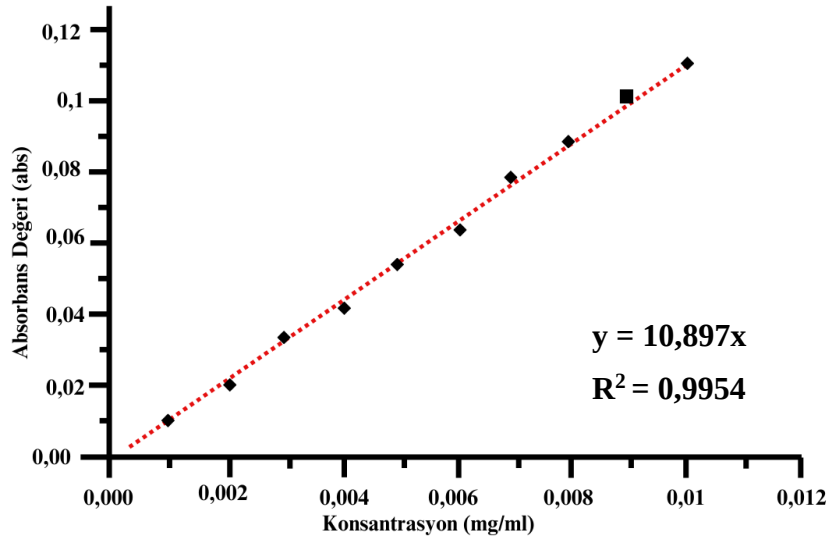
1-10 µg/ml konsantrasyonları aralığında seri çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltiye ait $\lambda_{\max}$ değeri UV-Vis spektroskopisinde 332 nm olarak belirlendi ve belirlenen dalga boyunda farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin UV şiddetleri ölçülerek kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Söz konusu uygulama üç farklı ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktlar için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1’de üç farklı yöntem ile elde edilen ekstraktların karşılaştırılmalı olarak 332 nm’de UV spekturumları absorbans-dalga boyu grafiği ile gösterilmektedir. Söz konusu ölçümde *H. italicum* ekstraktları suda düşük çözünürlüğe sahip olduğu için kontrol çözücüsü etil alkol olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1 Üç farklı yöntem ile elde edilen ekstraktların karşılaştırılmalı olarak 332 nm’de UV-Vis spekturumları absorbans-dalga boyu grafiği

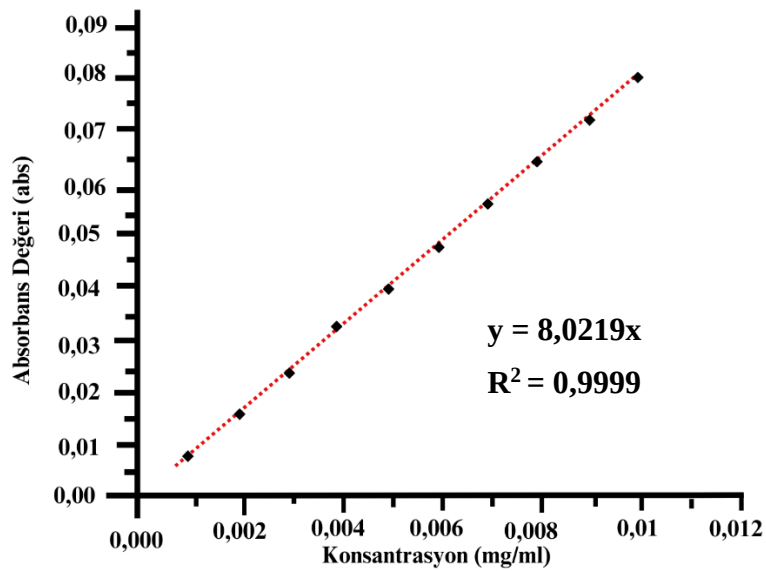
Literatüre uygun olarak *H. italicum* ekstraktları ile hazırlanan çözeltilerin $\lambda_{\max}$ = 332 nm değeri ölçüm parametresi olarak kabul edilmiş ve her bir ekstraktın kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Soxhlet ekstraksiyon sonucu elde edilen *H. italicum*

ekstraktının 332 nm dalga boyunda UV-Vis spektrometre kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi şekil 4.2’de sunulmuştur.



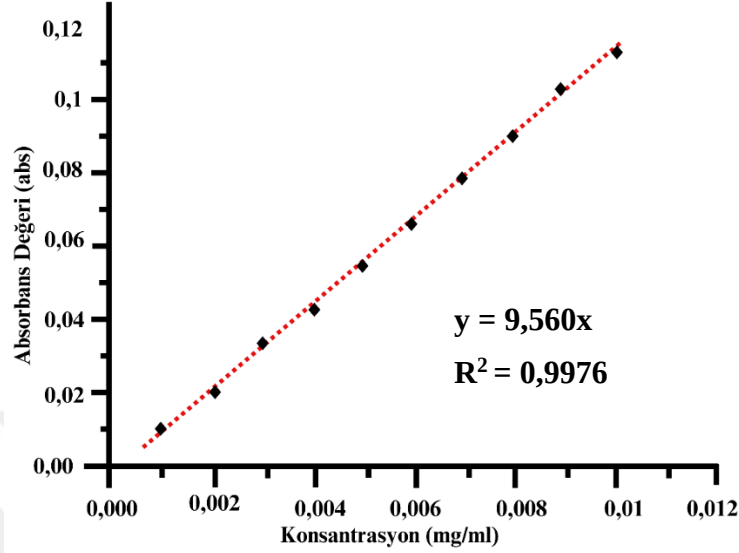
Şekil 4.2 Soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen *H. italicum* ekstraktının kalibrasyon eğrisi

Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen *H. italicum* ekstraktının 332 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometre kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi şekil 4.3’te sunulmuştur.



Şekil 4.3 Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen *H. italicum* ekstraktının kalibrasyon eğrisi

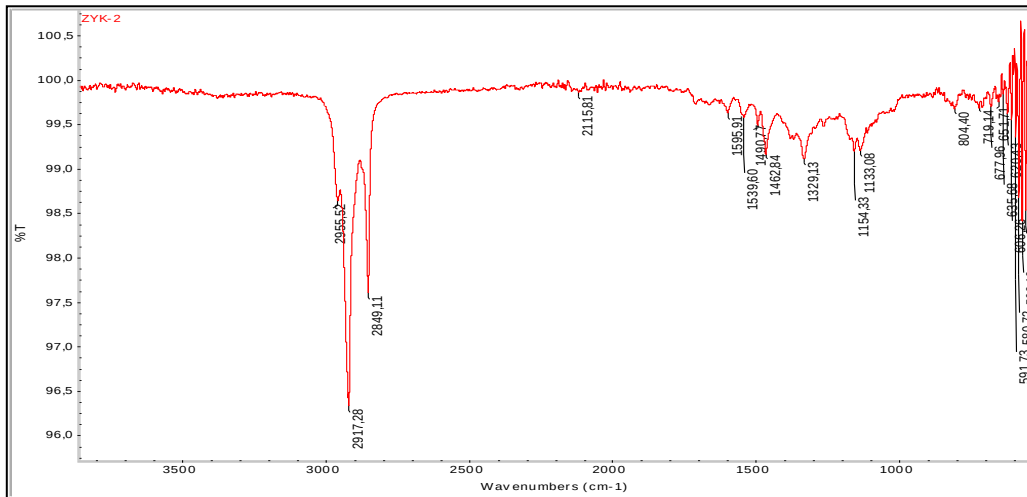
Su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen *H. italicum* uçucu yağının 332 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometre kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi şekil 4.4’te sunulmuştur.



Şekil 4.4 Su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen *H. italicum* uçucu yağının kalibrasyon eğrisi

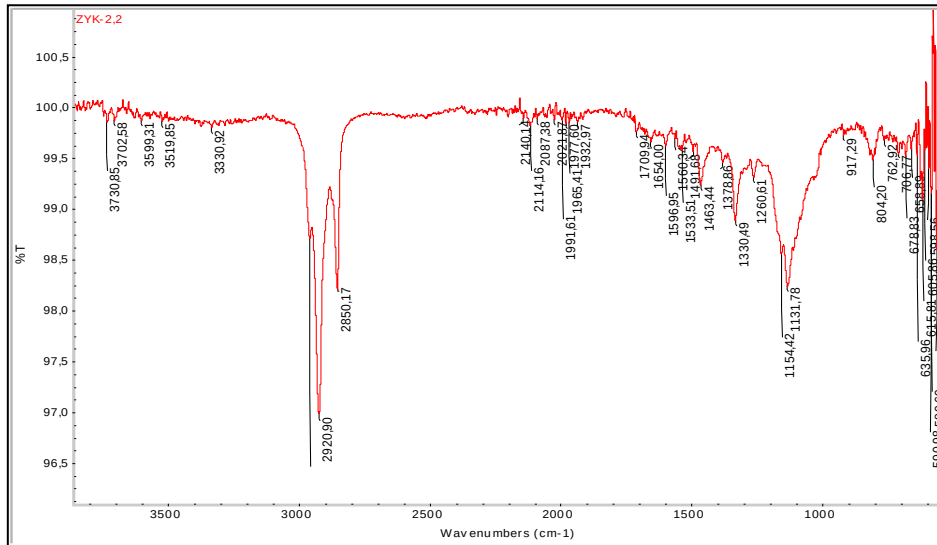
4.2 *H. italicum* Ekstraktlarının FT-IR Analizi Sonuçları

Şekil 4.5’te süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktlara ilişkin FT-IR grafiği sunulmuştur.



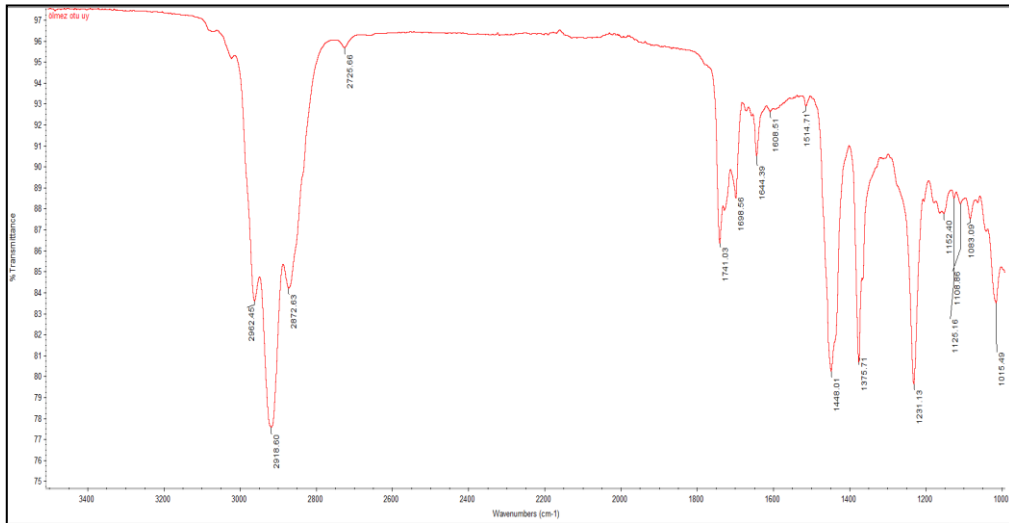
Şekil 4.5 *H. italicum*’un süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların FT-IR analiz sonucu

2928,41 cm^{-1} dalga sayısında belirgin bir pik, genellikle alkil gruplarına ait C-H gerilme titreşimlerini işaret etmektedir. 2017,28 cm^{-1} dalga sayısındaki pik ise daha az yaygın bir titreşim bölgesine denk gelmekte olup, karbon-karbon ($\text{C}=\text{C}$) veya karbon-azot ($\text{C}\equiv\text{N}$) üçlü bağlarının varlığını göstermektedir. 1650-1550 cm^{-1} dalga sayıları arasında yer alan bölge, $\text{C}=\text{C}$ çift bağlarının (alkenler) veya aromatik bileşiklerin titreşimlerine karşılık gelmektedir. Ayrıca, 1165-1030 cm^{-1} aralığında görülen pikler, C-O bağlarının (alkoller ve eterler) veya bazı C-N bağlarının titreşimleri ile ilişkilendirilebilmektedir. 804,47 cm^{-1} dalga sayısındaki pik ise aromatik halkaların veya benzen benzeri yapıların titreşim bölgelerine işaret etmektedir. Spektrumda görülen bu özellikler, numunede alkil gruplarının (C-H gerilme titreşimleri), karbon-karbon veya karbon-azot üçlü bağlarının, aromatik bileşiklerin ve oksijen veya azot içeren fonksiyonel grupların (C-O ve C-N bağları) varlığını göstermektedir. *H. italicum*'un süper kritik CO_2 ekstraktının FT-IR spektrumu; lipidler, fenolik bileşikler, flavonoidler, terpenoidler ve nitril veya alkin türevleri gibi çeşitli biyoaktif bileşenlerin varlığını göstermektedir. Bu bileşenler, bitkinin antioksidan, antienflamatuar veya antimikrobiyal özelliklerini açıklayabilmektedir. Özellikle, aromatik bileşikler ve C-O titreşimlerinin varlığı, ekstraktın biyoaktif özelliklere sahip olabilecek esterler, fenoller ve flavonoidler içerdiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.6 *H. italicum*'un sohxlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların FT-IR analiz sonucu

Şekil 4.6’da sunulan FT-IR grafiği *H. italicum*’un soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktına aittir. Spektrumda 3703,83 – 3270,60 cm^{-1} arasında geniş bir bant gözlenmektedir ve bu bölge, genellikle hidroksil gruplarına (O-H) işaret etmektedir. Bu pikler, fenolik bileşiklerin, alkollerin veya su içeriğinin varlığıyla ilişkilidir. *H. italicum*’da yaygın olarak bulunan flavonoidler ve fenolik yapılar bu titreşimlerle uyumludur. Ayrıca, 2920,40 cm^{-1} ve 2850,17 cm^{-1} bölgelerinde belirgin pikler, metil ($-\text{CH}_3$) ve metilen ($-\text{CH}_2-$) gruplarına ait C-H gerilme titreşimlerini göstermektedir. Bu bulgu, bitkide bulunan terpenoidler gibi alifatik bileşiklerin varlığını destekler niteliktedir. 1650,66 cm^{-1} civarındaki pik, karbonil gruplarını ($\text{C}=\text{O}$) temsil etmektedir ve esterler, ketonlar veya flavonoid türevlerinde sıkça görülmektedir. Bu, *H. italicum*’un soxhlet ekstraktında karbonil içeren biyoaktif bileşiklerin varlığına işaret etmektedir. 1590,64 cm^{-1} ve 1505,10 cm^{-1} bölgelerindeki pikler ise aromatik halkaların titreşimleriyle ilişkilidir. Flavonoid ve fenolik bileşiklerin aromatik yapıları bu bölgede pik vermektedir. 1164,42 cm^{-1} ve 1033,40 cm^{-1} bölgelerinde görülen pikler, C-O gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. Bu titreşimler alkoller, eterler ve esterlerin varlığını göstermektedir. Bu durum, soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen uçucu bileşenler ve fenolik yapılarla uyumlu bir bulgudur. Ek olarak, 804,21 cm^{-1} bölgesindeki pik, aromatik C-H dış düzlem bükülme titreşimlerine işaret eder ve aromatik yapıların varlığını doğrulamaktadır.

