


Momordica Charantia L. Meyveleri Kullanılarak Krem Hazırlanması, Kalite Kontrolü ve In Vitro Yara İyileştirici Etkisinin Araştırılması

İskender İnce^{1,2*}  Nurgül Çığırıl³, Barış Gümüştas¹, Özge Kozguş Güldü²,
Damla Karaman⁴, Emin İlker Medine², Günnur Güler¹, Ercüment Karasulu^{1,5}

¹Ege Üniversitesi, İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi, İzmir

²Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı, İzmir

³Veser Kimyevi Maddeler AŞ, İstanbul

⁴Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir

⁵Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyofarmasötik Farmakokinetik Bilim Dalı, İzmir

Geliş / Received: 23/11/2018, Kabul / Accepted: 05/02/2019

Öz

Bu çalışma, halk arasında geleneksel olarak dahilen ve haricen yara iyileştirici olarak kullanılan kudret narı (*Momordica charantia*)-zeytinyağı karışımından yara iyi edici prototip krem formunun hazırlanması, hazırlanan krem formunun standardizasyonu ve kalite kontrol çalışmaları ile yara iyileştirici etkisinin belirlenmesi için *in vitro* hücre kültürü yöntemi kullanılarak araştırılması amacıyla dizayn edilmiştir.

Çalışma kapsamında öncelikle kudret narı zeytinyağı karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan krem formunun total flavonoid içerikleri spektrofotometrik ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan Kudret narı krem formunun *in vitro* kalite kontrol çalışmalarında total flavonoid miktarı, pH, vizkozite ve stabilite tayinleri ile biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi kapsamında, BJ ve HaCaT hücreleri ile gerçekleştirilen *in vitro* hücre migrasyonu çalışmaları ile yara iyileştirici etkileri belirlenmiştir.

Kudret narı – zeytinyağı maseratı ve farmasötik kalitede yardımcı maddeler kullanılarak hazırlanan laboratuvar ölçekli krem formu total flavonoid içeriği üzerinden standardize edilmiş, yapılan 40 °C % 60 nemde yürütülen çalışmalarda ürünün stabil olduğu ve *in vitro* yara iyileştirme modelinde BJ ve HaCaT hücrelerinde artan dozlarla (1,10,30) birlikte kontrol grubuna karşılık hücre migrasyonunun arttığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kudret narı, yara iyi edici etki, flavonoid, krem

Investigation of Cream Preparation, Quality Control and In Vitro Wounding Effect using *Momordica charantia* L. Fruits

Abstract

This study was designed for preparation of wound-healing cream form from the mixture of olive oil and *Momordica charantia*, used as wound healing agent. We also aimed to employ the standardization and quality control studies of prepared cream form and to investigate its wound healing effect using *in vitro* cell culture method.

Within the scope of this study, first a mixture of olive oil and *Momordica charantia* was prepared. Total flavonoid contents of prepared cream form were determined by using spectrophotometry and high pressure liquid chromatography. Quality control studies of this cream were studied *in vitro* to determine the total amount of flavonoid, pH, viscosity and stability. Biological activities of prepared cream form were studied to determine the cell migration and wound healing effect on BJ and HaCaT cells by *in vitro* cell culture.

The laboratory scale cream form, prepared using the mixture of olive oil and *Momordica charantia* together with pharmaceutical quality excipients, was standardized on the total flavonoid content. The product was found to be stable at 40°C with 60% humidity. In *in vitro* wound healing models of BJ and HaCaT cells with increasing doses of cream form, cell migration was observed to increase, compared to control group.

Keywords: *Momordica charantia*, wound-healing effect, flavonoid, cream

1. Giriş

Hastalıkların tedavisinde bitkilerin kullanımına yönelik uygulamalar binlerce yıl öncesine tıbbın başlangıç dönemlerine dayanmaktadır. Son yıllarda bitkilere ve bitkilerden hazırlanmış ürünlere olan artan talep, gerek farmakolojik ve gerekse analitik yöntemlerdeki gelişmeler sonucunda bitkisel ürünlerin sayısının artmasına ve bunlara yönelik terapötik etkililik ve güvenilirlik verilerinin elde edilmesine yönelik prelinik ve klinik çalışmaların sayısının artmasına yol açmıştır.

