



**KARVAKROL VE ROSMARİNİK ASİT UYGULAMALARININ YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Sevim KÖMÜR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sevim KÖMÜR

05/01/2024

KARVAKROL VE ROSMARİNİK ASİT UYGULAMALARININ YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Sevim KÖMÜR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2024

ÖZET

Yaralar, normal anatomik yapıda birbirini takip eden işlev kayıplarıyla oluşan doku bozulmalarıdır. Diyabetin komplikasyonlarından olan gecikmiş yara iyileşmesi sağlık sisteminde finansal bir yük oluşturmaktadır. Bu durum, kronik yaraları hedefleyen terapötik fenolik bileşiklere yönelimi arttırmıştır. Bu çalışmada, antioksidan aktivitesi bilinen Karvakrol ve Rosmarinik asitin kombine kullanımının diyabetik yaraların iyileşme sürecinde meydana gelen oksidatif olaylar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Streptozotosin indüklü 72 adet Wistar Albino erkek rat; kontrol grubu, tedavisiz grup, karbopol ile tedavi grubu, topikal tedavili ve intraperitoneal tedavili grup olarak 5 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu haricindeki tüm ratlarda punch biyopsi ile 6 adet tam kat eksizyonel yara oluşturulmuştur. Yara açıldıktan sonra ratlar, %2'lik karbopol 974P içeren karbopol jel ile topikal, Rosmarinik asit ve Karvakrol (10 mg/kg) içeren jel ile topikal ve Rosmarinik asit ve Karvakrol (10 mg/kg) ile intraperitoneal olarak tedavi edilmiştir. Ratların yara dokuları 3. ve 7. günlerde alınarak ötenazisi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yara dokularında Nitrik oksit (NOx), Protein Karbonil (Pk), Askorbik asit (AA), Matriks Metalloproteinaz 2/9 (MMP-2/9) ve Kolajen parametrelerine bakılmıştır. Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) seviyeleri serumda değerlendirilmiştir. Rosmarinik asit ve karvakrol ile tedavi edilen grupların NOx, Pk ve TNF- α seviyelerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p<0,05$). MMP-2 seviyelerinde gruplar arası farklılık olmamasına karşın, MMP-9 seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Tedavisiz gruplara kıyasla kolajen seviyelerinde artış, AA seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir. Morfolojik ve histopatolojik değerlendirme sonuçları da oksidatif stres parametre sonuçlarını destekler niteliktedir. Elde edilen veriler sonucunda, Rosmarinik asit ve Karvakrol'un birlikte kullanımı sinerjistik etki göstererek yara ortamındaki farklı reaktif oksijen türlerini süpürüp inflamasyonu baskılamış ve yara iyileşmesini hızlandırmıştır.

Bilim Kodu : 20317

Anahtar Kelimeler : Yara iyileşmesi, diyabet, oksidatif stres, rosmarinik asit, karvakrol

Sayfa Adedi : 91

Danışman : Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

EFFECT OF CARVACROL AND ROSMARINIC ACID APPLICATIONS ON WOUND HEALING

(M. Sc. Thesis)

Sevim KÖMÜR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2024

ABSTRACT

Wounds are tissue disruptions that occur with successive loss of functions in the normal anatomical structure. Delayed wound healing, a complication of diabetes, creates a financial burden on the healthcare system. This situation has been an increased interest in therapeutic phenolic compounds targeting chronic wounds. In this study, the effects of the combination of Carvacrol and Rosmarinic acid, known to have antioxidant activities, on oxidative events occurring during the healing process of diabetic wounds were investigated. 72 male Wistar-albino rats with streptozotocin-induced (STZ) diabetes were divided into five groups: control, untreated group, carbopol treated group, topical treated group and intraperitoneal treated group. In all rats except the control group, 6 full-thickness excisional wounds were created by punch biopsy. After the wound was opened, the rats were treated topically with carbopol gel containing 2% carbopol 974P, topically with gel containing Rosmarinic acid and Carvacrol (10 mg/kg), and intraperitoneally with Rosmarinic acid and Carvacrol (10 mg/kg). The wound tissues of the rats were taken on the 3rd and 7th days and euthanized. Nitric oxide (NOx), Protein Carbonyl (Pk), Ascorbic acid (AA), Matrix Metalloproteinase 2/9 (MMP-2/9) and Collagen parameters were examined in the obtained wound tissues. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels were evaluated in serum. A significant decrease was observed in NOx, Pk and TNF- α levels of groups treated with rosmarinic acid and carvacrol ($p < 0.05$). Although there was no difference between groups in MMP-2 levels, a decrease in MMP-9 levels was observed ($p < 0.05$). An increase in collagen levels and a decrease in AA levels were observed compared to the untreated groups. Morphological and histopathological evaluation results also support the oxidative stress parameter results. The combined use of Rosmarinic acid and Carvacrol showed a synergistic effect that scavenged different reactive oxygen species in the wound environment, suppressing inflammation and accelerating wound healing.

Science Code : 20317

Key Words : Wound healing, diabetes, oxidative stress, rosmarinic acid, carvacrol

Page Number : 91

Supervisor : Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren değerli danışmanım Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER'e ve tecrübeleriyle tezime katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Fatma Nur TUĞCU DEMİRÖZ'e (Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji A.B.D) teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarıma, GÜDAM çalışmalarım boyunca güler yüzlerini esirgemeyen hocalarıma ve GÜDAM personeline en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve hayatımın her anında her zaman desteklerini hissettiğim, benim için zorlu geçen bu uzun sürecin her adımında beni yüreklendiren çok değerli dostlarım Merve SARAÇ'a ve Melis FIRAT'a en içten duygularıyla teşekkür ederim, iyi ki varsınız.

Eğitim sürecimde içinde olmak üzere hayatımın her anına eşlik eden, yorulup pes edecek olduğumda beni cesaretlendiren ve moral veren, vizyonu ile hayata her zaman daha farklı bakmamı sağlayan çok kıymetli ablam Av. Emine TUNÇER'e ve maddi manevi destekleriyle beni bugünlere getiren babam Yücel KÖMÜR, annem Canan KÖMÜR'e ve tüm aileme emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez sürecimin çok hassas bir döneminde yönlendirmeleriyle bana ışık tutan, proje sürecimi düzenli ilerletebilmem de katkısı büyük olan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimin'den Bilgisayar İşletmeni Sayın Taner ÇANKAYA'ya teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışmasını (Proje no: FYL-2022-7703) desteklediği için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Yara ve Yara İyileşmesi.....	5
2.1.1. Yara iyileşmesinin fazları.....	5
2.1.2. Yara iyileşmesinin tipleri.....	10
2.1.3. Yaraların sınıflandırılması.....	12
2.1.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler.....	14
2.2. Yara İyileşmesinin Ekonomi Üzerine Etkileri.....	16
2.3. Diyabet.....	17
2.3.1. Diyabet tanımı ve türleri.....	17
2.3.2. Diyabet ve komplikasyonları.....	20
2.3.3. Diyabet ve yara iyileşmesi.....	20
2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemleri.....	21
2.4.1. Reaktif oksijen türleri.....	21
2.4.2. Antioksidan savunma sistemleri.....	23

Sayfa

2.4.3. Reaktif oksijen türleri ve yara iyileşmesi.....	24
2.5. Matriks Metalloproteinazlar.....	25
2.5.1. Matriks metalloproteinazlar ve yara iyileşmesi.....	26
2.6. Kolajen.....	27
2.6.1. Yara iyileşmesinde kolajen.....	28
2.7. Yara İyileşmesinde Fenolik Bileşikler.....	28
2.7.1. Rosmarinik Asit.....	29
2.7.2. Karvakrol.....	30
3. MATERYAL VE METOT.....	31
3.1. Deney Protokolü.....	31
3.2. Rosmarinik Asit ve Karvakrol Jel Formülasyonlarının Hazırlanması.....	31
3.3. Diyabet Modelinin Oluşturulması.....	32
3.4. Yara Modelinin Oluşturulması.....	33
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	33
3.6. Tedavi ve Yara Dokularının Alınması.....	35
3.7. Yöntemler.....	36
3.7.1. Dokuda NOx tayini.....	36
3.7.2. Dokuda protein karbonil düzeylerinin ölçümü.....	36
3.7.3. Dokuda askorbik asit tayini.....	36
3.7.4. Dokuda MMP-2 tayini.....	37
3.7.5. Dokuda MMP-9 tayini.....	37
3.7.6. Dokuda Kolajen tayini.....	37
3.7.7. Serumda TNF- α tayini.....	37
3.7.8. Morfolojik inceleme.....	38

Sayfa

3.7.9. Histolojik inceleme.....	38
3.8. İstatistiksel Analizlerin Değerlendirilmesi.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Yara Dokusu NOx Düzeyleri.....	39
4.2. Yara Dokusu Pk Düzeyleri.....	41
4.3. Yara Dokusu MMP-2 Düzeyleri.....	43
4.4. Yara Dokusu MMP-9 Düzeyleri.....	44
4.5. Yara Dokusu Kolajen Düzeyleri.....	45
4.6. Yara Dokusu AA Düzeyleri.....	47
4.7. Serum TNF-a Düzeyleri.....	49
4.8. Morfolojik İnceleme Sonuçları.....	51
4.9. Histolojik İnceleme Sonuçları.....	53
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	91

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Rosmarinik Asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu NOx düzeylerine etkisi.....	39
Çizelge 4.2. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu Pk düzeylerine etkisi.....	41
Çizelge 4.3. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu MMP-2 ve MMP-9 düzeylerine etkisi.....	43
Çizelge 4.4. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu kolajen düzeylerine etkisi.....	46
Çizelge 4.5. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu AA düzeylerine etkisi.....	48
Çizelge 4.6. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının serum TNF-a düzeylerine etkisi.....	50
Çizelge 4.7. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara iyileşmesi üzerine morfolojik etkileri.....	52
Çizelge 4.8. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara iyileşmesi üzerine histopatolojik etkileri.....	54
Çizelge 4.9. Histoloji Puanlama Sistemi: Parametrelerin Açıklaması.....	55

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin fazları; A. Hemostaz fazı, B. İnflamatuvar faz, C. Proliferasyon fazı, D. Yeniden şekillenme fazı [Modifiye edilmiştir].....	6
Şekil 2.2. Yara iyileşmesinin fazlarında gerçekleşen olaylar.....	6
Şekil 2.3. Yara iyileşme tipleri.....	12
Şekil 2.4. Akut ve kronik yara iyileşmesinde yer alan mediatörler.....	13
Şekil 2.5. Normal yara iyileşmesi ve diyabetik yara iyileşmesi.....	16
Şekil 2.6. Tip 2 diyabetin patofizyolojisi.....	19
Şekil 2.7. Antioksidanların sınıflandırılması.....	23
Şekil 2.8. ROS ve yara iyileşmesindeki rolleri.....	25
Şekil 2.9. Matriks metalloproteinazların sınıflandırılması.....	26
Şekil 2.10. Kronik yaralarda MMP'lerin mekanizması.....	27
Şekil 2.11. Rosmarinik asit kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2.12. Karvakrol kimyasal yapısı.....	30
Şekil 4.1. Yara dokusu NOx düzeyleri.....	40
Şekil 4.2. Yara dokusu Pk düzeyleri.....	42
Şekil 4.3. Yara dokusu MMP-2 düzeyleri.....	44
Şekil 4.4. Yara dokusu MMP-9 düzeyleri.....	45
Şekil 4.5. Yara dokusu kolajen düzeyleri.....	47
Şekil 4.6. Yara dokusu AA düzeyleri.....	49
Şekil 4.7. Serum TNF- α düzeyleri.....	51

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Diyabet modelinin oluşturulması.....	32
Resim 3.2. Yara modelinin oluşturulması.....	33
Resim 3.3 Streptozotosin uygulaması ile diyabet modelinin oluşturulması, Yara modelinin oluşturulması, Tedavi uygulaması.....	35
Resim 4.1. Hematoksilen-eozin boyama görüntüleri.....	56
Resim 4.2. Masson trikom boyama görüntüleri (C; Kolajen, E; Epitelizasyon G; Granülasyon dokusu, M; kas).....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
β	Beta
dk	Dakika
dL	Desilitre
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
O ₂ •-	Süperoksit radikali
OH•	Hidroksil radikali
PBS	Fosfat tamponlu salin
RCF	Göreceli santrifüj kuvveti
RPM	Dakikadaki devir sayısı
°C	Santigrat derece
μ L	Mikrolitre
μ mol	Mikromol
>	Büyüktür
<	Küçüktür
%	Yüzde

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AA	Askorbik asit
AGE	İleri glikasyon son ürünleri
CAR	Karvakrol
COL-1	Kolajen-1
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazin
ECM	Hücre dışı matris
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
GD	Gestasyonel diyabet
IDF	Enternasyonal Diyabet Federasyonu
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
i.p.	Intraperitoneal
MMP	Matriks metallopeptidaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO_x	Nitrik oksit
PCA	Perklorik asit
Pk	Protein karbonil
RA	Rosmarinik asit
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
STZ	Streptozotosin
T1D	Tip 1 diyabet
T2D	Tip 2 diyabet
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TIMP	Metalloproteinaz doku inhibitörü

1. GİRİŞ

Yara, dokunun çeşitli etkenler sonucunda normal anatomik yapı ve fonksiyonlarının bozulması ya da kaybı olarak tanımlanmaktadır. Birbirini takip eden işlev kayıplarının ardından, yaralanma bölgesindeki hasarlanan dokunun yeniden onarılmasına yara iyileşmesi denir. Yara iyileşmesi kompleks bir süreçtir ve birbirini takip eden hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon süreçlerini içeren dört temel fazdan oluşmaktadır [1].

Yaralanmadan hemen sonra başlayan hemostaz, iyileşme sürecinin temel adımıdır. Vücudun yaralanmadan sonraki ilk eylemi kanamayı kontrol altına almaktır. Hemostatik sürecin başlangıcı olan bu durum trombosit hücreler tarafından fibrin pıhtının oluşumu ile başlar. Kan pıhtısı istilacı hücreler için de geçici bir matris görevi görür. Doku boşluğunu doldurmak için büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı gerçekleşir ve enflamatuvar yanıt başlamış olur [2]. Yara iyileşme kaskadının enflamatuvar fazı, hemostaz ve pıhtılaşma fazı sırasında aktive olur. Kemotaktik faktörlerin etkisiyle nötrofil, monosit ve makrofajlar aktive olur. Yara bölgesine gelen nötrofiller ölü dokuları, yabancı cisimleri ve bakterileri fagosit ettikten sonra yaralanmanın 3.gününde yara bölgesine makrofajlar gelir. Çok sayıda büyüme faktörü kemokin ve sitokinlerin salınımını indükler. Monositler, lenfositler ve plazma hücreleri dahil olmak üzere diğer beyaz hücreler yaralanma bölgesine göç etse de, nötrofiller ilk birkaç gün baskındır ve yara enfekte olmazsa kaybolurlar [3].

Yara iyileşmesinin proliferatif fazının genellikle yaralanmayı takip eden 4 ila 14. günlerde meydana geldiği kabul edilir [2]. Proliferatif fazın ana mekanizmaları, yara yüzeyini yeni deri ile kaplamayı (yeniden epitelizasyon), bölgeye damar bütünlüğünü geri kazandırmayı (neovaskülarizasyon) ve doku defektinin yapı bütünlüğünü yeni bağ dokusu ile doldurarak onarmayı (granülasyon dokusu) hedefler. Makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücrelerinden oluşan granülasyon dokusu, proliferatif fazın ayırt edici özelliğidir. Bu doku enflamatuvar faz sırasında oluşan fibrin hemostatik tıkaçın yerini alır. Granülasyon dokusunda bulunan baskın hücre tipi fibroblasttır [2, 3]. Bu nedenle fibroblast, üzerinde ilgili hücre göçü ve organizasyonunun yer aldığı geçici yara matrisinin öncüsüdür. Bu fazın sonunda, olgunlaşan fibroblastlar kolajen sentezlemeye başlar ve miyofibroblast farklılaşmasıyla azalır ve ardışık apoptoz ile sonlanır [4-6].

Yara iyileşmesinin son aşaması olan yeniden şekillenme, yaralanmadan sonraki 21. günden 1 yıla kadar gerçekleşir. Yara, granülasyon dokusu ile doldurulduktan ve keratinosit migrasyonu yarayı yeniden epitelize ettikten sonra, yaranın yeniden şekillenmesi süreci başlar [3, 7]. Yaranın olgunlaşması sırasında hücre dışı matrisin (ECM) bileşenleri belirli değişikliklere uğrar. Proliferatif fazda üretilen kolajen III daha güçlü olan kolajen I ile değiştirilir. Bu yavaş yeniden şekillenme aşamasına büyük ölçüde makrofajlar, fibroblastlar ve endotelial hücreler tarafından salgılanan, matris metaloproteinazlar olarak bilinen bir enzim sınıfı aracılık eder [8]. Kolajen sentezi, yaralanmadan yaklaşık 5 gün sonra zirve yapar ve haftalarca, aylarca devam eder. Bu süre zarfında, kolajen ve ECM dokusu yarada birikmeye devam ederken, gelişen bağ dokusu hücre olgunlaşması ve apoptoz ile yeniden şekillendirilir. Yara kuvveti artsa da hiçbir zaman yaralanma öncesi kuvvetinin %80'inden fazlasını elde edemez [3, 9].

Yara iyileşmesini etkileyen çok sayıda sistemik ve lokal faktörler mevcuttur. Lokal faktörler; yabancı bir cisim varlığı, hipoksi, venöz yetersizlik, travmalar şeklinde sıralanabilir. Sistemik faktörleri ise alkol ve sigara kullanımı, iskemi, hastanın yaş, cinsiyet ve hormonları, yeme bozuklukları ve obezite, immün sistem hastalıkları, diyabet, kortikosteroid kullanımı ve stres gibi sıralamak mümkündür [2, 10].

Yara iyileşmesini etkileyen sistemik faktörlerin başında gelen ve dünya çapında sağlık hizmetlerinde büyük bir yer kaplayan diyabet, iyileşmeyen ya da geç iyileşen kronik yaraların oluşumunda çok etkili bir metabolik hastalıktır [11, 12].

Diyabet, uzun vadeli sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Uzun süreli hiperglisemi ve insülin sekresyonun yetersizliği ile karakterizedir [13, 14]. Güncel verilere göre 2017 yılında Dünya nüfusunun %6,28'i yaklaşık 462 milyon kişi tip 2 diyabetten (T2D'den) etkilenmiştir [11]. Enternasyonal Diyabet Federasyonu'nun (IDF) verilerine göre; acil tedbir alınmazsa 2030 yılında 578 milyon diyabet hastası olacağı, 2045 yılında ise bu sayının %51 artması beklenmektedir [15].

Diyabetik hastalardaki kronik hiperglisemi, çeşitli organ sistemlerinde hasarlara neden olmaktadır ve hem mikrovasküler hem de makrovasküler olmak üzere farklı komplikasyonlara yol açmaktadır. Nefropati, nöropati ve retinopati gibi kronik

mikrovasküler komplikasyonlara, periferik arter hastalığı, koroner arter hastalığı ve serebrovasküler hastalıklar gibi makrovasküler komplikasyonlara yol açmaktadır [16, 17].

Diyabet kaynaklı gelişen kronik yaraların iyileşme süreci, akut yaraların iyileşme sürecinden daha farklı gelişmektedir. Kronik yaralarda yara iyileşmesi peş peşe örtüşen 4 fazda tamamlanamaz ve genelde inflamatuvar fazda takılır [18]. Makrofajlar yara iyileşmesinde kilit rol alır ve inflamatuvar fazdan proliferasyon fazına geçişte aktif rol almaktadır. Kronik yara iyileşmesi esnasında inflamatuvar fazda takılmanın önemli nedenleri arasında ise monosit ve makrofajların bozulmuş geçişi ve düzensizliği ve nötrofillerin ortamdaki uzun süreli varlığı yer almaktadır [19, 20].

Sürekli yüksek glikoz proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırır. Kronik bir yara ortamı, matriks metallopeptenazlar (MMP) gibi yüksek proteaz seviyeleri, metallopeptenazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) gibi proteaz inhibitörlerinin düşük seviyeleri ve aşırı miktarda proinflamatuvar sitokinler, proteolitik enzimler ve reaktif oksijen türevleri (ROS) varlığından oluşmaktadır. Yaranın proinflamatuvar sitokinlere uzun süreli maruz kalması MMP üretimini sağlar ve ECM'in yeniden şekillenmesini sağlayan ROS'nin üretimini artırır [18, 21]. Diyabetle birlikte artan ROS miktarı da oksidatif stres belirtecidir. Oksidatif stres, diyabetik yara iyileşmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Dokular üzerinde aşırı ve kontrol edilemez oksidatif stres ve antioksidan aktivitenin azalması iyileşmeyen kronik yaraların patogeneğinde önemli rol almaktadır [22, 23].

Kronik yaralarda iyileşmenin olmaması ve tedavi sürelerinin uzaması ile tedavi maliyetleri de günden güne artmaktadır. Artan finansal yükünde etkisi ile doğal yöntemlere yönelim artmıştır.

Özellikle bitki özlerinden elde edilen antimikrobiyal, antioksidan ve şifalı biyoaktif bileşikler enfeksiyonlarla savaşır ve yara iyileşmesini hızlandırır [24, 25]. Bu nedenle, doğal ürünler ve bunların saf bileşikleri, aralarında yara iyileşmesi de bulunan çeşitli hastalıkların tedavisi için alternatif tıbbi bileşiklerin gelişmekte olan bir kaynağıdır [25]. Bu doğal bileşikler hakkında literatürde çok sayıda rapor bulunmaktadır. Bu nedenle doğal fenolik bileşiklerin, şifalı bitkilerin, onların özüt ve yağlarının modern ilaçlarla kombinasyon halinde kullanımı umut vaat edici bir alanı temsil etmektedir [26, 27].

Bitkilerde bulunan bu aktif bileşiklerin sinerjistik etki gösterip göstermediği hala tartışılmaktadır ve farklı bitki karışımlarının meydana getirebileceği etkinlikler araştırılmaya devam edilmektedir [28]. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), çeşitli gıdalarda baharat olarak kullanılan ve iyileştirici özellikleri nedeniyle geleneksel tıpta kullanılan en yaygın ev bitkilerinden biridir. Biberiye, fenolik diterpenler, flavonoidler ve fenolik asitler gibi zengin bir aktif antioksidan bileşen kaynağıdır. Kafeik asit ve rosmarinik asit, en önemli biyoaktif bileşenlerdir [29].