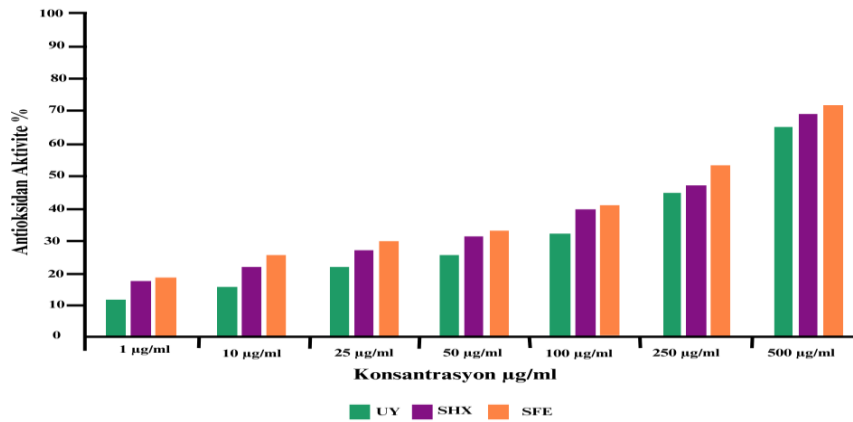


Şekil 4.7 *H. italicum*’un su buharı distilasyonu sonucu elde edilen uçucu yağının FT-IR analiz sonucu

Şekil 4.7’de sunulan grafik *H. italicum*’un su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağına ait bir FT-IR grafiğidir. 2924,45 cm^{-1} ve 2850,16 cm^{-1} bölgelerinde görülen pikler, metil ($-\text{CH}_3$) ve metilen ($-\text{CH}_2-$) gruplarına ait C-H gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. Bu pikler, uçucu yağlarda sıklıkla bulunan terpenoid yapılar (monoterpenler ve seskiterpenler) ile ilişkilidir. 1711,08 cm^{-1} bölgesinde gözlemlenen pik ise esterler veya ketonlar gibi karbonil içeren bileşiklerin varlığına işaret eder. Karbonil grupları, özellikle oksijenli terpenoidlerde yaygın olarak görülmektedir. 1642,57 cm^{-1} bölgesindeki pik, C=C çift bağlarının gerilme titreşimlerini temsil eder ve terpenoid yapıların alken içeriği ile uyumludur. Ayrıca, 1462,45 cm^{-1} ve 1377,41 cm^{-1} bölgelerinde metil ve metilen gruplarına ait bükülme titreşimleri tespit edilmiştir. Bu pikler, uçucu yağların hidrokarbon yapılar açısından zengin olduğunu doğrular niteliktedir. 1217,31 cm^{-1} ve 1162,74 cm^{-1} bölgelerinde yer alan pikler, C-O gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Bu titreşimler, ester ve hidroksil grupları içeren oksijenli bileşiklerle ilişkilidir. 880,89 cm^{-1} ve 814,42 cm^{-1} bölgelerinde tespit edilen aromatik C-H titreşimleri, uçucu yağda aromatik bileşiklerin varlığına işaret etmektedir.

4.3 *H. italicum* Ekstraktlarının Antioksidan Aktivite Sonuçları

Antioksidan aktivite sonuçları her ekstrakt türü için ilgili konsantrasyonlarda görsel, absorbans değerleri ve % antioksidan aktivite olarak aşağıda şekil 4.8’de sunulmuştur. Elde edilen etkin konsantrasyon (EC_{50}) değerleri DPPH analizi yapılan ekstraktların spektrofotometrik absorbanslarında %50 azalmaya neden olan konsantrasyonu temsil etmektedir.



Şekil 4.8 *H. italicum* ekstraktlarının antioksidan aktivite-konsantrasyon grafiği

Mevcut tez çalışması kapsamında DPPH analizi üç farklı yöntemle elde edilen ekstraktların genel serbest radikal süpürme aktivitesinin ölçülmesi amacı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Böylelikle arzanol, tilirosid ve gnaphaliin gibi çeşitli termolabil (ısıya tepki olarak bozunmaya veya değişime maruz kalan) polifenolik bileşiklerin bozunması önlenmiştir.

Her üç ekstrakt için de 1-500 µg/ml konsantrasyonda çözeltiler antioksidan aktivite analizi için hazırlanmış ve analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri kaydedilmiştir. Kaydedilen absorbans değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan % antioksidan aktivite değerleri tablo 4.1’de sunulmuştur.

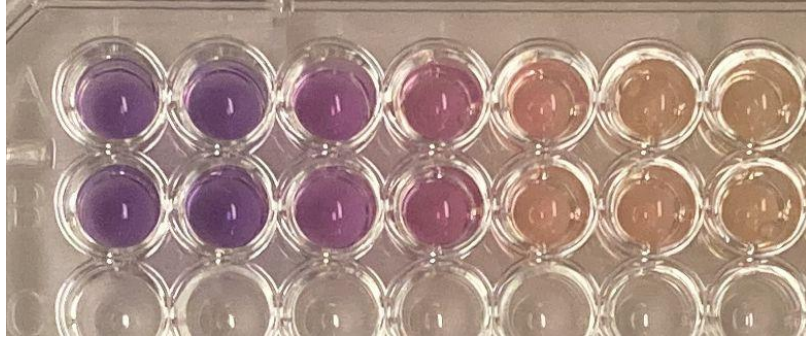
Tablo 4.1 *H. italicum* ekstraktlarının absorbans değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan % antioksidan aktivite değerleri

	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml
UY	%11,70	15,45	%21,70	%25,47	%32,15	%44,89	%65,48
SHX	%17,48	21,67	%26,99	%31,65	%39,89	%47,25	%69,32
SFE	%18,16	%25,44	%30,18	%33,48	%41,13	%52,98	%72,46

Su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen *H. italicum* uçucu yağının; 1 µg/ml konsantrasyonda en düşük % antioksidan aktivite değeri olan %11,7’den, 500 µg/ml konsantrasyonda en yüksek % antioksidan aktivite değeri olan %65,48’e bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

Soxhlet ekstraksiyon sonucunda elde edilen *H. italicum* ekstraktının; 1 µg/ml konsantrasyonda en düşük % antioksidan aktivite değeri olan %17,48’den, 500 µg/ml konsantrasyonda en yüksek % antioksidan aktivite değeri olan %69,32’ye bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen *H. italicum* ekstraktının; 1 µg/ml konsantrasyonda en düşük % antioksidan aktivite değeri olan %18,16’dan, 500 µg/ml konsantrasyonda en yüksek % antioksidan aktivite değeri olan %72,46’ya bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

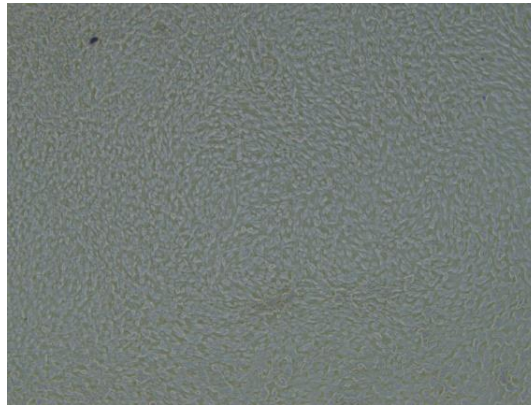


Şekil 4.9 Süper kritik CO₂ ekstraktı ve uçucu yağ DPPH analiz karşılaştırması

Şekil 4.9’da süper kritik CO₂ ekstraktı ve uçucu yağ DPPH analiz karşılaştırması gösterilmektedir. Ölçüm sağlanan reaktifin rengindeki azalma, analiz edilen bileşiğin konsantrasyonu ve antioksidatif aktivitesi ile doğru orantılı olarak literatürde yer almakta olup, mevcut tez çalışması kapsamında da destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan DPPH analizi ve literatür bilgileri ışığında antioksidan özelliğin diğer iki ekstraksiyon ürününe kıyasla en yüksek süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakta, diğer iki ekstraksiyon ürününe kıyasla en düşük su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen *H. italicum* uçucu yağında olduğu belirlenmiştir.

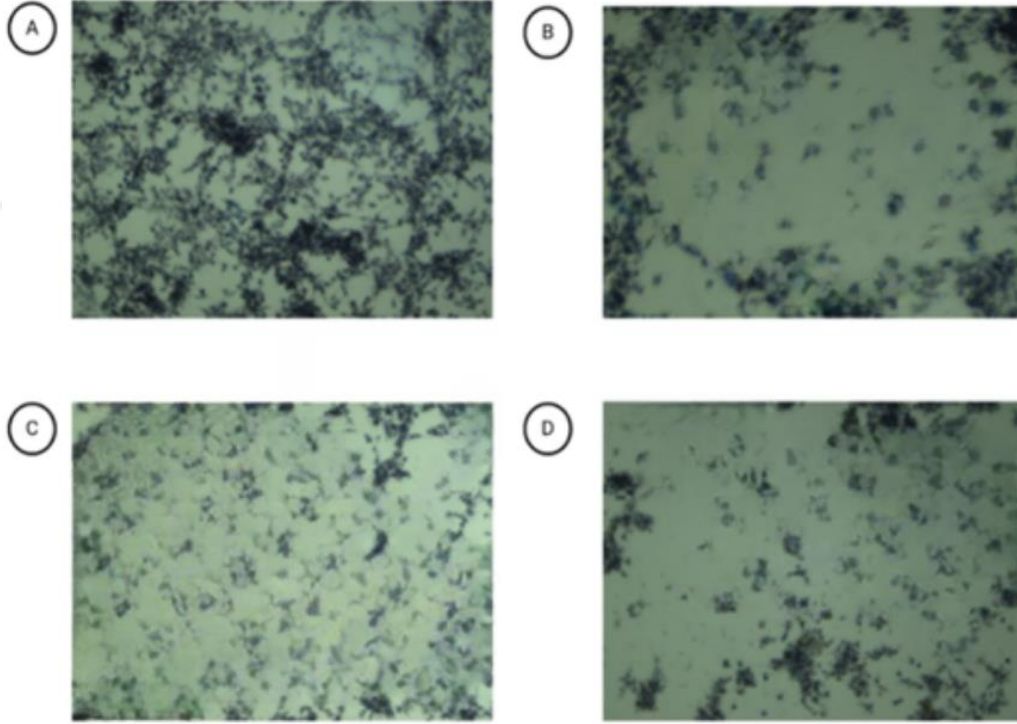
4.4 *H. italicum* Ekstraktlarının L929 Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksisite Analizi

Üç farklı ekstraksiyon metodu ile hazırlanan *H. italicum* ekstraktları örnek bir görüntüsü şekil 4.10’da gösterilen L929 Fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksisite analizleri MTT testi ile gerçekleştirilmiştir.



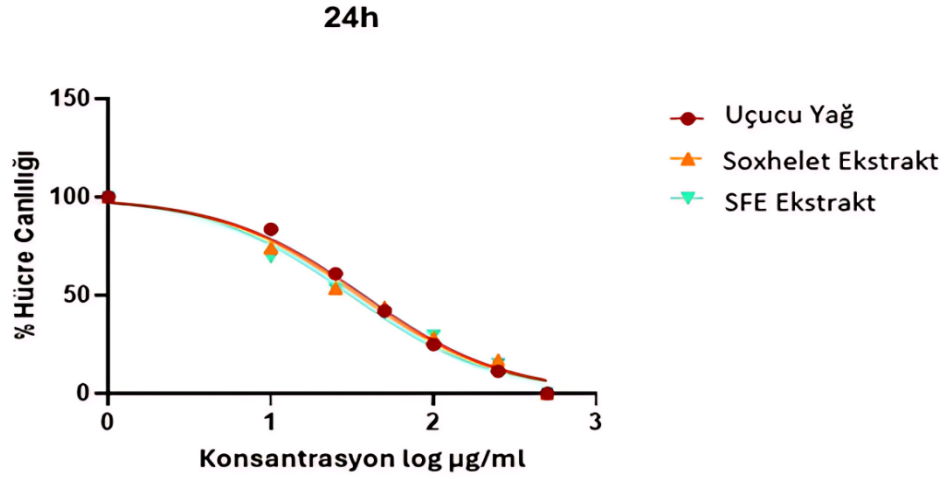
Şekil 4.10 L929 Fibroblast hücre hattı (x5 büyütme)

H. italicum ekstraktlarının IC₅₀ değerlerinin hesaplanması mevcut tez kapsamında bir sonraki aşamada gerçekleştirilecek olan yara iyileşmesi testi için de büyük önem arz etmektedir. Yara iyileşmesi testinde kullanılacak olan ekstraktların uygulama dozları belirlenirken IC₅₀ değerinde ya da yakın bir konsantrasyonda belirlenmesi, hücre canlılığına yüksek düzeyde zarar vererek hücre göçünün incelenmesini sağlamaktadır. Böylelikle *H. italicum* ekstraksiyonlarının yalnızca ekstraksiyon uygulaması farklılıklarının etkisi tespit edilebilecektir.



Şekil 4.11 L929 Fibroblast hücre hattında MTT sonucunda oluşan formazan kristal yapıları (24 saat / 500 µg/ml). A: İlaç etken madde uygulanmayan kontrol grubu hücre (x5 büyütme), B: Su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ uygulanan hücre MTT görüntüsü (x5 büyütme), C: Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrakt uygulanan hücre MTT görüntüsü (x5 büyütme), D: Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt uygulanan hücre MTT görüntüsü (x5 büyütme).

Şekil 4.11’de sunulan D unsurunda görüldüğü gibi süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktın IC₅₀ değerinin diğer iki ekstrakta kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir.



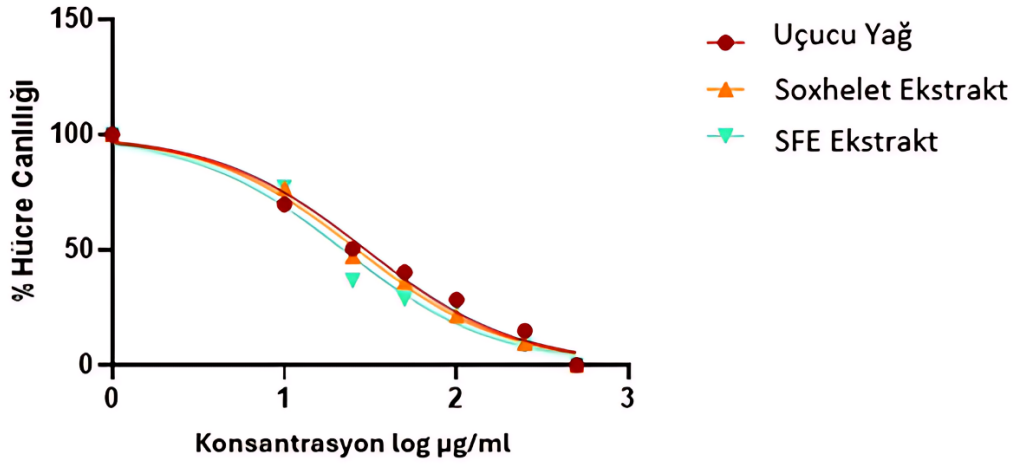
Şekil 4.12 Üç farklı ekstraktın 24. saat % hücre canlılığı-konsantrasyon grafiği

Tablo 4.2 Üç farklı ekstraktın 24. saat IC₅₀ değerleri

24. Saat	
Ekstrakt Türü	IC ₅₀ Değeri
Su Buharı Distilasyonu (Uçucu Yağ)	37,28 µg/ml
Soxhelet Ekstraksiyonu	34,57 µg/ml
Süper Kritik CO ₂ Ekstraksiyonu	31,18 µg/ml

Şekil 4.12 ve tablo 4.2'ye göre *H. italicum* ekstraktlarının artan dozlarda hücre canlılığı yüzdesini azalttığı belirlenmiştir. 24 saat inkübasyon işlemi sonrasında MTT test sonucunda su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın IC₅₀ değeri 37,28 µg/ml, soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktın IC₅₀ değeri 34,57 µg/ml ve süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktın IC₅₀ değeri 31,18 µg/ml olarak belirlenmiştir.