Latince adı *Momordica charantia* L. olup Cucurbitaceae familyası üyesi olup halk arasında kudret narı olarak bilinmektedir. Bitki Afrika, Asya, Karayipler, Hindistan, Çin Malezya ve Güney Amerika'da tropikal bölgelerde yetişmektedir (Güvenalp, 2011). Türkiye'nin genellikle Yalova ve Bursa civarında, Ege Bölgesi'nde yetiştirilmektedir. Kudret narı acayip elması, mucize elması, papara gibi isimlerde de bilinmektedir (Baytop, 1984) Yapısında glikozitler, saponinler, alkaloidler ve sabit yağlar, triterpenler, proteinler ve steroidler gibi biyolojik olarak etkin kimyasallara sahiptir. Olgunlaşmamış meyveler vitamin A ve C, β -karoten, demir, fosfor ve potasyum bakımından zengindir (Güvenalp, 2011)

Türk halk hekimliğinde bulunan meyvelerin yağ özü dahilen peptik ülserlerin neden olduğu mide şikayetlerini gidermek için oral yolla, yaraların tedavisinde haricen kullanılır. Son yıllarda *M. charantia* L.'nin farmakolojik etkileri üzerine yapılan çalışmalarda antidiyabetik, antilipidemik, antibakteriyel, antiviral ve antikanser etkilerinin olduğuna yönelik bulgular ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, yara iyileşme etkilerine yönelik çok az sayıda çalışma yapılmıştır. Pişkin ve arkadaşları *M. charantia* L. meyveleri ile hazırlanan zeyin yağı maseratının yara iyileşme etkilerini araştırmışlardır. *M. charantia* L. zeytin yağı maseratının etkileri

Bepanthen (BP) Furacin (FR) ile karşılaştırılarak ve stereolojik yöntemler kullanarak tedavi histopatolojik değerlendirilmiştir. Çalışma yağ ekstraktının yeniden epitelizasyon, vaskülarizasyon, dermal fibroblastların proliferasyonu, inflamasyon açısından BP ve FR ile karşılaştırılabilir olduğunu göstermişlerdir (Pişkin vd. 2014).

Flavonoidler, bitkilerde ve insan sağlığında çeşitli fonksiyonlara sahip büyük bir doğal ürün grubudur. Literatürde flavonoidlerin biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri ile ilgili pek çok bilimsel makale bulunmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidatif, antiinflamatuvar, antimikrobiyal aktiviteleriyle ilgili pek çok literatür bulunmaktadır (Ötleş ve Çağındı, 2009). Flavonoidler yara iyileşme sürecini teşvik etmek için esas olarak büzücü ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı, yara kasılmasından ve epitelizasyon oranının artmasından sorumludur (Ambiga vd. 2007).

Bitkilerin kendisi veya bunlardan üretilen; ekstre, tentür veya distilatları içeren tablet, pomad, damla, şurup, kapsül veya enjektabl preparatların günümüz modern ilaç teknolojisi kurallarına uygun olarak hazırlanmış, bitmiş ve etiketlenmiş tıbbi ürünlere fitofarmasötikler adı verilmektedir.

Çalışmanın amacı; halk arasında yaraların tedavisinde kudret narı zeytinyağ karışımından hareketle krem hazırlanması, standardizasyonun sağlanması ve in vitro kalite kontrol çalışmalarında ile yara iyileştirme etkisi hücre kültürü yöntemi kullanılarak belirlenmesidir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Likit Parafin, İsopropil miristat, Lesitin, Dimetikon Sorbitan kaprilat, Propandiol, Benzoik asit, (BASF), Sodyum hidroksit (Merck), Quercetin (Sigma-Aldrich) Metanol (İsolab), ACE 5 C18 (250 mm x 4.6 mm x 5

µm), Kersetin (referans standart) Sigma-Aldrich tarafından temin edildi. Asetonitril J.T. Baker, metanol Carlo Erba, etanol Merck, alüminyum klorür Merck ve saf su ise Millipore Direct-Q 8 UV sisteminden sağlandı. BJ (CRL2522) insan sünnet deri hücresi (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.), HaCaT (CRL 4048) insan keratinosit hücresi (Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Fakültesi), Eagle's minimum essential (Gibco), Dulbecco's MEM (Gibco), L-Glutamine (Gibco), Essential amino acid (Lonza), sodyum pruvat (Gibco), Fetal bovine serum (Gibco), Penisilin/streptomisin (Gibco), Tripan mavisi (Bio.Ind.), PBS (Gibco), Tripsin EDTA (Gibco) temin edildi.

2.2. Metot

2.2.1. Kudret Narı – Zeytinyağı Maseratının Hazırlanması

Ecz.İnci Afşaroğlu tarafından İzmir Alaçatı'da kültür yoluyla üretimi yapılan kudret narı meyveleri önce yıkanarak üzerindeki yabancı maddeler uzaklaştırıldı.

Kağıt havlu üzerinde kurutuldu. Meyvelerin içinde yer alan tohumlar temizlendikten sonra meyveler küçük parçalara ayrıldı. 2 litrelik bir kavanoza 1400 gram küçük parçalara ayrılmış kudret narı meyvelerin üzerine 500 gram sızma zeytinyağı ilave edilerek güneşte yaklaşık iki ay ara ara karıştırılarak bekletildi. Bekleme sonunda yağlı kısım süzüldü.

