

Evaluation of Effectiveness of the Containing Energized Oxygen Molecules Herbal Product on the Wound Healing

Nurullah OKUMUŞ¹, Sevim Feyza ERDOĞMUŞ^{2*}, Özlem ERDAL ALTINTAŞ³, Hasan Hüseyin DEMİREL⁴, Sefa ÇELİK⁵

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Afyonkarabısar University of Health Sciences, Afyonkarabısar, Türkiye

²Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Afyonkarabısar Health Sciences University, Afyonkarabısar, Türkiye

³Department of Medical Services and Techniques Science, Şubat Vocational School of Health Services, Afyonkarabısar University of Health Sciences, Afyonkarabısar, Türkiye

⁴Department of Laborant and Veterinary Health, Bayat Vocational School, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabısar, Türkiye

⁵Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Afyonkarabısar University of Health Sciences, Afyonkarabısar, Türkiye

ABSTRACT

In recent years, the interest in herbal medicinal products has been increasing with the development of advanced formulation technologies related to the use of the medicinal and aromatic plants. These developed products are used to treat wounds and burns quickly and effectively. In this study, the effectiveness of containing energized oxygen molecules herbal product on wound healing was evaluated by in vitro and in vivo studies for the first time. Within the scope of the study, the biological activities of *Hypericum perforatum* L. medicinal oil, energized oxygen molecules base were determined. Results of this study showed that the base containing energized oxygen molecules and the medicinal oil of *Hypericum perforatum* L. had antimicrobial activity on pathogen test microorganisms and did not have a toxic effect on human dermal fibroblast cells. It has been determined that the herbal product containing energized oxygen molecule is effective in second degree deep burns. It is thought that the wound-healing effect of the product is realized thanks to its antimicrobial, antifungal, antioxidant and cell proliferation-increasing effect. In line with future clinical studies, the product has the potential to be used in the treatment of second-degree burns.

Keywords: Energized oxygen molecules *Hypericum perforatum* L., Wound healing

Enerjilendirilmiş Oksijen Molekülleri İçeren Bitkisel İçerikli Ürünün Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi

ÖZ

Son yıllarda, tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımıyla ilgili ileri formülasyon teknolojilerinin gelişmesi ile birlikte bitkisel içerikli medikal ürünlere olan ilgi giderek artmaktadır. Geliştirilen bu ürünler, yara ve yanıkların tedavisini hızlı ve etkili bir şekilde gerçekleştirebilmektedir. Bu çalışmada, ilk kez enerjilendirilmiş oksijen molekülü içeren bitkisel içerikli ürünün yara iyileşme üzerindeki etkinliği in vitro ve in vivo çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında, *Hypericum perforatum* L. tıbbi yağı ve enerjilendirilmiş oksijen molekülü içeren bazın biyolojik etkinliği belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçları, enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren bazın ve *Hypericum perforatum* L. tıbbi yağının patojen test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etkinliğinin bulunduğunu ve insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde toksik bir etkisinin bulunmadığını göstermiştir. Enerjilendirilmiş oksijen molekülü içeren bitkisel içerikli ürünün ikinci derece derin yanıklarda etkili olduğu belirlenmiştir. Ürünün yara iyileştirici etkinliğinin antimikrobiyal, antifungal, antioksidan ve hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. İleride yapılacak klinik çalışmalar doğrultusunda ürün ikinci derece yanıkların tedavisinde kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri, *Hypericum perforatum* L., Yara iyileşme

To cite this article: Okumuş N, Erdoğan S.F, Erdal Altıntaş Ö, Demirel H.H, Çelik S. Evaluation of Effectiveness of the Containing Energized Oxygen Molecules Herbal Product on the Wound Healing. Kocatepe Vet J. (2023);16(2):195-208

Submission: 03.02.2023 Accepted: 25.05.2023 Published Online: 08.06.2023

ORCID ID: NO: 0000-0001-6082-0818, SFE: 0000-0002-4319-7558, ÖEA: 0000-0003-4680-1738, HHD: 0000-0002-4795-2266, SÇ: 0000-0002-5187-378X

*Corresponding author e-mail: feyza.erdogmus@afsu.edu.tr

GİRİŞ

Deri, organizmanın canlılığını sürdürebilmesi için gerekli birçok fonksiyonu yerine getirmektedir. Deri bütünlüğünün ve işleyişinin çeşitli faktörler ile bozulmasına yara adı verilmektedir. Bu işleyişin yeniden sağlanması ve doku bütünlüğünün yeniden kazanılması ise yara iyileşmesi olarak tanımlanmaktadır. Hemostasis, inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon evrelerinden oluşan yara iyileşme sürecinde çeşitli biyokimyasal ve hücrel süreçler ile hücrel yapılar ve doku tabakaları yeniden oluşturulmaktadır. Yanık yaraları; derinlik, alan genişliği ve yanığa neden olan etmenlere göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. En yaygın sınıflandırma ise yanığın deri katmanlarında oluşturduğu hasar değerlendirilerek yapılan derinlik sınıflandırmasıdır. Derinliklerine göre yanıklar; birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece yanıklar olmak üzere dört ayrı grupta incelenmektedir (Markiewicz-Gospodarek ve ark. 2022; Noor ve ark. 2022). Birinci derece yanıklar; derinin epidermis tabakası adı verilen en üst katmanının etkilendiği yanıklardır. Bu nedenle yanık alanı kırmızı, kuru ve ağrılıdır. Genellikle birkaç gün içinde yara izi bırakmayacak şekilde iyileşebilir ve yaralanmadan sonraki birkaç gün içinde epitelyumda kabuklaşma görülmektedir (O'Brien ve Billmire 2008). İkinci derece yanıklarda ise, derinin dermis ve epidermis tabakası etkilenmektedir. Bu tip yanıklar; genellikle sıcak su ile haşlanma, alev veya sıcak cisim ile temas sonucunda oluşmaktadır. İkinci derece yanıklar; doku hasarının daha fazla olduğu ağrılı ve iltihaplanmaya açık yanıklardır (Hussain 2013). Üçüncü derece yanıklarda ise epidermis, dermis ve hipodermisten oluşan derinin tüm katmanları etkilenmektedir ve bu yanıkların kendi kendine iyileşebilme özelliği yoktur. Yanık alanının rengi pembe-kırmızıdan kahverengi ve beyazımsı, sarımsı renge döner ve ağrı duyusu kaybolmuştur. Üçüncü derece yanıklarda cerrahi tedavi uygulanmadığında skar gelişimi, sepsis, mortalite riski artmaktadır. Dermal ve epidermal yapılar canlılığını yitirdiği için yara kenarından tekrar epitelize olarak iyileşme sürecine geçebilir. Dördüncü derece yanıklar; kas, tendon ve kemiklerin etkilendiği oldukça derin yanıklardır. Bu tip yanıklar mutlaka cerrahi uygulama gerektirmektedir, defektlerin kapatılması veya bazı olgular için amputasyon işlemi gerekli olabilmektedir (Patel ve ark. 2008; Suha ve Sanam 2022).

Yara iyileşme sürecinde ideal ortam koşullarının sağlanması oldukça önemlidir. Doku rejenerasyonunda kullanılan ürünler arasında yer alan yara-yanık kremleri; çözünürlükleri, etkili etken madde salımları, yara-yanık bölgesine kolayca uygulanabilir olmaları gibi avantajlara sahip oldukları için yaygın olarak kullanılır. Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri çok güçlü dezenfektan özellikleri ile ortamın mikrobiyolojik dengesinin sağlanmasında oldukça önemlidir. Kararsız bileşikler olup, belirli bir yarılanma süresi sonunda enerjilerini yitirip tekrar nötr

oksijen moleküllerine dönüşürler. Serbest radikal olmadıkları için ozon olarak bilinen triozon moleküllerinden ayrılırlar. Güneş ışınları veya 254 nm dalga boyu ışınları oksijen moleküllerini enerjilendirilmiş oksijen türevlerine dönüştürürler. Oksijen molekülleri, bu enerji sayesinde birbirleri arasında geçici bağlar oluşturularak enerji depolar. Profoks jeneratörü, radyoaktif olmayan plazma üreterek havadaki oksijeni tıpkı güneş gibi enerjilendirebilir. Sistem verimi %95'in üzerindedir, bu sayede manyetik sürtünme en az seviyede olur ve yüksek ısı açığa çıkmaz. Böylece, az miktarda elektrik enerjisi harcayarak havadan elde ettiği oksijeni enerjilendirilmiş oksijen moleküllerine dönüştürebilir (Tecer ve Gündüz 2021). Enerjilendirilmiş oksijen moleküllerinin yağ içerisinde tutunma oranı fazla olup, çeşitli krem formülasyonlarında baz olarak kullanılabilir.

Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan, *Hypericum perforatum* L. halk arasında yanık ve yaraların iyileşmesini hızlandırmak için yaygın olarak kullanılır (Altan ve ark. 2015; Nobakht ve ark. 2022). Türkiye'de ve Avrupa'da yayılış gösteren *H. perforatum* L., Hypericaceae (Guttiferae) familyasında yer alır. *H. perforatum* L. halk arasında "sarı kantaron, binbirdelik otu" olarak adlandırılır, çok yıllık, sarı çiçekli bir bitkidir. *H. perforatum* L. içerdiği hypericin, hyperforin, quercetin, rutin, campferol, myricetin ve hyperoside gibi biyoaktif bileşenler sayesinde, yara ve yanık tedavisi başta olmak üzere, sarılık, sıtma, tüberküloz, diyabet ve çeşitli enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır (Çelen ve ark. 2008, Saddique ve ark. 2010, Adams ve Graves 2013, Eroğlu ve ark. 2019; Erdal-Alıntaş ve Erdoğan 2023). Süntar ve arkadaşları; *H. perforatum* L.'un antienflamatuar etki gösterdiğini, enfeksiyona direnci ve fibroblast göçünü arttırdığını kolajen birikimi sağladığını rapor etmiştir (Süntar ve ark. 2010). *H. perforatum* L.'un yara iyileştirici aktivitesinin, fibroblastik aktivite ve kolajen sentezindeki artıştan kaynaklandığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur (Öztürk ve ark. 2007; Yalcınkaya ve ark. 2022; Parin ve Deveci 2023).

Bu çalışma kapsamında, *H. perforatum* L. tıbbi yağı ve enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren bazın biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren baza *H. perforatum* tıbbi yağı eklenerek hazırlanan ürünün yanık yarası iyileştirme etkinliği ilk kez in vitro ve in vivo çalışmalar ile değerlendirilmiştir.

MATERYAL ve METOT

Bitki Materyali ve Bitki Örneklerinin Hazırlanması

H. perforatum L. bitkisi 2021 yılının haziran-temmuz aylarında, Afyonkarahisar, Merkez, Erkmen beldesi, bölgesinden toplanmış ve teşhis edilmiştir (Herbaryum Kayıt No: AKU-10964). Bitkinin toprak

üstü kısımları gölgede kurutularak, ince toz halinde öğütülmüş ve steril siyah cam kavanozların içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 50 g *H. perforatum* bitkisinin toprak üstü kısımları 500 ml zeytinyağı (Kristal Natural Sızma Zeytinyağı-Kristal Ticaret ve Sanayi Kontuvarı A.Ş) içeren koyu renkli, steril cam kavanoza yerleştirilmiş ve kavanoz 4 hafta boyunca günde 12 saat güneş ışığında tutularak tıbbi yağ elde edilmiştir (Suntar ve ark. 2010).

Enerjilendirilmiş Oksijen Molekülleri İçeren Baz Elde Edilmesi

Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri (EOM) içeren baz, Profoks cihazı kullanılarak elde edilmiştir (Tecer ve Gündüz 2021). Bu jeneratör, saf oksijeni enerjilendirilmiş oksijen moleküllerine dönüştürebilmektedir. Bu oluşumunun gerçekleştiği reaktörlerde 254 nm dalga boyunda şiddetli UV radyasyonu elektron sintilatörleri aracılığı ile oluşturulur. Nano delikler içeren bu sintilatörlerden geçen elektronlar 254 nm dalga boyunda plazmik ışımaya neden olur. Kapasitör yapıdaki bu reaktör bir bobin tarafından belli bir rezonans frekansında indüklenerek LC rezonans devresinde elektronların nano tüplerden geçebilmesi için reaktörler AC 50.000 volt potansiyelde indüklenir. Bu sistemler aracılığı ile üretilen tetra oksijen, zeytinyağı gibi birçok bitkisel yağa emdirilme potansiyeli sahiptir. Bu çalışmada, enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren baz oluşturulması için zeytinyağı kullanılmıştır.

Antimikrobiyal Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda mevcut olan; *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *E. faecalis* ATCC 51289, *E. coli* ATCC 35218, *B. subtilis* NRS 744, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 12600, *C. albicans* ATCC 10231 test mikroorganizmaları kullanılmıştır.

In Vitro Sitotoksikite Çalışmaları

H. perforatum L. tıbbi yağ ve EOM içeren bazın insan deri fibroblast (HDFa) hücre hattı (ATCC, PCS-201-012) üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hücreler nemli ortamda, %5 CO₂ inkübatöründe 37 °C'de çoğaltılmıştır. Besiyeri olarak içerisinde %10 (v/v) oranında ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serumu (FBS; Fetal bovine serum), %1 (v/v) oranında penisilin streptomisin ve %1 (v/v) oranında (1 mM) glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri kullanılmıştır. Absorbans değerleri doğrudan canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT analizleri 96 kuyucuklu pleytler kullanılarak yapılmıştır. Her bir

kuyucuğa 200 µl medium içerisinde 2×10⁴ sayıda hücre ekilerek 37 °C'de inkübe edilmiştir. En az %70 konfluent olan tıbbi yağ ve EOM içeren baz eklenerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT çözeltisi (5 mg.ml⁻¹, PBS içerisinde) eklenerek 37 °C'de 2-4 saat inkübe edildikten sonra hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 200 µl DMSO eklenmiş ve 5 dakika inkübe edilmiştir. Renk değişimi, ELISA plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda okutularak belirlenmiştir. Kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (Denizot ve Land 1986).

% Hücre canlılığı = (örneğin absorbans değeri/kontrolün absorbans değeri)*100

Antimikrobiyal Etkinliğin Belirlenmesi

H. perforatum L. tıbbi yağ ve EOM içeren bazın antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi için patojen test mikroorganizmaları kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI 2016). Tüm çalışmalar üç tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

Tıbbi yağ ve enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren bazın MİK değerlerini belirleyebilmek için, test mikroorganizmaları 37 °C'de, 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra mikroorganizmalar 0.5 Mc Farland bulanıklık derecesine getirilmiş ve 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarına her bir test mikroorganizmasından 100 µl (10⁵-10⁶ kob.ml⁻¹) eklenmiştir. Daha sonra tıbbi yağ ve EOM içeren baz yarı yarıya seyreltilerek her bir konsantrasyondan 100 µl kuyucuklara ilave edilmiş ve 37 °C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonrasında bakteriyel büyüme, her bir bileşiğin büyüme inhibisyonunun MİK değerini belirlemek için ELISA cihazında ölçüm yapılarak belirlenmiştir (CLSI 2002, CLSI 2006).

Disk difüzyon testi için, patojen test mikroorganizmaları Müeller Hinton Broth (MHB) besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra mikroorganizmalar 0.5 Mc Farland bulanıklık derecesine getirilmiştir. Mc Farland bulanıklığına getirilen kültürden 0.1 ml alınarak Müeller Hinton Agar (MHA) katı besiyerine yayma ekim yapılarak, test edilecek tıbbi yağ ve EOM içeren baz konsantrasyonları boş steril disklere (6 mm) emdirildikten sonra petrilere yerleştirilmiştir. Daha sonra petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek kontrol grubuna göre değerlendirilme yapılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak geniş spektrumlu antibiyotikler olan penisilin (10 mg.ml⁻¹), amikasin (30 mg.ml⁻¹) ve flukonazol (10 mg.ml⁻¹) kullanılmıştır.

Oksidan-Antioksidan Aktivitesi ve Toplam Fenolik İçerik Belirlenmesi

H. perforatum L. tıbbi yağın oksidan, antioksidan aktivitesini belirleyebilmek için TAS/TOS kiti kullanılmıştır. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq.l}^{-1}$ olarak ifade edilmiştir (Erel 2005). Antioksidan aktivite sonuçları $\text{mmol Trolox Eq.l}^{-1}$ olarak ifade edilmiştir (Erel 2004). Toplam fenol miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine (Gamez 1999) göre yapılmıştır. 150 μl örnek, 150 μl Folin Ciocaltaeu reaktifi (%50) ve 3 ml sodyum karbonat çözeltisi (%2) deney tüpüne karıştırılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltilerin absorpsanları UV-Vis spektrofotometresi'nde 760 nm'de okunarak toplam fenol miktarları; gallik asit ile çizilen kalibrasyon eğrisinden, mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

Enerjilendirilmiş Oksijen Molekülleri İçeren Bitkisel İçerikli Ürün Hazırlanması

İlk olarak profoks jeneratörü kullanılarak EOM içeren krem bazı elde edilmiştir. Bu krem bazına yara iyileştirme özelliği kazandırmak amacıyla *H. perforatum* L. tıbbi yağı eklenmiştir. En uygun formülasyon (F₂) ise ürün değerlendirme çalışmalarında kullanılmıştır.