48h



Şekil 4.13 Üç farklı ekstraktın 48. saat % hücre canlılığı-konsantrasyon grafiği

Tablo 4.3 Üç farklı ekstraktın 48. saat IC₅₀ değerleri

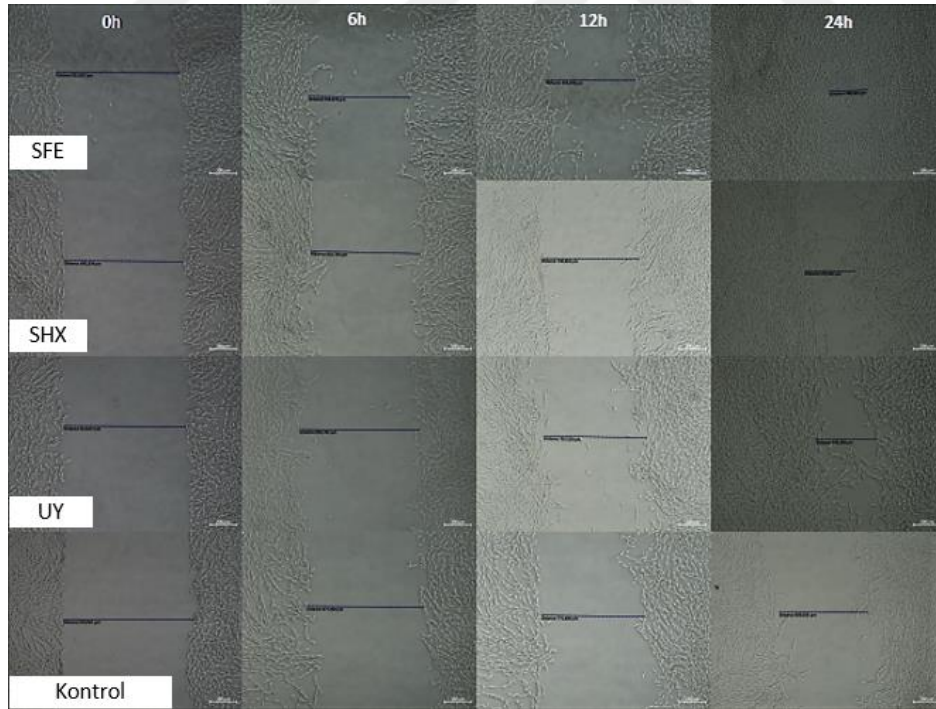
48. Saat	
Ekstrakt Türü	IC ₅₀ Değeri
Su Buharı Distilasyonu (Uçucu yağ)	29,83 µg/ml
Soxhelet Ekstraksiyonu	26,78 µg/ml
Süper Kritik CO ₂ Ekstraksiyonu	22,16 µg/ml

Şekil 4.13 ve tablo 4.3'te 48. saat MTT test sonuçlarına göre üç farklı ekstraktın IC₅₀ değerleri sunulmaktadır. Su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın IC₅₀ değeri 29,83 µg/ml, soxhlet ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktın IC₅₀ değeri 26,78 µg/ml ve süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktın IC₅₀ değeri 22,16 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında üç farklı yöntem ile elde edilmiş *H. italicum* ekstraktının da IC₅₀ değerlerinin düştüğü anlaşılmaktadır.

4.5 *H. italicum* Ekstraktlarının Yara İyileşmesi Analizi Sonuçları

Üç farklı yöntem ile elde edilen ekstraktların L929 Fibroblast hücrelerinde yara iyileştirme etkinlikleri incelenmiştir. Konfluent hale gelen hücelere 200µl'lik pipet ucu kullanılarak bir çizik açılmak suresiyle yara oluşturulmaktadır. Hücelere 24. saat IC₅₀ değerinde *H. italicum* ekstraktları uygulanmıştır. Çiziklerin her bir kenarı arasındaki mesafeler ImageJ programı kullanılarak ölçülmüş ve herhangi bir ekstrakt uygulaması yapılmayan kontrol grubu ile kıyaslanarak yara kapanma yüzdesi belirlenmiştir.

H.italicum bitkisinden üç farklı yöntem ile elde edilen ekstraktlarının fibroblast hücrelerinin migrasyonunu uyarma kabiliyeti tespit edilmiş ve karşılaştırılmıştır. 0., 6., 12. ve 24. saat hücre görüntüleri ve bu görüntülerden de ölçümler elde edilmiştir. Şekil 4.14'te üç farklı ekstraksiyonun hücelere uygulanması ve kontrol ile kıyaslanması görülmektedir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktın uygulandığı hücrelerin, kontrol grubu hücrelerine kıyasla yara bölgesinde göç eden hücre sayısı artmıştır.



Şekil 4.14 Üç farklı ekstraktın çizik açılan hücelere uygulanması ve kontrol ile kıyaslanması

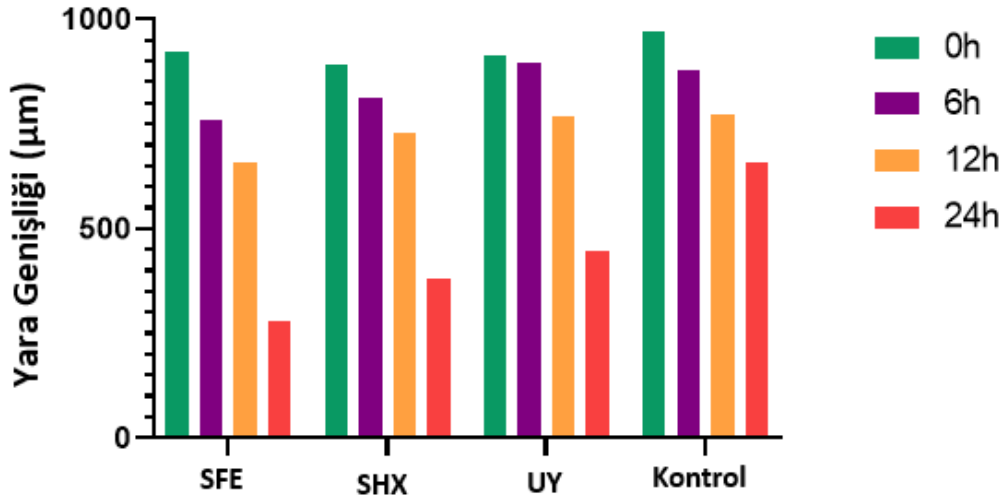
24. saat sonunda gerçekleştirilen yara iyileşme ölçümleri dikkate alındığında herhangi bir ekstrakt uygulaması yapılmayan kontrol grubu hücrelerde yara

iyileşme yüzdesi %32, su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen uçucu yağ uygulanan hücrelerde yara iyileşme yüzdesi %50,94, soxhlet ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktın uygulandığı hücrelerde yara iyileşme yüzdesi %57,38 ve süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktın uygulandığı hücrelerde yara iyileşme yüzdesi %69,60 olarak tespit edilmiş ve tablo 4.4.'da sunulmuştur.

Tablo 4.4 Üç farklı ekstrakt uygulanan L929 fibroblast hücre hatlarında yara iyileşme yüzdeleri

	Kontrol	Uçucu Yağ	Soxhlet Ekstraktı	Süper Kritik CO ₂ Ekstraktı
Yara İyileşme Yüzdesi	%32,00	%50,94	%57,38	%69,60

0., 6., 12. ve 24. saat hücre görüntülerinden elde edilen ölçümler şekil 4.15'te sunulan grafikte ayrıntılı olarak görülmektedir.



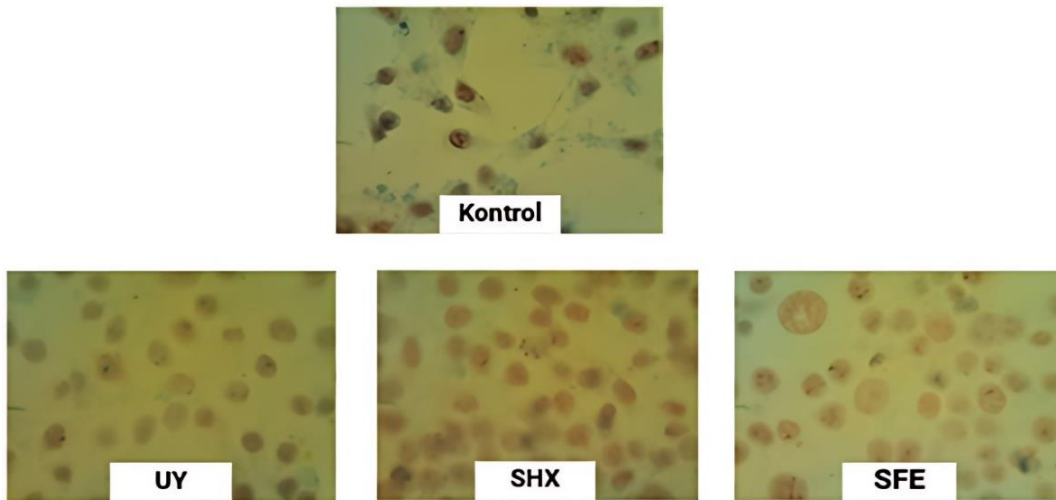
Şekil 4.15 0., 6., 12. ve 24. saat hücre görüntülerinden elde edilen yara iyileşmesi ölçümleri

Söz konusu yara iyileşme ölçümlerinin, ekstraktların 24. saat IC₅₀ konsantrasyonlarında uygulandığı göz önünde bulundurulduğunda en düşük konsantrasyonda uygulanan ekstrakt süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakttır. En yüksek konsantrasyonda uygulanan ekstrakt ise su buharı

distilasyonu sonucunda elde edilen uçucu yağ olarak belirlenmiştir. En düşük konsantrasyonda uygulanan ekstrakt süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt olmasına rağmen kontrol grubuna kıyasla en iyi yara iyileşmesini sağlamıştır.

4.6 *H. italicum* Ekstraktlarının PCNA Analizi Sonuçları

Deney grupları arasında L929 fibroblast hücre hattında PCNA işaretli hücre oranlarına ait değerler incelendi. PCNA işaretli hücrelerde IC₅₀ değerleri doğrultusunda *H. italicum* ekstraktları uygulandı ve proliferasyon yüzdeleri değerlendirildi. Uygulanan ekstraktların, hücre hattı üzerindeki proliferasyonu artırması hedeflenmekte olup bu sayede yara iyileşmesi gerçekleşecektir. İmmünohistokimya sonuçlarına göre, kontrol grubundaki L929 hücrelerinde proliferasyon yüzdesi %66 olarak belirlenmiştir. Su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen uçucu yağın L929 hücre hattına uygulanması sonucunda proliferasyon %75 oranına artmıştır. Soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktın hücre hattına uygulanması sonucunda proliferasyon yüzdesi %81 olarak kaydedilmiştir. PCNA analiz sonucunda elde edilen veriler tablo 4.5'te, seçilen bölgelerin mikroskop görüntüleri ise şekil 4.16'da sunulmuştur. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktın hücre hattına uygulanması sonucunda yara iyileşmesi analizini de destekler nitelikte proliferasyon yüzdesi %90'a yükselmiştir. Bu durum da en yüksek proliferasyon gösteren ekstrakt olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 4.16 Üç farklı ekstraktın PCNA mikroskop görüntüleri (x100 büyütme)

Tablo 4.5 Üç farklı ekstraktın proliferasyon yüzdeleri

PCNA	
Grup	Proliferasyon Yüzdesi
Kontrol	%66
Su Buharı Distilasyonu (Uçucu Yağ)	%75
Soxhelet Ekstraksiyonu	%81
Süper Kritik CO ₂ Ekstraksiyonu	%90

4.7 *H. italicum* Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Analizleri

Üç farklı yöntem ile elde edilen *H. italicum* ekstraktlarının kalibrasyon eğrileri oluşturulduktan ve sitotoksikite analizleri gerçekleştirilip IC₅₀ değerleri belirlendikten sonra tablo 4.6.'da verilen parametrelere uygun boş kitosan nanopartikül ve üç farklı *H. italicum* ekstraktı yüklü kitosan nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Mevcut tez çalışması kapsamında iyonik jelasyon ile kitosan nanopartikül sentez yöntemi tercih edilmiştir. Literatür kapsamında halihazırda optimize edilmiş söz konusu bu yöntem kullanılırken aşağıda sunulan parametreler kullanılmıştır.

Tablo 4.6 Kitosan nanopartikül sentezinde kullanılan parametreler

Nanopartikül Adı	Bileşenler				Sonikasyon Parametreleri	pH
	Kitosan (mg)	TPP (mg)	Asetik Asit (ml/ml)	Ekstrakt µg/ml		
CNP	20 mg	1 mg	%1 ml/ml	-	300 sn - 70 W	4.8

Tablo 4.6 Kitosan nanopartikül sentezinde kullanılan parametreler (devamı)

Nanopartikül Adı	Bileşenler				Sonikasyon Parametreleri	pH
	Kitosan (mg)	TPP (mg)	Asetik Asit (ml/ml)	Ekstrakt $\mu\text{g/ml}$		
UY-CNP	20 mg	1 mg	%1 ml/ml	37,28 $\mu\text{g/ml}$	300 sn - 70 W	4.8
SHX-CNP	20 mg	1 mg	%1 ml/ml	34,57 $\mu\text{g/ml}$	300 sn - 70 W	4.8
SFE-CNP	20 mg	1 mg	%1 ml/ml	31,18 $\mu\text{g/ml}$	300 sn - 70 W	4.8

Partiküller sentezlenirken karakterizasyon çalışmaları üzerinde en önemli etkiyi sergileyecek olan parametre eklenen ekstrakt konsantrasyonudur. Tablo 4.6.'da belirtilen parametrelere uygun sentezlenen kitosan nanopartiküllerin % enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve % etken madde yüklene kapasitesi (%DL) hesaplanmıştır. %EE ve %DL değerlerinin hesaplanabilmesi için nanopartiküllerin sentezi esnasında gerçekleştirilen santrifüj işlemi ardından elde edilen süpernatantlar saklanmıştır.

Ekstrakt miktarları en fazla uçucu yağ ve en az süper kritik CO₂ ekstraktı olacak şekildedir. Söz konusu muamele miktarının farklılığının sebebi başlangıçta da değinildiği gibi 24. saat IC₅₀ değerlerindeki farklılıktır. Saklanan süpernatantlar kullanılarak UV-Vis spektrometre ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda yapılan hesaplamalardan elde edilen veriler tablo 4.7'de reaksiyon verimi, %EE, %DL, boyut, PDI ve zeta potansiyel başlıkları altında sunulmuştur. Elde edilen veriler, formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmek açısından önem arz etmektedir. Özellikle %EE ve %DL değerleri, etkin maddenin enkapsülasyon başarısını göstermesi bakımından kritik parametrelerdir. Ayrıca zeta potansiyel ölçümleri, sistemin stabilitesi hakkında bilgi sağlamaktadır.

Tablo 4.7 Sentezlenen nanopartiküllere ilişkin veriler

NP Adı	Reaksiyon verimi	%EE	%DL	Boyut Z-Ave (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
CNP	%75	-	-	143.0±0.41	0,241±0.004	+18.6±0.8
UY-CNP	%39,12	%87,50	%4,893	190.3±1.56	0.295±0.007	-15.4±0.3
SHX-CNP	%44,07	%88,88	%4,126	185.2±1.20	0.271±0.006	-9.8±0.5
SFE-CNP	%53,98	%90,90	%3,090	190.3±1.56	0.259±0.006	-16.1±0.3

Reaksiyon verimleri incelendiğinde en yüksek reaksiyon verimi herhangi bir ekstrakt yüklenmemiş kitosan nanopartiküllerde görülmektedir. Sentezde kullanılan polimer miktarı her bir nanopartikül için eşit olup etken madde miktarı değişkenlik göstermektedir. Enkapsülasyon etkinliği en yüksek süper kritik CO₂ ekstraktı ile hazırlanan nanopartikülde görülürken en düşük enkapsülasyon etkinliği uçucu yağ ile hazırlanan nanopartiküldedir. Santrifüj işlemlerinden sonra ayrılarak muhafaza edilen süpernatantlarda mevcut olan serbest etken madde miktarı araştırılarak enkapsülasyon etkinlikleri hesaplanmıştır. İlaç yükleme kapasitesi ise doğrudan enkapsüle edilebilen madde miktarı ile ilişkilidir. En yüksek ilaç yükleme kapasitesi uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerde görülmektedir. Bu durum enkapsüle edilebilen madde miktarının, elde edilen nanopartiküllere oranının yüksek olduğunu göstermektedir.