2.2.2. Kudret Narı Krem (KNK) Formunun Hazırlanması

KNK formunun hazırlanması için Tablo.1'de yer alan değişik oranlarda farmasötik kalitede yardımcı maddeler ile etkin madde olarak Kudret Narı Zeytin yağı maseratı kullanıldı. Krem hazırlanırken şu yol izlendi: Faz 1 ve 2, 85 °C'ye ısıtıldı, Faz 2' Faz 1'in üzerine eklendi. Oluşan emülsiyon 65 °C'ye soğutuldu homojenizatörde 2 dakika karıştırıldı. 40°C'ye kadar soğutuldu. Karışım düşük hızda karıştırılarak üzerine Faz 3 ve Faz 4 ilave edildi.

Tablo 1: KNK formülü

	Fonksiyon	%
FAZ 1		
Baz- I*	Emülsiyon yapıcı	4,1-14,0
Likit Parafin	Yumuşatıcı, çözücü	1,5-5,0
İsopropil miristat	Cilt bakımı, Çözücü	0,5-3,0
Lesitin	Emülsiyon yapıcı, yumuşatıcı	1,0-3,0
FAZ 2		
Baz – II*	Çözücü, Emülsiyon stablizatörü, Nemlendirici,	61,6,0-81
	Tampon	
Sodyum hidroksit		km
FAZ 3		
Dimetikon	Emolyen, cilt bakımı	0,1-1,0
Sorbitan kaprilat, Propandiol, Benzoik asit	Koruyucu	0,5-3,0
FAZ 4		
<i>Momardica charantia</i> Zeytin Yağı Maseratı	Aktif madde	5,0-25,0

* Patent başvurusu kapsamında

2.2.3.KNK'nin Standardizasyonu

2.2.3.1. KNK Total Flavonoid İçerik Tayini

2.2.3.1.1.Spektrofotometrik Yöntem:

5 mg kersetin standardı hassas terazide tartılarak, 10 mL' lik balon jopenin içerisine alındı. Üzerine bir miktar metanol eklenerek ultrasonik su banyosunda çözündürüldü. Son olarak balon jopenin çizgisine kadar metanol ile tamamlanarak 500 µg/mL' lik "Stok Çözelti" elde edildi. Elde edilen stok çözelti belirli oranlarda metanol ile seyreltilerek, 3 farklı konsantrasyonda) standart çözelti hazırlandı. Daha sonraki aşamada her bir standart ve örnek hazırlama aşaması sonrası numunelerden 0.5 mL alındı (Chang vd.2002) Üzerine 1.5 ml etanol, 0.1 mL % 10 etanolde çözülmüş alüminyum klorür çözeltisi ve 2.8 ml saf su eklendi. 30 dakika oda ısısında ve karanlıkta ara sıra çalkalanarak bekletildi. Son olarak tüm standart ve numunelerin UV-Spektrofotometre cihazında 415 nm' de metanol körüne karşı absorbansları ölçüldü.

2.2.3.1.2.Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Yöntemi

Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Sistemi (HPLC), Shimadzu UV-2600, DGU-20A 5R gaz giderici, LC-20AT pompa, LC-20AC HT otomatik örnekleyici, CTO-10AS VP kolon fırını, CBM-20A sistem kontrolörü, SPD-M20A fotodiyot array dedektör birimlerinden oluşmaktadır.

Kromatografik Koşullar

Ayırma ACE 5 C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm) analitik kolonunda gerçekleşti (Ang vd. 2014) Hareketli faz olarak asetonitril ve % 2 asetik asit içeren su karışımı (pH 2.60) (40:60, v/v) kullanıldı. Mobil fazın akış hızı, izokratik elüsyon modunda 1.25 mL/dak olarak belirlendi. Kolon fırını sıcaklığı 35 °C, dalga boyu 370 nm ve enjeksiyon hacmi 20 µL' ye ayarlandı. Toplam enjeksiyon süresi her örnek için 10 dakika idi. Veri

değerlendirme LC-Solution yazılımı ile yapıldı.

Kalibrasyon ve Çalışma Standartları

5 mg kersetin hassas terazide tartılarak 10 mL' lik balon joje içerisinde HPLC saflıkta metanol ile çözündürüldü. Hazırlanan çözelti stok çözelti olarak kullanıldı ve +4 °C' de muhafaza edildi. Kalibrasyon standartları 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 ve 10.0 µg/mL olacak şekilde hareketli faz içerisinde hazırlandı. Çalışma standartları olarak 0.1, 0.5 ve 1.0 µg/mL konsantrasyonları seçildi ve kör krem ortamında hazırlandı.