F₁:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (1:1 v/v)
F₂:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (2:1 v/v)
F₃:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (3:1 v/v)
F₄:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (4:1 v/v)
F₅:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (5:1 v/v)

İn Vitro Biyouyumluluk Değerlendirilmesi

EOM içeren bitkisel içerikli ürünün HDFa hücre hattı üzerinde biyouyumluluğunun belirlenmesi için ürünlerin ekstraktları kullanılmıştır. Ekstraksiyon için örnekler bir saat UV ışığında sterilize edildikten sonra içerisinde DMEM besiyeri bulunan 24 kuyucuklu plakalara eklenmiş ve hücreler eklenmeden önce bir gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa $0,2 \times 10^6$ hücre eklenerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda 24, 48 ve 72 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Belirlenen süreler tamamlandığında kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 μl taze DMEM besiyeri ile 50 μl MTT çözeltisi eklenmiştir. Hücre kültür plakaları karanlık ortamda 4 saat süreyle inkübe edilmiştir (37 °C'de, %5 CO₂). Bu süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak, her kuyucuğa 100 μl DMSO çözeltisi eklenmiştir. Ardından plakalar 30 dakika süreyle karanlık bir ortamda bekletilmiş ve çözeltiler pipetaj sonrası yeni plakalara aktararak ELISA Microplate Reader yardımıyla 570 nm dalga boyunda absorpsan değerleri ölçülerek % hücre canlılığı belirlenmiştir. İçerisinde sadece besiyeri bulunan kuyucuklar kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Demirci ve ark. 2020).

İn Vivo Çalışmalar

In vivo çalışmada 250-300 g ağırlığında Wistar albino türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar deney hayvanları ünitesindeki kafeslerinde; 24 ± 1 °C sıcaklıkta, 12 saat ışık/karanlık ve düzenli havalandırılan ortamda bulundurulmuştur. Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda sıçanlar üzerinde ikinci derece yanık oluşturularak *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. İkinci derece yanık oluşturmak amacıyla; 12 saat aç bırakılmış deneklere 87 mg.kg^{-1} ketamin ve 13 mg.kg^{-1} ksilazin kullanılarak anestezi uygulanıp deneklerin vücut yüzey alanlarının %10'unu geçmeyecek şekilde $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 2 adet metal plak 30 saniye kaynar suda bekletildikten sonra deneklerin tıraş edilmiş sırtlarına 10 saniye basılı tutulmuştur. Böylece her denegin sırt bölgesinde $1 \times 1 \text{ cm}^2$ karşılıklı iki yanık bölgesi oluşturulmuştur. Bu çalışmada; 48 adet erkek sıçan kullanılarak her biri rastgele seçilmiş 12 sıçandan oluşan 4 grup oluşturulmuştur. Birinci grup, negatif kontrol (NK) grubu olarak kullanılmış olup bu gruptaki sıçanlara herhangi bir teröpatik ajan uygulanmamıştır. İkinci grup; pozitif kontrol (PK) grubuna, ticari olarak satılan yara iyileştirme etkinliği bilinen *Centella asiatica* bitkisinin titredilmiş ekstresini içeren krem (Madecassol) uygulanmıştır. Üçüncü grup EOM içeren baz ve dördüncü grup ise EOM içeren bitkisel içerikli ürün olacak şekilde uygulanmıştır. Her gruptan yanık oluşumu sonrası 0., 3., 7., 14., 21. ve 28. günlerde 3'er sıçan örnekleme için anestezi altına alınıp her yara bölgesi en geniş yara kısmını içine alacak şekilde biyopsi yapıldıktan sonra nötral buffer formalin ile fikse edilerek sıçanlar anestezi altında dekapitasyon şekliyle ötenazi edilmiştir. Alınan örneklerin histopatolojik incelemeler için hazırlanması, yaraların reepitelizasyon, granülasyon dokusu, kolajen birikimi, inflamatuvar hücre varlığı, anjiyogenezis ve ülser kriterleri bakımından histolojik yara iyileşmesinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Histopatolojik değerlendirmeler için alınan deri örnekleri %10'luk tamponlanmış formalinde 1 hafta süre ile fikse edilmiştir. Deri dokusu örnekleri akan çeşme suyunda bir gece yıkama işlemini takiben, artan derecelerdeki etanol serilerinden (%50-%100) ve ksilen serilerinden geçirildikten sonra 58 °C'de erimiş parafin infiltrasyonunu takiben parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2245) ile 5-7 μm kalınlığındaki kesitler lamalar üzerine alındıktan sonra bu kesitler hematoksilin-eosin boyama yöntemiyle boyanıp yara iyileşme skalasına göre değerlendirilmiştir. Boyanmış olan kesitler, araştırma mikroskopunda (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) incelenerek fotoğraflanmıştır. İstatistiksel Analizler Çalışma sonucunda elde edilen veriler varyans analiz testleri SPSS 22.0 versiyonu (SPSS Software, IBM, ABD) kullanılarak One Way ANOVA testi ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR

H. perforatum L. tıbbi yağının ve EOM içeren bazı HDFa hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. *H. perforatum* L. tıbbi yağının konsantrasyon artışına bağlı olarak 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığı değerlerinde artış göstermiştir. En yüksek hücre canlılığı 24. saatte 1/1 konsantrasyonda (seyreltilmemiş tıbbi yağ) %129,09 olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Yanık kremi formülasyonunda krem bazı olarak kullanılan EOM içeren krem bazının HDFa hücreleri üzerinde 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılığı değerlerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığı değerleri de artış göstermiştir. 72. saatte ise 1/4'ten düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığı kontrol grubuna göre düşük olup 1/4'ün üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığı kontrol grubuna göre yüksek değerler göstermiştir. 72. saatte genel olarak hücre canlılığı sonuçları tüm konsantrasyonlarda 24 ve 48. saate göre azalmıştır. En yüksek hücre canlılığı ise 24. saatte 1/1 konsantrasyonda %134,00 olarak belirlenmiştir (Şekil 2). Tüm veriler, Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., USA) programında One Way ANOVA, Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel analizleri yapılmıştır. $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

H. perforatum L. tıbbi yağının ve EOM içeren bazı antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi için MİK ve disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Patojen test mikroorganizmalarına karşı MİK değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Patojen test mikroorganizmaları üzerindeki inhibisyon etkileri Tablo 2'de gösterilmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak antimikrobiyal etkinlikte de artış görülmüştür. Tıbbi yağ saf olarak uygulandığında antimikrobiyal etkinliğin olduğu fakat seyreltme yapıldıkça bu etkinin azalarak kaybolduğu belirlenmiştir. EOM içeren baz saf olarak uygulandığında daha yüksek değerlerde antimikrobiyal etkinlik belirlenmiştir. Özellikle, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923 ve *C. albicans* ATCC 10231 üzerinde pozitif kontrol kadar etkili olduğu saptanmıştır.

Tıbbi yağın TAS, TOS ve OSİ değerleri ve toplam fenolik içerik miktarı Tablo 3'te gösterilmiştir. Toplam fenol miktarı için gallik asit ile hazırlanan standart grafik kullanılarak belirlenmiştir. ($R^2=0,994$). Biyolojik aktivite belirleme çalışmalarından elde edilen veriler doğrultusunda EOM içeren baz ve iyileştirme etkinliğini artırmak amacıyla *H. perforatum* L. tıbbi yağ kullanılarak farklı formüller (F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , F_5) hazırlanmıştır. F_4 ve F_5 numaralı formüller in vitro ve in vivo çalışmalar için uygun görülmediği için in vitro çalışmalarda F_1 , F_2 , F_3 formülasyonları kullanılmıştır. Bu formülasyonların HDFa hücreleri üzerinde biyoyumlulukları 24, 48 ve 72 saat periyotlarında test edilmiştir. Test edilen formülasyonların 24 saat