Rosmarinik asit (RA; C₁₈H₁₆O₈), *Heliotropium foertherianum*, *Rosmarinus officinalis*, *Perilla frutescens* ve *Salvia officinalis* gibi bitkilerde çok yaygın olarak bulunan oldukça değerli bir doğal fenolik bileşiktir. Kimyasal olarak RA, 3,4- dihidroksifenilaktik asit ve kafeik asidin esterleştirilmesini içeren yöntemlerle üretilebilir [30]. Günümüzde rosmarinik asitin anti-enflamatuar, nöroprotektif, antianjiyojenik, anti-mikrobiyal, immünomodülatör, anti-diyabetik, antialerjik, analjezik çok faydalı aktiviteleri tanımlanmıştır [31-36].

Karvakrol (CV; C₁₀H₁₄O, 5 - izopropil - 2 - metilfenol) kekik, karabiber, yabani bergamot ve diğer bitkilerin uçucu yağlarında bulunan sıvı bir fenolik monoterpenoiddir [37]. Karvakrol, günümüzde devam eden çalışmaların ışığında antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antikarsinojenik, hepatoprotektif, anti-hiperglisemik aktivitesi gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip pek çok aktivite göstermektedir [38-43].

Doğal antioksidan aktiviteye sahip bu iki bileşiğin birçok faydalı aktivitesi gözlemlenmiştir. Fakat yara dokusundaki oksidatif olaylar ve yara iyileşmesi aktivitesi üzerine yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada Karvakrol ve Rosmarinik asitin kombine kullanımının, diyabetin en büyük komplikasyonlarından olan diyabetik yaraların iyileşmesi sürecinde meydana gelen, özellikle inflamasyon aşamasındaki tüm oksidatif olaylar üzerinde bu bileşiklerin etkileri ve sinerjistik etki gösterip göstermedikleri biyokimyasal parametreler ile araştırılmıştır. Karvakrol ve Rosmarinik asitin eş zamanlı olarak iki farklı kullanımının, diyabetik ratlarda özellikle inflamasyon üzerine etkisi, yara iyileşmesinin inflamasyon ve proliferasyon fazındaki tüm değişimleri açısından bu tezde ele alınmıştır. Ayrıca yara dokusunda morfolojik ve histopatolojik değişimler de incelenmiştir.

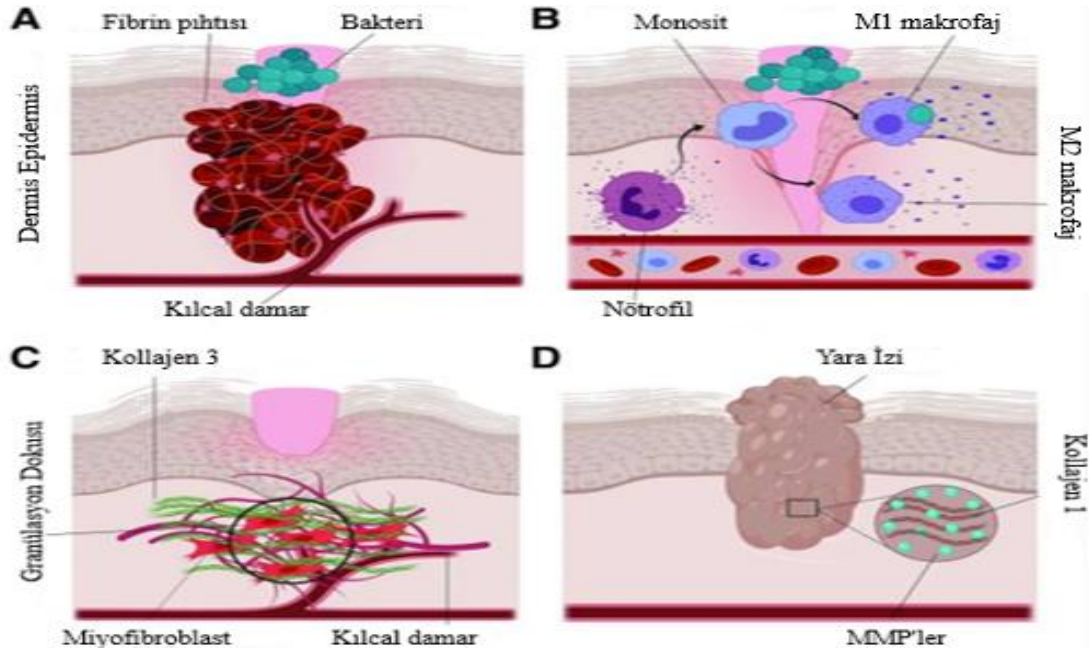
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara ve Yara İyileşmesi

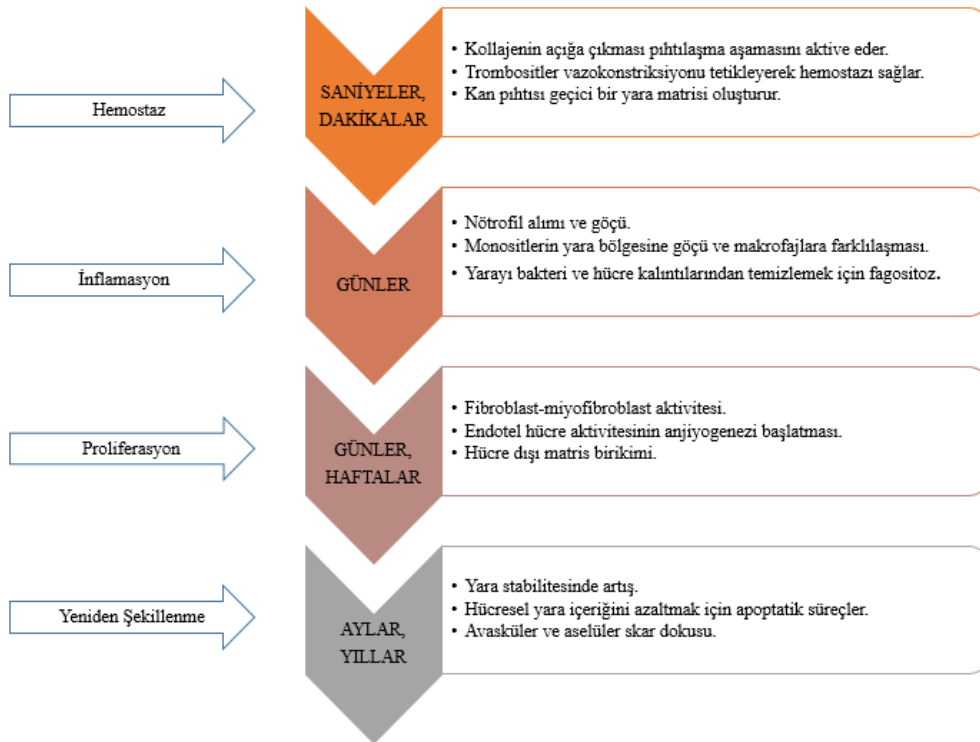
Yara, anatomik bütünlüğün bozulduğu ve fonksiyonel kaybın olduğu her türlü doku yaralanması olarak tanımlanmaktadır [44]. Zamanla epitel bütünlüğünde bozulması ile birlikte diğer yapılara zarar vererek deri altı dokulara yayılabilir. Yaralar herhangi bir patolojik durumdan kaynaklanabileceği gibi, kazara ya da kasıtlı bir etiyolojiye sahip olabilir veya bir hastalık sürecinin sonucu olabilirler. Yaralanma şekli ve nedeni her ne olursa olsun dokuya zarar verir [45-47]. Yara iyileşmesi, yaralanmaya karşı gelişmiş doğal fizyolojik bir tepkidir, epidermal tabakanın yaralanmasından hemen sonra başlar ve yıllarca sürebilir. Yara iyileşmesi sırasında derinin tamamen kapanıp epitel bütünlüğü sağlaması için çeşitli hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin mükemmel etkileşimi gereklidir. Bu dinamik süreç oldukça organize hücresel ve moleküler mekanizmaları içermektedir. Bu süreçteki herhangi bir bozulma anormal yara iyileşme sürecine sebebiyet vermektedir. Kronik yaralar sosyal boyutların yanında, iş gücünde kayıp, bakım ve tedaviye yönelik pahalı tıbbi müdahaleler ile sağlık sistemi üzerinde finansal bir yük oluşturmaktadır [44].

2.1.1. Yara iyileşmesinin fazları

Yara iyileşmesi ardışık ve birbiri ile örtüşen hemostaz, inflammatuar, proliferasyon ve yeniden şekillenme olmak üzere 4 temel fazdan oluşmaktadır [48].



Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin fazları; A. Hemostaz fazı, B. İnflamatuvar faz, C. Proliferasyon fazı, D. Yeniden şekillenme fazı [49] [Modifiye edilmiştir]



Şekil 2.2. Yara iyileşmesinin fazlarında gerçekleşen olaylar [48]

Hemostaz faz

Bu faz travmanın hemen ardından oluşan pıhtılaşma aşaması ile başlar ve yaralanmadan hemen sonra ortaya çıkıp birkaç saat içerisinde tamamlanan geçici yara matris oluşumu ile karakterizedir. Bu süreçteki ana oyuncular, trombosit ve fibrinogen [50].

Trombosit agregasyonu ve tıkaç oluşumu yoluyla trombositten zengin bir trombus oluşumu ile kan kaybı önlenir ve doku boşluğunu sitokinler ve büyüme faktörlerinden oluşan bir kan pıhtısı ile doldurmak için trombositler tarafından tetiklenen 5 ila 10 dakikalık bir vazokonstriksiyon gerçekleşir. Vazokonstriksiyon doku hipoksisinden birkaç dakika önce etkilidir ve vazokonstriksiyonu takiben vazodilatasyon gerçekleşir ve bu da pasif gevşemeye yol açar. Damar geçirgenliğinin artması nedeniyle doku ödemi gerçekleşir [48].

Trombositler kemotaktik faktörlerin salınımı ile lökositlerin infiltrasyonunu etkiler. Hem trombositler hem de lökositler, inflamatuvar süreci başlatmak için epidermal büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü alfa ve beta (TGF- α ve TGF- β), insülin büyüme faktörü, interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin 1 alfa (IL-1 α) gibi sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgırlar. Kolajen sentezi uyarılır, fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümü aktive olur ve anjiyogenez başlar. Bu faktörler, yara iyileşmesinin sonraki aşamalarında ve özellikle bağışıklık hücrelerinin kemotaktik olarak toplanmasında diğer süreçlere aracılık etmede önemli bir rol oynar. Trombosit aktivasyonundan sonraki ilk saat içinde trombosit faktörlerinin salınımı üst düzeydedir. Fakat aktifleşen trombositler 7 güne kadar bu faktörleri salmaya devam ederler [51].

İnflamatuvar faz

İstilacı mikroorganizmalara karşı bağışıklık bariyeri oluşturmak için hemostazı takiben inflamatuvar faz başlamaktadır. Bu faz erken inflamatuvar yanıt ve geç inflamatuvar yanıt olmak üzere iki evreden oluşmaktadır [52].

İnflamatuvar fazın başlaması için başka bir "başlangıç sinyali" daha vardır. Yara, kalsiyum dalgalarını, ROS gradyanlarını ve purinerjik molekülleri içeren transkripsiyondan bağımsız yolları aktive eder. Travmadan sonraki ilk dakikalarda, yara kenarlarındaki kalsiyum konsantrasyonu maksimum düzeyde artar ve yara merkezine doğru merkezcil olarak yayılır.

Daha sonra yaralı hücreler, nötrofil toplanması için gerekli olan hidrojen peroksitleri (H_2O_2), lipid araçlarını ve kemokinleri eklenir. H_2O_2 'in hızlı salınımı daha fazla nötrofil alımı ile yara enfeksiyonunu en aza indirir, keratinosit rejenerasyonunu aktive eder ve yeni damar oluşumunu destekler [53, 54].

İnflamatuar reaksiyonun erken fazı ilk olarak nötrofil aktivitesiyle başlamaktadır. Nötrofiller bir dizi sinyal sonunda yara bölgesine ulaşınca mikrop istilasını önlemek için geçici bir bariyer oluşturur. Nötrofiller bakterileri, yabancı cisimleri ve nekrotik dokuyu fagosit ederek başlarlar. Bu aktiviteleri nedeniyle özellikle ilk günler yara bölgesinde bulunmaları önemlidir ve yara bölgesinde 2 ila 5 gün arasında bulunurlar. Nötrofiller, yeterli bir onarım yanıtı için $TNF-\alpha$, interlökin 1β (IL- 1β) ve interlökin 6 (IL-6) gibi araçları salgırlar. Ayrıca, oldukça aktif antimikrobiyal maddeler (katyonik peptidler ve eikosanoidler) ve proteinazları (elastaz, katepsin G, proteinaz 3 ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü) serbest bırakarak debridmana başlarlar. Bütün bakteriler, yabancı cisimler ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra nötrofil aktivitesi kademeli şekilde değişir. Yara iyileşmesinin bir sonraki adımını aktive etmek için nötrofiller apoptoz süreciyle ortadan kaldırılmaktadır [55, 56].

Yaralanmadan yaklaşık 3 gün sonra yaralanma bölgesine makrofajlar girer ve devam eden fagositoz sürecini destekleyerek patojenlerin ve hücre kalıntılarının fagositozunu gerçekleştirirler, böylece geç inflammatuar fazı başlatırlar. Sayıları yaralanmadan sonraki üçüncü gün civarında zirveye ulaşır ve onuncu günde başlangıç seviyelerine düşer. Son hücre tipi olarak, özellikle IL-1 tarafından çekilen T lenfositleri yaralanmadan yaklaşık 72 saat sonra yaranın içine göç ederler ve epitelizasyon sürecinin başlatılmasında önemli rol oynarlar [48, 57].

Proliferasyon fazı

Proliferasyon fazı, yaralanmadan yaklaşık 3.günde başlar ve 2 hafta kadar devam eder. Bu fazın ana olayları yara yüzeyinin kaplanması, granülasyon dokusunun oluşması (Fibroplazi ve anjiyogenez) ve damar ağının onarılmasıdır. İyileşmenin bu aşamasında hücrel aktivite baskındır [58].

Hemostazda oluşan geçici fibrin/fibronektin matrisinin yerini yeni oluşan granülasyon dokusu alır. Yara epitelizasyonu ile birlikte proliferatif faz sona ermektedir. Bu faz önemli sitokinler ve büyüme faktörleriyle geçici yara mikro ortamı ile yeni damar oluşumunun başlangıç noktasını temsil eder böylece oksijen ve besin sağlamak, hücre metabolizmasını ve iyileşme sürecini sürdürmek için gerekli olan kan akışının restorasyonunu sağlar [48].

Fibroblast Göçü:

Yaralanmayı takiben çevre dokudaki fibroblastlar ve miyofibroblastlar ilk 3 gün boyunca çoğalmaları için uyarılır. Daha sonra, inflamatuvar hücreler tarafından salınan TGF- β ve Platelet kökenli büyüme faktörü gibi faktörler tarafından çekilerek yara bölgesine göç ederler. Yaraya girdikten sonra çoğalırlar ve matrisi üretirler. Fibronektin ve kolajen gibi bileşenlerin üretilmesiyle hücrelerin büyümesi desteklenir ve yeni hücre dışı matris oluşur. Bu görevi tamamladıktan sonra gereksiz fibroblastlar apoptoz yoluyla ortadan kaldırılır [5, 7, 59].

Kolajen Sentezi:

Kolajenler yara iyileşmesinin tüm aşamalarında çok önemli bir bileşendir. Fibroblastlar tarafından sentezlenerek dokulara bütünlük ve güç kazandırır ve özellikle proliferasyonda anahtar rol oynarlar ve hücre içi matriks oluşumu için önemlidir [59].

Anjiyogenez ve granülasyon dokusu oluşumu:

Yeni kan damarlarının modellenmesi ve oluşturulması yara iyileşmesinde çok önemlidir ve yara iyileşmesinin tüm aşamalarında eş zamanlı olarak gerçekleşir. Hemostatik faz sırasında salgılanan anjiyojenik faktörler anjiyogenezi (yeni kan damarı oluşumu) teşvik eder. Hipoksik koşullar altında, çevre dokudan moleküller salgılanır ve endotel hücrelerinin çoğalması ve büyümesi teşvik edilir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü, temel fibroblast büyüme faktörü, gibi büyüme faktörleri anjiyogenezi indükleyerek tüm bu süreçte aktif rol almaktadır [59].

Proliferasyon evresindeki son adım, akut granülasyon dokusunun gelişmesidir. Aynı zamanda yeniden yapılanma aşaması da başlatılmıştır. Granülasyon dokusu, fibrin/fibronektin bazlı geçici yara matrisinin yerini alır ve kolajen granülasyon dokusunda birikerek bir skar oluşturur. Ayrıca anjiogenez henüz tam olarak tamamlanmadığından bu doku oldukça damarlıdır. Bunun sonucunda klasik bir kızarıklıkla ortaya çıkar ve kolaylıkla travmatize edilebilir. Ancak bu fazda hakim olan hücre, fibroblasttır. ECM'nin oluşumu, hücre yapışması için bir iskele sağladığından ve içindeki hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını düzenlediğinden dolayı oldukça önemlidir. Bu nedenle fibroblast, geçici yara matrisinin öncüsüdür. Bu fazın sonunda olgunlaşan fibroblastların sayısı miyofibroblast farklılaşmasıyla azalır ve ardışık apoptozla sonlandırılır [2, 3, 60].

Yeniden şekillenme fazı;

Yara iyileşmesinin son fazı olan yeniden şekillenme aşaması, yeni epitelizasyon ve skar oluşumu ile karakterizedir [59]. Bu süreç yara iyileşme aşamasının 21.gününden 1 yıla kadar sürebilmektedir. Yaranın olgunlaşması sırasında ECM'nin bileşenleri bazı değişikliklere uğrar. Proliferatif fazda üretilen kolajen III'ün yerini artık daha güçlü olan kolajen I almıştır. Daha sonra miyofibroblastlar kolajene çoklu bağlanır ve yaranın kasılmasına neden olarak gelişen skar yüzeyinin küçülmesine yardımcı olurlar. Yara iyileştikçe fibroblast ve makrofajların yoğunluğu apoptoz nedeniyle daha da azalır. Bu süreçlerin bir parçası olan miyofibroblastlar, MMP'lerin ve onların inhibitörlerinin sentezini sağlar. Oluşan bu hassas denge ECM' nin ve granülasyon dokusunun yeniden modellenmesi için hayati öneme sahiptir. MMP'ler ile TIMP'ler arasında bir dengesizlik varsa, ECM faza uygun bir düzende değiştirilemez ve kronik bir yara gelişebilir. Yara iyileşmesinin bu fazında beklenen nihai sonuç, hücre ve kan damarlarının sayısı azalmış ve gerilme mukavemeti yüksek, tamamen olgunlaşmış bir yara izidir [7, 48, 59].

2.1.2. Yara iyileşmesinin tipleri

Yara iyileşmesi 3 farklı tipte gelişmektedir (Şekil 2.3).

Primer yara iyileşmesi

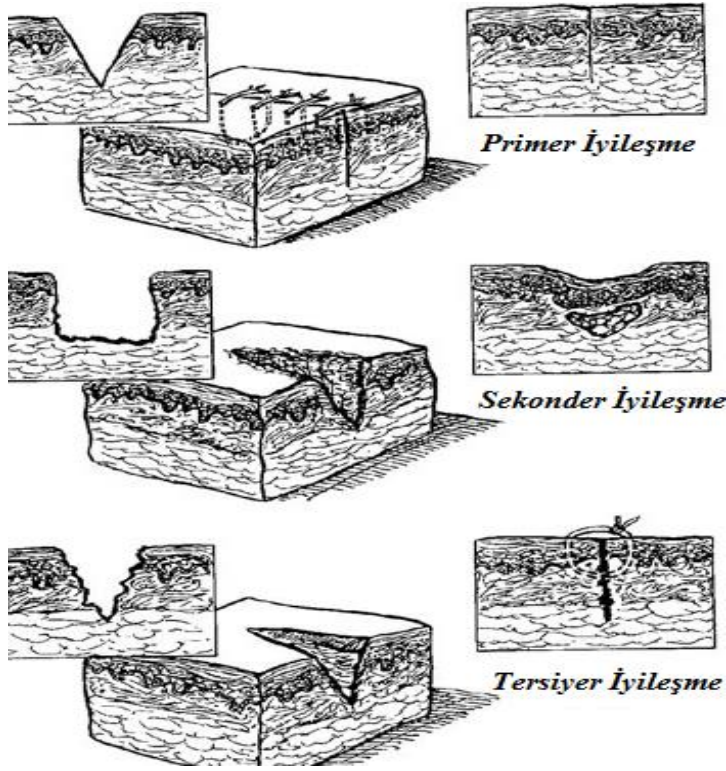
Birincil iyileşme, bir yaranın oluştuktan sonra 12-24 saat içinde kapatılmasıyla gerçekleşmektedir. Yaranın kenarları dikişler ile yaklaştırılarak, minimum yara iziyle hızlı bir şekilde kapanma sağlanır. 3-4 gün sonra fagositik hücrelerin yara bölgesine gelmesiyle zararlı bakteriler yok edilir ve yara sanki hemen kapanmış gibi gerilme kuvvetini korur [3, 61].

Sekonder yara iyileşmesi

Sekonder iyileşme majör travmalardan, ileri derecede yanıklardan ve bazı cerrahi işlemlerden sonra görülen, aşırı yumuşak doku kaybı olan yarada meydana gelmektedir. Bu süreç primer iyileşmeye göre daha uzundur ve bir yara iziyle sonuçlanabilmektedir. Miyofibroblastlar bu tür iyileşmede rol alırlar. Yaralanmayı takriben üç gün sonra ortaya çıkarlar ve sayıları onuncu ve yirmi birinci günler aralığında maksimum seviyeye ulaşır [3, 61].

Tersiyer (Gecikmiş) yara iyileşmesi

Yeni dokunun büyümesine izin vermek için yaranın bir süre açık bırakılması ile desteklenen iyileşmedir. Yara kenarları birbirine yaklaştırılır ve yaranın merkezi granülasyon dokusunun oluşumu ile iyileşmektedir [3].