Örnek Hazırlama

0.5 gram krem numunesi plastik kaba tartıldı. Üzerine 10 mL metanol, 10 mL hekzan ve eklenerek kapatıldı. 15 dakika çalkalayıcıda, 15 dakika ultrasonik su banyosunda bekletilerek, sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi için ayırma hunisine alındı. Gerekli ayırım sağlandıktan sonra metanol fazı falkon tüpüne alınarak 4000 rpm devirde santrifüjlendi. Son olarak ½ oranında mobil faz ile seyreltildi ve naylon filtreden süzülerek HPLC sistemine enjekte edildi.

Yöntem Validasyonu

Analitik sonuçların güvenilirliğini sağlamak adına yöntem özelinde, seçicilik, belirtme ve tayin alt sınırları, doğrusalılık, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve ekstraksiyon verimliliği parametreleri çalışılarak sonuçlar irdelendi.

Seçicilik

3 adet kör krem numunesi örnek hazırlama prosedürüne göre hazırlanarak analizlendi. Elde edilen kromatogramlar kersetin standardına ait kromatogramlarla karşılaştırıldı ve kersetine ait alıkonma zamanında herhangi bir sinyal vermediği gözlemlendi.

LOD – LOQ (Belirtme ve Tayin Alt Sınırları)

LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü (S/N) oranları esas alınarak hesaplandı.

Doğrusallık

Kalibrasyon eğrisi, 1.0 ile 10.0 µg/mL arasında seçilen 6 farklı konsantrasyondaki standart çözeltinin, pik alan değerlerinin konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturuldu.

Doğruluk

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesinde 3 farklı konsantrasyondaki (0.1, 0.5 ve 1.0 µg/mL) çalışma standardı kullanıldı. 3 konsantrasyon için bulunan ortalama konsantrasyon değerleri, ortalama doğruluk değerleri ve % bağıl standart sapma değerleri (% RSD) Tablo 2' de sunuldu.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik parametresi için 1.0 µg/mL konsantrasyondaki standart çözelti 6 kez sisteme enjekte edildi.

Ekstraksiyon Geri Kazanımı

Ekstraksiyon verimliliğinin hesaplanması için kör krem numunesinin üzerine doğruluk parametresindeki konsantrasyonlarda standart katımı yapıldı. Örnek hazırlama prosedürü uygulanarak hazırlanan numuneler HPLC sistemine enjekte edildi. Bulunan geri kazanım değerleri Tablo 3' de sunuldu.

2.2.3.2.KNK Kalite Kontrol Çalışmaları

Örnekler 25°C % 60 ve 40°C % 75 nemde iklim kabininde bekletildi. Başlangıçta ve 3. ayda vizkozite, pH ve kersetin miktar tayini çalışmaları yapıldı. Viskozite denemeleri için Brookfield DV-II + Pro Viskozimetre cihazı (T-B pedalı, 20 rpm) kullanıldı. pH ölçümleri Mettler Toledo SevenMulti cihazı ile yapıldı. Bu çalışmalara ait sonuçlar ve krem numunesindeki kersetin miktarları Tablo.4' te sunuldu.

2.2.4. KNK'nin İn Vitro Yara İyileştirici Etkisinin Belirlenmesi

2.2.4.1.Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada kullanılan BJ insan sünnet deri hücresi ATCC'den, HaCaT insan keratinosit hücresi Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesinden temin edilmiştir. BJ hücreleri minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 fetal bovine serum (FBS)'den oluşan medyumda; HaCaT hücreleri ise Dulbecco's MEM, 2 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 fetal bovine serum (FBS)'den oluşan medyumda üretildi.

Tüm hücreler flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra %0,25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu aracılığı ile flasktan ayrıldılar ve çalışmada kullanılmayacak olan hücreler %10 DMSO içeren medyumları içine koyularak -80°C de dondurulup, -190°C sıvı azot içinde stoklandı.

2.2.4.2.Hücre migrasyonu çalışmaları

BJ ve HaCaT hücreleri ile gerçekleştirilen hücre migrasyonu çalışmasında CytoSelect™ 24-Well Wound Healing Assay kullanıldı. Kudret narı (*Momordica charantia* L.) zeytinyağı maseratı kreminin hücre migrasyonu etkinliği, zaman ve konsantrasyon parametreleri kullanılarak değerlendirildi. Hazırlanmış olan BJ ve HaCaT hücreleri CytoSelect™ 24-Well Wound Healing Assay'e ilave edildi. Kuyucuk başına 1, 10 ve 30 µg/mL örnek olacak şekilde fosfat tamponu ile çözülen Kudret narı (*Momordica charantia* L.) zeytinyağı maseratı kremi, kuyucuklara uygulandı ve 37°C de inkübe edildi. Kontrol grubu olarak sadece besiyer kullanılmıştır. 0, 3, 6, 24, 48 ve 72. saatlerde hücreler invert mikroskopla görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen görüntülerde Image J programı ile kareleme yapılmıştır. Görüntülerdeki karelenmiş alandaki

kapanma, kontrol grubu ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir (Bilgi vd. 2017).