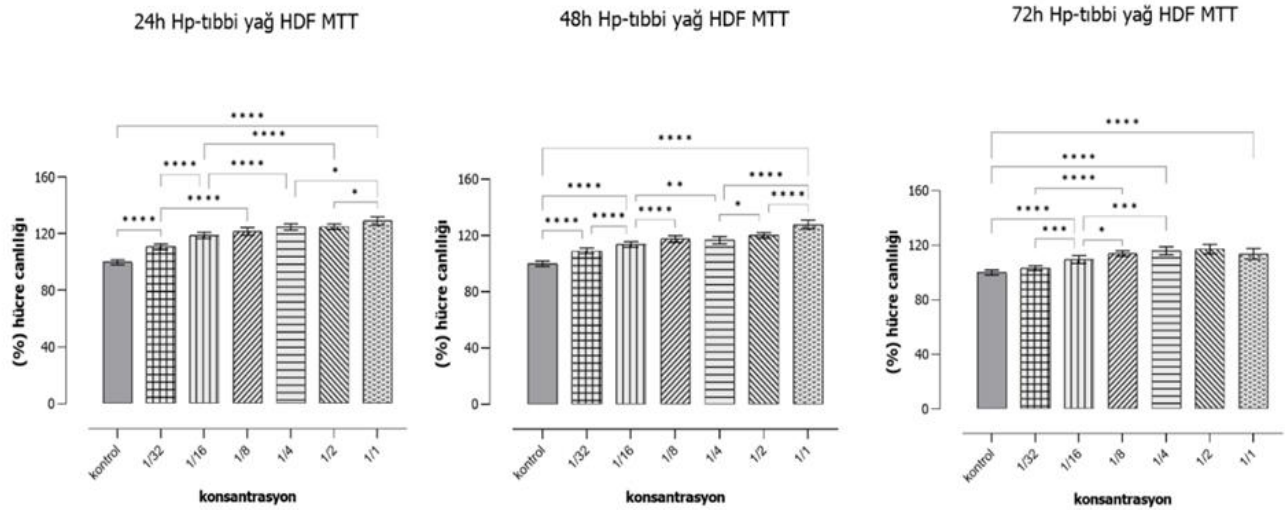
periyodunda kontrol grubuna göre hücre canlılığının yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek biyoyumluluk, F_2 formülasyonunda saptanmıştır (Şekil 3). Bu nedenle in vivo çalışmalarda ürün olarak F_2 formülasyonu kullanılmıştır. Elde edilen veriler Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., USA) programında One Way ANOVA, Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ($p \leq 0.05$).

İn vivo çalışma gruplarının ImageJ programı kullanılarak ölçülen yanık alanlarının iyileşme yüzdeleri Tablo 4 ve Şekil 4'te gösterilmiştir. Araştırmadan elde edilen sonuçlar, SPSS 22.0 istatistik paket programında One Way ANOVA testi uygulanarak yapılmıştır. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulanmış, veriler "ortalama \pm standart sapma" olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için $p \leq 0.05$ kabul edilmiştir (Tablo 4). İn vivo çalışma gruplarında kullanılan deney hayvanlarının ağırlıklarında gruplar arasında ve zamana bağlı olarak herhangi bir istatistiksel farklılık belirlenmemiştir.

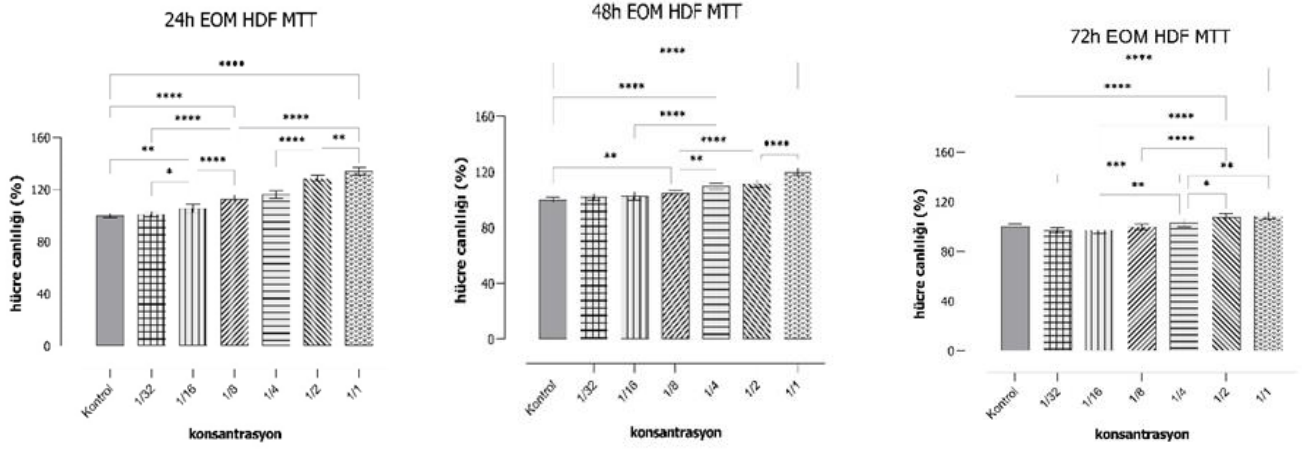
Yapılan histopatolojik incelemede hemotoksilen-eozin ile boyanan preparatlarda iyileşme sürecini takip etmek için inflamasyon, damarlanma ve fibroblastik aktivite 0., 3., 7., 14., 21. ve 28 günlerde alınan biyopsiler ile değerlendirilmiştir (Şekil 5, Tablo 5). Her bir parametre için kontrol ve tedavi grupları karşılaştırılmıştır. Birinci gün alınan biyopsilerde yanık derinliği değerlendirilmiş ve ikinci derece derin yanık oluşturulduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda, reepitelizasyon değerlendirmesinde yapılan histopatolojik inceleme sonucu 3 ve 7. günler arasında ürün ve PK gruplarında orta düzeyde epitel oluşumu gözlenirken EOM içeren baz grubunda hafif ve NK grubunda yok denecek kadar az oranda belirlenmiştir. 14., 21. ve 28. günlerde ise ürün ve PK gruplarında yüksek düzeyde reepitelizasyon görülmüştür. Epitel hücrelerin keratinosit migrasyonu ile temelini sağladığı, hasarlı alanda yeniden bir bazal laminanın kurulması reepitelizasyon ile oluşturulur, maturasyon fazıyla da sağlamlaştırılır (Broughton 2006, Sgvamang ve ark. 2007, Velnar ve ark. 2009, Leong ve ark. 2017). Dolayısıyla yara iyileşmesinin en önemli bileşenlerinden biri olan reepitelizasyonun, kaliteli bir yara iyileşmesi elde edilebilmesi için yüksek oranda olması gerekir. Neovaskülarizasyon düzeyi incelendiğinde ürün ve PK gruplarında 7. günden itibaren yükseldiği belirlenmiştir. Skar ve ulkus düzeylerine bakıldığında 3. günde ürün grubunda %80 yüksek düzeyde iken, % 20 orta düzeyde skar ve ulkus oluşumu görülmüştür. PK grubunda da %90 hafif oranda skar ve ulkus oluşumu ile karşılaşılmıştır. 7. gündeki skar ve ulkus düzeyleri karşılaştırıldığında; skar ve ulkus oranları ürün grubunda %80 hafif düzeyde iken %20 orta düzeyde skar ve ulkus oluşumu görülmüştür. PK grubunun tamamında hafif düzeyde skar ve ulkus oluşumu ile karşılaşılmıştır. 14.

gündeki skar ve ulkus düzeyleri karşılaştırıldığında; ürün grubunun %80'inde hafif, %20'sinde ise orta düzeyde gerçekleşirken; bu oran PK grubunda %90 hafif düzeyde skar ve ulkus oluşumu görülmüştür. 21. ve 28. gündeki skar ve ulkus düzeyleri karşılaştırıldığında; ürün ve PK grubunda skar ve ulkusa rastlanmamıştır. Kolajen aktivite değerlendirmesine göre 3. gündeki kolajen düzeyi karşılaştırıldığında ürün grubunda %40 yüksek düzeyde, %10 hafif ve %50 orta düzeyde kolajen oluşumu gözlenirken bu oran PK grubunda %50'sinde yüksek, %40'ında orta ve %10'unda ise hafif düzeyde gerçekleşmiştir. 7. gündeki kolajen düzeyi karşılaştırıldığında ürün grubu preparatlarının %80'inde yüksek; %10'unda orta ve %10'unda ise hafif düzey kolajen oluşumu görülürken; PK grubunda bu oran %90 yüksek düzeyde ve %10 ise hafif düzeyde saptanmıştır. 14. gündeki kolajen düzeyi karşılaştırıldığında; ürün grubu preparatlarının

%80'inde yüksek; %10'unda orta ise orta düzey kolajen oluşumu görülürken; PK grubunda bu oran %90 yüksek düzeyde ve %10 orta düzeyde saptanmıştır. Benzer şekilde EOM içeren baz grubunda bu oran yarı yarıya orta ve hafif düzeyde gerçekleşmiştir. NK grubunda ise bu oranlar %80 hafif düzey kolajen ve %20 orta düzeyde kolajen oluşumu gerçekleşmiştir. 21.gündeki kolajen düzeyi incelendiğinde; oranlar ürün grubunda %80 yüksek düzey, %10 orta ve %10 hafif düzey kolajen oluşumu görülürken; PK grubunda, %50 yüksek düzeyde, %40 orta ve %10 hafif düzeyde kolajen oluşumu ile karşılaşmıştır. 28. gün preparatları incelendiğinde oranlar ürün grubunun %80 inde yüksek düzeyde iken %10'unda orta ve %10'unda ise hafif düzeyde kolajen oluşumu görülmüştür. PK grubunda %80 yüksek düzey kolajen ve %20 orta düzey kolajen oluşumu görülmüştür. Yara iyileşmelerinde oluşan yeni dokunun dayanıklılığı kolajenizasyona bağlıdır.