Şekil 2.3. Yara iyileşme tipleri [3]

2.1.3. Yaraların sınıflandırılması

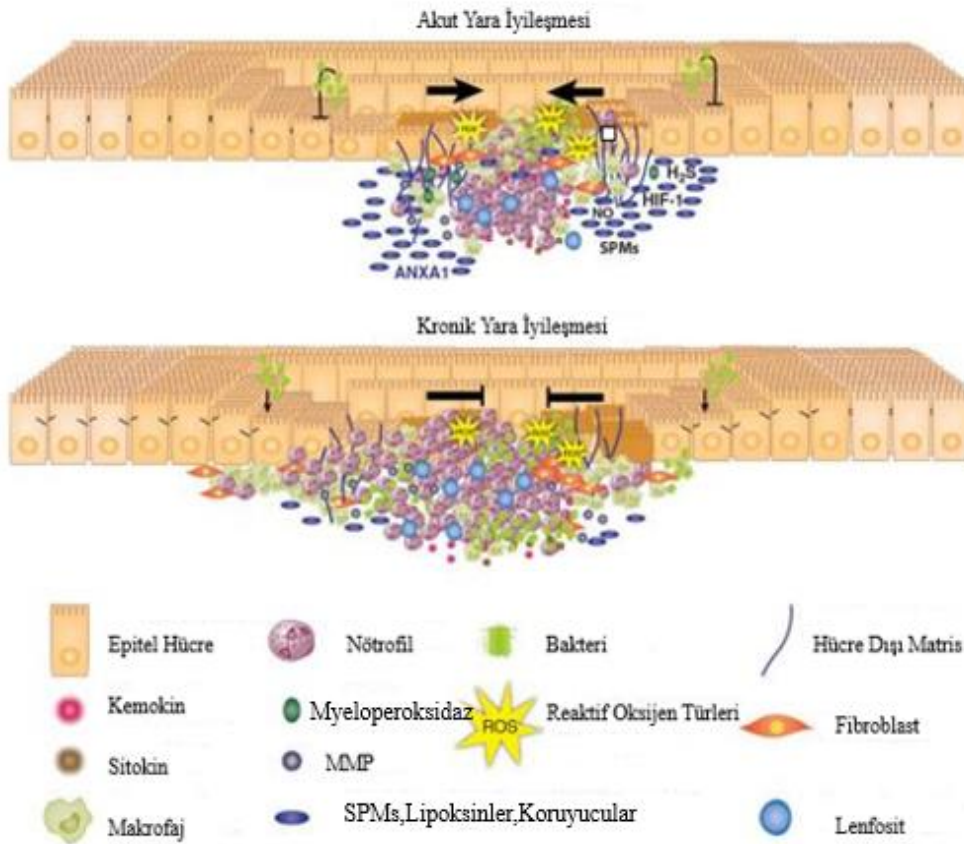
Deri yaraları akut ve kronik tipte olmak üzere ikiye ayrılır.

Akut yaralar

Akut yaralar, genellikle birbiri ile örtüşen 4 faz tamamlandığı yara iyileşme sürecine göre iyileşen travmatik veya cerrahi yaralardır. Akut yara iyileşmesi granülasyon dokusunun oluşması ile yeniden yapılanma sürecini tamamlayarak son bulur. Bağışıklık hücreleri akut yara iyileşmesinde anahtar düzenleyicilerdir. Bağışıklık hücrelerinin ve faktörlerin aktivasyonu, inflamatuvar süreci başlatır, yara temizliğini kolaylaştırır ve doku iyileşmesini destekler [62].

Kronik yaralar

Kronik yaralar (diyabetik ayak ülserleri, venöz bacak ülserleri vb.) sağlıklı bir akut yaranın iyileşmesine yol açan hücresel ve moleküler olayların standart zaman akışına uymaz [63]. Yara iyileşmesi sırasındaki immün yanıtın düzensizliği ve yetersizliği, kronik yaraların ortaya çıkmasına neden olur [62]. Kronik yaralarda yara iyileşmesi inflamatuvar fazda takılmaktadır, bu da zayıf ve gecikmiş iyileşmeye yol açar. Bu tür yaralarda kalıcı inflamasyon çeşitli özelliklerle karakterize edilir. Spesifik olarak, aşırı miktarda proinflamatuvar makrofaj bulunurken, antiinflamatuvar fenotiplere sahip makrofajların miktarı düşüktür. Ayrıca kronik yaralarda bulunan makrofajların ölü nötrofilleri temizleme kapasitesi sınırlıdır. Kronik yara makrofajları, ECM’i bozan ve iyileşmenin proliferatif aşamasının başlamasını önleyen MMP-2 ve MMP-9 gibi çeşitli MMP’leri salgılar. Neticede kronik yaralardaki sürekli inflamasyonun kontrol edilmesi çok zor olduğundan, kronik yaraların yönetimi hala büyük bir sorun olmaya devam etmektedir [62, 64].



Şekil 2.4. Akut ve kronik yara iyileşmesinde yer alan mediatörler [65]

2.1.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Yaraların oluşumunda genel olarak sistemik ve lokal faktörler etkilidir. Lokal faktörler, yarayı doğrudan etkileyen yaraya ait faktörlerdir; sistemik faktörler ise kişinin iyileşmesini etkileyen hastanın genel sağlık durumuna ait faktörlerdir. Yara iyileşme sürecini etkileyen bu faktörlerin tanımlanması doğru bir yara tedavisinin temel adımıdır. Bu faktörler birbiri ile ilişkidir ve kronik yaralar her iki faktörden de etkilenmektedir [10].

Lokal Faktörler

Oksijenasyon

Oksijenasyon yara iyileşmesinin temel unsurudur. Oksijen; inflamasyon, bakterisidal aktivite, anjiyogenez, epitelizasyon ve kolajen birikimi de dahil olmak üzere yara iyileşme sürecinin birçok adımında anahtar rol oynamaktadır. Kolajen sentezini artırır ve yara kontraksiyonunu destekler. Birçok sistemik durum, bozulmuş vasküler akışa sebep olmaktadır, bu da beraberinde zayıf doku oksijenasyonunu getirmektedir. Oksijenlenmenin sağlanamadığı yaralarda iyileşme bozulmaktadır bu da, hipoksik bir yara oluşumuna sebebiyet verir [66, 67].

Enfeksiyon

Yara enfeksiyonu, akut ve kronik yaralarda normal yara iyileşmesini bozar. Kontamine mikroorganizmaların yara ortamından uzaklaştırılması çok önemlidir. Enfekte yaralarda oluşan bakteriler biyofilm oluşturabilirler. Bakteriler proinflamatuvar sitokinlerin uzun süreli salınımına yol açabilirler. Bu durum inflamatuvar sürecin uzamasına sebep olur ve kronik yara gelişir [10, 68].

Sistemik Faktörler

Yaş

Yaşlandıkça, kolajenin azalması, fibroblastların azalması, elastin parçalanmasının artması ve kemokin üretimindeki değişiklikler, yara bölgesine gecikmiş T-hücresi infiltrasyonu ve

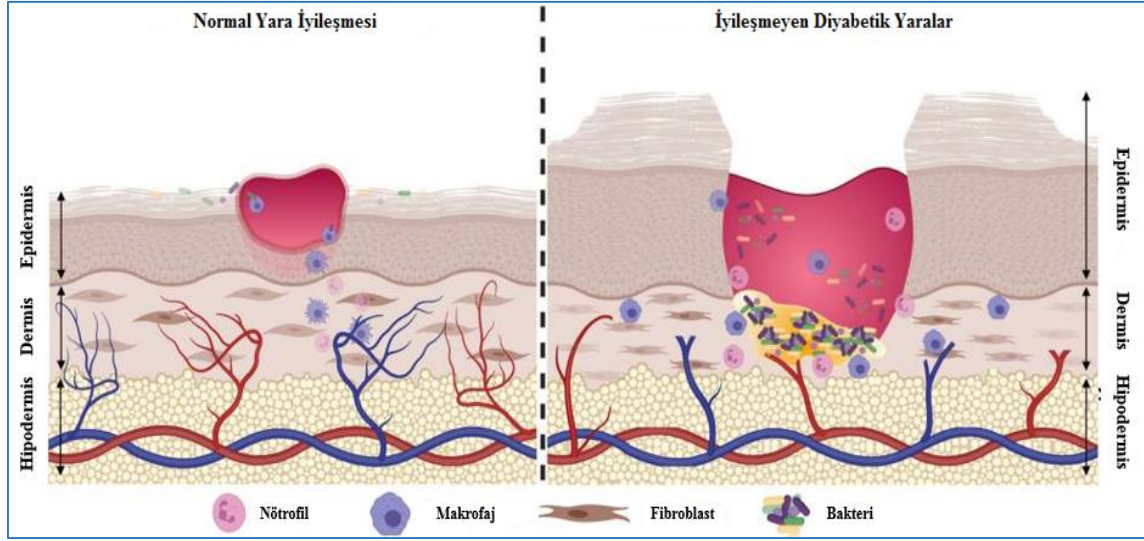
yara kasılmasının yavaşlaması neticesinde iyileşme yeteneği azalmaktadır. Genel olarak, genç ve yaşlı bireyler arasında yara iyileşmesinde küresel farklılıklar vardır. Yaşa bağlı bu değişiklikler, yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan birçok sistemik hastalıkla birlikte, daha yavaş ve daha az etkili iyileşmeye neden olur [10, 69].

Beslenme

Yara iyileşmesinde her türlü yetersiz beslenmenin güçlü bir olumsuz etkisi olabilir, ancak protein eksikliğinin çok büyük bir etkisi vardır. Tükenmiş bir protein durumu, fibroblast çoğalmasının azalmasına, kolajen sentezinin ve anjiyogenezin azalmasına kolajenin yeniden yapılanmasının değişmesine yol açar. Aynı zamanda yetersiz karbonhidrat alımı iyileşme için gerekli olan proteinlerin daha sonra tükenmesiyle birlikte protein yıkımına yol açmaktadır. C ve A vitaminleri, çinko ve tiamin gibi vitamin eksiklikleri, iyileşmenin zayıflamasına neden olabilmektedir. C vitamini ve tiamin kolajen oluşumunda gereklidir ve eksiklikleri çapraz bağlanmanın azalmasına ve sonuçta yara kuvvetinin azalmasına neden olur. A vitamini, özellikle normal hücre farklılaşması ve epitelyal keratinizasyon için gereklidir. A vitamini eksiklikleri kolajen sentezinde ve çapraz bağlanmada yetersizliğe, epitelizeasyonda ve yara kapanmasında gecikmeye neden olmaktadır. A vitamini eksikliği sırasında yaranın bağışıklık bariyerleri de bozulur. Çinko, DNA sentezi, protein sentezi, mitoz ve hücresel çoğalmada yer alan birçok enzimatik reaksiyonda kofaktör görevi görmektedir. Azalan çinko seviyeleri, gecikmiş epitelizeasyon ve fibroblast çoğalmasına neden olmaktadır [2, 69].

Diyabet

Uzun süreli hiperglisemi ve insülin sekresyonun yetersizliği ile karakterize olan diyabet gecikmiş ve bozulmuş yara iyileşmesinin en önemli sebeplerinden biridir. Diyabetli kişilerde meydana gelecek en ufak bir yaralanma dahi kronik ülserlere yol açabilmektedir. Diyabetik hastalarda bozulmuş iyileşme, uzun süreli inflamasyon ve azalmış epitelizeasyon kinetiği ile karakterize yaralar gelişir. Özellikle, T2D' den muzdarip hastaların %15'inde, diyabetik ayak ülserleri olarak adlandırılan alt ekstremitelerde lokalize ülserler gelişmektedir. Bu durum oldukça ciddidir ve amputasyona kadar ilerleyen bir süreci de beraberinde getirmektedir [70].



Şekil 2.5. Normal yara iyileşmesi ve diyabetik yara iyileşmesi [14]

Stres

Fizyolojik stres, yara onarım sürecinin başlangıçtaki inflammatuar aşamasını zayıflatarak yara iyileşmesini bozmaktadır. Stres, glukokortikoidleri artırır ve yara bölgesindeki proinflammatuar sitokinlerin seviyelerini azaltır. Stres aynı zamanda yara bölgelerinde IL-1 α ve interlökin 8'in (IL-8'in) ekspresyonunu da azaltır; her ikisi de yara iyileşmesinin başlangıç inflammatuar fazı için gereklidir. Yara iyileşmesinin bu ilk aşaması hücre aracılıdır ve çok önemlidir çünkü bozulduğunda tüm iyileşme süreci bozulur. Dolayısıyla serum kortizol seviyelerindeki artış ile erken inflammatuar yanıt azalır ve normal hücre aracılı bağışıklık bozularak, yara iyileşmesinde önemli bir gecikmeye neden olmaktadır [71-73].

2.2. Yara İyileşmesinin Ekonomi Üzerine Etkileri

Kronik yaralar, çok sayıda hastayı etkileyen, gerek hastaya gerekse sağlık sistemine önemli oranda bir finansal yük getiren sağlık problemleridir. Farklı etiyolojilere sahip yaraların tedavisi, toplam sağlık bütçesinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır.

Yaraların; bazıları cerrahi müdahale sonucunda, bazıları yaralanmanın sonucunda, bazıları ise dış faktörlerin, diyabet veya damar hastalığı gibi altta yatan koşulların sonucunda oluşmaktadır. Nedeni her ne olursa olsun yaralar, sağlık sistemi üzerinde önemli ve fark edilmeyen bir etkiye sahiptir [74, 75].

Anormal ve standart tedavi ile iyileşemeyen yaralar kronik yaralara dönüşürler ve uzun bir süre boyunca sağlık sistemi üzerindeki finansal yükü arttırarak yaşam kalitesinin bozulmasına sebep olmaktadır. Bazen yara tedavisinin mali maliyetinin sadece pansuman, bandaj veya topikal antiseptik gibi kullanılan malzemelerin maliyeti olduğu düşünülmektedir. Fakat süreç düşünüldüğünden daha maliyetlidir [74].

ABD'de 8,2 milyondan fazla insanın yaralanmaya uğradığını ve bakım maliyetinin 28,1 ila 96,8 milyar dolar arasında değişmektedir. Küresel yara bakımı pazarının büyüklüğü 2018'de 18,4 milyar ABD doları değerindeydi ve 2019'dan 2026'ya kadar %3,9'luk bileşik yıllık büyüme oranında büyümesi bekleniyor. Kronik yaralar sağlık hizmetleri açısından en büyük yüküdür ve yılda 25 milyar ABD dolarından fazla harcamaya neden olur ve yalnızca ABD'de 6,5 milyondan fazla insanı etkilemektedir [76, 77].

Avrupa'dan gelen veriler, evde bakımla tedavi edilen yaraların %64'ünün etiyolojisinin kronik olduğunu göstermektedir. Bunlardan %24'ünün 6 ay veya daha uzun süredir yaralarıyla yaşadığı ve neredeyse %16'sının bir yıldan uzun süredir iyileşmeden kaldığı tahmin edilmektedir [78, 79].

2.3. Diyabet

2.3.1. Diyabet tanımı ve türleri

Diyabet, giderek yaygınlaşan uzun süreli hiperglisemi ve insülin sekresyonunun yetersizliği ile karakterize edilen metabolik bir rahatsızlıktır. Şiddetli hiperglisemi, poliüri, polidipsi, polifaji, bulanık görme gibi görme bozuklukları, yorgunluk ve enfeksiyonlara eğilim gibi pek çok semptomu da beraberinde getirmektedir. Semptomların şiddeti diyabetin süresine ve tipine bağlıdır. Diyabetin uzun vadeli komplikasyonları arasında retinopati, nefropati, ayak ülseri, amputasyon, gastrointestinal ve genitoüriner bozukluklar gibi işlev bozuklukları bulunmaktadır [80].

Diyabet, 4 tipte sınıflandırılmaktadır; Tip 1D, Tip 2D, Gestasyonel Diyabet (GD) ve spesifik diyabet türleri [81].

Tip 1 diyabet (T1D)

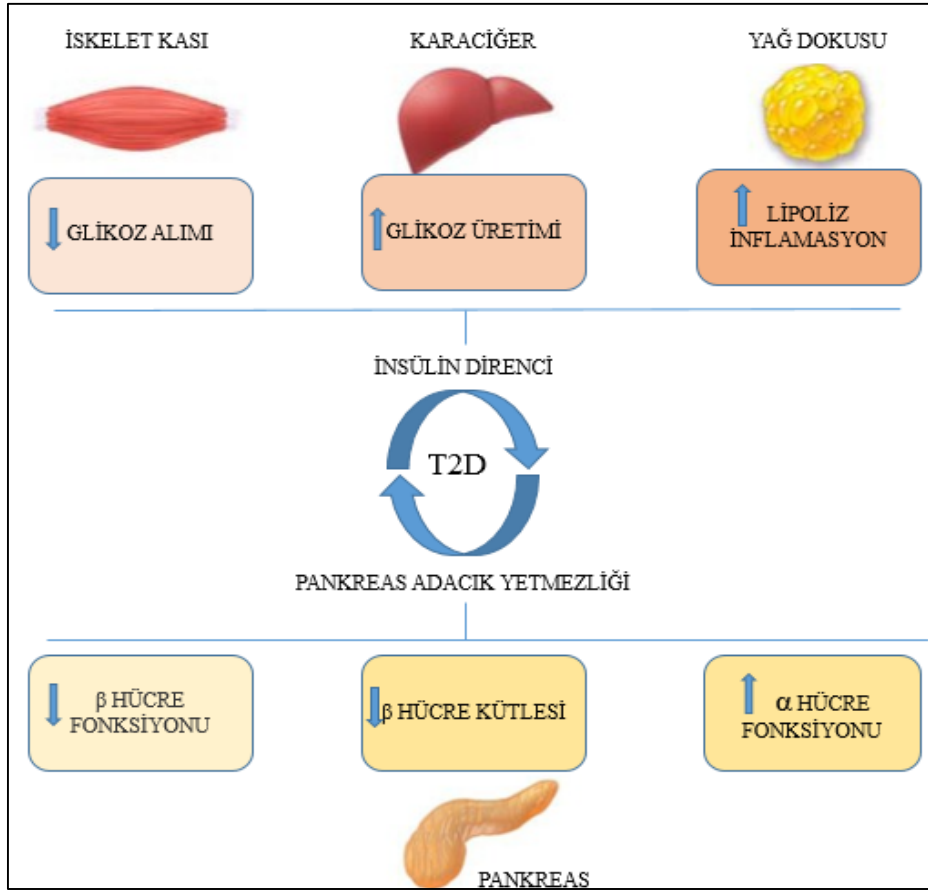
T1D, pankreas beta hücrelerinin immün aracılı yıkımı ile karakterize edilen ve mutlak insülin eksikliği ile sonuçlanan, ömür boyu eksojen insülin tedavisi gerektiren özellikle çocuklarda görülen heterojen bir rahatsızlıktır [82, 83].

Otoimmüniteye yol açan mekanizma henüz net değildir fakat çevresel faktörlerin etkisi büyüktür. Diyabetin bu formunda beta hücrelerinin yıkım hızı değişkendir. Pankreas beta hücrelerinin bir kısmı tahrip edildiğinde veya aktif olmadığında semptom göstermeye başlar [81, 84]. Son zamanlardaki araştırmalara göre, bazı beta hücrelerinin kış uykusunda olduğu ve potansiyel olarak yenilenebilir olduğu düşünülmektedir [85]. Dünya Sağlık Örgütü tarafından T1D'nin küresel prevalansının 2017'de 9 milyonun biraz üzerinde olduğu ileri sürülmüştür [86].

Tip 2 diyabet (T2D)

T2D, dünya çapında endişe verici oranlara ulaşan kronik bir sağlık durumudur. T2D'in nedeni karmaşıktır ve çok sayıda risk faktöründen etkilenmektedir. Diyabetlilerin yaklaşık %90-95'ini oluşturan T2D insülin bağımlı değildir ve bu hastaların hayatta kalmak için ömür boyu insülin tedavisine ihtiyaçları olmamakla birlikte β hücrelerinin otoimmün yıkımı da olmamaktadır. T2D gelişimine esasen iki ana faktörün birleşimi yol açmaktadır: bunlar pankreas β hücreleri tarafından kusurlu insülin salgılanması ve insüline duyarlı dokuların insüline yanıt vermemesidir [81, 87, 88].

T2D'nin epidemiyolojisi hem genetikten hem de çevreden etkilenmektedir. T2D'in esas nedenleri arasında obezitedeki küresel artış, hareketsiz yaşam tarzları, yüksek kalorili beslenme, yaş, etnik köken ve genetik eğilim gibi pek çok risk faktörü yer almaktadır [81]. Epidemiyolojik veriler, T2D için endişe verici bir gelecek öngörmektedir. IDF'na göre, 2019 yılında 463 milyon kişi diyabetle savaştırmaktadır. Bu rakamın tahminlere göre 2045 yılında 700 milyon kişi olacağı öngörülmektedir [87].



Şekil 2.6. Tip 2 diyabetin patofizyolojisi [89]

Gestasyonel diyabet (GD)

GD, gebelik sırasında başlayan veya ilk kez gebelik esnasında fark edilen herhangi bir seviyedeki glukoz intoleransı ile ilişkilendirilen diyabet türüdür. GD vakalarının çoğu gebeliğin bitmesiyle düzelmektedir ve oluşma prevalansı oldukça düşüktür. Tüm gebeliklerin yaklaşık %7'si GD ile sonuçlanmaktadır [81].

İster önceden var olan diyabetten ister GD'den kaynaklı olsun, annedeki hiperglisemi fetal hiperglisemiye sebep olmaktadır çünkü glukoz plasentadan kolayca aktarılmaktadır. Fetal pankreas, artan glukoz konsantrasyonlarına daha fazla insülin üreterek yanıt vermektedir. Bu nedenle hem anne de hem de bebekte insülin miktarı ile insülin direnci arasındaki denge korunamaz hale gelir ve yüksek hiperglisemi gelişir [90, 91]. GD'li tüm bireylerin sağlıklı beslenme ve kilo kontrolü, egzersiz ve glukoz takibi ile yönetilmesi tavsiye edilmektedir [92].

Diğer Spesifik Diyabet Türleri

Diyabetin; β -hücresinin genetik kusurları, insülin etkisindeki genetik kusurlar, ekzokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, ilaç veya kimyasal kaynaklı diyabet, enfeksiyonlar, immün aracılı diyabetin yaygın olmayan formları gibi çeşitli spesifik formları da bulunmaktadır [81].

2.3.2. Diyabet ve komplikasyonları

Diyabetik hastalardaki kronik hiperglisemi, hem mikrovasküler hem de makrovasküler olmak üzere çeşitli komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu komplikasyonlar sağlık sistemi üzerinde ciddi bir finansal yüke neden olmaktadır. Bu durumda komplikasyonların etkilerinin en aza indirilmesi için hastalığın erken teşhisi de önem kazanmaktadır. En yaygın mikrovasküler komplikasyonlar arasında nöropati, retinopati ve nefropati yer almaktadır. Diyabet miyokard enfarktüsü ile sonuçlanan kardiyovasküler hastalık ve felç olarak kendini gösteren serebrovasküler hastalık gibi makrovasküler komplikasyonlara da yol açmaktadır [16, 17]. Diyabetin kronik komplikasyonları arasında ise depresyon, demans ve cinsel işlev bozukluğu gibi komplikasyonlar vardır [93-96].

Diyabetin en karmaşık komplikasyonu diyabetik ayak ülserleridir. Diyabetli hastalarda ayak ülserlerinin gelişmesinde rol oynayan birçok etken vardır. En önemli iki risk faktörü periferik nöropati ve periferik vasküler hastalık olarak bilinmektedir. Nöropati, fark edilmeyen bir travma sonrasında ülser gelişmesine sebep olur bunun neticesinde gerçekleşen zayıf kan akımı (iskemi) ise yara iyileşmesini geciktirmektedir [97, 98].