3. Bulgular

3.1. KNK Formunun hazırlanması

Değişik oranlarda farmasötik kalitede yardımcı maddeler ile etkin madde olarak Kudret Narı Zeytin yağı maseratı kullanılarak homojen kirli beyaz renkte bir krem elde edildi.

3.2. KNK'nin Standardizasyonu

3.2.1. Spektrofotometrik Yöntem:

KNK'de Spektrofotometrik yöntemle yapılan Kersetin eşdeğeri cinsinden total flavonid miktarı tayininde 11.03 mg QE/100 g (Std. Sapma: 0.417, % RSD: 3,783) olarak bulunmuştur.

3.2.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi Yöntemi

3.2.2.1 Yöntem Validasyon Çalışmaları:

Seçicilik

Elde edilen kromatogramlar kersetin standardına ait kromatogramlarla

karşılaştırıldı ve kersetine ait alıkonma zamanında herhangi bir sinyal vermediği gözlemlendi.

LOD – LOQ (Belirtme ve Tayin Alt Sınırları)

LOD değeri 0.0094 µg/mL, LOQ değeri ise 0.031 olarak belirlendi. Bu değerlerin yapılan tüm çalışmaları karşıladığı gözlemlendi.

Doğrusallık

Kalibrasyon eğrisi, 1.0 ile 10.0 µg/mL arasında seçilen 6 farklı konsantrasyondaki standart çözeltinin, pik alan değerlerinin konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulan eğri için regresyon parametrelerinin değerleri $y = ax + b$ denklemi ile hesaplandı, değerler $a = 48547$, $b = 111.6$ ve $r = 0.9999$ bulundu

Doğruluk

Doğruluk değerleri % 91.5 - % 100.2 aralığında tespit edildi.

Tablo 2: Kersetine Ait Doğruluk Parametresi İçin Bulunan Değerler (n=3)

Gerçek Kons. (µg/mL)	Bulunan Ort. Kons. (µg/mL)	Doğruluk (Ortalama, %)	% RSD
0.1	0.1002	100.2	1.136
0.5	0.4885	97.7	0.656
1.0	0.915	91.5	1.197

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik parametresi için 1.0 µg/mL için % RSD 0.450 olarak hesaplandı.

Ekstraksiyon Geri Kazanımı

Geri kazanım değerleri % 76.5 - % 82.8 aralığında tespit edildi. 3 konsantrasyon için bulunan geri kazanım değerleri, Tablo.3' te sunuldu.

Tablo 3: Kersetine Ait Ekstraksiyon Geri Kazanımı Parametresi İçin Bulunan Değerler (n=3)

Gerçek Kons. (µg/mL)	% Geri Kazanım
0.1	82.8
0.5	79.4
1.0	76.5

3.2.3. KNK'nin Kalite Kontrol Çalışmaları

Tablo 4: Kudret Narı Krem Numunesine Ait Sonuçlar

	Kerşetin Miktarı (µg/mL)	Viskozite (cP)	pH
Başlangıç	18.44 ±0.157	7780±226	4.71±0.014
3. Ay	25 ° C	18.40±0.346	4,75±0.014
	40 ° C	18.25±0.280	3,82±0.021

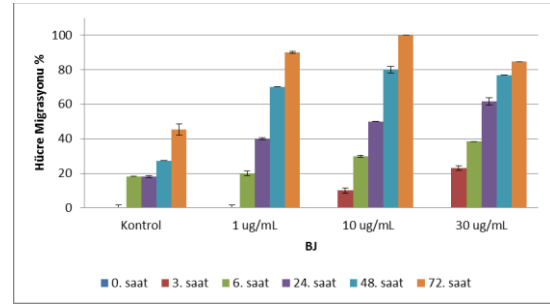
3.4. KNK'nin in Vitro Yara İyileştirici Etkisinin Belirlenmesi

Kudret narı (*M. charantia* L.) zeytinyağı maseratı ile hazırlanan krem (KNK) formunun BJ ve HaCaT hücreleri üzerinde hücre migrasyon hızı incelenmiştir. Hazırlanan kremin BJ ve HaCaT hücreleri üzerinde hücre migrasyonu sonuçları Şekil 1, Şekil 2, Tablo 5 ve Tablo 6'de verilmiştir.