4.8 *H. italicum* Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin FT-IR Analizi

Şekil 4.17’de yer alan FT-IR spektrumları kitosan, UY-CNP, SFE-CNP ve SHX-CNP sistemlerinin yapısal özelliklerini karşılaştırmak amacı ile sunulmuştur. Her spektrum, kitosan yapısındaki değişiklikleri ve yüklenen bileşenlerin kitosan ile etkileşimlerini ayrıntılı olarak anlamaya yararmaktadır. Kitosan spektrumunda, hidroksil (-OH) ve amin (-NH) gruplarına ait geniş bantlar 3500-3200 cm⁻¹ arasında

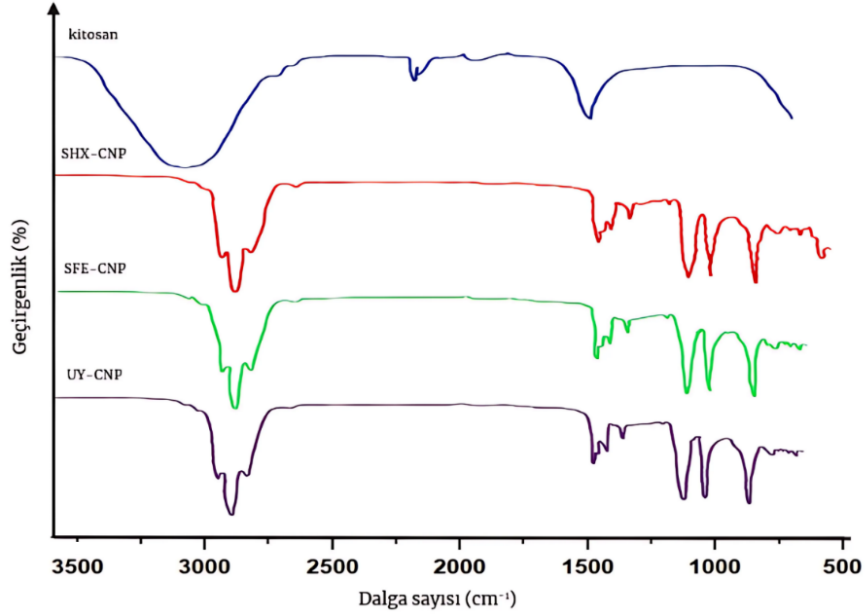
görülmektedir. Metil ve metilen gruplarına ait C-H gerilme titreşimleri 2920-2850 cm^{-1} aralığında zayıf şekilde görülmekte olup, asetillenmiş kitosan kısmına ait C=O ve N-H titreşimlerinin 1650-1550 cm^{-1} aralığında olduğu görülmektedir. Ayrıca, kitosanın glikozid bağlarını temsil eden C-O-C titreşimlerinin 1150-1000 cm^{-1} arasında gözlenmesi doğrulama sağlamaktadır. Doğrulamayı sağlayan söz konusu spektrum, kitosanın temel yapısını yansıtan karakteristik pikleri ortaya koymaktadır.

UY-CNP (uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülü) spektrumunda, 2920-2850 cm^{-1} aralığında C-H gerilme titreşimlerinin yoğunluğu artmıştır. C-H gerilme titreşimlerinin artması durumu, uçucu yağın terpenoid yapılarındaki C-H titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, 1700-1650 cm^{-1} aralığında karbonil piklerinin yoğunlaşması, uçucu yağdaki ester veya karbonil bileşiklerin kitosan yapısına başarıyla yüklendiğini kanıtlar niteliktedir. C-O titreşimleri yani 1200-1000 cm^{-1} aralığında görülen pikler, ester gruplarının kitosan yapısına eklenmiş olduğunu doğrulamaktadır.

SFE-CNP spektrumunda, karbonil titreşimlerinde yani 1700-1650 cm^{-1} aralığında görülen piklerde belirgin bir güçlenme görülmektedir. Bu durum, süper kritik CO₂ ekstraktındaki esterler ve ketonlar gibi oksijenli bileşiklerin kitosan nanopartiküllerine bağlandığını kanıtlar niteliktedir. 2920-2850 cm^{-1} aralığında görülen C-H gerilme titreşimleri alifatik yapılar içeren ekstraktın nanopartiküllere yüklenmesiyle yoğunluk kazanmıştır. Ayrıca, ester yapılarındaki 1200-1000 cm^{-1} aralığında görülen C-O titreşimleri de belirgin hale gelmiştir.

SHX-CNP spektrumunda ise O-H ve N-H gerilme titreşimleri (3500-3200 cm^{-1}) genişlemiştir. Bu durum, Soxhlet ekstraktındaki fenolik bileşiklerin veya su içeriğinin kitosan yapısı ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Karbonil titreşimleri (1700-1650 cm^{-1}), Soxhlet ekstraktında bulunan esterler ve ketonlar gibi oksijenli bileşiklerin kitosan nanopartiküllerine bağlandığını kanıtlamaktadır. C-H gerilme titreşimlerinin yoğunluğu (2920-2850 cm^{-1}), Soxhlet ekstraktındaki alifatik grupların varlığını yansıtırken; C-O titreşimleri (1200-1000 cm^{-1}), esterler ve fenolik yapılar nedeniyle belirginleşmiştir. Ekstraktlar arasında karşılaştırma yapmak mevcut tezin amaçları arasında yer aldığından; UY-CNP, uçucu yağdaki terpenoid yapılar nedeniyle C-H ve karbonil titreşimlerinde artış göstermiştir; SFE-CNP, süper kritik CO₂ ekstraktındaki oksijenli bileşikler (örn. C=O ve C-O)

nedeniyle pik yoğunlaşmaları sergilemiştir ve son olarak SHX-CNP, Soxhlet ekstraktındaki polar bileşiklerin etkisiyle O-H ve C=O bölgelerinde daha geniş bantlar ve yoğun pikler göstermiştir şeklinde değerlendirme yapmak mümkündür.



Şekil 4.17 *H. italicum* ekstraktları yüklü nanopartiküllerin ve kitosanın FT-IR spektrumları

4.9 *H. italicum* Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin SEM Analizi



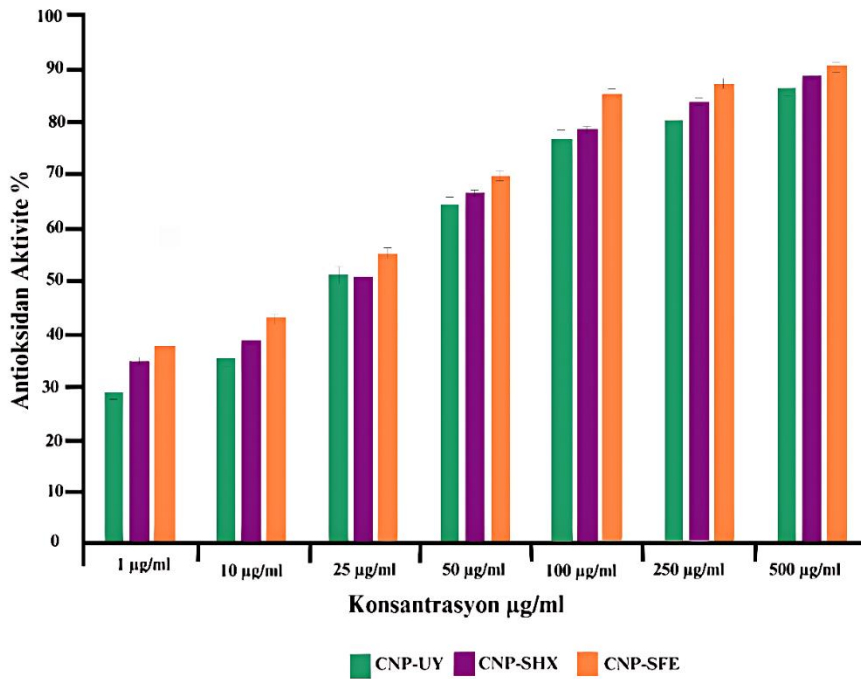
Şekil 4.18 Süper kritik CO₂ ekstraktı yüklü nanopartiküllere ait 50.000X büyütme oranı ile çekilmiş SEM görüntüsü

Mevcut tez çalışmasında, yüklü kitosan nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla SEM görüntüleme tekniği kullanılmıştır. Şekil 4.18’de SFE-CNP’ye ait SEM görüntüsü sunulmuştur.

Nanopartiküllere ait boyut analizi, şekil ve yüzey morfolojisi incelenirken SEM kullanılmış olup, görüntüler Carl-Zeiss EVO LS10 taramalı elektron mikroskopunda alınmıştır. Elektron mikroskobu ile elde edilen yüklü kitosan nanopartiküllerin SEM görüntüsü şekil 4.18’de sunulan görüntüsü incelendiğinde partiküller küresel yapıdadır. Boyutları 100-200 nm aralığında görülmektedir, yüzeylerinde herhangi bir etken madde görülmemektedir ve küresel şekilli partiküller homojen olarak dağılım göstermektedir.

4.10 *H. italicum* Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Antioksidan Aktivite Sonucu

Kitosan nanopartiküllerin 1–500 µl/ml konsantrasyon aralığındaki antioksidan aktivite çalışma verileri şekil 4.19’daki grafikte sunulmuştur. Mevcut tez çalışması kapsamında ekstraktların 24. saat IC₅₀ değerlerinde ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküller sentezlenmiştir.



Şekil 4.19 Kitosan nanopartiküllerin 1-500µl/ml konsantrasyon aralığındaki antioksidan aktivite çalışma verileri

Üç farklı ekstrakt ile yüklenmiş nanopartiküller kullanılarak 1 µg/ml-500 µg/ml konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmak suretiyle DPPH antioksidan aktivite analizi gerçekleştirilmiş ve analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri kaydedilmiştir. Kaydedilen absorbans değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan % antioksidan aktivite değerleri tablo 4.8’de sunulmuştur.

Tablo 4.8 Absorbans değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan % antioksidan aktivite verileri

	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml
UY-CNP	%29,62	%36,15	%52,70	%66,48	%76,56	%83,32	%89,46
SHX-CNP	%35,41	%40,18	%52,46	%68,74	%81,35	%87	%91,76
SFE-CNP	%38,81	%44,47	%56,94	%72,23	%88,10	%90,23	%94,12

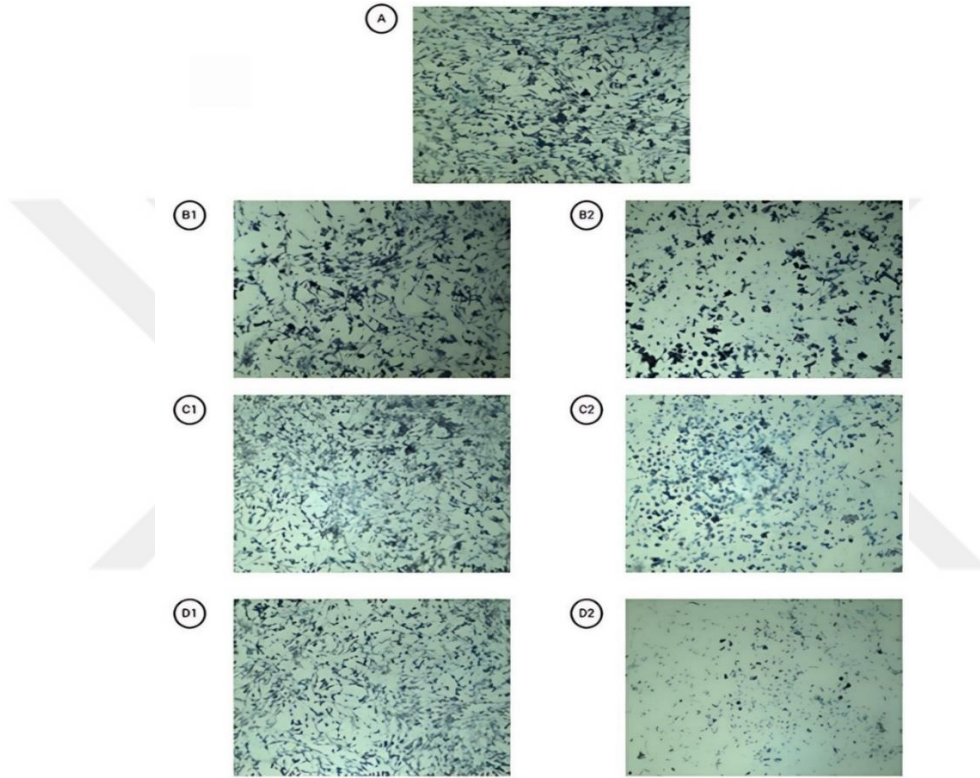
Su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen *H. italicum* uçucu yağı yüklü kitosan nanopartikülün; 1 µg/ml konsantrasyonda en düşük % antioksidan aktivite değeri olan %29,62’den, 500 µg/ml konsantrasyonda en yüksek % antioksidan aktivite değeri olan %89,46’ya anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

Soxhlet ekstraksiyon sonucunda elde edilen *H. italicum* ekstraktı yüklü kitosan nanopartikülün; 1 µg/ml konsantrasyonda en düşük % antioksidan aktivite değeri olan %35,41’den, 500 µg/ml konsantrasyonda en yüksek % antioksidan aktivite değeri olan %91,76’ya anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

Süper Kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen *H. italicum* ekstraktı yüklü kitosan nanopartikülün; 1 µg/ml konsantrasyonda en düşük % antioksidan aktivite değeri olan %38,81’den, 500 µg/ml konsantrasyonda en yüksek % antioksidan aktivite değeri olan %94,12’ye anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

Ekstraktların ve nanopartiküller her konsantrasyonunda uçucu yağ ve uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikül en düşük antioksidan aktivite gösterirken, süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt ve yüklü nanopartikül en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir.

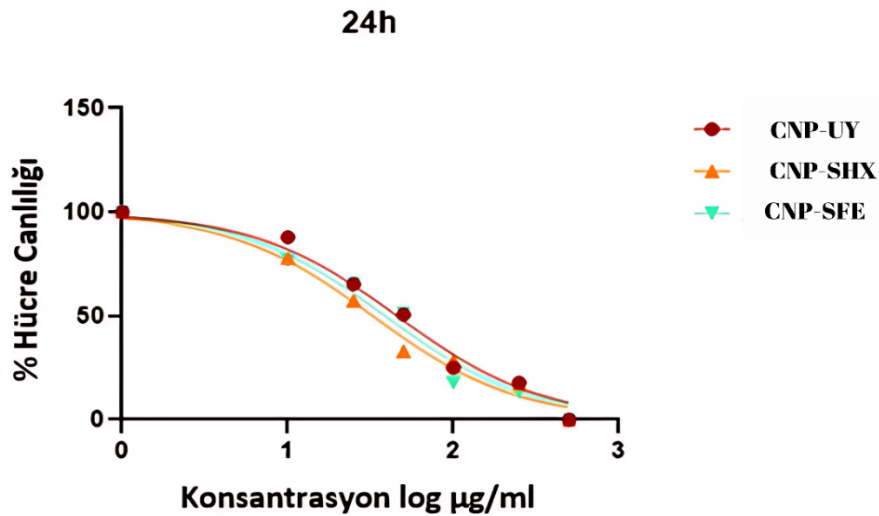
4.11 *H. italicum* Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin L929 Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksikite Analizi



Şekil 4.20 L929 Fibroblast hücre hattında MTT sonucunda oluşan formazan kristal yapıları (24 saat / 10 µg/ml / 500 µg/ml): A: İlaç etken madde uygulanmayan kontrol grubu hücre (x5 büyütme), B1: Su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ yüklü 10 µg/ml nanopartikül uygulanan hücre MTT görüntüsü (x5 büyütme), B2: Su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ yüklü 500 µg/ml nanopartikül uygulanan hücre MTT görüntüsü (x5 büyütme), C1: Süper Kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakt yüklü 10 µg/ml nanopartikül uygulanan hücre MTT görüntüsü (x5 büyütme), C2: Süper Kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakt yüklü 500 µg/ml nanopartikül uygulanan hücre MTT görüntüsü (x5 büyütme), D1: Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrakt yüklü 10 µg/ml nanopartikül uygulanan hücre MTT görüntüsü (x5

büyütme), D2: Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrakt yüklü 500 µg/ml nanopartikül uygulanan hücre MTT görüntüsü (x5 büyütme).