2.3.3. Diyabet ve yara iyileşmesi

Sağlıklı bir yara iyileşmesi birbiri ile örtüşen 4 temel fazdan oluşmaktadır. Ancak diyabetik yaralar gibi anormal iyileşme gösteren yaralarda 4 temel faz birbirini tamamlamaz dolayısıyla uzamış ve bozulmuş bir yara iyileşme süreci gerçekleşir. Diyabette, bu fazlar boyunca normal ilerleme bozulur ve bu durumda yara iyileşmesi yüksek proinflatuar sitokinler, proteazlar ve ROS varlığı ile karakterize edilen inflamatuvar fazda takılır ve yarada işlevsiz epitelizasyona yol açar.

Trombositler, makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar ve keratinositler yara iyileşmesinde önemli rol alırlar ve bağışıklık hücrelerindeki fonksiyonel değişikliklerden dolayı, yara iyileşmesinin normal fazlarında ilerlemesi başarısız olmaktadır. Makrofajlar, inflamasyon aşamasından proliferasyon aşamasına geçişte çok önemlidir. Diyabet yaraya monosit alımını bozarak, keratinosit ve fibroblast fonksiyonunu engelleyerek, fagositozu azaltarak yara iyileşmesinin bozulmasına neden olmaktadır [99, 100].

ROS, proinflamatuvar sitokinlerin artışı ile, MMP'leri indükleyerek yaranın yeterli bir inflamatuvar yanıt oluşturmamasını giderek bozmaktadır. Bu da ECM bozunmasına yol açmaktadır. Sonuç olarak diyabetik yaralar, sürekli inflamatuvar fazda takılan anormal bir yara iyileşme sürecine girerek bir kısır döngü içerisinde devam etmektedir [100].

2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikaller, dış yörüngesinde eşlenmemiş bir veya birden fazla elektrona sahip moleküler fragmanlar olarak adlandırılmaktadır. Genellikle kararsız halde olan serbest radikallerden oksijen türevi olanlar ROS, nitrojen türevi olanlar ise reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılmaktadırlar. Süperoksit radikali, peroksil radikali, hidroksil radikali, hidroperoksil radikali ve alkoksil radikalleri serbest oksijen radikal örnekleridir. Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit iki ise nitrojen serbest radikalleridir [101, 102]. Serbest radikaller, canlılar üzerinde zararlı ve yararlı etkileri arasında hassas bir denge vardır. Serbest radikallerin zararlı etkisine ise oksidatif stres adı verilmektedir [103]. Oksidatif stres, serbest radikallerin artması ve antioksidan aktivitenin azalması ile pro-oksidan/antioksidan moleküllerin dengesindeki bozukluk ile karakterizedir [104, 105].

2.4.1. Reaktif oksijen türleri

ROS, en az bir oksijen atomu ve bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron içeren, bağımsız olarak var olabilen sinyal fragmanlarıdır. ROS, hücre farklılaşmasını ve apoptozu indükleyerek yaşlanma sürecinde, kas kasılmalarında, gen ekspresyonunda, antimikrobiyal, bakterisidal ve bakteriyostatik aktivitenin belirlenmesinde rol almaktadır. Aynı zamanda hücre süreçleri sırasında, hepatositlerde ve makrofajlarda küçük miktarlarda ROS oluşmaktadır [106].

ROS, radikal ve radikal olmayanlar olarak ikiye ayrılmıştır. Radikaller; Hidroksil ($\text{OH}\bullet$), Peroksil ($\text{RO}_2\bullet$), Süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Hidroperoksil ($\text{HOO}\bullet$), NO. Radikal olmayanlar ise H_2O_2 , Hipoklorik asit (HOCl), Singlet oksijen, Peroksinitrit (ONOO^-), Nitroz asit (HNO_2) olarak sınıflandırılmaktadır [101, 107].

Serbest radikaller ve diğer ROS insan vücudunda temel metabolik süreçlerin aktivitesiyle meydana gelmektedirler. Üretilen serbest radikallerin ve ROS'nin bazı kaynaklarını; mitokondri, ksantin oksidaz, peroksidomlar, sitokrom P450 metabolizması ve fagositoz gibi sıralayabiliriz.

Süperoksit, sitokrom P450, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi birden fazla yol ile üretilmektedir. Üretildikten sonra da bir dizi farklı reaksiyonlara katılmaktadır. Süperoksit, H_2O_2 kaynağıdır ve Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla H_2O_2 'e dönüştürülmektedir ve daha sonra hidroksil radikallerini meydana getirmektedir. Hidroksil radikalleri reaktif radikallerdir. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları sonucu H_2O_2 'den oluşmaktadırlar. Oluştukları yerde yeni radikaller oluşturarak hücrede hasarlara sebep olabilmektedirler [101, 104, 108, 109].

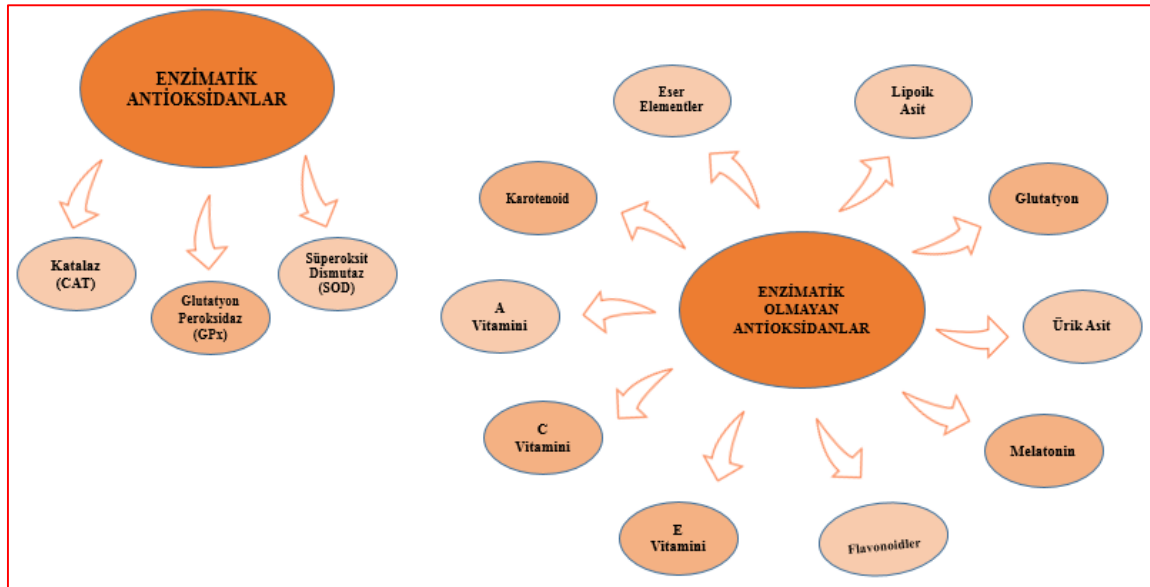
ROS ve diğer oksidanların üretiminde antioksidan kapasiteyi aşan bir artış sonucunda oksidatif stres meydana gelmektedir. Aşırı ROS birikmesi, DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermektedir. ROS, DNA'yı parçalayarak dönüştürmektedir. DNA değişikliği ise yaşlanmaya ve çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. ROS, peptit zincirlerini parçalayarak biyolojik membranı bozar ve çok sayıda molekülü etkileyen lipid peroksidasyonuna neden olur.

Lipid peroksidasyonu, lipid yan zincirindeki metilen karbonundan H koparan herhangi bir radikal ile başlamaktadır ve bir dizi radikal zincir reaksiyonuyla ilerlemektedir [101, 108]. Sonucunda izopropanlar, alkanlar ve malondialdehit gibi bileşiklerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Peroksidasyon işleminin son ürünü sitotoksik ve mutajenik aktiviteleri olan malondialdehittir. ROS kaynaklı oksidatif stresin kötü etkilerini ortadan kaldırmak için organizmalar bir dizi savunma mekanizması geliştirmiştir. Antioksidanlar serbest radikalleri ortadan kaldırmada ve hücre fonksiyonlarını stabilize ederek oksidatif stres ile başa çıkmaktadır. Antioksidanlar savunma sisteminde radikal temizleme, onarım ve adaptasyon gibi çeşitli etkiler göstermektedir [110, 111].

2.4.2. Antioksidan savunma sistemleri

Serbest radikaller, hücresel bileşenlere zarar verecek şekilde reaksiyona girme eğilimine sahip oldukları için, hücresel bileşenleri radikal kaynaklı hasarlardan korumak için hem endojen hem de eksojen olarak çok çeşitli bir antioksidan savunma yelpazesi bulundurmaktadır. Antioksidan aktivite çeşitli yollar ile kendini göstermektedir. Bir serbest radikal başka bir fragmanla etkileşime girince, ikincil radikaller üretir ve bunlar daha fazla radikal tür açığa çıkarırlar. Radikaller birleşerek sabit bir ürün oluşturup zincir kırıcı bir antioksidan enzim tarafından parçalanana kadar bu süreç devam etmektedir. Bir başka şekilde ise bazı antioksidan enzimler serbest radikalleri temizler ve zincir reaksiyonunun yayılmasını engelleyerek aktivite gösterirler. Bu tür antioksidanlar sulu faz ve lipid faz antioksidanları olarak kategorize edilip aktivitesini göstermektedirler [112-114].

Endojen antioksidanlar, enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde kategorize edilmektedirler (Şekil 2.7). Enzimatik antioksidanlar, katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi destekleyici enzimlerden oluşmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanları ise oksidatif strese karşı savunmada doğrudan etkili olan ürik asit, lipoik asit, bilirubin, glutatyon, metatonin, karotenoidler, E, A ve C vitaminleri olarak sınıflandırılmak mümkündür [105].



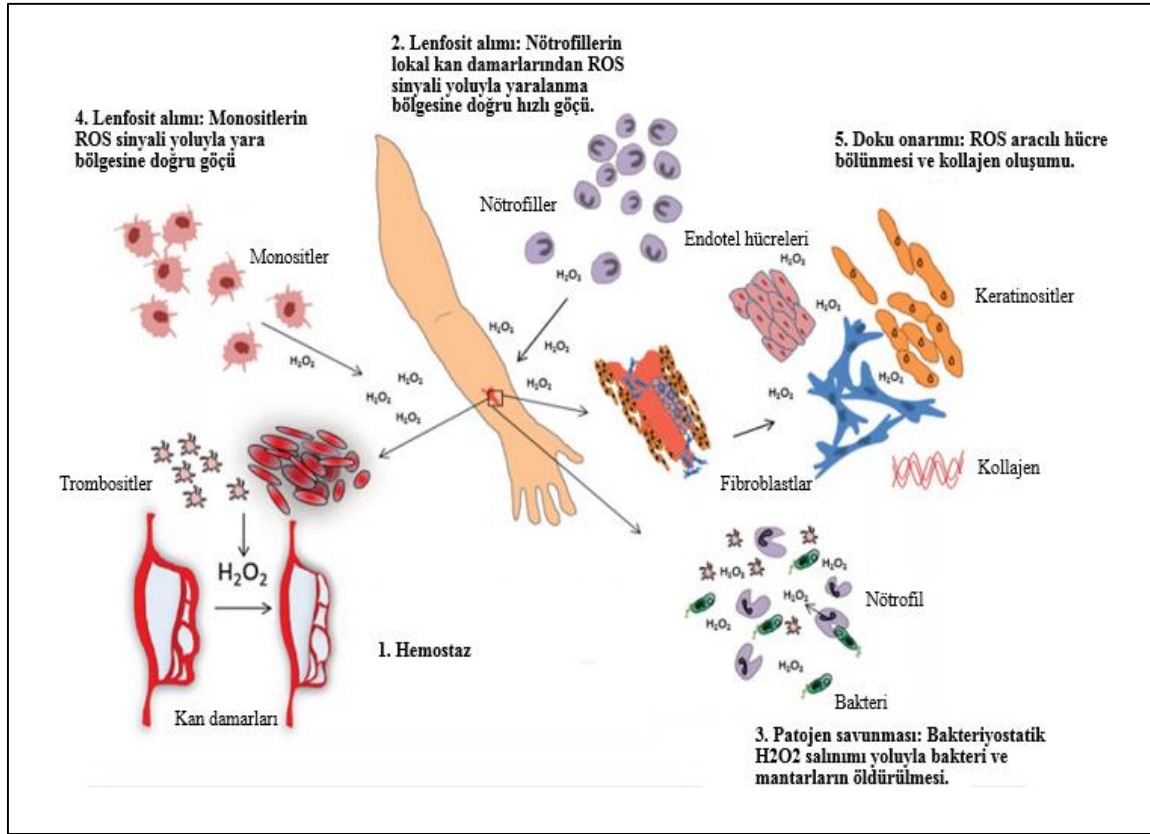
Şekil 2.7. Antioksidanların sınıflandırılması [105]

2.4.3. Reaktif oksijen türleri ve yara iyileşmesi

Yara iyileşmesi, çeşitli süreçlerden oluşur ve bu süreçlerin her adımında ROS üretimi meydana gelmektedir. Serbest radikal ve antioksidan dengesizliği, aşırı ROS üretimine yol açarak yara iyileşmesinin gecikmesine sebep olmaktadır. Bu sebeple, antioksidan sistemler aracılığıyla ROS seviyelerinin azaltılması, oksidatif stresin neden olduğu hasarı azaltarak yara iyileşmesinin sağlıklı olarak ilerlemesine yardımcı olmaktadır [22].

Düşük ve yüksek ROS seviyeleri arasında bir denge olması çok önemlidir. Düşük ROS seviyesi, normal yara iyileşme süreci için çok önemlidir. ROS ve RNS seviyesinin olağandan yüksek olması ise bozuk veya gecikmiş yara onarımına ve hücresel hasara sebep olmakla birlikte doğrudan veya dolaylı yoldan ECM proteinlerini de değiştirip bozabilmektedirler. Ayrıca fibroblast ve keratinosit fonksiyonunun bozulmasına neden olmaktadır [115-117].

ROS, onarım sürecinde ikincil haberciler olarak görev alırlar ve etkili doku onarımını koordine ederler. Nötrofiller ve makrofajların yıkıcı özelliklerinden dolayı, ROS ve RNS konakçı savunmasında bütünleyici bir rol alırlar. Bu hücreler fagozom içerisindeki bakterileri yutarak NADPH oksidaz sistolik alt birimini tetikler ve yoğun bir oksijen alımı gerçekleşir. Bu olaya solunum patlaması denilmektedir ve sonucunda çok yüksek seviyede ROS ve RNS salınımı olmaktadır. Bu esnada salgılanan H_2O_2 bakterilerin daha fazla büyümesini önler. Yoğun oksijen alımı hipoksiye yol açar ve doku onarımını olumsuz etkiler. Ortaya çıkan bu doku hipoksisi diyabetli hastalarda diyabetik ayak ülserine sebebiyet vermektedir. Zayıf hipoksi nedeniyle anjiyogeneze de bozulma meydana gelerek, bu durum yara onarımını olumsuz etkilemektedir. Bu yüzden yara bölgesindeki ROS'nin detoksifiye edilmesi gereklidir. Aksi takdirde, bozulmuş ve gecikmiş bir yara iyileşme sürecine girilmektedir. Bozulmuş detoksifikasyon da oksidatif stresi artırarak yara iyileşmesinin inflamasyon aşamasında takılmasına ve doku onarımın sekteye uğramasına sebep olmaktadır [117-119].



Şekil 2.8. ROS ve yara iyileşmesindeki rolleri [117]

2.5. Matriks Metalloproteinazlar

Matriksinler olarak da adlandırılan matriks metalloproteinazlar; ECM'in tüm komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan çinko endopeptidazlardır. MMP'ler morfogenezis, doku yeniden yapılanması, yara iyileşmesi, anjiyogenezis gibi birçok süreçte aktif rol almaktadırlar [120, 121].

MMP ailesi 6 temel gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.9). Bunlar; kolajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler, membran tipi metalloproteinazlar ve diğerleridir. Bilinen 24 farklı çeşidi olmakla birlikte 23 tanesi doğuştan her insanda bulunmaktadır [120, 122].

TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olarak 4 farklı alt tipi bulunan TIMP'leri, MMP'lerin aktif bölgelerine bağlanarak etkilerini keser ve MMP'leri inhibe edebilirler [120, 123].

Kollajenazlar	• MMP-1 MMP-8 MMP-1 MMP-18
Jelatinazlar	• MMP-2 MMP-9
Stromelisinler	• MMP-3 MMP-10 MMP-11
Membran Tipi MMP'ler	• MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25
Matrilisinler	• MMP-7 MMP-26
Diğerleri	• MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-21 MMP-23 MMP-27 MMP-28

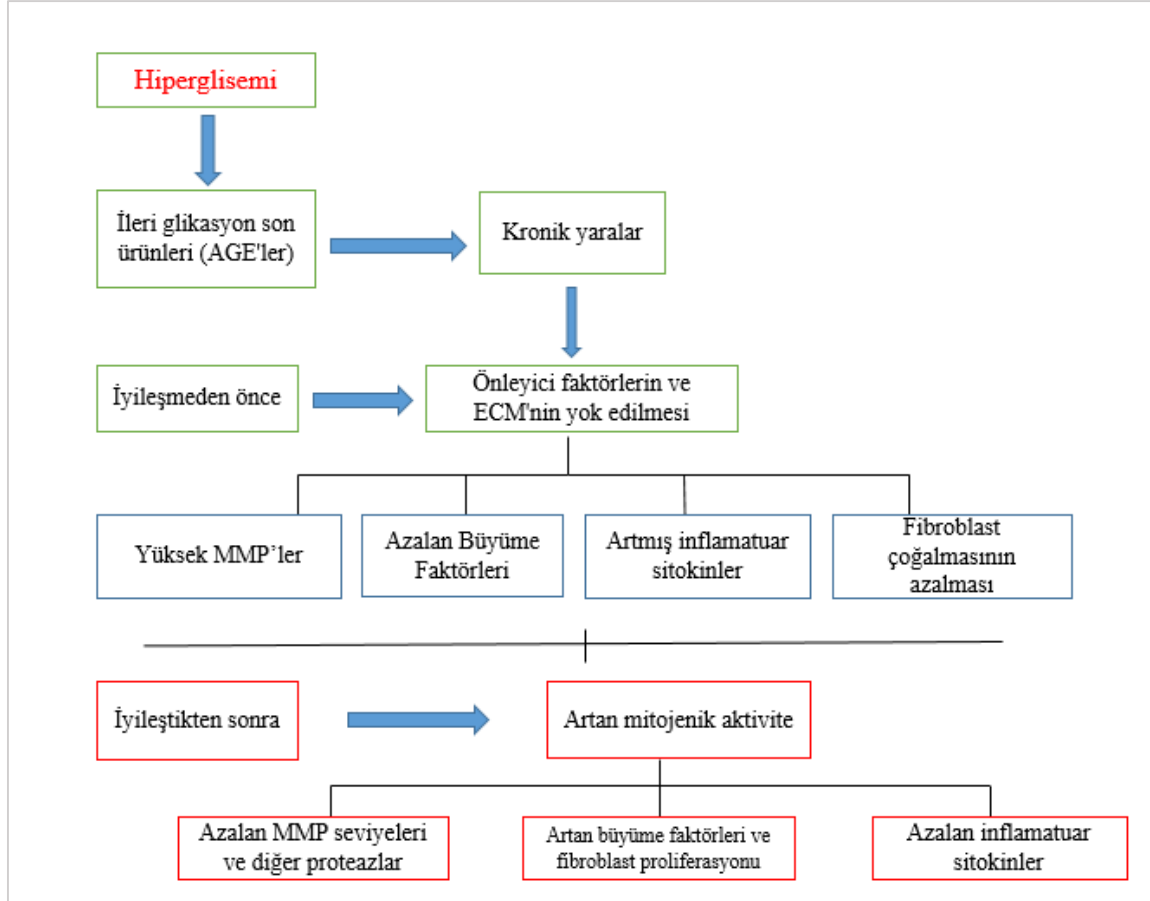
Şekil 2.9. Matriks metalloproteinazların sınıflandırılması [120]

2.5.1. Matriks metalloproteinazlar ve yara iyileşmesi

MMP'ler yara iyileşmesinin tüm aşamalarına aktif olarak katılmaktadırlar. Yara iyileşmesinin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için ECM'nin yeniden modellenmesi gerekmektedir. MMP'ler, ECM'nin hemen hemen tüm protein bileşenlerini parçalayarak yara iyileşmesine katılmaktadırlar. MMP'ler inflamatuvar faz esnasında geçici ECM'i ortadan kaldırarak, proliferasyon aşamasında bazal membranı parçalayarak, yeniden şekillenme aşamasında ise dokuyu kasarak yeniden yapılandırıp skar dokusunun yeniden şekillenmesini sağlayarak iyileşme sürecinin pek çok aşamasında aktif rol alırlar [120, 124].

MMP'ler gecikmiş yara iyileşmesinde de aktif rol almaktadır. Yara iyileşme süreci, ECM bozulmasının kontrol edilmesini ve yeniden yapılanmasını içermektedir. Dolayısıyla ECM oluşumu ile bozunma süreci arasındaki dengesizlik kontrol edilmezse, bu durum kronik ülserlerin ve diyabete bağlı kronik yaraların gelişmesini de tetikleyerek yaranın gecikmeli kapanması ile sonuçlanır. Diyabet dünya çapında büyük ölçüde insanı etkileyen hiperlisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Hiperglisemi diyabete bağlı gelişen oksidatif stres ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE'ler) yoluyla MMP aktivitesini arttırmaktadır (Şekil 2.10) [120, 125, 126].

Kronik yaralar, kolajenazların ve jelatinazların yüksek seviyesi ve anormal düşük TIMP seviyeleri ile karakterize edilmektedir. Özellikle MMP-9 ve MMP-2'nin aşırı aktivitesinin, kronik cilt ülserlerinin katkıda bulunduğu gözlenmiştir. Bu nedenle MMP/TIMP dengesinin korunması yara iyileşmesinin sağlıklı ilerlemesi için önemlidir [127].



Şekil 2.10. Kronik yaralarda MMP'lerin mekanizması [120]

2.6. Kolajen

Kolajenler, bağ dokusunun ana bileşenleridir ve insan vücudunda en bol bulunan proteinlerdir. Kolajenler, yapısal roller oynarlar ve dokuların organizasyonuna ve şekline katkıda bulunurlar. Kolajenler, çeşitli reseptör aileleri aracılığıyla hücrelerle etkileşime girerek çoğalmalarını, göçlerini ve morfogenezini düzenlerler. Kolajen ailesi, 28 üyeden oluşmaktadır. Bunlar fibriler ve fibriler olmayan kolajenler olarak 2 grup altında toplanmaktadır. Fibriler kolajenlerin en yaygın olanları kolajen tip I, III ve V'dir. Fibril olmayan en yaygın kolajenler ise Tip IV, VI, VII, XII, XIV, XVI ve XVII kolajenleri içerir. Kolajenlerin ortak yapısal özelliği, üçlü sarmalın varlığıdır [128, 129].