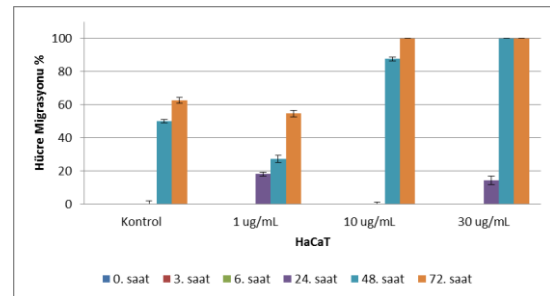
BJ hücrelerinde artan dozlarla birlikte hücre migrasyonunun arttığı gözlenmiştir. Bunun yanında en yüksek hücre migrasyonu 10 µg/mL lik örneğin uygulanmasından 72 saat sonra gözlenmiştir. Örneklerin uygulanmasından 48 saat sonra alınan görüntüler incelendiğinde %70-80 oranında hücre migrasyonunun varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca en düşük konsantrasyon olan 1 µg/mL lik örneğin uygulanmasında bile 72. saatte yaklaşık %90 lık bir hücre migrasyonu oluşmuştur.

HaCaT hücrelerinde ise elde edilen sonuçlar kontrol gurubu ile kıyaslandığında 1 µg/mL lik örneğin uygulanmasında herhangi bir etkili hücre migrasyonu gözlenmemiştir.

Ancak 10 ve 30 µg/mL lik örneklerin uygulanması sonucunda hücre migrasyon oranları 48. saatten itibaren %80 düzeylerine çıkmıştır. 72. saatte alınan görüntüler incelendiğinde hücre migrasyonları 10 ve 30 µg/mL lik örnekler için %100 seviyesindedir.

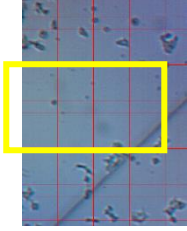
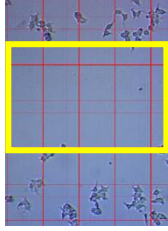
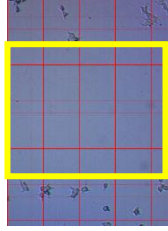
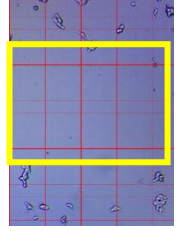
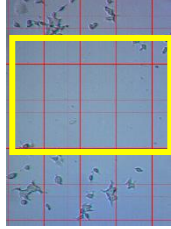
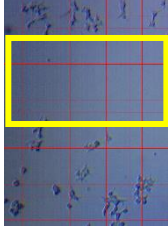
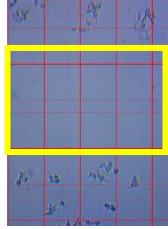
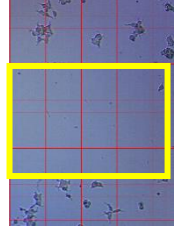
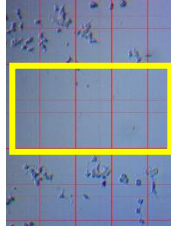
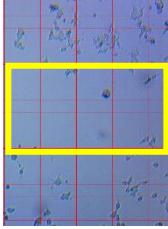
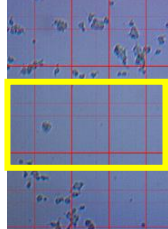
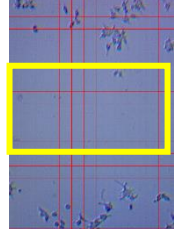
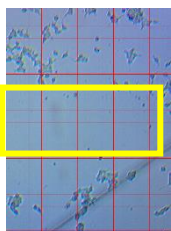
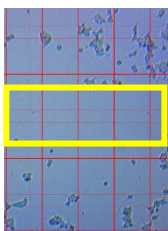
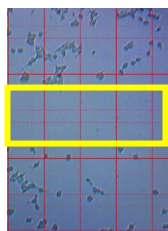
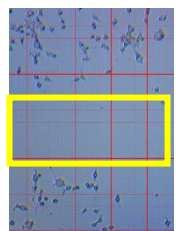

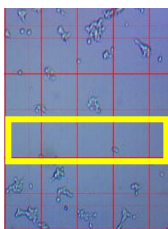

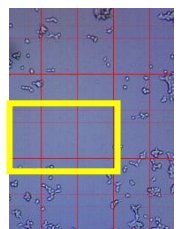
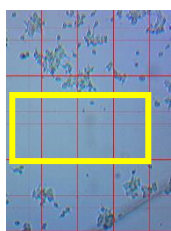
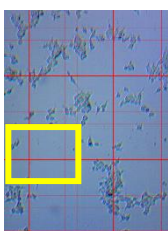
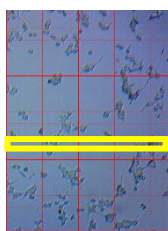
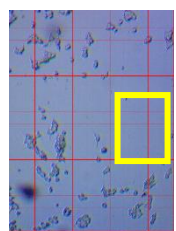


Şekil 1. BJ hücreleri üzerinde KNK'in zamana ve konsantrasyona bağlı migrasyon etkisi.