Uçucu yağ, soxhlet ekstrakt ve süper kritik CO₂ ekstraktları sentez aşamasında kitosan nanopartiküllere 24. saat IC₅₀ konsantrasyon miktarlarında yüklenmiştir. Düşük IC₅₀ değeri uygulanan ekstrakt ya da genel kullanımı ile etken maddenin yüksek sitotoksositeye sahip olduğu anlamına gelmektedir. Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin IC₅₀ değerlerinin tespit edilmesi bir sonraki aşamada gerçekleştirilen yara iyileşmesi testi için de büyük önem arz etmektedir. Şekil 4.15'te L929 Fibroblast hücre hattında MTT testi sonucunda oluşan formazan kristal yapıları sunulmaktadır. Şekil 4.20'de A görüntüsünde ilaç etken madde uygulanmayan kontrol grubu L929 fibroblast hücreleri sunulmaktadır. B1-2, C1-2, D1-2'de ise 1 ile etiketlenen görseller düşük doz yani 10 µg/ml konsantrasyonda ekstrakt yüklü nanopartikül uygulanan hücreleri gösterirken 2 ile etiketlenen görseller yüksek doz yani 500 µg/ml konsantrasyonda ekstrakt yüklü nanopartikül uygulanan hücreleri göstermektedir. Şekil 4.20 – D1 ve D2'de görüldüğü gibi soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların IC₅₀ değerinin diğer iki ekstrakta kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Koyu mor renkle görünen yapılar formazan kristalleri olarak nitelendirilmektedir. Spektrofotometrik ölçümler sonucunda elde edilen sayısal veriler söz konusu öngörüyü destekler niteliktedir. Şekil 4.21'de grafik olarak ve tablo 4.9'da sayısal olarak 24. saat MTT testi sonuçları sunulmuştur.



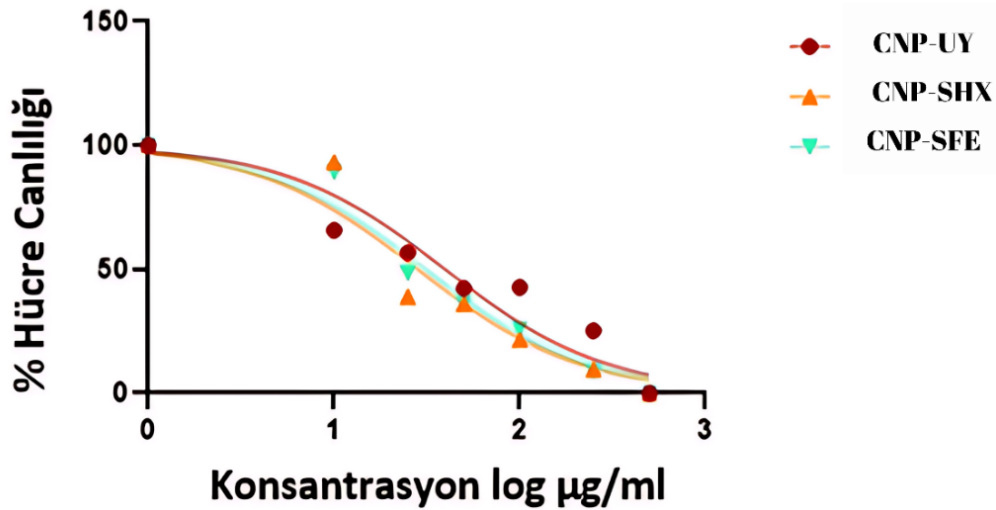
Şekil 4.21 Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin 24. saat % hücre canlılığı-konsantrasyon grafiği

Tablo 4.9 Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin 24. saat IC₅₀ değerleri

24 Saat	
Ekstrakt Türü	IC ₅₀ Değeri
Su Buharı Distilasyonu yüklü CNP	45,98 µg/ml
Soxhelet Ekstraktı yüklü CNP	32,64 µg/ml
Süper Kritik CO ₂ Ekstraktı yüklü CNP	39,11 µg/ml

24 saat inkübasyon işlemi sonrasında MTT test sonucunda su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerin IC₅₀ değeri 45,98 µg/ml, soxhelet ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartikülün IC₅₀ değeri 32,64 µg/ml ve süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartikülün IC₅₀ değeri 39,11 µg/ml olarak belirlenmiştir. Yalnızca ekstraktlar kullanılarak gerçekleştirilen MTT testi sonucunda IC₅₀ değeri en yüksek olan ekstrakt su buharı distilasyonu yoluyla elde edilen uçucu yağ ve en düşük IC₅₀ değeri ise süper kritik CO₂ ekstraktında görülmekteydi.

48h



Şekil 4.22 Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin 48. saat % hücre canlılığı-konsantrasyon grafiği

Tablo 4.10 Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin 48. saat IC₅₀ değerleri

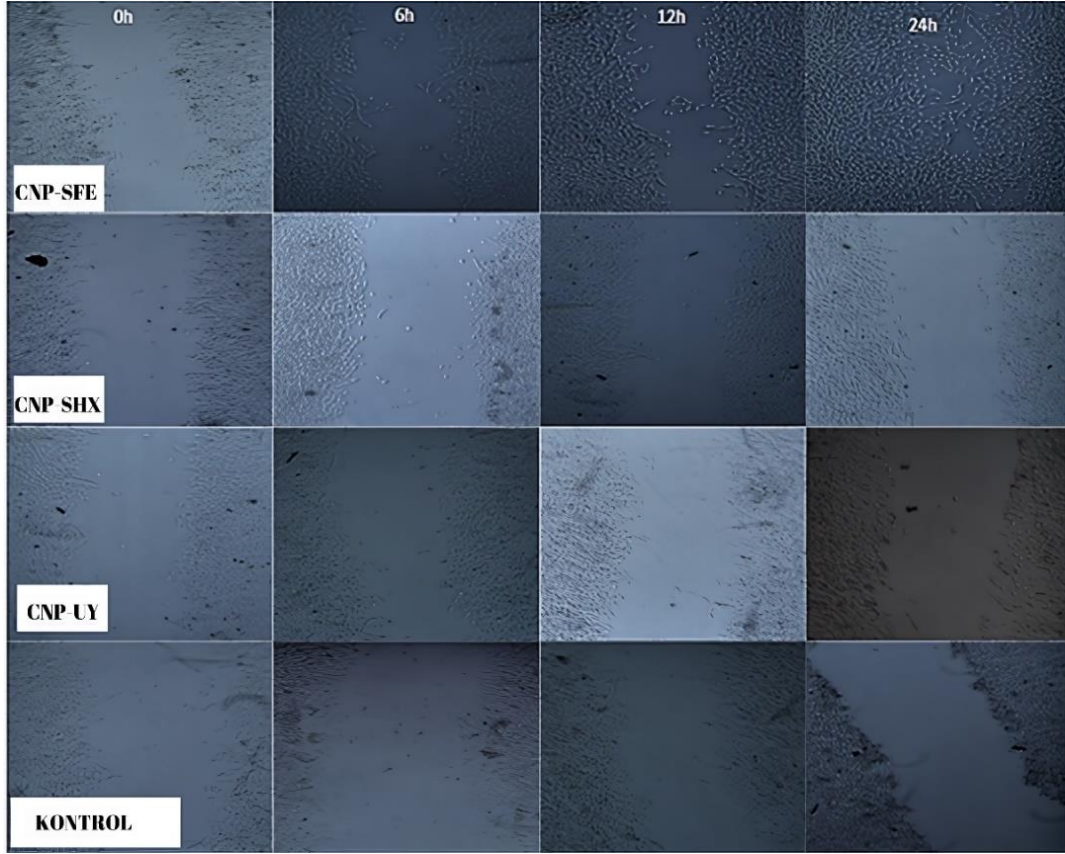
48 Saat	
Ekstrakt Türü	IC ₅₀ Değeri
Su Buharı Distilasyonu yüklü CNP	39,80 µg/ml
Soxhelet Ekstraktı yüklü CNP	28,34 µg/ml
Süper Kritik CO ₂ Ekstraktı yüklü CNP	31,41 µg/ml

Şekil 4.22'ye göre 48. saat MTT test sonuçlarına göre üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartikülün IC₅₀ değerleri sunulmaktadır. Su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülün IC₅₀ değeri 39,80 µg/ml, soxhlet ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartikülün IC₅₀ değeri 28,34 µg/ml ve süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartikülün IC₅₀ değeri 31,41 µg/ml olarak belirlenmiştir. L929 hücre hattında 48. saat ölçümlerinde elde edilen verilere göre üç farklı yöntem ile elde edilmiş *H. italicum* ekstraktı yüklü kitosan nanopartikülün de IC₅₀ değerlerinin düştüğü görülmektedir.

4.12 *H. italicum* Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Yara İyileşme Analizi Sonucu

Üç farklı yöntem ile elde edilen ekstraktlar 24. saat IC₅₀ değerlerinde kitosan nanopartiküllere yüklenmiştir. Ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin L929 fibroblast hücre hattında yara iyileştirme özellikleri incelenmiştir. Konfluent hale gelen hücrelere 200µl'lik pipet ucu kullanılarak bir çizik açıldı ve çiziklerin her bir kenarı arasındaki mesafeler ImageJ programı kullanılarak ölçüldü. Herhangi bir ekstrakt yüklü nanopartikül uygulaması yapılmayan kontrol grubu ile kıyaslanarak yara kapanma yüzdesi belirlenmiştir. *H.italicum* bitkisinden üç farklı yöntem ile elde edilen ekstrakt yüklü nanopartiküller fibroblast hücrelerinin migrasyonunu uyarma kabiliyeti tespit edilmiş ve karşılaştırılmıştır. 24. saat sonunda ölçülen IC₅₀ konsantrasyonunda ekstraktlar ile yüklenmiş nanopartiküller ekstraktların 24. saat

IC₅₀ değerinde hücre hattına uygulandı. 0., 6., 12. ve 24. saat hücre görüntüleri ve bu görüntülerden de ölçümler elde edildi. Şekil 4.23'te sunulduğu gibi süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktın uygulandığı hücrelerin, kontrol grubu hücrelerine kıyasla yara bölgesinde tespit edilen g   eden hücre sayısı artmıştır.



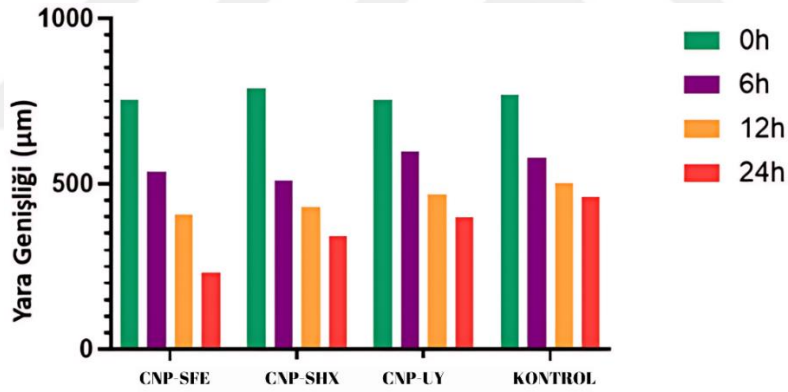
Şekil 4.23 üç farklı ekstrakt yüklü nanopartiküllerin çizik açılan hücrelere uygulanması ve kontrol ile kıyaslanması

24. saat sonunda gerçekleştirilen yara iyileşme ölçümleri dikkate alındığında tablo 4.11'de de görüldüğü gibi herhangi bir ekstrakt yüklü nanopartikül uygulaması yapılmayan kontrol grubu hücrelerde yara iyileşme yüzdesi %40,31, su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen uçucu yağ y kl m kitosan nanopartikül uygulanan hücrelerde yara iyileşme yüzdesi %47,17, soxhlet ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartikül uygulandığı hücrelerde yara iyileşme yüzdesi %56,67 ve süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartikül uygulandığı hücrelerde yara iyileşme yüzdesi %79,10 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.11 Üç farklı ekstrakt yüklü nanopartikül uygulanan L929 fibroblast hücre hatlarında yara iyileşme yüzdeleri

	K-CNP	UY-CNP	SHX-CNP	SFE-CNP
Yara İyileşme Yüzdesi	%40,31	%47,17	%56,67	%79,10

Söz konusu yara iyileşme ölçümlerinin, ekstrakt yüklü nanopartiküllerin 24. saat IC₅₀ konsantrasyonlarında uygulandığı göz önünde bulundurulduğunda en düşük konsantrasyonda uygulanan ekstrakt soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakttır. En yüksek konsantrasyonda uygulanan ekstrakt ise su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen uçucu yağ olarak belirlenmiştir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü nanopartiküller L929 fibroblast hücrelerine düşük konsantrasyonda uygulanmasına rağmen kontrol grubu hücrelerine kıyasla yara iyileşmesini %38,79 daha fazla sağlamıştır. Yara iyileşmesini gösteren grafik de şekil 4.24'te sunulmuştur.



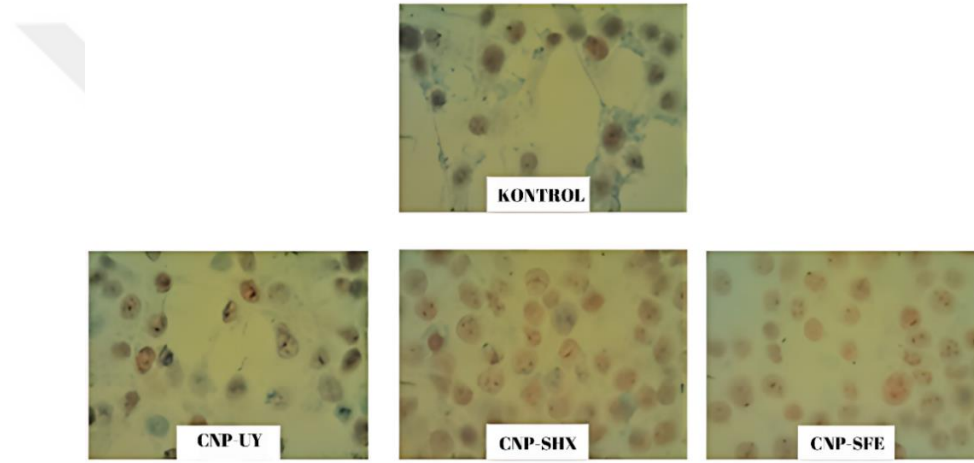
Şekil 4.24 0., 6., 12. ve 24. saat hücre görüntülerinden elde edilen ölçümler

4.13 *H. italicum* Ekstraktları Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin PCNA Analizi Sonuçları

PCNA işaretli hücrelere 24. saat IC₅₀ değerleri doğrultusunda *H. italicum* ekstraktları yüklü kitosan nanopartiküller uygulandı ve proliferasyon yüzdeleri değerlendirildi. Uygulanan ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin, hücre hattı üzerindeki proliferasyonu arttırması hedeflenmekte olup bu sayede yara iyileşmesi gerçekleşecektir. İmmünohistokimya sonuçlarına göre, kontrol grubundaki L929 hücrelerinde proliferasyon yüzdesi %66 olarak belirlenmişti. Su buharı distilasyonu

sonucunda elde edilen uçucu yağ yüklü kitosan nanopartikülün L929 hücre hattına uygulanması sonucunda proliferasyon %81 oranına, soxhlet ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartikülün hücre hattına uygulanması sonucunda proliferasyon yüzdesi %82 oranına yükselmiştir.

Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartikülün hücre hattına uygulanması sonucunda yara iyileşmesi analizini de destekler nitelikte proliferasyon yüzdesi %93'e yükselmiştir. PCNA analiz sonucunda elde edilen veriler tablo 4.12'de, mikroskop görüntüleri şekil 4.25'te sunulmuştur Bu durum da en yüksek proliferasyon gösteren ekstraktın en yüksek yara iyileşmesi sağlayan ekstrakt olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 4.25 Üç farklı ekstrakt yüklü nanopartikülün PCNA mikroskop görüntüleri (x100 büyütme)

Tablo 4.12 Üç farklı ekstrakt yüklü nanopartiküllerin proliferasyon yüzdeleri

PCNA	
Grup	Proliferasyon Yüzdesi
K-CNP	%66
UY-CNP	%81
SHX-CNP	%82
SFE-CNP	%93

5

SONUÇ

Mevcut tez çalışması kapsamında öncelikle 3 farklı yöntem ile ekstraktlar elde edilmiştir. *H. italicum* ekstraktlarında çözücü kalıntılarının mevcut olması antioksidan aktivite verilerini olumsuz etkileyebilmektedir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonunda kimyasal çözücü söz konusu değilken, soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan organik çözücüler ekstraktan uzaklaştırılamamış olabilmektedir (Herzyk vd., 2024). *H. italicum* bitkisi çiçek kısımları her üç ekstraksiyon için de eşit ağırlık miktarında kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktların aynı kütlede ölçülmemesi bileşiklerin her birinde farklı miktarda ekstraksiyon sağlanabildiğini göstermektedir. Süper kritik CO₂, *H. italicum* ile daha yüksek etkileşim sağlayarak hücre içinde bulunan antioksidan bileşiklerin daha yüksek verimle ekstrakte edilmesini sağlamaktadır. Soxhlet ekstraksiyonu esnasında *H. italicum* hücre duvarı tam olarak parçalanamamış olabilir. Uçucu yağlar ise genellikle su buharı distilasyonu gibi yöntemler ile elde edilmekte olup distilasyon yöntemleri genellikle sadece uçucu bileşikleri ortaya çıkarmaktadır. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonunda ve soxhlet ekstraksiyonunda ise hem uçucu bileşikler hem de uçucu olmayan antioksidan bileşikler açığa çıkmakta olup bu sebeple antioksidan aktivite değerleri uçucu yağdan daha yüksektir (Cvitković vd., 2024). Süper kritik CO₂, sıvıların çözünürlüğünü ve gazların difüzyon özelliklerini bir arada taşımaktadır. Yüksek çözücülük ve difüzyon özellikleri sayesinde *H. italicum* uçucu yağından ve soxhlet ekstraktından daha yüksek antioksidan aktivite sergileyen bir ekstrakt ortaya çıkmaktadır.

Su buharı distilasyonu yöntemi ile elde edilen *H. italicum* uçucu yağı, uçucu bileşikler içerdiği için hızlı ve etkili bir şekilde DPPH radikallerini nötralize edebilirken toplam antioksidan kapasitesi ekstrakte edilen bileşiklerin sınırlı olması sebebiyle daha düşüktür. DPPH antioksidan aktivite tayin testi aynı zamanda sitotoksisite analizi ile de mevcut tez çalışması kapsamında doğrulanmıştır. *H. italicum* uçucu yağının IC₅₀ değeri soxhlet ekstraktına ve süper kritik CO₂ ekstraktına göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Söz konusu bu durum literatürde de açıklandığı gibi daha düşük bir antioksidan aktiviteye işaret etmektedir (Furlan ve Bren, 2023).

DPPH antioksidan tayin testi üç farklı yöntemle elde edilmiş ekstraktların yüklü olduğu kitosan nanopartiküller için de gerçekleştirilmiştir. Kitosan nanopartiküllerin antioksidan aktiviteleri ekstraktlar ile karşılaştırıldığında nanopartiküllerin antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu sonucu tespit edilmiştir. Kitosan nanopartiküller, yüklü ekstraktların kontrollü ve sürekli salımını sağlayabilmesi sebebi ile yüklenen ekstraktların serbest radikallerle etkileşimini daha uzun süre ve daha etkili şekilde sürdürmesini mümkün kılmaktadır. Ekstraktların kitosan nanopartiküller ile enkapsüle edilmesi sonucunda oksidasyon veya bozulma gibi istenmeyen reaksiyonlardan korunma sağlanmış bu sayede ekstrakt yüklü nanopartiküllerin antioksidan aktivitesi ekstraktlardan daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Soltanzadeh vd., 2021). Ek olarak kitosan nanopartiküller, ekstraktların homojen bir şekilde dağılımını ve çözünürlüğünü arttırmak suretiyle üç farklı ekstraktın aktif bileşenlerinin daha etkin bir şekilde serbest radikaller ile etkileşime girmesi sağlanmaktadır.

Doğal bir polisakkarit olan kitosanın serbest radikalleri temizleme kapasitesi ve oksidatif stresi azaltma potansiyeli literatürde yer almaktadır. Kitosan, serbest radikalleri yapısında bulunan amino grupların sayesinde nötralize etmektedir (Herdiana vd., 2023). Mevcut tez çalışmasında düşük molekül ağırlıklı kitosan tercih edilmesinin sebeplerinden biri de düşük molekül ağırlığındaki kitosanın yüksek molekül ağırlıklı kitosana kıyasla daha fazla serbest amino grubu içermesidir. Bu sayede yüksek antioksidan aktiviteye göstermedir (Amoli vd., 2021). Antioksidan aktiviteye ilişkin açıklanan bilgiler ışında kitosan halihazırda yüksek antioksidan aktivite sergileyen bir polisakkarittir ve *H. italicum* ekstraktları yüklü kitosan nanopartiküller sentezlendiğinde de antioksidan aktivite değerleri ekstraktlara kıyasla yüksek sonuç vermiştir. En yüksek antioksidan aktivite gösteren süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartikül beklendiği gibi en yüksek antioksidan aktivite gösteren kitosan nanopartikül olarak kaydedilmiştir.

Mevcut tez kapsamında antioksidan aktivite tayini amacı ile gerçekleştirilen DPPH testi sonuçları iki bağlamda değerlendirilebilir. Su buharı distilasyonu, soxhlet ekstraksiyon ve süper kritik CO₂ ekstraksiyonu olmak üzere üç farklı yöntem ile *H. italicum* ekstraktları elde edilmiştir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt diğer iki ekstrakta kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite

göstermiştir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi sebebi ile ısıya duyarlı antioksidan bileşiklerin bozulmasını engellemektedir (Widmann vd., 2022). Buna karşın soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan yüksek sıcaklık hassas antioksidan bileşiklerin degradasyonuna sebep olmaktadır. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonunda çözücü gücü basınç ve sıcaklık parametrelerinin ayarlanması suretiyle değiştirilebilir. Söz konusu ayarlanabilirlik spesifik antioksidan bileşiklerinin seçici olarak ekstrakte edilebilmesini mümkün kılmaktadır (Kessler vd., 2024). Soxhlet ekstraksiyonunun seçiciliği, süper kritik CO₂ ekstraksiyonuna kıyasla düşük olup *H. italicum* materyalinden daha geniş bir bileşik grubu elde edilmesine sebep olmuştur. Söz konusu elde edilen bileşik grubu içeriğinde istenmeyen bileşikler de tespit edilebilmektedir.

H. italicum bitki ekstraktlarının FT-IR spektrumları, ekstraksiyon yöntemlerinin bitki bileşenleri üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Bu yöntemler farklı kimyasal bileşen gruplarını hedef aldığından, spektrumlar arasında belirgin farklılıklar gözlenmektedir. SFE yöntemi, genellikle düşük polariteye sahip bileşiklerin (örn. terpenoidler, yağ asitleri ve lipofilik fenolik bileşikler) çıkarılmasında etkilidir. FT-IR spektrumunda 2928,41 cm⁻¹ ve 2850,17 cm⁻¹ bölgelerinde güçlü C-H gerilme titreşimleri; SFE ile elde edilen ekstraktın terpenoidler ve yağ asitleri açısından zengin olduğunu göstermektedir. Ayrıca, 1650-1550 cm⁻¹ bölgesindeki aromatik yapıların pikleri, lipofilik fenolik bileşiklerin varlığına işaret etmektedir (Tyśkiewicz vd., 2018). Soxhlet ekstraksiyonu, polar ve apolar çözücülerin etkisiyle daha geniş bir kimyasal bileşen yelpazesini içerebilmektedir. Soxhlet yöntemiyle elde edilen ekstraktın FT-IR spektrumunda, hem polar gruplar (örn. karbonil gruplarına ait 1711,08 cm⁻¹ piki) hem de apolar hidrokarbon yapılar (yani 2924,45 cm⁻¹ ve 2850,16 cm⁻¹ bölgelerindeki pikler) belirgin şekilde görülmektedir. Bunun yanı sıra, C-O gerilme titreşimlerine (1162,74 cm⁻¹ ve 1033,40 cm⁻¹) ait pikler, esterler, alkol ve eter gruplarını içeren oksijenli bileşiklerin varlığını desteklemektedir. Uçucu yağ spektrumu, bitkinin uçucu ve hafif bileşiklerini yansıtmaktadır. 2924,45 cm⁻¹ ve 2850,16 cm⁻¹ bölgelerindeki C-H gerilme titreşimleri, uçucu yağın terpenoidler açısından zengin olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, 1711,08 cm⁻¹ bölgesindeki karbonil grubu titreşimleri, oksijenli terpenoidlerin (esterler ve ketonlar) varlığına işaret etmektedir. Aromatik bileşiklere ait C-H bükülme titreşimleri (880,89 cm⁻¹

ve 814,42 cm⁻¹) de uçucu yağda bulunan aromatik yapıların varlığını göstermektedir.

Antioksidan aktivite tayininin ardından L929 fibroblast hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen MTT analizi yani sitotoksosite tayini de üç farklı ekstraksiyon metodu ve yüklü kitosan nanopartiküllere ilişkin ayrıntılı bilgi sunmaktadır. Her üç ekstraktın da 24. saatte IC₅₀ değeri ve 48. saatte IC₅₀ değeri belirlenmiştir. 24. saat MTT analizi sonuçlarına göre en yüksek IC₅₀ değerine sahip ekstrakt su buharı distilasyonu sonucunda elde edilen uçucu yağ olarak belirlenirken; en düşük IC₅₀ değerine sahip ekstrakt ise süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt olarak belirlenmiştir.

48. saat MTT analizi sonuçlarında sıralama değişmemiştir ancak elde edilen sonuçlara göre her üç ekstraktın da 24. saatte ölçülen IC₅₀ değerleri 48. saatte ölçülen IC₅₀ değerlerinden daha yüksektir. Söz konusu durum 48. saat sonunda L929 fibroblast hücreleri uygulanan ekstrakta daha duyarlı hale gelmesi ve bu durumda fibroblast hücrelerinin %50'sinin daha düşük ekstrakt konsantrasyonunda ölmesi, ekstraktların etkinliğinin zaman içerisinde artması, L929 fibroblast hücreleri 24 saat içerisinde uygulanan ekstraktlara karşı adaptasyon göstermiş olup söz konusu adaptasyonun 48 saat sonunda tamamlanması, ekstraktların zamanla daha aktif forma geçmesi gibi sebepler ile meydana gelmiş olabilir. Ayrıca ilk 24 saat hücre proliferasyonu 24-48 saat aralığına kıyasla daha yüksek olup, 48. saat hücre proliferasyonunun yavaşlaması sebebi ile uygulanan ekstraktın etkinliğinin belirgin hale gelmesi ve uygulanan ekstraktların içeriğinde barındırdığı birçok kimyasal bileşim söz konusudur ve kimyasal stabilite zamanla değişebilmektedir (Strupp vd., 2023).

Mevcut tez çalışması kapsamında üç farklı yöntem ile elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküller 24. saat IC₅₀ değerinde ekstraktlar kullanılarak sentezlenmiştir. MTT analizi sonuçları karşılaştırıldığında ekstraktlarda elde edilen sonuçları destekler nitelikte 24. saat IC₅₀ değeri en yüksek olan nanopartikül su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküldür. 24. saat IC₅₀ değeri en düşük olan nanopartikül ise soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküldür. Soxhlet ekstraksiyonu, çözücü olarak genellikle organik çözücüler kullanır ve bu yöntemle daha geniş bir yelpazede polar ve nonpolar bileşikler ekstrakte edilebilir. Bu, soxhlet

ekstraksiyonuyla elde edilen ekstraktın daha çeşitli ve potansiyel olarak daha etkili bileşikler içermesine yol açabilir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu, daha seçici bir ekstraksiyon yöntemi olabilir ve belirli bileşikler daha az veya daha çok ekstrakte edebilir (Ray vd., 2023). Bu yöntem, özellikle nonpolar bileşiklerin ekstraksiyonunda etkilidir, ancak soxhlet ekstraksiyonunda elde edilen kadar geniş bir bileşik yelpazesini içermeyebilir.

Yüklü kitosan nanopartiküllerin IC₅₀ değerleri arasındaki sıralama 48. saat sonunda gerçekleştirilen ölçümde de ekstraktlarda olduğu gibi değişmemiştir. Üç farklı ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin 24. saat IC₅₀ değerleri 48. saat IC₅₀ değerlerinden daha yüksektir. Yüklü kitosan nanopartiküller için söz konusu olan bu durum; hücrelerin nanopartiküllere karşı adaptasyonunun ilk 24 saatte henüz tam gerçekleşmemiş olması sebebiyle meydana gelmiş olabilir. Zamanla L929 fibroblast hücreleri uygulanan nanopartiküllere karşı canlılığının düştüğü gözlemlenmiştir bu sebeple IC₅₀ değeri azalmıştır (Ilhan, 2023). Aynı zamanda kitosan nanopartiküller, hücreler tarafından ilk 24 saat içinde yeterince alınmamış olabilir (Manaspon vd., 2012) ve bu durum daha yüksek bir IC₅₀ değerinin meydana gelmesine sebep olmaktadır. 48 saatlik süre içerisinde nanopartiküller hücrelere daha iyi dağılmak suretiyle daha düşük bir IC₅₀ değeri meydana getirmektedir. Mevcut tez kapsamında gerçekleştirilen MTT testi sonucunda 48. saat IC₅₀ değerlerinin 24. saat IC₅₀ değerlerinden daha düşük olmasının doğrudan sebebi ileri çalışmalar ile çözümlenebilir.

Mevcut tez çalışması kapsamında temel hipotez *H. italicum* ekstraktları yara iyileşmesi üzerinde etkilidir şeklinde belirlenmiştir. Üç farklı ekstraksiyon metodu ile sentezlenen ekstraktların karşılaştırılmalı olarak yara iyileşmesi analizi yapıldığında 24 saatte %32 yara iyileşmesi sergileyen L929 hücre hattında yara iyileşmesini indüklediği görülmektedir. Gerçekleştirilen yara iyileşmesi çalışması sonucunda elde edilen verilere göre en yüksek yara iyileşme yüzdesi sergileyerek en etkili tedavi yöntemi olarak süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt görülmektedir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyon yönteminin bitkiden en yüksek biyolojik aktiviteye sahip bileşikler ortaya çıkardığını ve bu bileşiklerin hücre iyileşme sürecini en iyi şekilde desteklediğini göstermektedir. Soxhlet ekstraktı da yüksek bir iyileşme yüzdesi göstermiştir, ancak süper kritik CO₂ ekstraktı kadar etkili olmadığı görülmektedir. Uçucu yağ ise kontrol grubuna

kıyasla belirgin bir iyileşme sağlamış olsa da soxhlet ve süper kritik CO₂ ekstraktları kadar yüksek etkinlik göstermemiştir.