2.6.1. Yara iyileşmesinde kolajen

Yara iyileşmesi, epidermal bütünlüğü ve cilt bariyer fonksiyonunu sağlamak çeşitli hücreler değişiklikler ile karakterize, doku hasarına karşı dinamik bir yanıttır. Kolajen, doğal fibriller yapısında veya yara ortamında çözünebilir bileşenler olarak yara iyileşmesinin tüm fazlarında önemli rol almaktadırlar [128, 130].

İyileşen yaradadaki kolajen değişime uğrar ve derinin gerilme mukavemetini belirlemektedir. Yara iyileşmesinin erken evresinde sentezlenen kolajen türü kolajen III, yerini kolajen I'e bırakmaktadır. Kolajenin yeniden şekillenmesi yaranın kapanmasının ardından uzun bir süre devam etmektedir. Kolajen dokuların mekanik kuvvetine ve elastikiyetine katkıda bulunmaktadır ve doğal bir substrat görevi görmektedir [130, 131].

Kolajen, yara iyileşmesinde inflamasyon, anjiyogenez ve ECM'in yeniden şekillenmesi gibi süreçlerde rol almaktadır. Yaralanma uyarısından hemen sonra kolajenleri içeren pıhtılaşma aşaması meydana gelir ve fibrin pıhtı oluşumu gerçekleşir. Kolajen I ve IV, güçlü kemoatraktanlardır ve inflamasyonun araçları olurlar. İnflamasyon, kolajen ve ECM'yi sentezleyen fibroblastların çoğalmasını sağlamaktadır ve ECM'nin yeniden şekillenmesine yardımcı olur. İnflamasyonun doğru şekilde ilerlemesi ve ECM yeniden yapılanması normal bir yara iyileşme süreci için temel adımdır. Kolajen, fragmanına bağlı olarak anjiyogenezin destekleyicisi veya inhibitörü olabilmektedir.

Yara iyileşmesi sürecinde, yara dokusu yıllar içinde yeniden şekillenmektedir ve skar izi sonuçlanmaktadır. Yaralanmamış cilt ile arasındaki temel fark, kolajen fibrillerin yoğunluğu olarak görülmektedir. Bu nedenle kolajen yaranın mikro ortamını doğrudan modüle ederek yara iyileşmesinde aktif rol almaktadır [129, 132, 133].

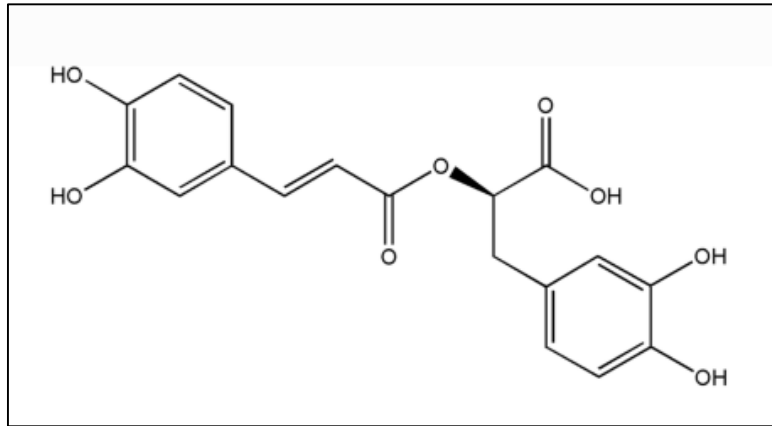
2.7. Yara İyileşmesinde Fenolik Bileşikler

Fitokimyasalların yaygın gruplarından biri olan, bitkilerdeki fenilpropanoid ve pentoz fosfat yollarının çeşitleri olan ikincil metabolitlere fenolik bileşikler adı verilmektedir [134, 135]. Fenolik bileşikler, anti-alerjik, anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal, antioksidan, vazodilatör etkiler gibi çok çeşitli fizyolojik aktiviteler göstermektedir. Fenolik bileşikler, serbest

radikalleri temizleyerek ve metal katyonları şelatlayarak antioksidan aktivite göstermektedirler [134, 136].

2.7.1. Rosmarinik Asit

Rosmarinik asit; *Heliotropium foertherianum*, *Rosmarinus officinalis* ve *Perilla frutescens* gibi, *Lamiaceae* ve *Boraginaceae* familyalarına ait bitkilerde yaygın bulunan bir doğal fenolik bileşiktir. Kimyasal olarak RA, 3,4-dihidroksifenilaktik asit ve kafeik asidin esterleştirilmesini içeren yöntemlerle üretilen bir polifenol flavonoiddir. RA'nın moleküler formülü $C_{18}H_{16}O_8$ 'dir. Moleküler ağırlığı 360,318 g/mol'dir ve kırmızı-turuncu renktedir. Suda az çözünür fakat dimetil sülfoksit, etanol ve dimetil formamid'de iyi çözünmektedir. Bir fenolik asit olan RA'nın, her aromatik halkasında iki komşu OH grubu bulunan iki aromatik halkası vardır (Şekil 2.11). H bağışlama aktivitelerinden dolayı serbest radikalleri yakalayıp etkili bir antioksidan aktivite göstermektedir [30, 137].

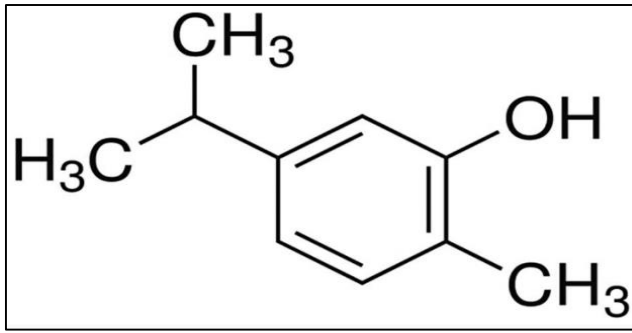


Şekil 2.11. Rosmarinik asit kimyasal yapısı [30]

Günümüzde rosmarinik asidin çok faydalı aktiviteleri aydınlatılmıştır. Bunlar arasında ROS temizleyici ve lipid peroksidasyon inhibitörü, anti-enflamatuar, nöroprotektif ve antianjiyojenik ve hepatoprotektif potansiyeli [31-33], anti-mikrobiyal, immünomodülatör, anti-diyabetik, antialerjik, analjezik [32, 34-36], anti kanser [138], yüksek glukoz kaynaklı ROS oluşumunu zayıflattığı ve yüksek glukoz kaynaklı apoptozu bastırmasını [139] oksidatif strese karşı koruyucu aktiviteleri derlenmiştir [35, 36].

2.7.2. Karvakrol

5-izopropil-2-metilfenol olarak da adlandırılan karvakrol; kekik (*Origanum vulgare*), (*Thymus vulgaris*), yabani bergamot (*Citrus aurantium bergamia*), karabiber (*Lepidium flavum*) gibi bitkilerin uçucu yağlarında bulunan sıvı bir fenolik monoterpenoiddir. CAR'ün moleküler formülü $C_{10}H_{14}O$ 'dır. Moleküler ağırlığı 150,22'dir ve 0,976 g/ml yoğunluğa sahiptir. CAR, lipofilik özelliklere sahiptir; suda çözünmez ancak etanol, aseton ve dietil eterde yüksek oranda çözünmektedir [37, 140].



Şekil 2.12. Karvakrol kimyasal yapısı [37]

Karvakrol, günümüzde devam eden çalışmaların ışığında pek çok aktivite gösterir. Bunlar arasında antibakteriyel ve antifungal [37, 38], antiviral [39], antioksidan [38, 40, 41], antikarsinojenik [42], oksidatif hasarı azaltıcı ve radikal temizleme aktivitesi [141], hepatoprotektif [38, 40], antibiyofilm ve antimikrobiyal özelliği [142], antikanser, antiinflamatuvar, spazmolitik ve dahil olmak üzere çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olduğunu gösterilmektedir [38].

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Deney Protokolü

Çalışmalara Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan (G.Ü.ET-21.079) izin alınarak başlanmıştır. Doku örneklerinin alımına kadar olan bütün aşamalar Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deneylerde GÜDAM’nden temin edilen 72 adet yetişkin Wistar albino ırkı erkek rat (250-300g) kullanılmıştır. Deney öncesi ve deney sırasında ad libitum beslenen ratlar, deney süresince tek tek kafeslerde, gün ışığı döngüsü paralelinde aydınlanan ortamda bakılmıştır. Diyabet oluşturmak üzere ratlara tek doz 60 mg/kg streptozotosin (STZ) intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir ve kan şekeri 250 mg/dL’nin üzeri diyabetli olarak kabul edilmiştir. Sonrasında punch biyopsi ile eksizyonel yara modeli oluşturulmuştur. Alınan doku örneklerinin biyokimyasal parametreleri Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Fizyoloji ve Biyokimya Laboratuvar’ında çalışılmıştır.

3.2. Rosmarinik Asit ve Karvakrol Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Rosmarinik asit ve karvakrol içeren topikal bir formülasyon için etkin maddelerin fizikokimyasal özelliklerine göz önünde bulundurularak organojel formülasyonlarının hazırlanmasına karar verilmiştir. Formülasyona ait tüm çalışmalar Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji ABD’inde gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda %2 oranında polimer içeren jel hazırlamak amacı ile, 2 g karbopol 974P, 98 g distile suda disperse edilerek, 800 rpm’de 60 dakika karıştırılarak ve 60 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek homojen bir hal alması sağlanmıştır. Oluşan hava kabarcıklarının çıkması için +4°C’de 24 saat bekletilmiştir. Rosmarinik asitin lipofilik özelliğinden dolayı uygun bir yağ fazında çözülmesi sağlanmıştır, karvakrol ise çözünürlüğüne bağlı olarak su veya yağ fazına eklenmiştir. Daha sonra yağ fazı/su fazı 1:4 (h/h) oranında olacak şekilde karışımları hazırlanmıştır. Su fazı olarak %2 oranında hazırlanan karbopol 974P jelle yağ fazı ilave edilerek homojen görünüm elde edilinceye kadar 800 rpm’de 30 dakika karıştırılmıştır. Böylece homojen etkin madde içeren organojel formülasyonları hazırlanmıştır.

Rosmanirik asit ve karvakrol dozu 10 mg/kg olacak şekilde ayarlanmıştır. Organojel formülasyonu UV altında sterilize edilerek topikal in vivo uygulama için hazır hale getirilmiştir. Organojel formülasyonu ince bir tabaka halinde petri kabına serilerek laminar akış kabininde (Euroflow Class IIA, Clean Air Techniek, Holland) UV lambası (254 nm) altında 2 saat sterilize edilmiştir. Ayrıca hazırlanan organojel formülasyonunun tüm farmasötik karakterizasyon çalışmaları sterilizasyon işleminden önce ve sonra değerlendirilmiştir (viskozite, akış, pH, yapı profil analizi vb).

3.3. Diyabet Modelinin Oluşturulması

Diyabet oluşturmak üzere ratlara tek doz 60 mg/kg STZ (S0130, Sigma Aldrich, USA), 0.1 M PH; 4.5 sitrat tamponunda çözülürerek intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir (Resim 3.1). Bir hafta sonra glikoz seviyeleri ölçülerek kan şekeri 250 mg/dL'nin üzeri olan ratlar diyabetli olarak kabul edilmiştir. Fizyolojileri gereği diyabete direnç gösteren ratlara ise ikinci bir doz STZ enjekte edilerek diyabetik hale getirilmiştir.



Resim 3.1. Diyabet modelinin oluşturulması

3.4. Yara Modelinin Oluşturulması

Uygulamaya başlamadan önce deney hayvanları standart terazide tartılıp ağırlıklarına göre intramüsküler olarak ketamin (Keta-control 50 mg/kg) ve ksilazin (Xylazınbıo 5 mg/kg) enjekte edilerek genel anestezi sağlanmıştır. Deney öncesi infeksiyon olmaması için yara oluşturmadan önce hayvanların dorsal bölgelerine batikon uygulanmıştır. Tüm hayvanların dorsal bölgesinde omurganın her iki yanında birbirine paralel olacak şekilde 6 mm punch biyopsi (Acu-Punch, Acuderm, USA) ile 6 adet tek tip tam kat eksizyonel yara oluşturulmuştur.



Resim 3.2. Yara modelinin oluşturulması

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

Hiperglisemik ratlar 9 gruba ayrılmıştır. DeneySEL diyabet modelinde hayvan kayıpları nedeniyle her bir grup n=8 olacak şekilde planlanmıştır. Toplamda 72 rat kullanılmıştır.

Hiperglisemik Kontrol Grubu

Deney grubu 1: Diyabet grubu herhangi bir uygulama yapılmamıştır(n=8).

Hiperglisemik Tedavisiz Gruplar

Deney grubu 2: Diyabet + Yara oluşturulduktan sonra 3.günde feda edilmiştir(n=8).

Deney grubu 3: Diyabet + Yara oluşturulduktan sonra 7. günde feda edilmiştir(n=8).

Hiperglisemik Karbopol Uygulanan Gruplar

Deney grubu 4: Diyabet + Yara oluşturulduktan sonra 3 gün boyunca Karbopol 974P ile topikal tedavi edilmiştir(n=8).

Deney grubu 5: Diyabet + Yara oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca Karbopol 974P ile topikal tedavi edilmiştir(n=8).

Hiperglisemik Rosmarinik Asit Ve Karvakrol Topikal Uygulanan Gruplar

Deney grubu 6: Diyabet + Yara oluşturulduktan sonra 3 gün boyunca %2 oranında karbopol 974P içinde Karvakrol ve Rosmarinik asit ile topikal tedavi edilmiştir (n=8).

Deney grubu 7: Diyabet + Yara oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca %2 oranında karbopol 974P içinde Karvakrol ve Rosmarinik asit ile topikal tedavi edilmiştir(n=8).

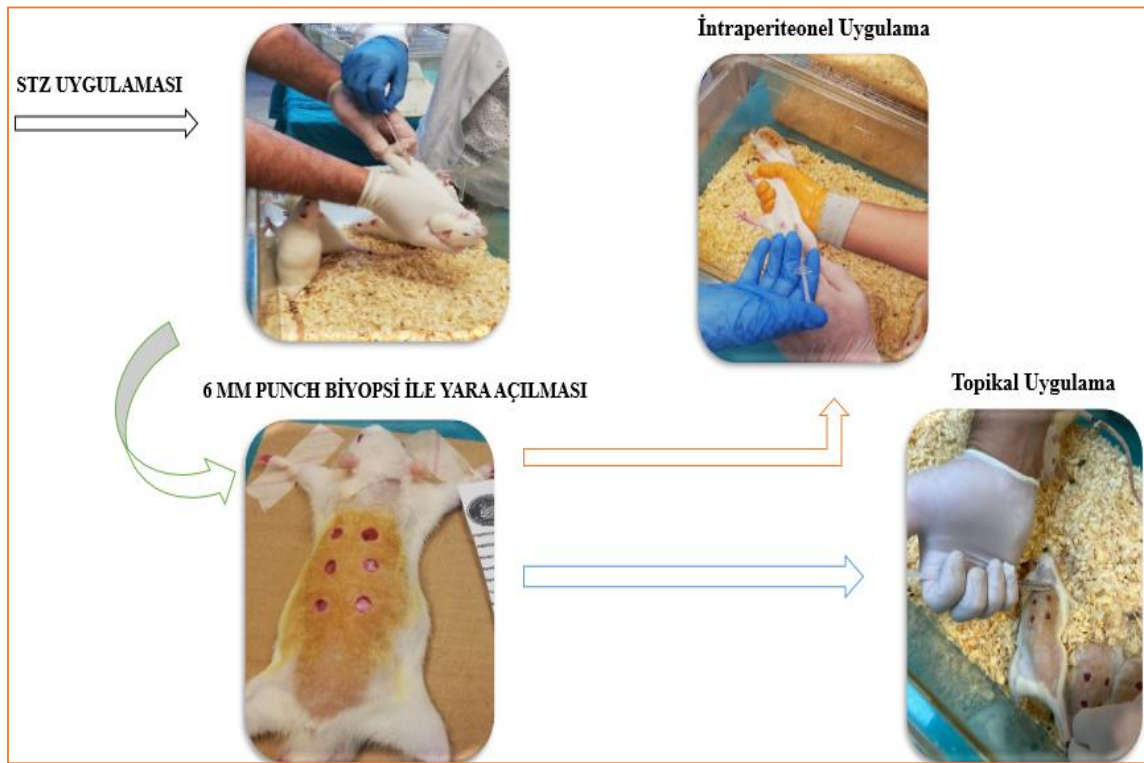
Hiperglisemik Rosmarinik Asit Ve Karvakrol I.P. Uygulanan Gruplar

Deney grubu 8: Diyabet + Yara oluşturulduktan sonra 3 gün boyunca Karvakrol ve Rosmarinik asit ı.p.yol ile verilerek tedavi edilmiştir (n=8).

Deney grubu 9: Diyabet + Yara oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca Karvakrol ve Rosmarinik asit ı.p. yol ile verilerek tedavi edilmiştir (n=8).

3.6. Tedavi ve Yara Dokularının Alınması

Gruplara topikal ve intraperitoneal olmak üzere iki farklı şekilde uygulama yapılmıştır (Şekil 3.1). Uygulamalar her gün aynı koşullarda ve 10.30-11.00 saatleri aralığında yapılmıştır. İ.p. uygulama günlük 10 mg/kg olacak şekilde hesaplanarak hayvanların kütlelerine göre uygulanmıştır. Hazırlanan jel formülasyonlar ise hayvanların yara bölgesine 3 günlük ve 7 günlük olarak, günde 10 mg/kg dozunda uygulanmıştır. Denekler uygulamaları izleyen 3 ve 7. günlerde anestezi altındayken kalplerinden kan çekilmek suretiyle feda edilmiştir ve yara dokuları çıkartılmıştır. Dokular sıvı azotun içerisine konularak alınmıştır ve analizler için - 80 °C’de saklanmıştır.



Resim 3.3. Streptozotosin uygulaması ile diyabet modelinin oluşturulması, Yara modelinin oluşturulması, Tedavi uygulaması

3.7. Yöntemler

3.7.1. Dokuda NO_x tayini

Dokulardaki NO_x konsantrasyonu Griess yöntemi ile çalışılmıştır. Kontrol ve yara dokuları, sodyum fosfat tamponu ile homojenize edildikten sonra, 3500 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. 200 µL süpernatana, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda VCl₃ eklenmiştir ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklenmiştir ve 37 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm'de okunmuştur [143].

3.7.2. Dokuda protein karbonil düzeylerinin ölçümü

Protein karbonil içeriği, Reznick ve Packer'in metoduna göre çalışılmıştır. Kontrol ve yara dokuları 1/10 oranında %1.17 KCl içeren PH 7.4, 0.1M fosfat tamponunda homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar +4°C'de 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. PC içeriğini tespit etmek için 2,4-Dinitrofenilhidrazinli (DNPH'lı) ve DNPH'siz olmak üzere 2 adet deney tüpü alınmıştır. Her iki tüpe de 0.5 ml homojenat eklenmiştir ve sonra DNPH'lı tüpe 2 ml DNPH, DNPH'siz tüpe de 2 ml HCl eklenmiştir. Tüpler 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her iki tüpe de 2.5 ml %20'lik TCA buz üzerinde eklenmiştir ve 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır ve pellet kısmıyla devam edilmiştir. Daha sonra %10'luk TCA'dan 2 ml eklenmiştir ve 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir, pellet kısmıyla devam edilmiştir. Daha sonra etil asetat/etanol 2 ml olmak üzere tüplere eklenmiştir ve 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pellet kısmıyla çalışmaya devam edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Guanidin HCl 2 tüpe'de 1 ml eklenmiştir ve 10 dakika vorteks yapılarak, absorbans değerleri guanidin HCl'e karşı 370 nm ve 280 nm'de okunmuştur [144].

3.7.3. Dokuda askorbik asit tayini

Roe ve Kuether' in Berger tarafından modifiye edilmiş metodu kullanılmıştır. Dokular buz üzerinde 9 kat perklorik asit (PCA) ile homojenize edilmiştir. Homojenat 15.000 g'de +4°C'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Bir tüpe 400 µl standart askorbik asit (AA) çözeltisi,

başka bir tüpe kör için 400 µl PCA çözeltisi ve örneklerin hazırlanacağı tüplere 400 µl süpernatant konulmuştur. Tüm tüplere 100 µl renk reaktifi eklenmiştir. 3 saat 37°C’de benmaride inkübe edilmiştir. Buz üzerindeyken 600 µl H₂SO₄ eklenmiştir. 45 dk 25°C’de etüvde inkübasyona bırakılmıştır ve 520 nm’de köre karşı okunmuştur. Dokulardaki AA konsantrasyonu mg/g doku olarak hesaplanmıştır [145].

3.7.4. Dokuda MMP-2 tayini

Dokuda MMP-2 yöntemi ELİSA ile çalışılmıştır. Öncelikle yara dokuları tartılmıştır ve 2.7 ml PBS tamponu eklenerek dokular homojenize edilmiştir. Daha sonra elde edilen homojenatlar 20 dk boyunca 3000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ise hizmet alımı yapılarak SunRed (China) Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) Rat ELISA Kit ile çalışılmıştır. Doku MMP-2 düzeyleri ng/ml olarak hesaplanmıştır.

3.7.5. Dokuda MMP-9 tayini

Dokuda MMP-9 yöntemi ELİSA ile çalışılmıştır. Öncelikle yara dokuları tartılmıştır ve 2.7 ml PBS tamponu eklenerek dokular homojenize edilmiştir. Daha sonra elde edilen homojenatlar 20 dk boyunca 3000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ise hizmet alımı yapılarak SunRed (China) Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) Rat ELISA Kit ile çalışılmıştır. Doku MMP-9 düzeyleri ng/ml olarak hesaplanmıştır.

3.7.6. Dokuda Kolajen tayini

Dokuda kolajen yöntemi ELİSA ile çalışılmıştır. Öncelikle yara dokuları tartılmıştır ve 2.7 ml PBS tamponu eklenerek dokular homojenize edilmiştir. Daha sonra elde edilen homojenatlar 20 dk boyunca 3000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ise hizmet alımı yapılarak SunRed (China) Collagen-1 Rat ELISA Kit ile çalışılmıştır. Doku COL-1 düzeyleri ng/ml olarak hesaplanmıştır.

3.7.7. Serumda TNF-α tayini

Serumda TNF-α tayini ELİSA ile çalışılmıştır. Ratlardan alınan kan örnekleri 3500 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen serumlar ependorflara aktararak sıvı azot içinde

dondurulup hazır hale getirilmiştir. Örnekler hizmet alımı yapılarak, SunRed (China) Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) kit ile çalışılmıştır. TNF- α düzeyleri ng/L cinsinden hesaplanmıştır.