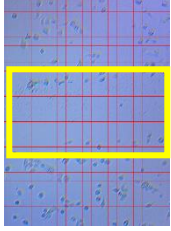
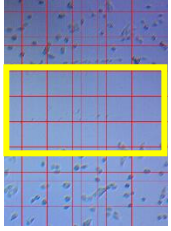
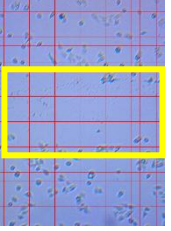
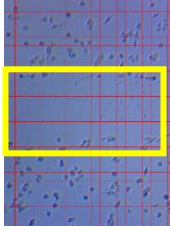
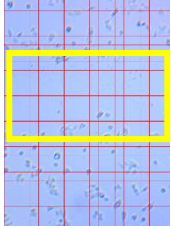
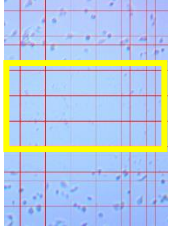

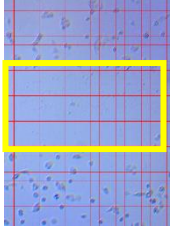
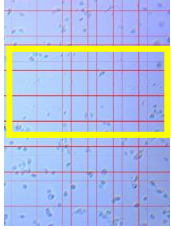
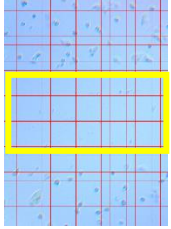
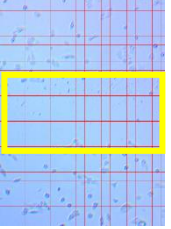
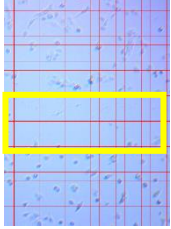
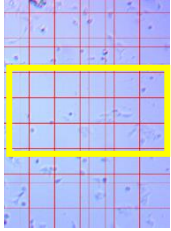
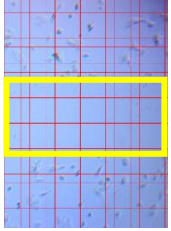
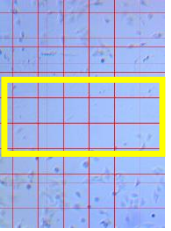
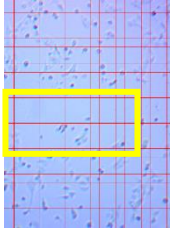
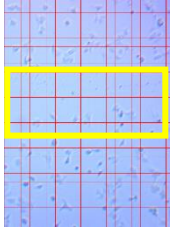
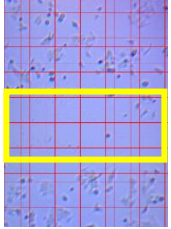
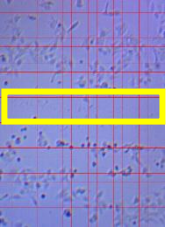
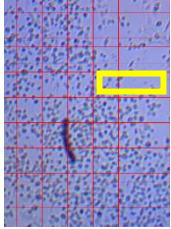
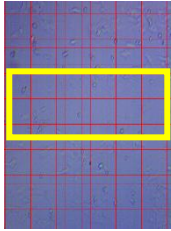
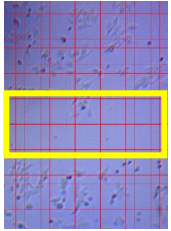

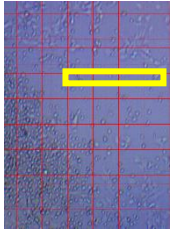


Şekil 2. HaCaT hücreleri üzerinde KNK'in zamana ve konsantrasyona bağlı migrasyon etkisi.