Hücre proliferasyonu, hücrelerin bölünerek çoğalması sürecidir ve yara iyileşmesinde kritik bir rol oynar. Yara iyileşme sürecinde, hasarlı dokuların onarılması için yeni hücrelerin oluşması gerekmektedir. Bu süreç, çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstraselüler matriks bileşenleri tarafından düzenlenmektedir. Yara iyileşmesi sonuçları göz önünde bulundurularak PCNA seviyelerinin genellikle daha hızlı ve etkili bir yara iyileşme süreci ile ilişkili olduğu ileri sürülebilmektedir. 24. saat sonunda yara iyileşmesi %32 olarak belirlenen kontrol grubu %66 olacak şekilde düşük PCNA ekspresyonu sağlamıştır. Herhangi bir ekstraksiyon muamelesi yapılmayan kontrol grubu fibroblast hücreleri hiçbir müdahalede bulunulmadan bırakılması sebebi ile hücre proliferasyonu ve doku yenilenmesi düşük olarak değerlendirilmektedir. Uçucu yağ uygulanan fibroblast hücrelerinde yara iyileşmesi kontrol grubuna göre %18,94'lük bir iyileşme göstermiş ve söz konusu durum uçucu yağın hücre proliferasyonunu teşvik ettiği ve böylelikle yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermektedir. Soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktın PCNA ekspresyonu %81 olarak belirlenmiştir ve uçucu yağdan daha etkili olduğu ve hücre proliferasyonunu ve doku yenilemesini daha fazla teşvik ettiği belirlenmiştir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt en yüksek seviyede yani %69,60 yara iyileşmesi sağlamış olup, en yüksek PCNA ekspresyonunu da %90 olarak sergilemektedir. Bu bağlamda yara iyileşme yüzdeleri ile PCNA analizleri arasında güçlü bir pozitif korelasyon bulunmaktadır.

H. italicum ekstraktları yüklü kitosan nanopartiküller de incelendiğinde yalnızca ekstraktlar kullanılarak gerçekleştirilen PCNA analizini destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin PCNA analizi sonucunda %93 ekspresyon sergilediği, soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt yüklü kitosan nanopartiküllerin %82 proliferasyon sergilediği ve son olarak uçucu yağ yüklü kitosan nanopartiküllerin en düşük PCNA ekspresyonu olarak %81 ekspresyon gösterdiği görülmektedir. *H. italicum* ekstraktlarının doğrudan uygulanması ile kitosan nanopartiküllere yüklendiği durumda elde edilen PCNA analiz sonuçları arasındaki fark, kitosan nanopartiküllerin biyoyararlanımı artırıcı ve hücresel

hedefleme kapasitesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Doğrudan uygulamalarda ekstraktlar hücrelerle sınırlı bir etkileşim sunarken, kitosan nanopartiküller ekstraktların stabilitesini artırarak hücelere daha etkili bir şekilde ulaşmalarını sağlamaktadır. Bu durum, yara iyileşme süreçlerini hızlandırarak hücre proliferasyonunu desteklemektedir. Özellikle süper kritik CO₂ ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların nanopartiküller aracılığıyla uygulanması, doğrudan uygulamalara kıyasla en yüksek PCNA ekspresyonu ve yara iyileşmesi değerlerini sağlamış, bu da kitosan nanopartiküllerin biyoteknolojik faydalarını açıkça ortaya koymuştur (Franco ve Marco, 2021).

H. italicum bitkisinin temel kimyasal bileşenlerinden olan flavonoidler ve polifenoller hücre proliferasyonunu teşvik eden ve antiinflamatuvar özelliklere sahip bitkisel bileşenler olarak literatürde yer almaktadır (Węglarz vd., 2022). *H. italicum* bitkisinde bulunan başlıca flavonoidler; apigenin, luteolin, kuersetin ve kaempferol olarak bilinmektedir. Söz konusu flavonoidler, hücre proliferasyonunu teşvik eden ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olan güçlü antioksidanlardır. Flavonoidler, inflamasyonu azaltarak yara iyileşme sürecini hızlandırır. Flavonoidler, inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ederek bu süreci dengelemektedir. Mevcut tez çalışması kapsamında da DPPH antioksidan aktivite tayin yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite de proliferasyonda oldukça önemlidir. Flavonoidler, serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri oksidatif strese korur. Bu, hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğalmasını sağlar ve doku yenilenmesini desteklemektedir. Yara iyileşme sürecinde oldukça önemli olan hücre döngüsü flavonoidler sayesinde düzenlenerek hücrelerin hızlı bir şekilde oluşması suretiyle yara bölgesinin onarılmasını sağlamaktadır.

H. italicum bitkisinde bulunan başlıca polifenoller ise kafeik asit, klorojenik asit ve rosmarinik asit olarak sıralanabilir. Polifenoller inflamatuvar yanıtı azaltır yani inflamatuvar mediatörlerin üretimini azaltarak inflamasyonu kontrol altında tutmaktadır. Bu sayede yara iyileşmesini hızlandırır. Polifenollerin yara iyileşmesi üzerinde en büyük etkisi ise, yeni kan damarlarının oluşumunu (anjyogenez) teşvik etmesidir. Bu, yara iyileşmesi için gerekli olan oksijen ve besin maddelerinin yaralı bölgeye taşınmasını sağlar. Tüm bu bilgiler ışığında, *H. italicum* ekstraktları, yara iyileşmesi ve hücre proliferasyonu için potansiyel bir doğal tedavi olarak mevcut tez kapsamında değerlendirilmiştir.

KAYNAKÇA

- Amoli, P. I., Hadidi, M., Hasiri, Z., Rouhafza, A., Jelyani, A. Z., Hadian, Z., ... & Lorenzo, J. M. (2021). Incorporation of low molecular weight chitosan in a low-fat beef burger: Assessment of technological quality and oxidative stability. *Foods*, 10(8), 1959.
- Antunes Viegas, D., Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, R. (2014). *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data. *Journal of ethnopharmacology*, 151(1), 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.005>
- Aoki, T., Koizumi, T., Kobayashi, Y., Yasuda, D., Izumida, Y., Jin, Z., Nishino, N., Shimizu, Y., Kato, H., Murai, N., Niiya, T., Enami, Y., Mitamura, K., Yamamoto, T., & Kusano, M. (2005). A novel method of cryopreservation of rat and human hepatocytes by using encapsulation technique and possible use for cell transplantation. *Cell transplantation*, 14(9), 609–620. <https://doi.org/10.3727/000000005783982710>
- Arjun, B., Krishnendu, P.R., Anishma, P. N., Zachariah, S. M. (2023). 5 - Chitin in drug delivery. *Natural Biopolymers in Drug Delivery and Tissue Engineering*, 101-125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98827-8.00022-9>.
- Azuma, K., Ifuku, S., Osaki, T., Okamoto, Y., & Minami, S. (2014). Preparation and biomedical applications of chitin and chitosan nanofibers. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(10), 2891–2920. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1882>
- Bartold, M., & Ivanovski, S. (2024). Biological processes and factors involved in soft and hard tissue healing. *Periodontology 2000*, 10.1111/prd.12546. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/prd.12546>
- Bhattacharjee S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not?. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Calvo, C.P., Vila-Jato, J.L. and Alonso, M.J. (1997). Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/>
- Cappiello, F., Casciaro, B., & Mangoni, M. L. (2018). A Novel In Vitro Wound Healing Assay to Evaluate Cell Migration. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (133), 56825. <https://doi.org/10.3791/56825>
- Carvalho, P. M., Felício, M. R., Santos, N. C., Gonçalves, S., & Domingues, M. M. (2018). Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Frontiers in chemistry*, 6, 237. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00237>
- Chai, Z., Childress, A., & Busnaina, A. A. (2022). Directed Assembly of Nanomaterials for Making Nanoscale Devices and Structures: Mechanisms and

- Applications. *ACS nano*, 16(11), 17641–17686. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c07910>
- Cioce, A., Cavani, A., Cattani, C., & Scopelliti, F. (2024). Role of the Skin Immune System in Wound Healing. *Cells*, 13(7), 624. <https://doi.org/10.3390/cells13070624>
- Cvitković, D., Škarica, I., Dragović-Uzelac, V., & Balbino, S. (2024). Supercritical CO₂ Extraction of Fatty Acids, Phytosterols, and Volatiles from Myrtle (*Myrtus communis* L.) Fruit. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29(8), 1755. <https://doi.org/10.3390/molecules29081755>
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7, 301–311. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>
- Davidson, J. M., Klagsbrun, M., Hill, K. E., Buckley, A., Sullivan, R., Brewer, P. S., & Woodward, S. C. (1985). Accelerated wound repair, cell proliferation, and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor. *The Journal of cell biology*, 100(4), 1219–1227. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.4.1219>
- Dehghani, T., & Panitch, A. (2020). Endothelial cells, neutrophils and platelets: getting to the bottom of an inflammatory triangle. *Open biology*, 10(10), 200161. <https://doi.org/10.1098/rsob.200161>
- Desai, N., Rana, D., Salave, S., Gupta, R., Patel, P., Karunakaran, B., Sharma, A., Giri, J., Benival, D., & Kommineni, N. (2023). Chitosan: A Potential Biopolymer in Drug Delivery and Biomedical Applications. *Pharmaceutics*, 15(4), 1313. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041313>
- Diller, R. B., & Tabor, A. J. (2022). The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, 7(3), 87. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030087>
- Dioscorides Pedanius, O. A. A. & Laguna, A. D. (1555) "*De Materia Medica*" by Dioscorides. Antwerp: Jean Laet. [Pdf] Retrieved from the Library of Congress, <https://www.loc.gov/item/2021666851/>.
- Edo, G. I., Yousif, E., & Al-Mashhadani, M. H. (2024). Chitosan: An overview of biological activities, derivatives, properties, and current advancements in biomedical applications. *Carbohydrate research*, 542, 109199. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109199>
- Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International journal of advanced research*, 4(3), 411–427.
- Ersen, O., Florea, I., Hirlimann, C., & Pham-Huu, C. (2015). Exploring nanomaterials with 3D electron microscopy. *Materials Today*, 18(7), 395–408.
- Faria, R. R., Guerra, R. F., de Sousa Neto, L. R., Motta, L. F., & Franca, E.deF. (2016). Computational study of polymorphic structures of α - and β - chitin and chitosan in aqueous solution. *Journal of molecular graphics & modelling*, 63, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2015.11.001>
- Feng, P., Luo, Y., Ke, C., Qiu, H., Wang, W., Zhu, Y., Hou, R., Xu, L., & Wu, S. (2021). Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair:

- Mechanisms and Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 650598. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.650598>
- Franco, P., & De Marco, I. (2021). Nanoparticles and nanocrystals by supercritical CO₂-assisted techniques for pharmaceutical applications: a review. *Applied Sciences*, 11(4), 1476.
- Freimoser, F. M., Jakob, C. A., Aebi, M., & Tuor, U. (1999). The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3727–3729. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3727-3729.1999>
- Froelich, A., Jakubowska, E., Wojtyłko, M., Jadach, B., Gackowski, M., Gadziński, P., Napierała, O., Ravliv, Y., & Osmałek, T. (2023). Alginate-Based Materials Loaded with Nanoparticles in Wound Healing. *Pharmaceutics*, 15(4), 1142. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041142>
- Furlan, V., & Bren, U. (2023). *Helichrysum italicum*: From Extraction, Distillation, and Encapsulation Techniques to Beneficial Health Effects. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(4), 802. <https://doi.org/10.3390/foods12040802>
- Furlan, V., & Bren, U. (2023). *Helichrysum italicum*: From Extraction, Distillation, and Encapsulation Techniques to Beneficial Health Effects. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(4), 802. <https://doi.org/10.3390/foods12040802>
- Gadziński, P., Froelich, A., Jadach, B., Wojtyłko, M., Tatarek, A., Białek, A., Krysztofiak, J., Gackowski, M., Otto, F., & Osmałek, T. (2022). Ionotropic Gelation and Chemical Crosslinking as Methods for Fabrication of Modified-Release Gellan Gum-Based Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 15(1), 108. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010108>
- Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
- Guo, Y., Miller, B., Heim, M., Gutierrez-Garcia, A., Jaskula-Sztul, R., Ren, B., & Sewell-Loftin, M. K. (2023). Protocol for indirect and direct co-culture between human cancer cells and endothelial cells. *STAR protocols*, 4(2), 102177. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102177>
- Harish, V., Ansari, M. M., Tewari, D., Gaur, M., Yadav, A. B., García-Betancourt, M. L., Abdel-Haleem, F. M., Bechelany, M., & Barhoum, A. (2022). Nanoparticle and Nanostructure Synthesis and Controlled Growth Methods. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(18), 3226. <https://doi.org/10.3390/nano12183226>
- Herdiana, Y., Husni, P., Nurhasanah, S., Shamsuddin, S., & Wathoni, N. (2023). Chitosan-Based Nano Systems for Natural Antioxidants in Breast Cancer Therapy. *Polymers*, 15(13), 2953. <https://doi.org/10.3390/polym15132953>
- Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S., & Muchtaridi, M. (2021). Drug release study of the chitosan-based nanoparticles. *Heliyon*, 8(1), e08674. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08674>
- Herzyk, F., Piłakowska-Pietras, D., & Korzeniowska, M. (2024). Supercritical Extraction Techniques for Obtaining Biologically Active Substances from a

- Variety of Plant Byproducts. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(11), 1713. <https://doi.org/10.3390/foods13111713>
- Hoang, N. H., Le Thanh, T., Sangpueak, R., Treekoon, J., Saengchan, C., Thepbandit, W., Papatthoti, N. K., Kamkaew, A., & Buensanteai, N. (2022). Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management. *Polymers*, 14(4), 662. <https://doi.org/10.3390/polym14040662>
- <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pol.20220734>
- Hudu, S. A., Alshrari, A. S., Syahida, A., & Sekawi, Z. (2016). Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 10(3), DE01–DE5. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15837.7460>
- Ilhan H. (2023). Nanoarchitectonics of the Effects of Curcumin Carbon Dot-Decorated Chitosan Nanoparticles on Proliferation and Apoptosis-Related Gene Expressions in HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cells. *ACS omega*, 8(37), 33554–33563. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03405>
- Jeong, S. H., Kim, K. K., Jeong, S. J., An, K. H., Lee, S. H., & Lee, Y. H. (2007). Optical absorption spectroscopy for determining carbon nanotube concentration in solution. *Synthetic Metals*, 157(13-15), 570-574.
- Jhaveri, J., Raichura, Z., Khan, T., Momin, M., & Omri, A. (2021). Chitosan Nanoparticles-Insight into Properties, Functionalization and Applications in Drug Delivery and Theranostics. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(2), 272. <https://doi.org/10.3390/molecules26020272>
- Kauanova, S., Urazbayev, A., & Vorobjev, I. (2021). The Frequent Sampling of Wound Scratch Assay Reveals the "Opportunity" Window for Quantitative Evaluation of Cell Motility-Impeding Drugs. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 640972. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640972>
- Kessler, J. C., Martins, I. M., Manrique, Y. A., Rodrigues, A. E., Barreiro, M. F., & Dias, M. M. (2024). Advancements in conventional and supercritical CO₂ extraction of Moringa oleifera bioactives for cosmetic applications: A review. *The Journal of Supercritical Fluids*, 106388.
- LE, L. T. T., Giang, N. N., Chien, P. N., Trinh, X. T., Long, N. V., VAN Anh, L. T., Nga, P. T., Zhang, X. R., Nam, S. Y., & Heo, C. Y. (2023). Enhancement of Wound Healing Efficacy by Chitosan-based Hydrocolloid on Sprague Dawley Rats. *In vivo (Athens, Greece)*, 37(3), 1052–1064. <https://doi.org/10.21873/invivo.13180>
- LE, L. T. T., Giang, N. N., Chien, P. N., Trinh, X. T., Long, N. V., VAN Anh, L. T., Nga, P. T., Zhang, X. R., Nam, S. Y., & Heo, C. Y. (2023). Enhancement of Wound Healing Efficacy by Chitosan-based Hydrocolloid on Sprague Dawley Rats. *In vivo (Athens, Greece)*, 37(3), 1052–1064. <https://doi.org/10.21873/invivo.13180>
- Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*, 25(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>