3.7.8. Morfolojik inceleme

Yara kontraksiyonunu takip etmek için yara iyileşmesi süreci 0, 3 ve 7. günler fotoğraflanmıştır ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Bilgisayar ortamına aktardığımız fotoğraflar üzerinden ölçeğe göre yara alanları ImageJ software (NIH, USA) ile hesaplanmıştır ve yara kontraksiyon yüzdeleri aşağıdaki formülle belirlenmiştir (Eş 3.1).

$$\% \text{ N. gündeki kontraksiyon yüzdesi} = \frac{(0.\text{gündeki alan} - \text{N.gündeki açık alan})}{0.\text{gündeki alan}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.7.9. Histolojik inceleme

Histolojik incelemesi yapılmak üzere tüm deney gruplarının yara dokuları öncelikle %10 formaldehit içerisinde sabitlendikten sonra doku prosedürü uygulanmıştır. Doku işleme yapıldıktan sonra dokular parafine gömülmüştür. Parafine gömülen doku örnekleri Mikrotom aleti kullanılarak 6 μm kesitler halinde kesilmiştir. Ardından parçalar, genel yara analizi için hematoksilen ve eozin ile boyanmıştır ve dermis içindeki kollajen içeriği ve olgunlaşmanın değerlendirilmesi için daha sonra özel olarak Masson trikromu ile boyanmıştır. Boyanan parçalar ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Dokularda oluşan patolojilere göre; 1, 2 ve 3 olarak değerlendirmek üzere bir patoloji skor tablosu oluşturulmuştur.

3.8. İstatistiksel Analizlerin Değerlendirilmesi

Elde edilen bütün verilerin istatistiksel analizlerinde Graphpad Prism 8.4.2. programı kullanılmıştır. Tüm sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. $P \leq 0,05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Gruplar arasındaki karşılaştırma tek yönlü ANOVA ve ardından Post-Hoc Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir. $P \leq 0,05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Ötenazisi gerçekleştirilen ratlardan alınan yara dokularında; NO_x, Pk, MMP-2, MMP-9, Kolajen, AA seviyeleri ve serumda TNF- α seviyeleri biyokimyasal tayinler ile analiz edilmiştir. Yara dokusuna ait NO_x, Pk, MMP-2, MMP-9, Kolajen, AA seviyeleri ve serumda TNF- α seviyeleri Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6’de gösterilmiştir. Yara dokularındaki morfolojik değişimler, Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Yara dokularındaki histopatolojik değişimler ise Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

4.1. Yara Dokusu NO_x Düzeyleri

Çizelge 4.1. Rosmarinik Asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu NO_x düzeylerine etkisi

GRUPLAR	NO _x Değerleri (μ mol/g)
Kontrol Grup (n=8)	8,61 $\pm$ 0,92
3 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	14,26 $\pm$ 1,43*
7 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	21,08 $\pm$ 1,24*,a
3 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	9,30 $\pm$ 1,88 a,b
7 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	6,56 $\pm$ 0,72 a,b
3 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	3,71 $\pm$ 1,16*,a,b,c
7 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	2,43 $\pm$ 0,91*,a,b,c,d
3 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	3,57 $\pm$ 0,68*,a,b,c,d
7 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	3,48 $\pm$ 1,18*,a,b,c,d

*: Kontrol Grubu ile kıyaslandığında

a: Tedavisiz 3 günlük grup ile kıyaslandığında

b: Tedavisiz 7 günlük grup ile kıyaslandığında

c: 3 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

d: 7 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

e: 3 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

f: 7 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

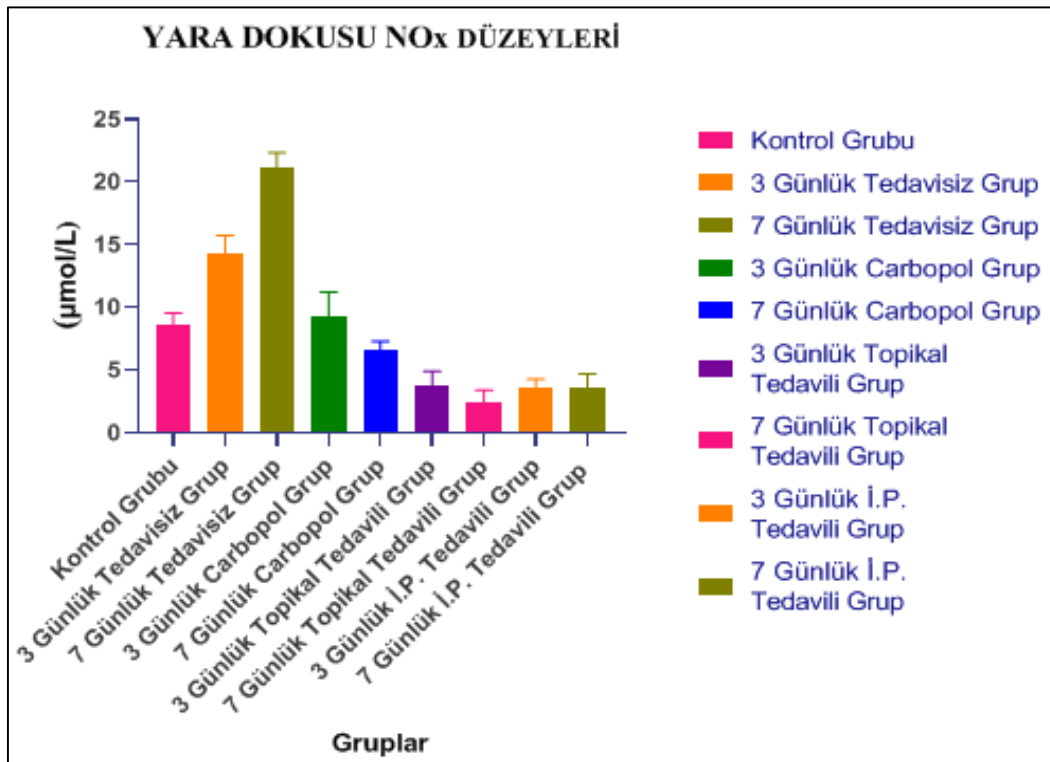
g: 3 günlük I.P. Tedavili grup ile kıyaslandığında

Yara dokusu Nox düzeyleri değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile tüm gruplar kıyaslandığında karbopol grupları dışında diğer tüm gruplar ile aralarında anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p<0,05).

Tedavisiz gruplar gün bazında kıyaslandığında 3 günlük tedavisiz grup ile 7 günlük tedavisiz grup arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Tedavisiz gruplar ile tedavi grupları kıyaslandığında; 3 günlük tedavisiz gruplar ve 7 günlük tedavisiz gruplar ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

3 günlük karbopol tedavili grup ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). 7 günlük karbopol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; 3 günlük topikal tedavili grup dışında diğer tedavi grupları ile aralarında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi arasında uygulama şekline göre kıyaslandığında; gruplar arasında istatistiksel anlamda anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Tedavisiz gruplar ile tedavi grupları kıyaslandığında; 3 ve 7 günlük tedavisiz gruplar ile 3 ve 7 günlük topikal ve i.p. tedavili tüm gruplar arasında anlamlı derecede bir farklılık vardır ve özellikle 7 günlük topikal tedavili grupta NOx anlamlı derecede bir düşüş göstermiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.1. Yara dokusu NO_x düzeyleri

4.2. Yara Dokusu Pk Düzeyleri

Çizelge 4.2. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu Pk düzeylerine etkisi

GRUPLAR	Pk Değerleri (nmol/mL)
Kontrol Grup (n=8)	2,78±0,89
3 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	9,76±0,65*
7 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	11,76±1,95*
3 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	12,48±1,74*
7 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	8,65±0,89*,c
3 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	5,74±1,67 a,b,c,d
7 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	2,98±1,21 a,b,c,d,e
3 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	1,59±1,16 a,b,c,d,e
7 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	4,00±0,96 a,b,c,d

*: Kontrol Grubu ile kıyaslandığında

a: Tedavisiz 3 günlük grup ile kıyaslandığında

b: Tedavisiz 7 günlük grup ile kıyaslandığında

c: 3 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

d: 7 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

e: 3 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

f: 7 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

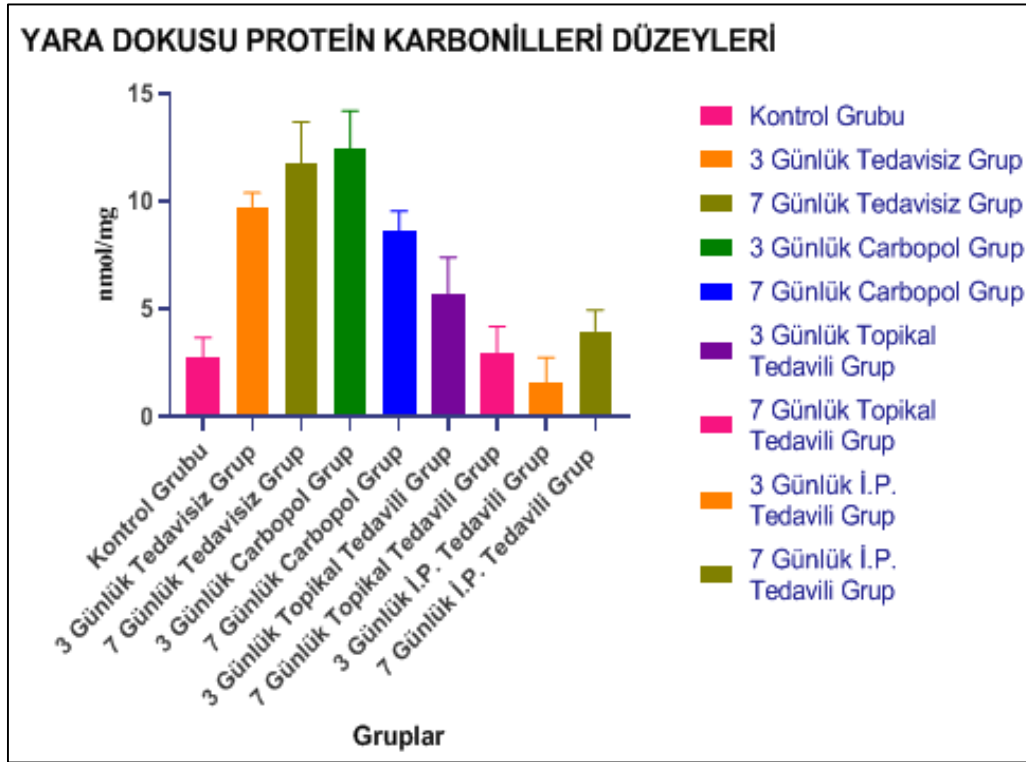
g: 3 günlük I.P. Tedavili grup ile kıyaslandığında

Kontrol grubu ile tüm gruplar kıyaslandığında; 3 ve 7 günlük topikal ve ı.p. tedavili gruplar dışında diğer gruplar ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tedavisiz gruplar ile tedavi grupları kıyaslandığında; 3 günlük tedavisiz grup ile 3 ve 7 günlük karbopol tedavili gruplar dışında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). 7 günlük tedavisiz grup ile 3 ve 7 günlük topikal tedavili ve 3-7 günlük ı.p. tedavili gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Karbopol uygulamalı gruplar ile diğer gruplar kıyaslandığında; 3 günlük karbopol uygulamalı grup ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmektedir ($p<0,05$). 7 günlük karbopol uygulamalı grup ile tüm topikal ve ı.p. tedavili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Tedavi grupları kendi içinde kıyaslandığında; 3 günlük topikal tedavili grup ile 7 günlük topikal tedavili grup ve 3-7 günlük i.p. tedavili gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ancak 7 günlük i.p. tedavili grupla aralarında istatistiksel anlamda fark yoktur ($p>0,05$). 7 günlük topikal tedavili grup ile diğer tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$).

Tedavisiz 3 ve 7 günlük gruplarla tedavi grupları kıyaslandığında tedavi edilen gruplarda Pk değerlerinde anlamlı derecede bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Özellikle 3 günlük i.p. tedavili grupta uygulama yapılmayan gruplara göre Pk düzeyinde istatistiksel olarak bir azalma gözlemlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.2. Yara dokusu Pk düzeyleri

4.3. Yara Dokusu MMP-2 Düzeyleri

Çizelge 4.3. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu MMP-2 ve MMP-9 düzeylerine etkisi

GRUPLAR	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)
Kontrol Grup (n=8)	7,50±1,05	48,20±4,17
3 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	12,47±1,86*	57,03±2,40*
7 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	8,89±0,90	60,06±1,66*
3 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	9,14±2,99	42,36±1,28 ^{a, b}
7 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	9,66±3,40	46,36±2,03 ^{a, b}
3 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	10,05±1,68	56,16±3,03 ^{*, c, d}
7 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	9,09±2,51	48,49±2,25 ^{a, b, e}
3 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	8,50±2,27	47,96±3,95 ^{a, b, e}
7 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	9,01±1,50	40,64±2,42 ^{*, a, b, e, f, g}

*: Kontrol Grubu ile kıyaslandığında

a: Tedavisiz 3 günlük grup ile kıyaslandığında

b: Tedavisiz 7 günlük grup ile kıyaslandığında

c: 3 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

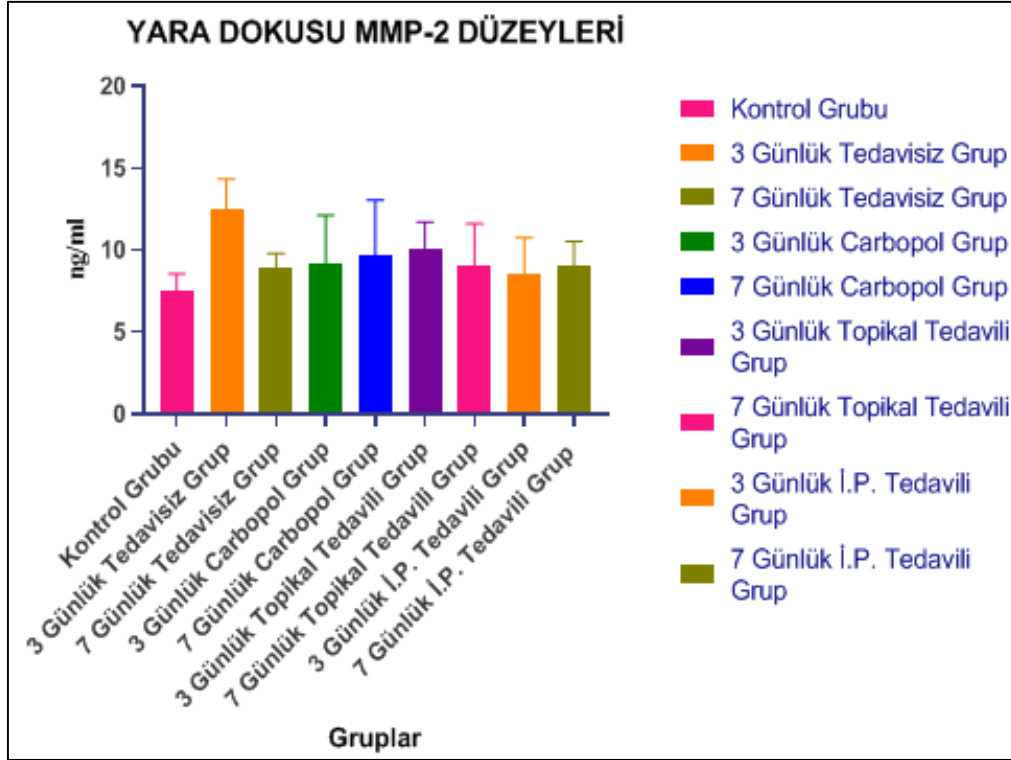
d: 7 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

e: 3 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

f: 7 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

g: 3 günlük I.P. Tedavili grup ile kıyaslandığında

Yara dokusu MMP-2 düzeyleri değerlendirildiğinde; Kontrol grubu ile tüm gruplar kıyaslandığında, 3 günlük tedavisiz grup arasında istatistiksel anlamda anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). Tüm gruplar kendi aralarında kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.3. Yara dokusu MMP-2 düzeyleri

4.4. Yara Dokusu MMP-9 Düzeyleri

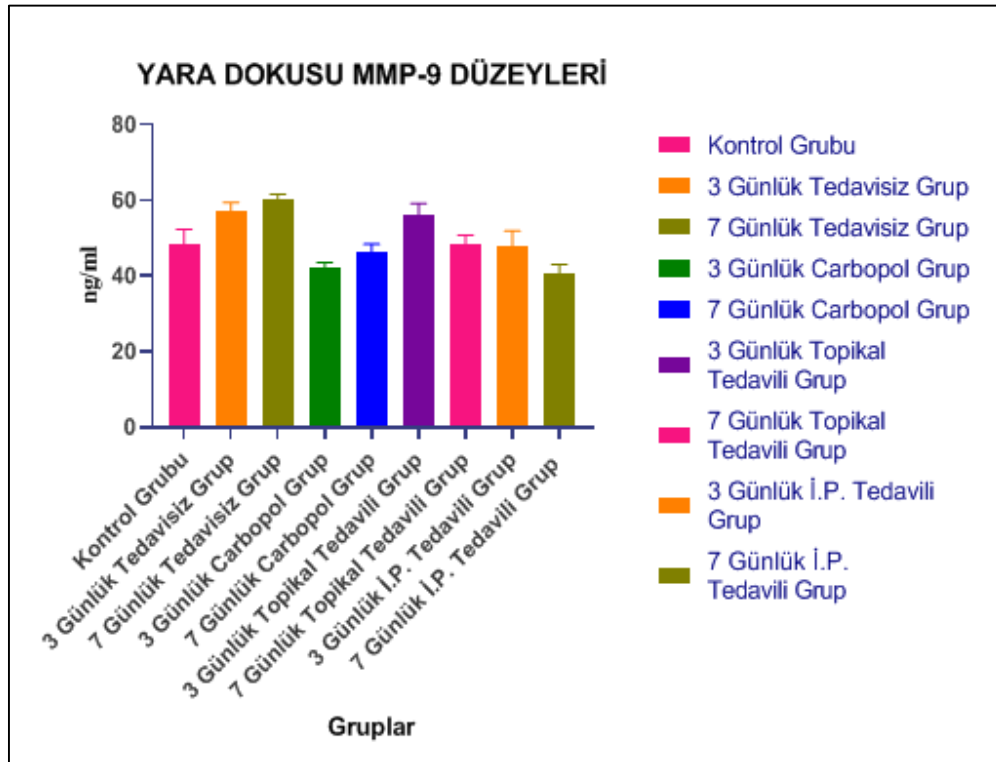
Yara dokusu MMP-9 düzeyleri değerlendirildiğinde; Kontrol grubu ile tüm gruplar kıyaslandığında, tedavisiz gruplar (3 ve 7 günlük), 3 günlük topikal tedavili grup ve 7 günlük i.p. tedavili gruplar arasında istatistiksel anlamda farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tedavisiz gruplar kendi aralarında kıyaslandığında; 7 günlük tedavisiz grup MMP-9 düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Tedavili ve tedavisiz gruplar kendi aralarında kıyaslandığında; 3 günlük tedavisiz gruba kıyasla 3 günlük karbopol tedavili grup ile 3 günlük i.p. tedavili grup MMP-9 düzeylerinde azalma belirlenmiştir ($p<0,05$).

3 günlük tedavisiz grup ile 3 günlük topikal tedavili grup karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). 7 günlük tedavisiz grup ile 7 gün tedavili tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlenmiş olup MMP-9 düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Uygulama şekline göre tedavili gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, 3 günlük topikal grup ile tüm tedavi grupları arasında anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$). 7 günlük topikal tedavili grup ile 7 günlük i.p. tedavili grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Gruplar arasında en düşük MMP-9 seviyesi 7 günlük i.p. tedavili grupta olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.4. Yara dokusu MMP-9 düzeyleri

4.5. Yara Dokusu Kolajen Düzeyleri

Yara dokusu kolajen düzeyleri değerlendirildiğinde; Kontrol grubu ile tüm gruplar karşılaştırıldığında 3 günlük topikal grup ve 7 günlük i.p. grup dışındaki diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tedavisiz gruplar gün bazında karşılaştırıldığında, tedavisiz 7 günlük grup Col-1 düzeylerinin 3 günlük tedavisiz col-1 düzeylerine göre istatistiksel olarak arttığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.4. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu kolajen düzeylerine etkisi

GRUPLAR	COL-1 (ng/L)
Kontrol Grup (n=8)	345,73±3,46
3 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	236,27±2,69*
7 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	272,85±5,64*, a
3 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	269,96±7,15*, a
7 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	268,63±7,59*, a
3 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	346,12±7,02 a, b, c, d
7 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	382,73±5,13*, a, b, c, d, e
3 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	312,72±4,18*, a, b, c, d, e, f
7 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	352,25±3,71 a, b, c, d, f, g

*: Kontrol Grubu ile kıyaslandığında

a: Tedavisiz 3 günlük grup ile kıyaslandığında

b: Tedavisiz 7 günlük grup ile kıyaslandığında

c: 3 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

d: 7 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

e: 3 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

f: 7 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

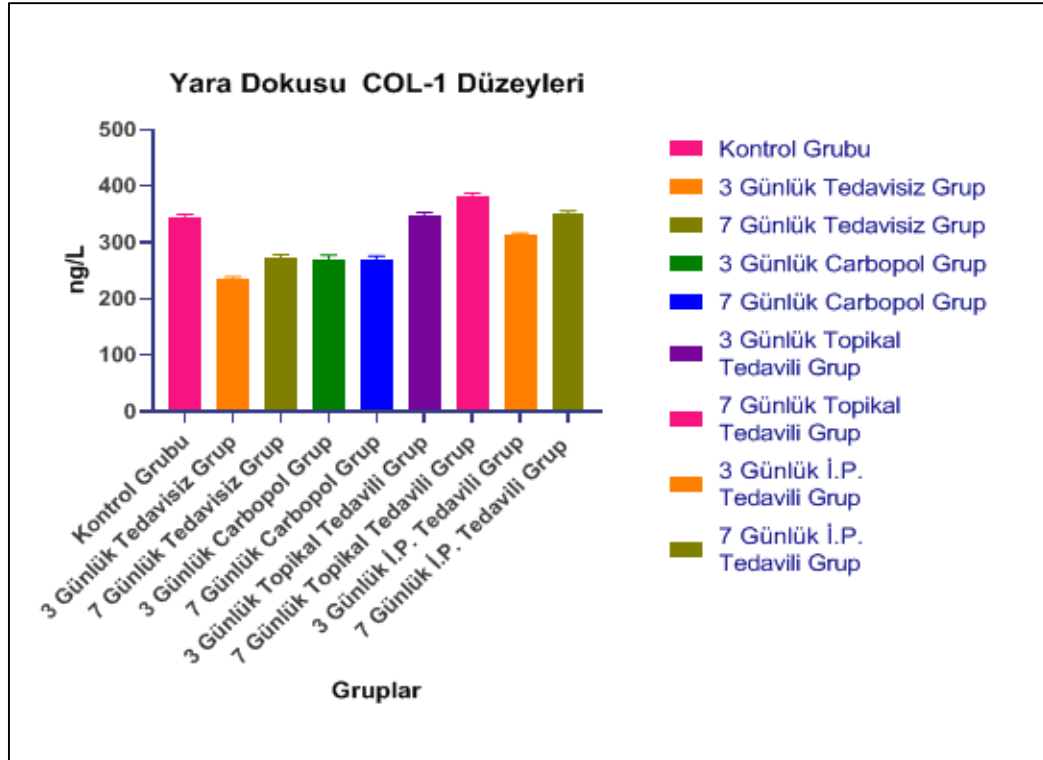
g: 3 günlük I.P. Tedavili grup ile kıyaslandığında