Şekil 1: *H. perforatum* L. tıbbi yağının HDFa hücre canlılığı üzerindeki etkisi
Figure 1: Effect of *H. perforatum* L. medicinal oil on HDFa cell viability



Şekil 2: EOM içeren bazın HDFa hücre canlılığı üzerindeki etkisi
Figure 2: Effect of EOM containing base on HDFa cell viability

Tablo 1. *H. perforatum* L. tıbbi yağının ve EOM içeren bazın MİK değerleri
Table 1. MIC values of *H. perforatum* L. medicinal oil and base containing EOM

Test Mikroorganizmaları	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)	
	Tıbbi Yağ	EOM içeren baz
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	1:2	1:4
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1:4	1:8
<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	-	1:8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	1:2	1:4
<i>E. faecalis</i> ATCC 51289	1:2	1:8
<i>E. coli</i> ATCC 35218	1:2	1:4
<i>B. subtilis</i> NRS 744	1:2	1:4
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1:4	1:8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1:2	1:4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1:2	1:8
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	1:4	1:8
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1:2	1:8

Tablo 2. Disk difüzyon test sonuçları
Table 2. The results of disc diffusion test

TEST MİKROORGANİZMALARI	İnhibisyon Zon Çapları (mm±ss)													
	Tıbbi Yağ					EOM içeren baz					PK ₁	PK ₂	PK ₃	NK
	Saf	1:1	1:2	1:4	1:8	Saf	1:1	1:2	1:4	1:8				
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	11±0,5	10±0,3	9±0,5	8±0,5	-	12±0,3	11±0,0	10±0,1	9±0,0	8±0,0	24±0,5	15±0,4	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	11±0,3	10±0,3	9±0,3	8±0,3	-	24±0,5	18±0,5	16±0,5	15±0,5	13±0,4	30±0,8	13±0,3	-	-
<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	-	-	-	-	-	11±0,3	10±0,2	10±0,1	9±0,2	8±0,5	30±1,2	15±0,5	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	12±0,3	10±0,5	9±0,5	8±0,3	8±0,5	14±0,5	13±0,4	11±0,2	10±0,4	9±0,2	29±0,7	14±0,2	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 51289	10±0,4	9±0,3	8±0,5	8±0,5	-	12±0,6	11±0,3	10±0,4	9±0,5	8±0,5	25±0,5	15±0,2	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	10±0,5	9±0,3	9±0,5	8±0,3	-	11±0,5	10±0,5	9±0,5	8±0,0	-	30±0,7	12±0,5	-	-
<i>B. subtilis</i> NRS 744	11±0,2	10±0,3	9±0,3	8±0,5	-	11±0,4	10±0,3	9±0,5	8±0,0	-	30±0,8	20±0,3	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	11±0,2	10±0,5	9±0,3	9±0,5	8±0,0	21±0,5	19±0,7	18±0,5	16±0,7	14±0,5	31±0,5	17±0,5	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10±0,5	9±0,5	8±0,5	7±0,3	-	11±0,3	10±0,5	9±0,0	8±0,0	-	29±0,5	16±0,5	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11±0,3	10±0,0	9±0,0	9±0,0	8±0,0	15±0,5	13±0,2	12±0,0	10±0,2	9±0,2	20±0,5	15±0,3	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	12±0,0	11±0,0	10±0,5	9±0,5	8±0,5	22±0,5	20±0,8	17±0,3	16±0,5	14±0,4	39±1,0	15±0,5	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10±0,0	9±0,0	8±0,0	-	-	22±0,5	20±0,5	19±1,0	17±0,7	16±0,5	30±0,5	-	18±0,5	-

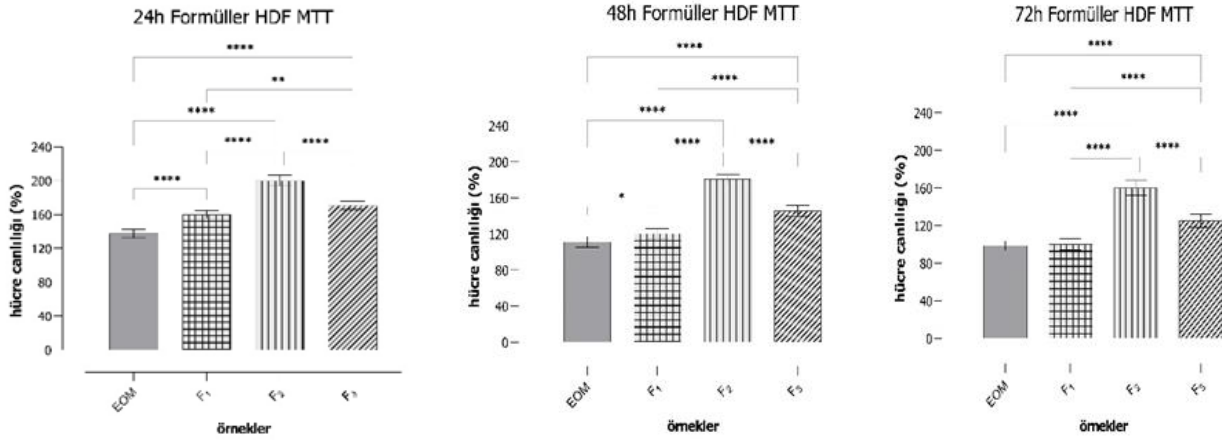
**C. albicans* ATCC 10231 için; PK₃: Flukonazol (10 mg.ml⁻¹) ss: standart sapma

*Diğer test mikroorganizmaları için; PK₁: Penicilin G (10 mg.ml⁻¹) PK₂: Amikasin (30 mg.ml⁻¹) NK: dH₂O

Tablo 3. *H. perforatum* L. tıbbi yağının TAS, TOS, OSI ve total fenolik içerik miktarları
Table 3. TAS, TOS, OSI and total phenolic content values of *H. perforatum* L. medicinal oil

Örnekler	Toplam Antioksidan Düzeyi (TAS) mmol Trolox.l ⁻¹	Toplam Oksidan Düzeyi (TOS) µmol H ₂ O ₂ .l ⁻¹	Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	Toplam Fenolik İçerik (mg GAE*.g ⁻¹ ekstrakt)
Tıbbi Yağ	2,797±0,016	6,303±0,013	2,253±0,025	0,314±0,006

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=5)



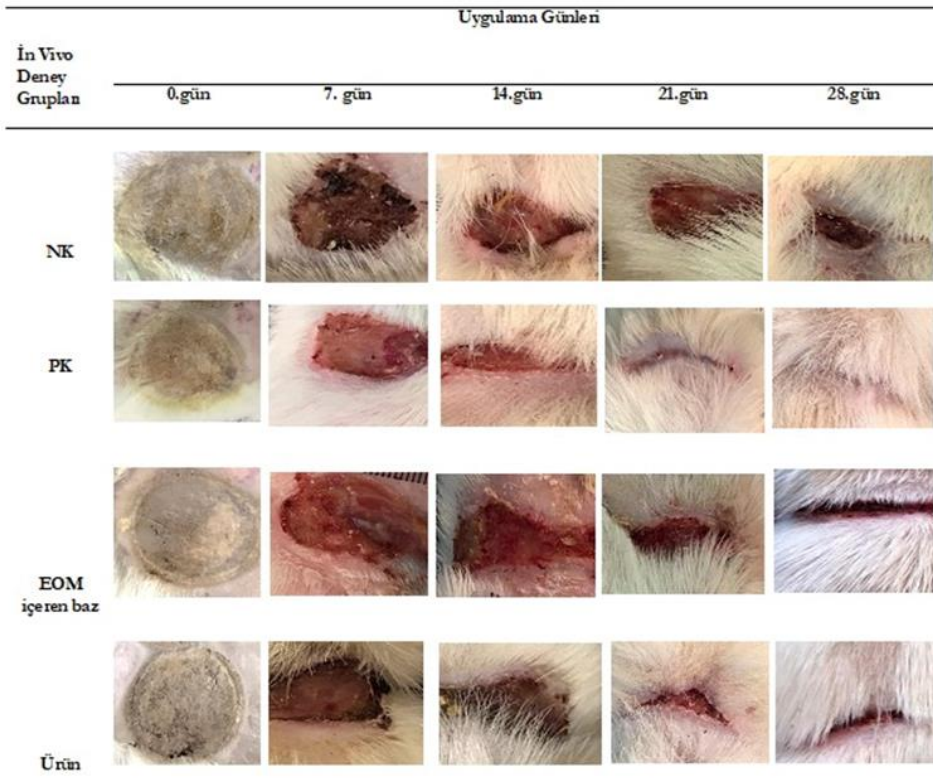
Şekil 3: EOM, F₁, F₂ ve F₃ formülasyonlarının in vitro biyoyumluluk sonuçları
Figure 3: In vitro biocompatibility results of product formulations