Tablo 5: BJ hücre hatlarında hücre migrasyonunun zamana bağlı görüntüleri

Zaman (saat)	Kontrol	1 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
0				
3				
6				
24				
48				
72				

Tablo 6: HaCaT hücre hatlarında hücre migrasyonunun zamana bağlı görüntüleri

Zaman (saat)	Kontrol	1 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
0				
3				
6				
24				
48				
72				

4. Sonuçlar

Kudret narı – zeytinyağı maseratu ve farmasötik kalitede yardımcı maddeler kullanılarak hazırlanan laboratuvar ölçekli krem formu total flavonoid içeriği üzerinden standardize edilmiş, yapılan 40 °C % 60 nemde yürütülen çalışmalarda ürünün stabil olduğu gösterilmiştir.

Literatürde kudret narı meyvesi, bundan hareketle hazırlanan ekstraktlar ile yapılan pek çok çalışma yer almakla birlikte bu kapsamda bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sarı kantaron *Hypericum perforatum* L. ekstraktı ile yapılan bir diğer çalışmada ise HaCaT hücrelerinde migrasyonunu ATP-Ca²⁺ sinyalini arttırarak hücre migrasyonunu hızlandırdığı tespit edilmiştir.

Flavonoidler HaCaT hücrelerine uygulanan yara modelinde hücre migrasyonunu hızlandırmıştır (Moonja vd. 2014).

Korede yanık tedavisinde geleneksel bir bitkiden elde edilen merhem yara iyileştirme özelliği HaCaT hücrelerinde migrasyon izlenerek incelenmiştir. 24 saatte hücre migrasyonuna etkisi gözlemlenmiştir. (Jun vd.2016).

Literatür incelendiğinde bitki ekstraktları ile yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmada bizim kullandığımız hazırlanan Kudret Narı Kreminin literatürde bulunan çalışmalara kıyasla hücre migrasyonunu daha da arttırdığı tespit edilmiştir (Pişkin vd. 2014).

5. Öneriler

Yapılacak ileri çalışmalarla geliştirilen kremin deney hayvanları üzerinde yürütülecek farmakolojik ve toksikolojik çalışmalarla sonucunda geleneksel bitkisel ürünler yönetmeliği çerçevesinde ruhsatlandırılabilir.

6. Teşekkür

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenen 18-İLAM-001 projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

7. Kaynaklar

Ambiga, S., Narayanan, R., Durga G., Sukumar, D., Madhavan, S., 2007 Evaluation Of Wound Healing Activity Of Flavonoids From *Ipomoea Carnea Jacq.* Ancient Science of Life Vol : XXVI (3)

Ang L.F., Yam, M.F., Fung, Y.T.T., Kiang, P. K., Darwin, Y. 2014 “HPLC Method for Simultaneous Quantitative Detection of Quercetin and Curcuminoids in Traditional Chinese Medicines” *Journal of Pharmacopuncture*, 17[4] pp. 36-49

Baytop, T. 1984 Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), İ.Ü. Basım ve Yayınevi, İstanbul.

Bilgi, A., Müftüler, F.Z., Akman, L. Medine, E.İ., Bilgi, P.T., Güldü, Ö.K., Gokulu, Ş.G., Tekin, V., Terek, M.C. 2017, *In vitro* Determination of Wound Healing Potential of Axonge, Wounds; 29(7):209-214

Chang, C., Yang M., Wen, H., Chern J. 2002 “Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods” *J. Food Drug Anal.*, 10 , pp. 178-182

Grover, J.K.; Yadav, S.P. 2004 Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review, *Journal of Ethnopharmacology*, (93), 123-132

Güvenalp, Z. 2011. Kudret Narı *Momordica charantia*, FDD Monografıları, Editörler: Demirezer Ö.; Ersöz, T.;

Saraçoğlu, İ.; Şener, B., Medikal & Nobel Tıp Kitabevi, 403-415

Jun Y.P., Jin H.K., Ki S.K., Eun B.J., Dong-Soo L., Sanghyun L., Yujung J., Ki H., Gwi Seo H., Hye Lim L., Noriko Y., Su-Nam K., 2016, Wound healing effects of deoxyshikonin isolated from Jawoongo: *In vitro* and *in vivo* studies, *Journal of Ethnopharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.031>].

Moonjae C., Hyuk Y., Mijoo P., Young H. K., Yoongho L., 2014, Flavonoids promoting HaCaT migration: I. Hologram quantitative structure–activity relationships, *Phytomedicine* 21, , 560–569.

Ötleş, S.; Çağındı, Ö.; 2009 Zeytinyağı, Akdeniz Usulü Beslenme. Editörler: Eren Akçiçek, Semih Ötleş, Mustafa Tan, Egetan Basım Yayın, 109-120

Pişkin, A., Altunkaynak, B.Z., Tümentemur, G., Kaplan, S., Yazıcı, Ö.B., & Hökelek, M. 2014 The beneficial effects of *Momordica charantia* (bitter gourd) on wound healing of rabbit skin. *Journal of Dermatological Treatment*,; 25: 350–357