Tedavisiz gruplar ile tedavi grupları kıyaslandığında; 3 günlük tedavisiz grup ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmektedir ($p<0,05$). 7 günlük tedavisiz grup ile karbopol uygulanan gruplar arasında (3 ve 7 günlük) anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$), 7 günlük tedavisiz grup ile tedavi grupları ile arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuş olup, Col-1 düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

3 günlük karbopol grubu diğer gruplarla kıyaslandığında; 7 günlük karbopol uygulamalı grup ile aralarında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiş olup ($p>0,05$), topikal ve i.p. tedavili gruplar ile arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). 7 günlük karbopol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tedavi grupları kendi aralarında uygulama şekline göre kıyaslama yapıldığında, 3 günlük topikal tedavili grup ile 7 günlük topikal tedavili grup arasında anlamlı farklılık

gözlemlenmektedir ($p<0,05$). 3 günlük i.p. tedavili grup ile 7 günlük i.p. tedavili grup kendi içinde kıyaslandığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olup 7 günlük grup Col-1 düzeylerinde artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Tüm tedavi gruplarına bakıldığında tedavisiz gruplara göre en önemli artış istatistiksel anlamda 7 günlük topikal tedavili grupta gözlemlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.5. Yara dokusu kolajen düzeyleri

4.6. Yara Dokusu AA Düzeyleri

Kontrol grubu ile tüm gruplar kıyaslandığında; 3 ve 7 günlük tedavi grupları ve 7 günlük tedavisiz grup ile anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Gün bazında kıyaslandığında 3 günlük tedavisiz grup ile 7 günlük tedavisiz grup arasında anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). 3 günlük tedavisiz grup ile tedavi grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). 7 günlük tedavisiz grup ile tüm gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.5. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara dokusu AA düzeylerine etkisi

GRUPLAR	AA Değerleri (mg/g)
Kontrol Grup (n=8)	2,93±0,27
3 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	3,58±0,58
7 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	4,38±0,45*
3 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	3,11±0,34 ^b
7 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	2,3±0,14 ^{a,b}
3 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	1,36±0,30 ^{*,a,b,c}
7 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	1,11±0,06 ^{*,a,b,c,d}
3 Günlük İ.P. Tedavili Grup (n=8)	1,57±0,22 ^{*,a,b,c}
7 Günlük İ.P. Tedavili Grup (n=8)	1,01±0,09 ^{*,a,b,c,d}

*: Kontrol Grubu ile kıyaslandığında

a: Tedavisiz 3 günlük grup ile kıyaslandığında

b: Tedavisiz 7 günlük grup ile kıyaslandığında

c: 3 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

d: 7 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

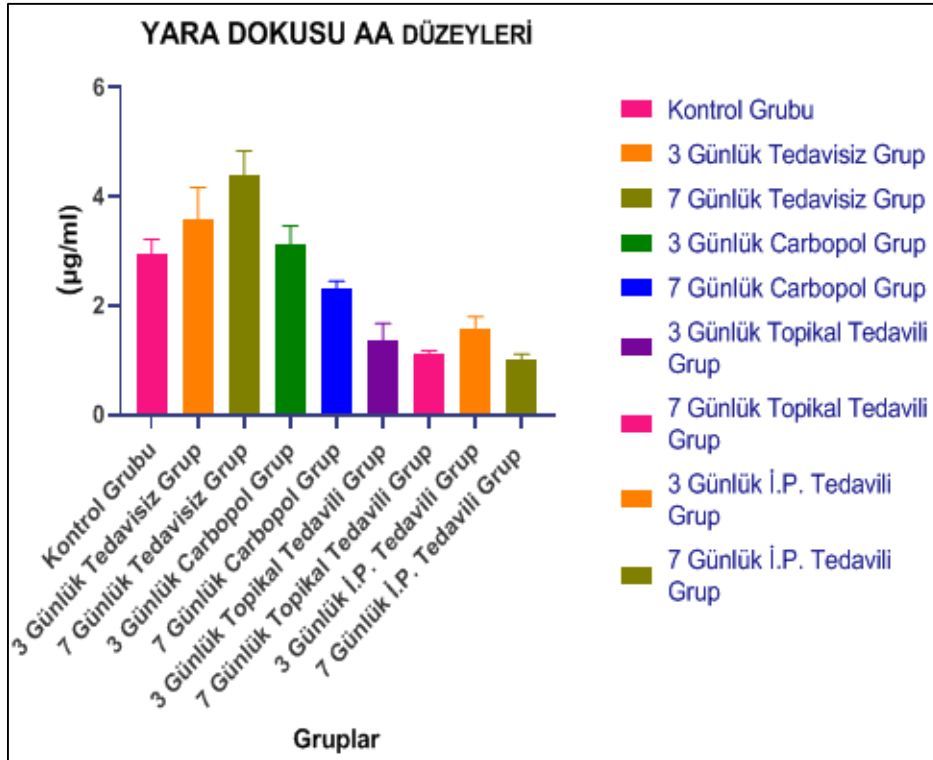
e: 3 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

f: 7 günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

g: 3 günlük İ.P. Tedavili grup ile kıyaslandığında

3 günlük karbopol tedavili grup ile tedavi grupları kıyaslandığında aralarında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). 7 günlük karbopol tedavili grup ile tedavi grupları kıyaslandığında 7 günlük topikal tedavili ve 7 günlük ı.p. tedavili grup arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Uygulama şekline göre tedavi grupları kıyaslandığında topikal tedavi (3 ve 7 günlük) ve ı.p. tedavi (3 ve 7 günlük) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.6. Yara dokusu AA düzeyleri

4.7. Serum TNF-a Düzeyleri

Serum TNF- a düzeyleri değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile tüm gruplar kıyaslandığında, 7 günlük karbopol grubu dışında aralarında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Tedavisiz gruplar kendi aralarında gün bazında kıyaslandığında, tedavisiz 7 günlük grup TNF-a düzeyleri ile 3 günlük tedavisiz TNF-a düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0.05$).

Tedavisiz gruplar ile tedavi grupları kıyaslandığında; 3 günlük tedavisiz grup ile 3 günlük karbopol grubu arasında anlamlı fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Ancak diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmektedir ($p < 0.05$). 7 günlük tedavisiz grubun 3 günlük karbopol tedavili grup dışında diğer gruplar ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.6. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının serum TNF-a düzeylerine etkisi

GRUPLAR	TNF- α (ng/L)
Kontrol Grup (n=8)	156,53 $\pm$ 5,21
3 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	187,34 $\pm$ 5,20*
7 Günlük Tedavisiz Grup (n=8)	185,02 $\pm$ 7,23*
3 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	174,61 $\pm$ 6,64*
7 Günlük Karbopol Tedavili Grup (n=8)	169,14 $\pm$ 6,21 ^{a, b}
3 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	110,58 $\pm$ 4,23*, ^{a, b, c, d}
7 Günlük Topikal Tedavili Grup (n=8)	119,42 $\pm$ 1,86 *, ^{a, b, c, d}
3 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	127,56 $\pm$ 5,48*, ^{a, b, c, d, e}
7 Günlük I.P. Tedavili Grup (n=8)	117,38 $\pm$ 6,82*, ^{a, b, c, d}

*: Kontrol Grubu ile kıyaslandığında

a: Tedavisiz 3 günlük grup ile kıyaslandığında

b: Tedavisiz 7 günlük grup ile kıyaslandığında

c: 3 Günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

d: 7 günlük Karbopol grup ile kıyaslandığında

e: 3 Günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

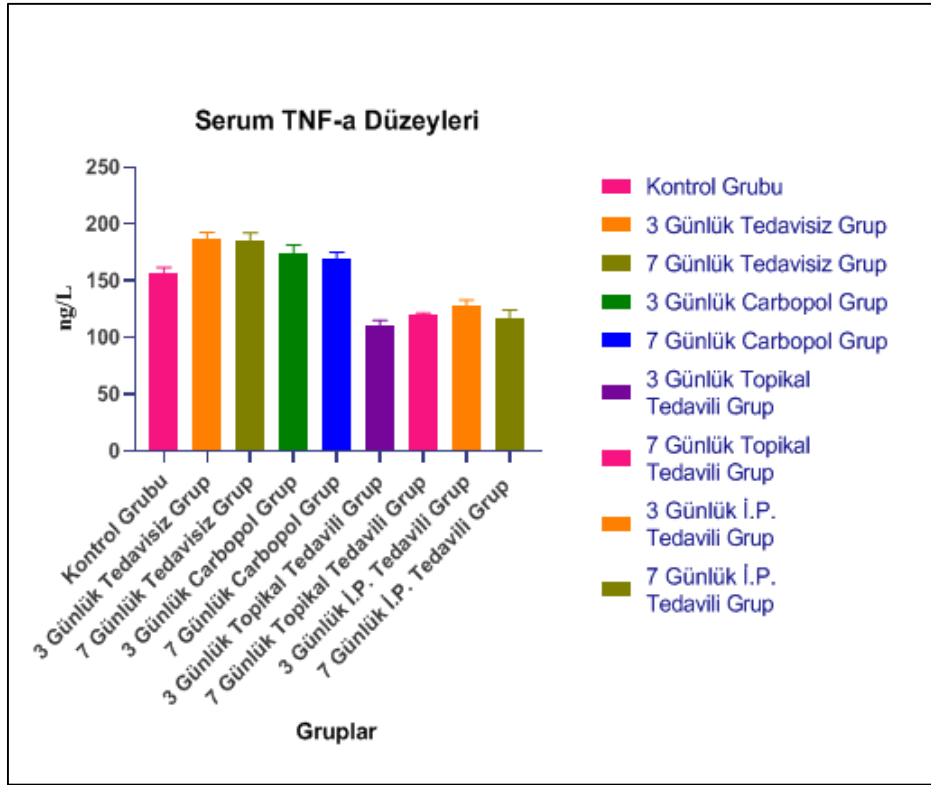
f: 7 Günlük Topikal Tedavili grup ile kıyaslandığında

g: 3 Günlük I.P. Tedavili grup ile kıyaslandığında

3 günlük karbopol grubu diğer gruplarla kıyaslandığında, 7 günlük karbopol tedavili grup ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte ($p>0.05$), diğer tedavi grupları ile arasında anlamlı fark bulunarak TNF- α düzeylerinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Aynı zamanda 7 günlük karbopol grubu ile diğer tedavi grupları arasında da istatistiksel anlamda bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Tedavi grupları kendi aralarında uygulama şekline göre kıyaslandığında, 3 günlük topikal tedavili grup ile 3 günlük ı.p. tedavili gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). 7 günlük topikal tedavili grup ile 7 günlük ı.p. tedavili gruplar arasında ise istatistiksel anlamda belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0.05$).

Tedavi grupları arasında tedavisiz gruplara kıyasla en düşük TNF- α seviyesinin 3 günlük topikal tedavili grupta olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7. Serum TNF- α düzeyleri

4.8. Morfolojik İnceleme Sonuçları

Fenolik bileşiklerin yara iyileşmesi üzerindeki aktivitelerini gösteren morfolojik inceleme sonuçları, yara alanları ve yara kontraksiyon (kapanma) yüzdeleri Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara iyileşmesi üzerine morfolojik etkileri

GRUP	GÜNLER	YARA ALANI (mm ²)	YARA KAPANMA ORANI
TEDAVİSİZ	0. Gün	26,85±1,89	-
	3. Gün	20,59±1,81 ^a	23,31%
	7. Gün	16,32±1,15 ^a	39,21%
KARBOPOL	0. Gün	28,28±0,71	-
	3. Gün	20,37±0,85 ^{a, c}	27,95%
	7. Gün	17,66±0,56 ^a	37,54%
TOPIKAL	0. Gün	29,40±1,62	-
	3. Gün	15,97±0,87 ^{a, c, d}	45,68%
	7. Gün	8,06±1,33 ^{a, b, c, d}	72,58%
I.P.	0. Gün	27,48±0,48	-
	3. Gün	14,86±0,95 ^{a, c, d}	45,92%
	7. Gün	8,93±0,65 ^{a, b, c, d}	67,50%

a: Tedavisiz 0. Gün ile kıyaslandığında

b: Grup içi 3. Gün ile kıyaslandığında

c: Aynı gün tedavisiz grup ile kıyaslandığında

d: Aynı gün karbopol tedavi uygulamasıyla kıyaslandığında

Yara alanları kıyaslandığında; tedavisiz 0. gün ile tüm grupların 3 ve 7 günlükleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($P<0,001$). 3 günlük tedavi grupları kendi içlerinde kıyaslandığında aralarında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($P<0,001$). 3 günlük tedavi gruplarının yara alanlarında tedavisiz 3 günlük gruba göre azalma gözlemlenmiştir. 3 günlük karbopol tedavili grup ile diğer gruplar kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark vardır ($P<0,001$).

RA ve CAR ekstraktlarının uygulandığı gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde ise yara alanları 7. günlerde 3. günlere göre anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Topikal ve ı.p. tedavili gruplarda karbopole oranla yara alanlarında daha çok küçülme gözlemlenmiştir. Tüm gruplar kendi içinde kıyaslandığında; tedavisiz gruba kıyasla yara alanında en belirgin kapanma 7 günlük topikal tedavili grupta gözlemlenmiştir.

4.9. Histolojik İnceleme Sonuçları

Tüm gruplardan alınan yara dokularının iki farklı boyama yöntemi kullanılarak yapılan histolojik değerlendirmesi puanlama sistemi ile birlikte Çizelge 4.8, Çizelge 4.9, Resim 4.1 ve Resim 4.2’ de açıkça gösterilmiştir.

Yapılan değerlendirmeler neticesinde, kontrol grubunda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır (Resim 4.1 ve 4.2).

Tedavi görmeyen 3 ve 7 günlük grupların kesitleri incelendiğinde, 3 günlük tedavisiz grupta yüksek derece inflamasyon ve nekroz aynı zamanda kısmi bir yeniden epitelizasyon gözlemlenmiştir. 7 günlük tedavisiz grupta 3 günlük tedavisiye kıyasla daha hafif bir nekroz gözlemlenmiştir. Karbopol ile tedavili gruplara bakıldığında, tedavisiz gruplara kıyasla daha hafif bir inflamasyon gözlemlenmiş ancak epitelizasyon, granülasyon ve yeniden şekillenme açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Tedavi gruplarına bakıldığında, 3 günlük topikal ve 3 günlük i.p. tedavili grup arasında yeniden epitelizasyon, keratinizasyon, granülasyon, yeniden şekillenme ve inflamasyon açısından belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. 7 günlük tedavi gruplarının 3 günlük tedavi gruplarına göre daha ileri epitelizasyona sahip olduğu görülmüştür. Tedavisiz gruplardaki yaralarda zayıf biçimde oluşmuş granülasyon dokusunun aksine tedavi gruplarında, özellikle de 7 günlük topikal tedavi grubunda ileri epitelizasyon ile birlikte yüksek düzeyde hücresel granülasyon dokusu görülmüştür. Tedavi gruplarında yara alanını büyük derecede kaplayan bir keratinizasyon, tam kalınlıkta bir epidermal rejenerasyon, daha az skar izi ve yeniden epitelizasyon gözlemlenmiştir. Tedavi gruplarının aksine tedavisiz gruplarda düzensiz bir epidermal katman ve buna bağlı olarak gecikmiş bir yeniden epitelizasyon görülmüştür. Masson trikom boyama görüntülerinde (Şekil 4.2) görüldüğü gibi 3 günlük tedavi gruplarına kıyasla 7 günlük tedavi gruplarında daha belirgin ve yoğun organize olmuş kollajen liflerin varlığı gözükmemektedir.

Diğer gruplara kıyasla yaranın iyileşmesinde ve cilt dokusunun yeniden düzenlenmesinde en etkili grubun 7 günlük RA+CAR topikal tedavili grup olduğu gözükmemektedir. Diğer gruplara kıyasla sağlam bir deri, normal bir epidermal kalınlıkla birlikte gelen yeniden epitelizasyon süreci ve yeniden şekillenme görmekteyiz.

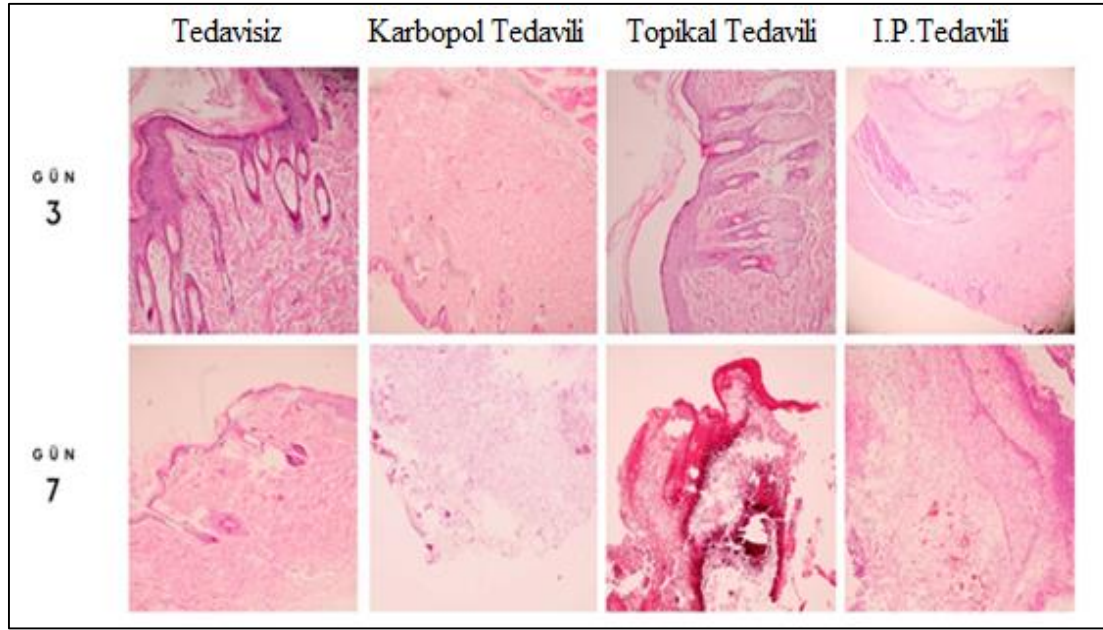
Çizelge 4.8. Rosmarinik asit ve Karvakrol uygulamasının yara iyileşmesi üzerine histopatolojik etkileri

Örnek (Doku)	Yeniden Epitelizasyon	Epidermal kalınlık	Keratinizasyon	Granülasyon	Yeniden Şekillenme	Yara izi yükselme indeksi	İnflamasyon ve Nekroz
Kontrol grubu	2	2	2	2	2	2	1
3 günlük tedavisiz grup	1	0	0	1	0	0	3
7 günlük tedavisiz grup	2	0	2	1	2	2	1
3 günlük karbopol tedavili grup	1	0	0	0	1	0	2
7 günlük karbopol tedavili grup	2	2	2	1	1	2	2
RA+CAR 3 gün topikal tedavili grup	1	0	0	1	1	0	1
RA+CAR 7 gün topikal tedavili grup	2	2	2	2	1	2	3
RA+CAR 3 gün İ.P. tedavili grup	1	0	0	1	1	0	3
RA+CAR 7 gün İ.P. tedavili grup	2	1	2	1	1	1	2

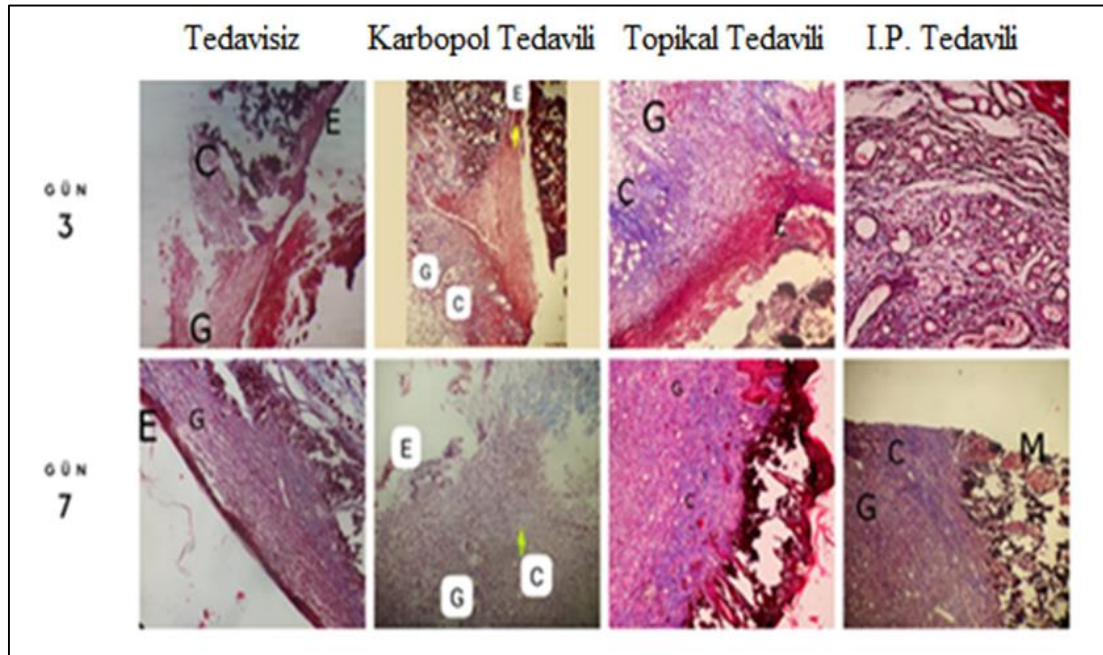
RA: Rosmarinik asit; CAR: Karvakrol

Çizelge 4.9. Histoloji Puanlama Sistemi: Parametrelerin Açıklaması

Parametre	Tanım	Kriter	Skor
Yeniden epitelizasyon	Tamamı	95–100%	2
	Kısmi	<95%; >0%	1
	Hiçbiri	0%	0
Epidermal kalınlık	Normal	95–105%	2
	Hipertrofi	>105%	1
	Hipoplazi	<95%	0
Keratinizasyon	Evet	Gevşek bir şekilde tutunmuş /kaybolmuş katmanlar veya kalın parakeratotik	2
	Hayır	Hiçbiri	0
Granülasyon	Sağlam deri	Dermal katman sağlam, iyileşmeyle uyumlu granüler sızıntı yok	2
	Kalın	>100 µm	1
	İnce	<100 µm	0
Yeniden Şekillenme	Tamamı	✓ Dermal Beyaz yağ dokusu ✓ Cilt ekleri ✓ Panniculus carnosus rejenerasyonu	2
	Kısmi	✓ Kolajen birikimi ✓ Dermal Beyaz yağ dokusu	1
	Hiçbiri	Kanıt yok	0
Yara izi yükselme indeksi	Normal	95–105%	2
	Hipertrofi	>105%	1
	Hipoplazi	<95%	0
İnflamasyon ve nekroz	Hiçbiri		0
	Hafif	Beyaz kan hücreleri matrisinin yeniden şekillenmesi	1
	Kısmi		2
	Yüksek		3



Resim 4.1. Hematoksilen-eozin boyama görüntüleri



Resim 4.2. Masson trikom boyama görüntüleri (C; Kolajen, E; Epitelizasyon
G; Granülasyon dokusu, M; kas)

5. TARTIŞMA

Çeşitli nedenlerden dolayı meydana gelen yaralar oluştuktan sonra eski haline dönebilmesi için iyileşme süreci hızlıca başlamaktadır. Yara iyileşme sürecinin gecikmesi ve iyileşmeyen yaraların oluşması insan hayatını olumsuz etkilemektedir [1]. İyileşme sürecini etkileyen hastaya ait sistemik faktörler arasında olan diyabet ve onun en önemli komplikasyonu olan diyabetik yaralarda sağlık sistemi üzerinde ciddi bir yük olmaktadır. Hiperglisemi ile birlikte artan ROS, oksidatif stresinde artmasına neden olarak yara iyileşmesini olumsuz etkilemektedir [13, 14, 22, 23]. Özellikle kronik yaralarda yüksek derecede ROS aktivitesi yara iyileşme sürecinin normal akışını bozmaktadır. Bu nedenle ROS'nin düşük ve yüksek seviyeleri arasındaki dengenin korunması yara iyileşmesinin sağlıklı ilerlemesi için çok önemlidir [117, 146, 147]. Son yıllarda tıbbi tedavilere alternatif olarak doğal şifalı bitkiler kullanılmaktadır. Özellikle kronik yaraların tedavilerinde doğal fenolik bileşikler sık tercih edilmektedir [28]. Karvakrol yapısında bulunan hidroksil varlığı ile süperoksit radikallerini ve hidrojen peroksiti başarılı bir şekilde temizleyerek endojen antioksidanların aktivitesini artırma yeteneğine sahip güçlü bir bileşiktir [148-150]. Rosmarinik asit, ROS temizleme aktivitesini sağlayan 4 fenolik hidrojenden; Oksidan maddelere karşı koruma sağlamak için uygun polariteyi üreten 2 katekol kısmından oluşmaktadır. RA'in yapısında bulunan O-difenol dimeri sayesinde özellikle hidroksil radikalının başarılı bir şekilde temizlenmesini sağlamaktadır [151-155].