Tablo 4. İn vivo deney gruplarının ImageJ programı kullanılarak ölçülen yanık alanlarının ortalama iyileşme yüzdeleri

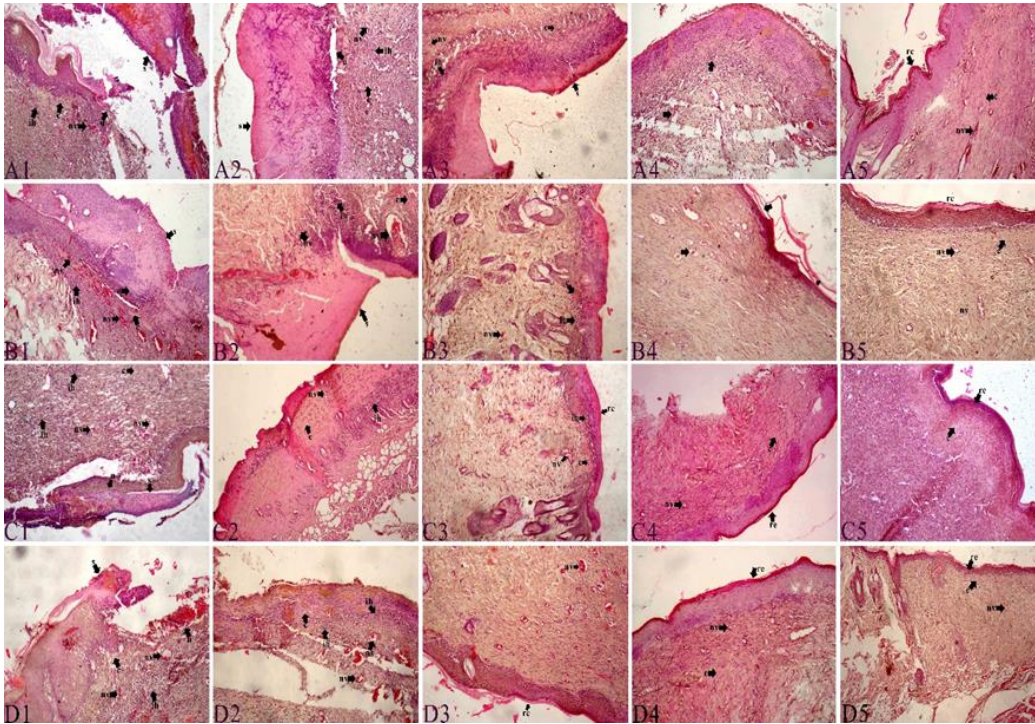
Table 4. The average healing percentages of the burn areas measured using the image j program of the in vivo experimental groups.

İn vivo grupları (n=10)	% İyileşme			
	7. gün	14. gün	21.gün	28. gün
NK	18,73±3,85 ^c	29,45±4,58 ^d	50,99±4,39 ^c	71,65±5,33 ^c
PK	31,38±5,43 ^a	64,91±4,86 ^a	86,19±4,21 ^a	98,57±2,51 ^a
EOM içeren baz	27,46±3,34 ^b	48,25±2,96 ^c	71,71±2,90 ^b	93,85±2,02 ^b
Ürün (F2)	29,23±2,12 ^{ab}	59,92±5,08 ^b	83,04±4,19 ^a	92,69±3,11 ^b
“p” Değerleri	0,001	0,001	0,001	0,001

NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif Kontrol, EOM içeren baz: Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren baz
 Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.



Şekil 4: İn vivo deneş gruplarının farklı uygulama günlerindeki yanık alanlarının görüntüleri.
Figure 4: Images of burn areas in vivo experimental groups on different application days.



- A:** Negatif kontrol **1:** 3.gün **s:**Skar
B: Pozitif kontrol **2:** 7. gün **nv:** Neovaskularizasyon
C: EOM içeren baz **3:** 14. Gün **ih:** inflamatuvar hücre
D: Ürün (F₂) **4:** 21. Gün **c:** kolajen
5: 28. gün **re:**Reepitelizasyon **u:**Ulkus

Şekil 5: İn vivo çalışma gruplarının farklı günlerdeki histopatolojik incelemeleri
Figure 5: Histopathological examinations of in vivo groups on different days

Tablo 5. İkinci derece yanık modelinin reepitelizasyon, inflammatuar hücre, neovaskülarizasyon ve kolajen düzeyleri üzerine etkileri

Table 5. Effects of second degree burn model on reepithelialization, inflammatory cell, neovascularization and collagen levels

İn vivo çalışma grupları	Reepitelizasyon	Neovaskülarizasyon	Skar ve Ulkus	Kolajen	İnflammatuar Hücre
NK-3.gün	0,16±0,40 ^c	0,50±0,44 ^b	2,33±0,51 ^{ab}	1,01±0,16 ^g	2,83±0,41 ^a
PK-3.gün	0,51±0,54 ^{de}	0,83±0,40 ^b	1,83±0,75 ^{bcd}	2,33±0,81 ^{abcd}	2,33±0,51 ^{abcd}
EOM-3.gün	0,51±0,54 ^{de}	0,66±0,51 ^b	2,00±0,38 ^{bc}	1,66±0,52 ^{cdefg}	2,66±0,51 ^{ab}
Ürün-3.gün	0,66±0,51 ^{de}	0,83±0,40 ^b	2,66±0,51 ^a	2,16±0,75 ^{abcde}	2,50±0,54 ^{abc}
NK-7.gün	0,51±0,63 ^{df}	0,66±0,51 ^b	1,83±0,40 ^{bcd}	1,16±0,40 ^{fg}	2,66±0,52 ^{ab}
PK-7.gün	1,33±0,51 ^{bcd}	2,33±0,81 ^a	1,01±0,12 ^{fg}	2,33±1,03 ^{abcd}	2,33±0,51 ^{abcd}
EOM-7.gün	1,01±0,63 ^{cde}	1,01±0,96 ^b	1,51±0,54 ^{cdef}	2,01±1,09 ^{abcdef}	2,66±0,51 ^{ab}
Ürün-7.gün	0,83±0,40 ^{cde}	2,16±1,32 ^a	1,33±0,51 ^{defg}	2,51±0,84 ^{abc}	2,33±0,51 ^{abcd}
NK-14.gün	1,16±0,47 ^{cde}	2,16±0,98 ^a	1,66±0,51 ^{cde}	1,33±0,51 ^{efg}	2,51±0,55 ^{abc}
PK-14.gün	2,66±0,51 ^a	3,01±1,32 ^a	0,83±0,40 ^g	2,83±0,41 ^b	1,83±0,41 ^{cde}
EOM-14.gün	2,16±1,32 ^{ab}	2,66±0,51 ^a	1,50±0,54 ^{cdef}	1,66±0,51 ^{cdef}	2,00±0,66 ^{bcde}
Ürün-14.gün	2,50±0,83 ^a	2,66±0,51 ^a	1,16±0,40 ^{efg}	2,66±0,52 ^{ab}	1,83±0,41 ^{cde}
NK-21.gün	1,01±0,90 ^{cde}	2,50±0,83 ^a	0,33±0,81 ^h	1,50±0,54 ^{defg}	2,51±0,54 ^{abc}
PK-21.gün	2,66±0,81 ^a	2,83±0,40 ^a	0,00±0,00 ^h	2,33±0,81 ^{abcd}	1,33±0,51 ^{ef}
EOM-21.gün	1,84±1,02 ^{abc}	2,66±0,51 ^a	0,16±0,04 ^h	1,66±0,51 ^{cdefg}	1,66±0,51 ^{de}
Ürün-21.gün	2,50±0,83 ^a	2,83±0,40 ^a	0,00±0,00 ^h	2,51±0,83 ^{abc}	1,33±0,52 ^{ef}
NK-28.gün	2,33±0,81 ^a	2,66±0,51 ^a	0,00±0,00 ^h	1,66±0,51 ^{cdefg}	1,51±0,54 ^{ef}
PK-28.gün	2,83±0,40 ^a	2,83±0,41 ^a	0,00±0,00 ^h	2,66±0,52 ^{ab}	0,51±0,54 ^{gh}
EOM-28.gün	2,66±0,51 ^a	2,66±0,50 ^a	0,00±0,00 ^h	1,83±0,40 ^{bcdefg}	1,00±0,89 ^{fg}
Ürün-28.gün	2,83±0,41 ^a	2,83±0,40 ^a	0,00±0,00 ^h	2,50±0,82 ^{abc}	0,33±0,52 ^h
P değeri	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=5).