- Liu, S., Yang, W., Li, Y., & Sun, C. (2023). Fetal bovine serum, an important factor affecting the reproducibility of cell experiments. *Scientific reports*, 13(1), 1942. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29060-7>
- Liu, Y. C., Hall, B., Lwin, N. C., Teo, E. P. W., Yam, G. H. F., Hipsley, A., & Mehta, J. S. (2020). Tissue Responses and Wound Healing following Laser Scleral Microporation for Presbyopia Therapy. *Translational vision science & technology*, 9(4), 6. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.4.6>
- Liu, Z., Xu, Y., Su, H., Jing, X., Wang, D., Li, S., Chen, Y., Guan, H., & Meng, L. (2023). Chitosan-based hemostatic sponges as new generation hemostatic materials for uncontrolled bleeding emergency: Modification, composition, and applications. *Carbohydrate polymers*, 311, 120780. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120780>
- Lourens, A. C., Viljoen, A. M., & van Heerden, F. R. (2008). South African Helichrysum species: a review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *Journal of ethnopharmacology*, 119(3), 630–652. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.011>
- Ma, J., Wang, Y., & Lu, R. (2022). Mechanism and Application of Chitosan and Its Derivatives in Promoting Permeation in Transdermal Drug Delivery Systems: A Review. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(4), 459. <https://doi.org/10.3390/ph15040459>
- Ma, Y., Jin, S., Yokozeki, T., Ueda, M., Yang, Y., Elbadry, E.A., Sugahara, T., & Hamada, H. (2021). Effect of heat and moisture on mechanical performance of composite materials used in automotive structures. *Biocomposite and Synthetic Composites for Automotive Applications*, 377-399.
- Maksimovic, S., Tadic, V., Skala, D., & Zizovic, I. (2017). Separation of phytochemicals from Helichrysum italicum: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry*, 138, 9–28. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.001>
- Manaspon, C., Viravaidya-Pasuwat, K., & Pimpha, N. (2012). Preparation of Folate-Conjugated Pluronic F127/Chitosan Core-Shell Nanoparticles Encapsulating Doxorubicin for Breast Cancer Treatment. *Journal of Nanomaterials*, 2012(1), 593878.
- Mancini, E., De Martino, L., Marandino, A., Scognamiglio, M. R., & De Feo, V. (2011). Chemical composition and possible in vitro phytotoxic activity of Helichrysum italicum (Roth) Don ssp. italicum. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(9), 7725–7735. <https://doi.org/10.3390/molecules16097725>
- Manzanares, D., & Ceña, V. (2020). Endocytosis: The Nanoparticle and Submicron Nanocompounds Gateway into the Cell. *Pharmaceutics*, 12(4), 371. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371>
- Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza, B. R., Jr, & Garrels, J. I. (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 309(5966), 374–376. <https://doi.org/10.1038/309374a0>
- Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza, B. R., Jr, & Garrels, J. I. (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 309(5966), 374–376. <https://doi.org/10.1038/309374a0>

- Mezzana, P. (2008). Clinical efficacy of a new chitin nanofibrils-based gel in wound healing. *Acta chirurgiae plasticae*, 50(3), 81–84.
- Mikušová, V., & Mikuš, P. (2021). Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9652. <https://doi.org/10.3390/ijms22179652>
- Mirtajaddini, S. A., Fathi Najafi, M., Vaziri Yazdi, S. A., & Kazemi Oskuee, R. (2021). Preparation of Chitosan Nanoparticles as a Capable Carrier for Antigen Delivery and Antibody Production. *Iranian journal of biotechnology*, 19(4), e2871. <https://doi.org/10.30498/ijb.2021.247747.2871>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature reviews. Drug discovery*, 20(2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Miyachi, K., Fritzler, M. J., & Tan, E. M. (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 121(6), 2228–2234.
- Motiei, M., Sedlařík, V., Lucia, L. A., Fei, H., & Münster, L. (2020). Stabilization of chitosan-based polyelectrolyte nanoparticle cargo delivery biomaterials by a multiple ionic cross-linking strategy. *Carbohydrate polymers*, 231, 115709. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115709>
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934.
- Muire, P. J., Mangum, L. H., & Wenke, J. C. (2020). Time Course of Immune Response and Immunomodulation During Normal and Delayed Healing of Musculoskeletal Wounds. *Frontiers in immunology*, 11, 1056. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01056>
- Oh, S. Y., Yoo, D. I., Shin, Y., Kim, H. C., Kim, H. Y., Chung, Y. S., Park, W. H., & Youk, J. H. (2005). Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 340(15), 2376–2391. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.08.007>
- Okaiyeto, K., & Oguntibeju, O. O. (2021). African Herbal Medicines: Adverse Effects and Cytotoxic Potentials with Different Therapeutic Applications. *International journal of environmental research and public health*, 18(11), 5988. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115988>
- Open Resources for Nursing (Open RN); Ernstmeyer K, Christman E, editors. Nursing Skills [Internet]. 2nd edition. Eau Claire (WI): Chippewa Valley Technical College; 2023. Chapter 20 Wound Care. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK596725/>
- Pellis, A., Guebitz, G. M., & Nyanhongo, G. S. (2022). Chitosan: Sources, Processing and Modification Techniques. *Gels (Basel, Switzerland)*, 8(7), 393. <https://doi.org/10.3390/gels8070393>
- Piekarska, K., Sikora, M., Owczarek, M., Jóźwik-Pruska, J., & Wiśniewska-Wrona, M. (2023). Chitin and Chitosan as Polymers of the Future-Obtaining,

- Modification, Life Cycle Assessment and Main Directions of Application. *Polymers*, 15(4), 793. <https://doi.org/10.3390/polym15040793>
- Ponce, A., Mejía-Rosales, S., & José-Yacamán, M. (2012). Scanning transmission electron microscopy methods for the analysis of nanoparticles. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 906, 453–471. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-953-2_37
- Prete, S., Dattilo, M., Patitucci, F., Pezzi, G., Parisi, O. I., & Puoci, F. (2023). Natural and Synthetic Polymeric Biomaterials for Application in Wound Management. *Journal of functional biomaterials*, 14(9), 455. <https://doi.org/10.3390/jfb14090455>
- Primitivo, M. J., Neves, M., Pires, C. L., Cruz, P. F., Brito, C., Rodrigues, A. C., de Carvalho, C. C. C. R., Mortimer, M. M., Moreno, M. J., Brito, R. M. M., Taylor, E. J., Millson, S. H., Reboredo, F., Jorge Campos, M., Vaz, D. C., & Ribeiro, V. S. (2022). Edible flowers of *Helichrysum italicum*: Composition, nutritive value, and bioactivities. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 157, 111399. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111399>
- Quintanilla-Sierra, L., García-Arévalo, C., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2019). Self-assembly in elastin-like recombinamers: a mechanism to mimic natural complexity. *Materials today. Bio*, 2, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100007>
- Ran, Y., Liu, Y., Sun, H., Zhang, H., Dong, H., Yang, Y., ... & Xu, J. (2021). Surface modification of cuprous oxide nanoparticles with improved chemical stability and antibacterial activity. *Applied Surface Science*, 565, 150566.
- Ray, A., Dubey, K. K., Marathe, S. J., & Singhal, R. (2023). Supercritical fluid extraction of bioactives from fruit waste and its therapeutic potential. *Food Bioscience*, 52, 102418.
- Ridiandries, A., Tan, J. T. M., & Bursill, C. A. (2018). The Role of Chemokines in Wound Healing. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3217. <https://doi.org/10.3390/ijms19103217>
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Arkin M, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065>
- Rizwan, M., & Gwenin, C. (2021). Nanomaterials in renewable energy: UV-Visible spectroscopy characterization and applications. In *Nano Tools and Devices for Enhanced Renewable Energy* (pp. 103-120). Elsevier.
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>
- Rodrigues, S., da Costa, A. M., & Grenha, A. (2012). Chitosan/carrageenan nanoparticles: effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate polymers*, 89(1), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.010>

- Rydz, J., Šišková, A., & Andicsová Eckstein, A. (2019). Scanning electron microscopy and atomic force microscopy: topographic and dynamical surface studies of blends, composites, and hybrid functional materials for sustainable future. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019(1), 6871785.
- Scholer, A. J., Khan, M. A., Tandon, A., Swan, K., & Chokshi, R. J. (2018). Herman Boerhaave, the Dutch Hippocrates, a Forgotten Father of Medicine. *The American surgeon*, 84(3), 323–325.
- Schultz GS, Chin GA, Moldawer L, et al. Principles of Wound Healing. In: Fitridge R, Thompson M, editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. 23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534261/>
- Sharma, S., & Kishen, A. (2024). Bioarchitectural Design of Bioactive Biopolymers: Structure-Function Paradigm for Diabetic Wound Healing. *Biomimetics* (Basel, Switzerland), 9(5), 275. <https://doi.org/10.3390/biomimetics9050275>
- Shi, Z., Chow, C. W. K., Fabris, R., Liu, J., & Jin, B. (2022). Applications of Online UV-Vis Spectrophotometer for Drinking Water Quality Monitoring and Process Control: A Review. *Sensors* (Basel, Switzerland), 22(8), 2987. <https://doi.org/10.3390/s22082987>
- Simpson, J. D., Smith, S. A., Thurecht, K. J., & Such, G. (2019). Engineered Polymeric Materials for Biological Applications: Overcoming Challenges of the Bio-Nano Interface. *Polymers*, 11(9), 1441. <https://doi.org/10.3390/polym11091441>
- Singh, D., Rai, V., & Agrawal, D. K. (2023). Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiology and cardiovascular medicine*, 7(1), 5–16. <https://doi.org/10.26502/fccm.92920302>
- Sohn, S. I., Priya, A., Balasubramaniam, B., Muthuramalingam, P., Sivasankar, C., Selvaraj, A., Valliammai, A., Jothi, R., & Pandian, S. (2021). Biomedical Applications and Bioavailability of Curcumin-An Updated Overview. *Pharmaceutics*, 13(12), 2102. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122102>
- Soltanzadeh, M., Peighambaroust, S. H., Ghanbarzadeh, B., Mohammadi, M., & Lorenzo, J. M. (2021). Chitosan Nanoparticles as a Promising Nanomaterial for Encapsulation of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract as a Natural Source of Antioxidants. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 11(6), 1439. <https://doi.org/10.3390/nano11061439>
- 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. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, 58(1-2), 81–94. <https://doi.org/10.1159/000454919>
- Stan, D., Tanase, C., Avram, M., Apetrei, R., Mincu, N. B., Mateescu, A. L., & Stan, D. (2021). Wound healing applications of creams and "smart" hydrogels. *Experimental dermatology*, 30(9), 1218–1232. <https://doi.org/10.1111/exd.14396>

- Strupp, C., Corvaro, M., Cohen, S. M., Corton, J. C., Ogawa, K., Richert, L., & Jacobs, M. N. (2023). Increased cell proliferation as a key event in chemical carcinogenesis: application in an integrated approach for the testing and assessment of non-genotoxic carcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, 24(17), 13246.
- Sulthan, R., Reghunadhan, A., & Sambhudevan, S. (2023). A new era of chitin synthesis and dissolution using Deep Eutectic Solvents- Comparison with Ionic Liquids. *Journal of Molecular Liquids*. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121794>
- Sun, L., Liu, H., Ye, Y., Lei, Y., Islam, R., Tan, S., Tong, R., Miao, Y. B., & Cai, L. (2023). Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 418. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01642-x>
- Šuran, J., Ceganec, I., Mašek, T., Radić, B., Radić, S., Tlak Gajger, I., & Vlaineć, J. (2021). Propolis Extract and Its Bioactive Compounds-From Traditional to Modern Extraction Technologies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(10), 2930. <https://doi.org/10.3390/molecules26102930>
- Szczyglewska, P., Feliczak-Guzik, A., & Nowak, I. (2023). Nanotechnology-General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(13), 4932. <https://doi.org/10.3390/molecules28134932>
- Torabi, S., Soleimani, S., Mahravani, H., Ebrahimi, M. M., & Shahsavandi, S. (2023). Mouse Fibroblast L929 Cell Line as a Useful Tool for Replication and Adaptation of Infectious Bursal Disease Virus. *Archives of Razi Institute*, 78(3), 863–871. <https://doi.org/10.22092/ARI.2023.361584.2663>
- Tyskiewicz, K., Konkol, M., & Rój, E. (2018). The Application of Supercritical Fluid Extraction in Phenolic Compounds Isolation from Natural Plant Materials. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(10), 2625. <https://doi.org/10.3390/molecules23102625>
- Van Bavel, N., Issler, T., Pang, L., Anikovskiy, M., & Prenner, E. J. (2023). A Simple Method for Synthesis of Chitosan Nanoparticles with Ionic Gelation and Homogenization. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(11), 4328. <https://doi.org/10.3390/molecules28114328>
- Verma, A., Verma, M., & Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology*, 269–293. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>
- Waheed, S., Li, Z., Zhang, F., Chiarini, A., Armato, U., & Wu, J. (2022). Engineering nano-drug biointerface to overcome biological barriers toward precision drug delivery. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 395. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01605-4>
- Węglarz, Z., Kosakowska, O., Pióro-Jabrucka, E., Przybył, J. L., Gniewosz, M., Kraśniewska, K., Szyndel, M. S., Costa, R., & Bączek, K. B. (2022). Antioxidant and Antibacterial Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. from Central Europe. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(6), 735. <https://doi.org/10.3390/ph15060735>

- Węglarz, Z., Kosakowska, O., Pióro-Jabrucka, E., Przybył, J. L., Gniewosz, M., Kraśniewska, K., Szyndel, M. S., Costa, R., & Bączek, K. B. (2022). Antioxidant and Antibacterial Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. from Central Europe. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(6), 735. <https://doi.org/10.3390/ph15060735>
- Widmann, A. K., Wahl, M. A., Kammerer, D. R., & Daniels, R. (2022). Supercritical Fluid Extraction with CO₂ of *Curcuma longa* L. in Comparison to Conventional Solvent Extraction. *Pharmaceutics*, 14(9), 1943. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091943>
- Wiegand, J. R., Mathews, L. D., & Smith, G. D. (2014). A UV-Vis photoacoustic spectrophotometer. *Analytical chemistry*, 86(12), 6049–6056. <https://doi.org/10.1021/ac501196u>
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, 10(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- Yasin, S. N. N., Said, Z., Halib, N., Rahman, Z. A., & Mokhzani, N. I. (2023). Polymer-Based Hydrogel Loaded with Honey in Drug Delivery System for Wound Healing Applications. *Polymers*, 15(14), 3085. <https://doi.org/10.3390/polym15143085>
- Yilmaz Atay H. (2020). Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. *Functional Chitosan: Drug Delivery and Biomedical Applications*, 457–489. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7_15
- Zhang, H., Lin, X., Cao, X., Wang, Y., Wang, J., & Zhao, Y. (2023). Developing natural polymers for skin wound healing. *Bioactive materials*, 33, 355–376. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.11.012>
- Zhang, T., Liu, H., Ma, P., Huang, J., Bai, X., Liu, P., Zhu, L., & Min, X. (2022). Immunomodulatory effect of polysaccharides isolated from *Lonicera japonica* Thunb. in cyclophosphamide-treated BALB/c mice. *Heliyon*, 8(11), e11876. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11876>
- Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., & Xue, M. (2016). Inflammation in Chronic Wounds. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2085. <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>
- Zheljazkov, V. D., Semerdjieva, I., Yankova-Tsvetkova, E., Astatkie, T., Stanev, S., Dincheva, I., & Kačániová, M. (2022). Chemical Profile and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. and *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(7), 951. <https://doi.org/10.3390/plants11070951>

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Z. Y. Karagülleoğlu, Ö. T. Günkara, S. Derman, “Investigation Of The Effect Of *H. Italicum* Extracts And *H. Italicum* Loaded Chitosan Nanoparticles On Wound Healing”, 1st International Congress on Biotech Solutions for Sustainability, May 07-11, 2024, Kocaeli, Türkiye.