TARTIŞMA

Günümüzde yara ve yanıkların tedavisinde yan etkilere ve istenmeyen durumlara sebebiyet veren kimyasal içerikli ürünler yerine bitkisel içerikli doğal ürünler tercih edilmektedir (Hajialyani ve ark. 2018). Son yıllarda tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımıyla ilgili bilgi ve deneyimin artması, ileri formülasyon teknolojisinin gelişmesi ile birlikte doğal içerikli medikal ürünler geliştirilmektedir. Geliştirilen bu ürünler ile yara/yanık tedavileri hızlı ve etkili bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Medikal yararlı ürün eldesinde kullanılan tıbbi ve aromatik bitkiler sahip oldukları antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, analjezik ve antitrombosit etkileri ile yara ve yanıkların tedavisinde doku rejenerasyonu etkinliğini arttırmaktadır. Bu çalışma kapsamında, tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan *H. perforatum* L. tıbbi yağının biyolojik aktivitesi ortaya çıkarılarak geliştirilen üründe yara iyileştirme ajanı olarak kullanılmıştır. Ayrıca hızlı bir iyileştirme etkisi bulunan antimikrobiyal-antioksidan özelliğe sahip EOM içeren baz ürün formülasyonunda kullanılmıştır.

EOM içeren baz ve *H. perforatum* L. tıbbi yağ seyreltilmeden uygulandığında antimikrobiyal etkinliğin olduğu fakat seyreltme yapıldıkça bu etkinin azalarak kaybolduğu belirlenmiştir. Tıbbi yağ ve EOM içeren bazın yara/yanık bölgelerinde kolonize olabilen patojen mikroorganizmalar üzerinde etkili olması geliştirilen yanık kreminin yara iyileştirme etkinliğinin artırılması bakımından oldukça önemlidir. Bu bitkinin yara iyileştirme etkisinin antimikrobiyal, antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Saddique ve ark. 2010). Orhan ve Kartal (2015), sarı kantaronda klorojenik asit, rutin, hiperozit, kersitrin, quersetin ve biapigenin, psödohiperisin, hiperisin, hiperforin ve adhiperforin bileşiklerini belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada; Burunkaya ve ark. (2021) yapmış oldukları çalışmada sarı kantaron bitkisinde; klorojenik asit, flavanol, fenolik asit, naphthodianthronlar, flavonoidler tanımlanmışlardır. Çalışmamızda, *H. perforatum* L. tıbbi yağının toplam antioksidan düzeyi $2,797 \pm 0,016$, toplam oksidan düzeyi $6,303 \pm 0,013$ ve oksidatif stres indeksi ise $2,253 \pm 0,025$ olarak belirlenmiştir. Erdal Altıntaş ve Erdoğan (2023) tarafından yapılan bir çalışmada ise *H. perforatum* bitkisinin etanol ve metanol ekstraktlarının toplam antioksidan düzeyleri sırasıyla $22,352 \pm 0,002$; $18,804 \pm 0,15$, toplam oksidan düzeyleri sırasıyla $4,743 \pm 0,001$; $4,523 \pm 0,12$ ve oksidatif stres indeksleri ise 0,21; 0,24 olarak belirlenmiştir.

H. perforatum L. tıbbi yağ ve EOM içeren baz ile ürün formülasyonları hazırlanarak in vitro biyoyoumluluk çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen formüller arasından

% canlılık üzerinde en fazla etkiye sahip olan formül F₂ numaralı olarak belirlenmiştir. Bu formülün yara iyileştirme etkinliğini belirleyebilmek için Wistar albino türü erkek sıçanlar üzerinde ikinci derece yanık modeli oluşturularak in vivo çalışmalar yapılmıştır. İmage j uygulamasında yapılan değerlendirmeler sonucunda, 7. günün sonunda ürün grubunda %29,23 iyileşme belirlenmişken bu oran pozitif kontrol grubunda %18,73 ve negatif kontrol grubunda ise %31,38 olarak saptanmıştır. 14. günün sonunda ürün grubunda %59,92 iyileşme belirlenmişken bu oran pozitif kontrol grubunda %64,91 ve negatif kontrol grubunda ise %29,45 olarak saptanmıştır. 21. günün sonunda ürün grubunda %83,04 iyileşme belirlenmişken bu oran pozitif kontrol grubunda %86,19 ve negatif kontrol grubunda ise %50,99 olarak saptanmıştır. 28. günün sonunda ürün grubunda %92,69 iyileşme belirlenmişken bu oran pozitif kontrol grubunda %18,73 ve negatif kontrol grubunda ise %31,38 olarak saptanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan farklılık olduğu, 21. günde ürünün ve pozitif kontrol arasında farklılık olmadığı belirlenmiştir. % İyileşme oranları karşılaştırıldığında geliştirilen ürünün pozitif kontrole yakın değerler gösterdiği saptanmıştır. İn vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre EOM içeren bazın % hücre canlılığı ve % yara iyileşme üzerinde olumlu yönde etkisinin olduğu ve bu etkinliğin formül içeriğinde kullanılan tıbbi yağ ile daha çok artış gösterdiği belirlenmiştir.

Yara iyileşme süreci; inflamasyon, proliferasyon, rejenerasyon ve hücresel yanıtın yer aldığı karmaşık bir süreçtir. Yara iyileşme sürecinde, keratinositler, fibroblastlar, endotelial hücreler, makrofajlar ve plateletlerin rol oynar. Süntar ve ark. (2010) *H. perforatum*'un antiinflamatuvar etki gösterdiğini, fibroblast göçünü arttırarak kolajen birikimi sağladığını rapor etmişlerdir. *H. perforatum*'un yara iyileştirici aktivitesinin, fibroblastik aktivite ve kolajen sentezindeki artıştan kaynaklandığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur (Öztürk ve ark. 2007). Literatür çalışmaları, *H. perforatum* L. özütlerinin antimikrobiyal etkisinin bulunduğunu, yara ve yanıkların tedavisinde kullanılabilirliğini ortaya çıkarmıştır (Keleş ve ark. 2001, Tolkunova ve ark. 2002). Yapılan bir çalışmada, *H. perforatum* L. özütü içeren merhem yanık iyileşme süresini kısalttığına ve antiseptik etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (Saddique ve ark. 2010). Başka bir çalışmada, *H. perforatum* L'den elde edilen zeytinyağı özütünün in vivo yara iyileşme etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuçlar; *H. perforatum* zeytinyağı özütünün eksizyon (%5,1-82,6 inhibisyon) ve sirküler insizyon (%20,2- 100,0 inhibisyon) üzerinde önemli bir yara-iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Duman ve ark. 2017). Başka bir çalışmada ise Kıyan ve ark. (2015), deneysel

haşlama tipi yanıklarda *H. perforatum* L. (sarı kantaron) tedavisinin akut etkilerini gümüş sülfadiazin tedavisiyle karşılaştırılmıştır. *H. perforatum* grubunun epidermis kalınlığının ve damar sayısının diğer gruplara göre daha fazla olduğu ve yanık yara iyileşmesinde gümüş sülfadiazine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Öztürk ve ark. (2007), *H. perforatum*'un etanol özütünün yara iyileştirici etkisini tavuk embriyonik fibroblast kültüründe dekspatenol ve *Centella asiatica*'nın titre edilmiş ekstraktı ile karşılaştırılmıştır. *H. perforatum*'un yara iyileştirici mekanizmasının kolajen artışı ve fibroblast migrasyon artışı bakımından *C. asiatica*'nın etki mekanizmasına benzer olduğu saptanmıştır. Süntar ve ark. (2010) ise *H. perforatum*'un aktif bileşenlerinin epitelizasyon üzerinde etkisinin olduğunu fakat fibroblast proliferasyonunu veya yeni damar oluşumunu etkilemediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada EOM içeren bazın tek başına ikinci derece derin yanıklar üzerinde negatif kontrole göre daha etkili bulunmuştur. *H. perforatum* L. tıbbi yağı eklenerek elde edilen ürün ise ikinci derece derin yanıklar üzerinde pozitif kontrole yakın derecelerde iyileştirme etkinliği göstermiştir.

SONUÇ

Günümüzde gereksiz ve yanlış ilaç kullanımı, özellikle antibiyotiklere karşı gelişen direnç, yan etki ve deri florasının bozulması yara/yanık tedavilerinde yeni seçeneklerin arayışına neden olmuştur. Bitkisel içerikli ilaçların ucuz ve kolay bulunabilirliği, yan etkilerinin olmaması veya az olması sentetik ilaçlara alternatif olması bakımından önemlidir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler; *H. perforatum* L.'nin tıbbi kullanımı, ilaç geliştirme çalışmalarından kullanılabilme potansiyeli ve ülkemize sağlayabileceği ekonomik katkı bakımından önem arz etmektedir. Ayrıca, çalışma kapsamında ilk kez enerjilendirilmiş oksijen molekülleri kullanılarak bitkisel içerikli ürün geliştirilerek doku rejenerasyonundaki etkinliği in vitro ve in vivo etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; ikinci derece derin yanıklarda geliştirilen ürünün pozitif kontrole yakın derecede etkili olduğu saptanmıştır. Bu etkinin antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan etkisi sayesinde yara iyileşmesini desteklediği yönünde veriler elde edilmiştir. Bu durum, yara/yanık iyileşmesinde kullanılan *Rosmarinus officinalis*, *Plantago major*, *Acahypha langiana*, *Aloe vera* ve *Centella asiatica* gibi tıbbi bitkilerin, reepitelizasyon ve kolajenizasyonu hızlandırıcı maddelerle birlikte kullanımının yanık tedavisine önemli bir katkı sunacağını göstermektedir. Yanık iyileşmesinin evrelerinin belirgin bulgularına göre sağaltımın evrelerinin süreleri takip edilerek, iyileşmede dokunun ihtiyaç duyacağı ajanlarla desteklenmesinin en sağlıklı

doku iyileşmesini sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen verilerin, ürünün ticarileştirilmesi için yapılması planlanan klinik araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Finansal destek: Bu çalışma, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, 19. TEMATİK.002 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Etik izin: Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.08.2019 tarih ve 49533702\99 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Yazarların Katkı Oranı: NO:%30, SFE:%25, ÖEA:%20, HHD: %15, SÇ:%10

KAYNAKLAR

- Solomon, D., Adams, J., & Graves, N. (2013). Economic evaluation of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) for the treatment of mild to moderate depression. *Journal of affective disorders*, 148(2-3), 228-234.
- Burunkaya, B., Selli, S., & Kelebek, H. (2021). Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Fenoliklerinin Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antimikrobiyal Potansiyelinin Belirlenmesi. *Çukurova tarım ve gıda bilimleri dergisi*, 36(2), 309-324.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 2nd ed. Document M27-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 7th ed. Document M7-A7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2016. Performance standards for antimicrobial standards institute susceptibility testing, 26 th Edition. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory.
- Çelen, G., Özkan, S., & Ayhan, F. (2008). The phenolic compounds from *Hypericum perforatum* and their antimicrobial activities. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 36(4), 339-345.
- Demirci, T., Hasköylü, M. E., Eroğlu, M. S., Hemberger, J., & Öner, E. T. (2020). Levan-based hydrogels for controlled release of Amphotericin B for dermal local antifungal therapy of Candidiasis. *European journal of pharmaceutical sciences*, 145, 105255.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2), 271-277.
- Duman, R., Dogan, H.H., & Tuncer, P. (2017). Evaluation of the in vitro antiviral activity of *Salvia halophila* and *Salvia sclarea* extracts against human respiratory syncytial virus (HRSV). *International journal of science and research*, 3 (7), 44-59.

- Erdal Altıntaş, Ö., & Erdoğan, S. F. (2023). Development of controlled delivery systems by nanoliposomes of *Hypericum perforatum* L. extracts. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 3(1), 86–94. <https://doi.org/10.29228/ijpbp.20>
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
- Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 37(2), 112-119.
- Gamez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J. A., Medina-Juarez, L. A., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R., & Angulo-Guerrero, O. (1999). Antioxidant activity in soybean oil of extracts from *Thompson grape bagasse*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1445-1447.
- Hussain A. (2013). Surgical treatment of acute burns. *Wounds*, 9(4), 54-59.
- Hajialyani, M., Tewari, D., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. M., Farzaei, M. H., & Abdollahi, M. (2018). Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes: therapeutic targets and drug delivery systems. *International journal of nanomedicine*, 13, 5023.
- Keleş, O., Ak, S., Bakirel, T., & Alpınar, K. (2001). Screening of some Turkish plants for antibacterial activity. *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 25(4), 559-565.
- Kıyan, S., Uyanıkgil, Y., Altuncı, Y. A., Cavusoglu, T., Cetin Uyanıkgil, E. O., & Karabey, F. (2015). Investigation of acute effects of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort-Kantaron) treatment in experimental thermal burns and comparison with silver sulfadiazine treatment. *Ulus travma acil cerrahi dergisi*, 21 (5), 323-336.
- Markiewicz-Gospodarek, A., Koziół, M., Tobiasz, M., Baj, J., Radzikowska-Büchner, E., & Przekora, A. (2022). Burn Wound Healing: Clinical Complications, Medical Care, Treatment, and Dressing Types: The Current State of Knowledge for Clinical Practice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19, 1338.
- Nobakht, S.Z., Akaberi, M., Mohammadpour, A.H., Moghadam, A.T., & Emami, S.A. (2022). *Hypericum perforatum*: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25(9), 1045-1058.
- Noor, A., Afzal, A., Masood, R., Khaliq, Z., Ahmad, S., Ahmad, F., Qadir, M.B., & Irfan, M. (2022). Dressings for burn wound: a review. *Journal of Material Science*, 57, 6536–6572
- O'Brien, S. P., & Billmire, D. A. (2008). Prevention and management of outpatient pediatric burns. *Journal of craniofacial surgery*, 19(4), 1034-1039.
- Orhan, I. E. (2015). LC-DAD-MS-Assisted quantification of marker compounds in *Hypericum perforatum* L.(St. John's wort) and its antioxidant activity. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 12(3).
- Özkan, E.E., Çelik, B.Ö., & Afife, M. (2019). Antimicrobial activities of five endemic *Hypericum* species from Anatolia compared with *Hypericum perforatum*. *Journal of Research Pharmacology*, 23, 114-119. Öztürk, N., Korkmaz, S., & Öztürk, Y. (2007). Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *Journal of ethnopharmacology*, 111(1), 33-39.
- Parin, F.N., & Deveci, S. (2023). Production and Characterization of Bio-based Sponges Reinforced with *Hypericum perforatum* oil (St. John's Wort Oil) via Pickering Emulsions for Wound Healing Applications. *ChemistrySelect*, 8(5), e202203692.
- Patel, P.P., Vasquez, S.A., Granick, M.S., & Rhee, S. T. (2008). Topical antimicrobials in pediatric burn wound management. *Journal of craniofacial surgery*, 19(4), 913-922.
- Raja, K.S., Garcia, M. S., & Isseroff, R.R. (2007). Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Frontiers in bioscience-landmark*, 12(8), 2849-2868.
- Saddiqe, Z., Naeem, I., & Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of ethnopharmacology*, 131(3), 511-521.
- Suha, S.A., & Sanam, T.F. (2022). A deep convolutional neural network-based approach for detecting burn severity from skin burn images. *Machine Learning with Applications*, 9, 100371. <https://doi.org/10.1016/j.mlwa.2022.100371>.
- Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yilmazer, D., Baykal, T., Kırmızıbekmez, H., Alper, M., & Yeşilada, E. (2010). Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *Journal of ethnopharmacology*, 127(2), 468-477.
- Tecer LH., & Gündüz AM. (2021). Design of a new cold atmospheric plasma reactor based on dielectric barrier discharge for the treatment and recovery of textile dyeing wastewater: Profoks/CAP Reactor. *Sustainable practices in the textile industry*, 285-305. <https://doi.org/10.1002/9781119818915.ch12>
- Tolkunova, N.N., Cheuva, E.N., & Bidyuk, A.Y. (2002). Effect of medicinal plant extracts on microorganism development. *Pishchevaya promyshlennost*, 8, 70-71.
- Townsend, C.M., Beauchamp, R.D., Evers, B.M., & Mattox, K.L. (2016). Sabiston textbook of surgery. Elsevier Health Sciences.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical research*, 37(5), 1528-1542.
- Yalcinkaya, E., Basaran, M.M., Tunckasik, M.E., Yazici, G.N., Elmas, Ç., & Kocaturk, S. (2022). Efficiency of hypericum perforatum, povidone iodine, tincture benzoin and tretinoin on wound healing, *Food and Chemical Toxicology*, 166, 113209, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113209>.