Bu çalışmada, doğal antioksidan aktiviteye sahip iki farklı fenolik bileşik olan Karvakrol ve Rosmarinik asit kullanılarak, diyabetik yaraların iyileşme sürecinde meydana gelen oksidatif olaylar üzerine bu bileşenlerin sinerjistik etki gösterip göstermediklerini yara dokularında NOx, Pk, MMP-2, MMP-9, Kolajen, AA ve TNF- α düzeyleri araştırılarak gösterilmesi ve dokularda meydana gelen histolojik ve morfolojik değişimlerin aydınlatılması amaçlanmıştır.

NOx , yara iyileşmesinde aktif rol alan bir gaz ileticidir. NOx sentazları 3 farklı izoformdan meydana gelmektedir [156, 157]. Bu gruplar endotelial (eNOS), nöronal (nNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS) içermektedir. İzozimlerden ikisi, nNOS ve eNOS, yapısal olarak eksprese edilmektedir. Bu izozimler düşük konstrasyonlarda NO üretmektedir. Üçüncü izozim olan iNOS, akut inflamatuvar uyaranlara cevap olarak üretilen,

uyarılabilen bir izoformdur [156, 158, 159]. iNOS, yara iyileşmesi sırasında salınır ve akut inflamasyonu düzenler. NO, inflamatuvar faz sırasında iNOS tarafından daha yüksek seviyelerde üretilmektedir; daha düşük eNOS kaynaklı NO seviyeleri, proliferatif ve olgunlaşma aşamaları sırasında oluşmaktadır [156, 160].

Yara iyileşmesinin erken evrelerinde iNOS ekspresyonu yüksektir ancak iyileşmenin sonraki evrelerinde iNOS aktivitesinin down regülasyonu hakkındaki literatür kısıtlıdır. Literatür ışığında iNOS aktivitesinin sitokin sinyalleme veya inflamatuvar yanıt ile aşağı regülasyonu mümkündür [161, 162]. iNOS yoluyla salınan NO'nun yara iyileşmesindeki aktivitesine dair kanıtlar artmaktadır. Yarada büyük miktarlarda NO sentezi yara iyileşmesini bozar ve yara iyileşmesinin sağlıklı ilerlemesi için NO seviyesinin down regülasyonu gereklidir [161].

Çalışmamızda diyabetik rat dokularındaki NOx seviyelerinde, tedavisiz gruplar ile tedavi grupları kıyaslandığında; 3 ve 7 günlük tedavisiz gruplar ile tüm tedavi grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Tedavi uygulanmayan gruplara göre özellikle 7 günlük topikal tedavi grubunda NOx düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$).

Zhao ve diğerleri (2018) yapmış oldukları çalışmada, DSS kaynaklı kolit modelleri üzerinde, RA'in NO ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu hafiflettiğini gözlemlemiştir. Ek olarak, IL-6, IL-1 β ve iNOS'un mRNA seviyelerinin de azaldığını gözlemlemiştir [163]. Bir başka çalışmada, Ou ve diğerleri (2018), iki biberiye bileşeni olan RA ve karnosik asidin diyabetik sıçanlarda koruyucu etkilerini değerlendirmişlerdir. RA ve Karnosik asit ayrıca malondialdehit ve AGE'lerin oluşumunu azaltarak anti-oksidatif etki göstermiştir. Ayrıca karaciğer, kalp ve böbrek örneklerinde hem RA hem de Karnosik asitin NO düzeyini ve iNOS aktivitesini olumlu yönde etkileyebileceği bulunmuştur [164].

Sadeghi ve diğerleri (2020) yapmış oldukları çalışmada, lipid peroksidasyonunda ve NO seviyelerinde RA aracılı düşüş olduğunu ve antioksidan/oksidan dengesinin yeniden sağlandığını göstermiştir. RA, lipid peroksidasyonunu ve NO üretimini önlemiştir [165]. Guimarães ve diğerleri (2010) yapmış oldukları çalışmada, karvakrolün antioksidan ve antinosiseptif etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır. CAR, nitrit üretimini azaltmıştır, bu da NO temizleme maddesi olarak potansiyel bir rol oynadığını göstermiştir.

Dolayısıyla CAR, hem ROS'u hem de NO'yu ayrı ayrı temizleme yeteneği sayesinde peroksinitrit oluşumunu engelleyebilmektedir [166]. Kuo ve diğerleri (2017) yapmış oldukları çalışmada, karvakrolün deneysel bir sıçan periodontitis modelinde periodontal hasar üzerindeki iyileştirici etkisini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Karvakrol grubu iNOS mRNA'ların seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır [167]. Xiao ve diğerleri (2018) yapmış oldukları çalışmada, IL-1 β ile uyarılmış insan kondrositlerinde karvakrolün inflamasyona karşı koruyucu etkilerini araştırmayı amaçlamıştır. Sonuçlar, karvakrolün NO üretimini inhibe ettiğini ve indüklenabilir NO sentaz (iNOS) ekspresyonunu azalttığını göstermiştir [168].

Khan ve diğerlerinin (2019) yapmış oldukları çalışmada, alkole bağlı yükselen NO seviyeleri karvakrol tedavisi ile önemli düzeyde azalmıştır ve iNOS, TNF- α , eNOS, nNOS seviyeleri doza bağlı olarak pozitif kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır [169]. Bir başka çalışmada El-Gendy ve diğerleri (2021), erkek sıçanlarda tioasetamid kaynaklı karaciğer fibrozuna karşı Karvakrol'ün potansiyel etkinliğini araştırmayı amaçlamıştır. Karvakrol ile tedavi, karaciğer NOx içeriğinde oranında önemli bir azalma göstermiştir [170].

NOx'in down regülasyonu yara iyileşmesini olumlu etkilemektedir fakat yüksek düzeyleri çeşitli hasarlara sebep olabilirler. Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz verilerdeki NOx düzeyleri ele aldığında, sonuçlarımız literatür ile paraleldir. Tedavi görmeyen gruplardaki yüksek NOx seviyeleri RA+CAR kombinasyonunun hem i.p. hem de topikal uygulamaları ile anlamlı bir düşüş göstermiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki; RA ve CAR'ün birlikte uygulanması inflamasyonu azaltarak, yara iyileşmesinin hem inflamasyon hem de proliferasyon fazına katkı sağlamış ve hiperglisemik şartları düzenleyici etki göstermiştir.

Oksidatif stres, doku hasarını arttırarak yara iyileşme süresini etkilemektedir. Yara iyileşmesi esnasında sadece lipitler değil proteinler de artmış oksidatif streten etkilenmektedir. Hücredeki ROS, oksidatif stres düzeyine bağlı olarak ortaya çıkan çözünmeyen yapılar olan protein agregatlarını oluşturmaktadır. Proteinler oksitlendiklerinde protein yan zincirlerinde üretilen karbonil grupları (aldehitler ve ketonlar) kimyasal olarak stabildir ve proteinlerin oksidasyonu, oksidatif stres için ideal bir biyobelirteç olarak bilinmektedir. Bu nedenle toplam karbonil içeriğinin tükenmesi antioksidan kapasitenin bir diğer göstergesidir ve yara iyileşmesinin bir belirteçi olarak kullanılmaktadır [171, 172].

Bizim çalışmamızda diyabetik rat dokularındaki Pk seviyelerinde, tedavisiz gruplarla tedavi uygulanan gruplar kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ve tedavi edilen gruplarda Pk değerlerinde anlamlı derecede bir düşüş gözlenmiştir ($p<0.05$). Tedavisiz gruplar ile kıyaslandığında tedavi grupları arasındaki en önemli düşüş 3 günlük 1.p. tedavili grupta gözlenmiştir.

Kim ve diğerleri (2020), RA'nın biyolojik sistemlerde serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini temizleyerek güçlü bir antioksidan kapasite sergilediğini gözlemlemişlerdir [173]. Yılmaz ve diğerleri (2022) yapmış oldukları çalışmada, *Rosmarinus officinalis* metanol ekstraktının anti-ülseratif kolit etkisini kapsamlı bir şekilde araştırmışlardır. Ekstraktın uygulaması ile hastalıkla artan serum Pk seviyesi önemli ölçüde azaltmıştır. Sonuçlar, bu ekstraktın sıçanlarda ülseratif kolite karşı önemli bir iyileştirici etki sağladığını ortaya çıkarmıştır [174].

Dagli Gul ve diğerleri (2013) yapmış oldukları çalışmada, sıçanlarda izole pankreas adacıklarında H_2O_2 kaynaklı hasara karşı oral karvakrol tedavisinin koruyucu etkilerinin araştırmışlardır. Karvakrol uygulamasında protein oksidasyonu ve lipit peroksidasyonu düzeylerinde önemli düşüşler gözlenmiştir ve karvakrol grubu, önemli ölçüde daha düşük protein karbonil içeriğine sahiptir [175].

Barzan ve diğerleri (2023) çalışmalarında, erkek sıçanlarda CAR'ın Diklofenak kaynaklı karaciğer hasarı ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Diklofenak'a maruz kaldıktan sonra CAR (10 mg/kg) ile tedavi edilen hayvanlarda serum Pk miktarı, önemli ölçüde azalmıştır [176].

Literatüre bakıldığında bizim çalışmamızdaki gibi iki antioksidanın beraber kullanıldığı herhangi bir yara çalışması Pk düzeyleri bakımından bulunmamıştır. Protein karbonil içeriği ile ilgili literatür kısıtlı olmasına karşın sonuçlarımız literatür ile bu anlamda paraleldir. Oksidatif stresin önemli bir belirteci olan protein karbonil tayini sonuçlarımıza göre, kullandığımız bileşiklerin yara iyileşme sürecini desteklediğini göstererek literatüre yeni bir katkı sağlamıştır. Tedavi görmeyen gruplardaki yüksek Pk seviyeleri RA+CAR kombinasyonunun hem 1.p. hem de topikal uygulamaları ile istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir. Pk seviyelerinin tedavi ile birlikte baskılanması yara iyileşme sürecini

olumlu etkilemektedir. Bu sonuçlar göstermektedir ki; bu iki antioksidan hem inflamasyonu hem de protein oksidasyonunu baskılayarak yara iyileşmesini düzenlemiştir.

MMP'ler yara iyileşmesinde tamamlayıcı ve aktif bir rol oynamaktadırlar. Yara iyileşmesinin tüm fazlarında düzenleyici bir görev alan MMP'lara yara ortamında etkili bir iyileşme için gerek duyulmaktadır. Etkili bir iyileşmenin gerçekleşmesi için, tüm yaralarda bu enzimlerin belirli bir miktarına ihtiyaç vardır. Ancak yüksek konsantrasyonlarda MMP, yara iyileşmesinin bozulmasına neden olarak olumsuz bir aktiviteye neden olabilmektedirler [120]. Kronik yara ortamında MMP'ların yüksek aktivitesi gözlenmektedir. Kronik yaralar, kolajenazların (MMP-1 ve MMP-8) ve jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9) artmış aktiviteleri ve beraberinde düşük TIMP seviyeleri ile karakterize edilmektedir. MMP aktivasyonunun dengesi bozulursa yaranın gecikmeli veya hiç kapanmamasıyla sonuçlanmaktadır. Jelatinazlar ve kolajenazlar yara iyileşme sürecinde önemli rol alırlar. Özellikle MMP-2 ve MMP-9'un aktiviteleri kronik yaralarda daha yüksek gözlenmektedir ve bu enzimlerin inhibasyonu yara iyileşmesini hızlandırmaktadır [125, 177, 178].

Çalışmamızda diyabetik rat dokularındaki MMP-2 ve MMP-9 seviyelerine bakıldığında, MMP-2 seviyelerinde gruplar arası anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). MMP-9 düzeylerine bakıldığında ise tedavisiz gruplar ile tedavi uygulanan 1.p. ve topikal gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiş olup MMP-9 düzeylerinin azaldığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Gruplar arasında en düşük MMP-9 seviyesi 7 günlük 1.p. tedavili gruptadır.

Rocha ve diğerlerinin (2015) yaptıkları çalışmada, RA ve bir *R. officinalis* ekstraktının lokal enflamasyonda anti-inflamatuar özelliklerini değerlendirmeyi ve ayrıca sistemik inflamasyonun sıçan modellerinde rosmarinik asidin koruyucu etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. RA, yaralanmanın indüklenmesinden önce ve NF- κ B ve metaloproteinaz-9'u modüle ederek çoklu organ fonksiyon bozukluğu belirteçlerini (karaciğer, böbrek, akciğer) önemli ölçüde azaltmıştır [179]. Sutkowska ve diğerleri (2021) çalışmalarında, fibroblastlar için toksik olmayan düşük konsantrasyonlardaki hem RA hem de Biberiye ekstraktının MMP-1, -2 ve -9'un yüksek düzeyleri üzerinde inhibe edici aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir [180].

Benzofenon-3 (BP-3), en yaygın kullanılan kimyasal güneş koruyucularından biridir. Galicka ve Sutkowska-Skolimowska (2021) çalışmalarında, RA'in insan derisi

fibroblastlarında BP-3 kaynaklı değişiklikleri azaltıp azaltamayacağını araştırmışlardır. Sonuçta MMP-2 ekspresyonunun, ne tek başına BP-3 ile ne de RA ile kombinasyon halinde BP-3 ile yapılan tedaviden önemli ölçüde etkilenmediğini gözlemlemişlerdir [181].

Khan ve diğerlerinin (2019) yapmış oldukları çalışmada, yüksek MMP-2 ve -9 seviyelerinin karvakrol tedavisinden sonra normale döndüğü gözlemlenmiştir [169]. Bir başka çalışmada Kuo ve diğerleri (2017), deneysel bir sıçan periodontitis modelinde karvakrolün koruyucu aktivitesi gözlemlenmiştir. Karvakrol ile tedavi edilen gruplarda, MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin önemli ölçüde düşmesi karvakrolün sıçanlardaki diş eti hasarına karşı koruyucu aktivitesini desteklemiştir [167].

El-Gendy ve diğerleri (2021) yapmış oldukları çalışmada, karaciğer fibrozuna karşı Karvakrol ile tedavi edilen grupta MMP-3 ve MMP-9 düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir [170]. Çengel Kurnaz ve diğerleri (2022) yapmış oldukları çalışmada, deneysel bir tavşan modelinde karvakrolün nazal septal perforasyonun iyileşme sürecine etkisini incelemiştir. Karvakrolün topikal ajan olarak kullanılması nazal septal perforasyonların kapanmasını arttırmıştır. Ayrıca bağ dokusunun yeniden şekillenmesinde kritik olan MMP-9 ekspresyonunu da artırarak iyileşmeyi desteklemiştir [182].

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz verilerdeki MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ele alındığında, sonuçlarımız literatür ile paraleldir. Tedavi görmeyen gruplardaki yüksek MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri RA+CAR kombinasyonlarının uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstererek iyileşme sürecine olumlu katkı sağlamıştır.

ECM'in önemli bir bileşeni olan kolajen, yara iyileşmesinin aşamalarının düzenlenmesinde aktif rol almaktadırlar. Bu aşamalarda meydana gelen herhangi bir bozukluk yara ortamını bozmakta ve yara iyileşmesini kronikleştirmektedir. Kronik bir yaranın ortamındaki ana faktörler, yüksek metaloproteinazlar ve diğer enzimlerin neden olduğu ECM bileşenlerinin artan tahribatı ve beraberinde gelen kalıcı inflamasyondur. Bu süreçlerin düzenlenmesinde aktif rolü olan kolajen, iyileşmeyi desteklemek için önemli bir yara terapisi olarak görülmektedir [130]. İyileşen yaradaki kolajenin türü, miktarı ve organizasyonu değişkendir ve iyileşen derinin gerilme mukavemetini belirlemektedir. Kolajen III, yara iyileşmesinin erken evrelerinde sentezlenir ve yerini baskın cilt kolajeni olan kolajen I'e bırakmaktadır [131].

Çalışmamızda diyabetik rat dokularındaki kolajen-1 seviyelerine bakıldığında, Tedavisiz gruplar ile tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmiş olup 7 günlük topikal tedavili grupta Col-1 düzeyinde istatistiksel anlamda önemli bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Ince ve diğerleri (2015) çalışmalarında, *Rosmarinus officinalis* ekstraktının deri flebinin hayatta kalmasını iyileştirip iyileştiremeyeceğini araştırmayı amaçlamıştır. R. officinalis, antioksidan, anti-proliferatif, anti-inflamatuvar ve vazodilatör etkileri nedeniyle deri flep sağkalımını artıran bir ajan olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir [183].

Sutkowska ve diğerleri (2021) çalışmalarında, düşük konsantrasyonlardaki RA ve RE uygulamasının cilt homeostazisinde rol oynayan tip I kolajen üzerinde faydalı etkilerini kanıtlamışlardır. Ekstraktların, protein seviyesinde tip I kolajenin ekspresyonunun uyarılmasında etkili olduğu ortaya çıkmıştır [180]. Galicka ve Sutkowska-Skolimowska (2021) çalışmalarında, rosmarinik asit ile insan derisi fibroblastlarında BP-3 kaynaklı değişiklikleri azaltıp azaltamayacağını araştırılmışlardır ve BP-3 varlığında azalan tip I kolajen miktarı RA tedavisi ile önemli ölçüde artış göstermiştir [181].

Han ve Parker (2017) çalışmalarında, kekik esansiyel yağının insan cilt hücresi hastalığı modelinde biyolojik aktivitesini araştırılmıştır. Sonuçta kekik esansiyel yağı insan dermal fibroblast hücrelerinde kolajen I, kolajen III, MMP-1 ve TIMP 1 gibi doku yeniden modelleme biyobelirteçlerini önemli ölçüde düzenlemiştir [184].

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz verilerdeki kolajen-1 düzeylerine bakıldığında sonuçlarımız literatür ile paraleldir. Literatür kısıtlı olmasına karşın RA ve CAR ayrı ayrı tip I kolajen miktarında artışa yol açarak yara iyileşmesini önemli düzeyde desteklemiştir. Çalışmamızda RA ve CAR'ün 1.p. ve topikal olarak kombine kullanımı 3 ve 7 günlük tedavi gruplarında bakılmıştır. Özellikle 7 günlük 1.p. grupta ikisinin kombine kullanımı kolajen-1 düzeyinde literatüre paralel şekilde artış göstermiştir. RA ve CAR'ün birlikte kullanımı MMP-2 ve MMP-9'u inhibe ederek yara iyileşmesinin önemli elemanlarından birisi olan kolajen düzeyini artırarak yaranın daha erken sürede kapanmasını desteklemiştir.

Askorbik asit olarak bilinen C vitamini, suda çözünen ve glikoz metabolizmasından türetilen bir vitamindir [185]. AA, yara iyileşmesinin tüm aşamalarında rol oynamaktadır. AA,

inflatuar faz sırasında nötrofillerin apoptozunda önemlidir. Proliferatif faz sırasında AA, kolajenin sentezine katkıda bulunmaktadır. AA'in eksikliği yara iyileşmesi esnasında skar oluşumunu değiştirirerek yeniden şekillenme aşamasını etkilemektedir. Bu nedenle vücudumuz AA'in vücut içi homeostazisini korumaya çalışmaktadır. Çünkü AA, güçlü bir antioksidan olmasının yanında, kolajen molekülünün üçüncül yapısını stabilize eden prolin ve lizin hidroksilazlar için bir kofaktör görevi görerek kolajen sentezi için de kullanılabilirlik sağlamaktadır. Yaralanmanın ardından AA'in plazma ve doku düzeyleri azalmaktadır. Bu nedenle sağlıklı bir yara iyileşmesi için AA'in artmış seviyelerini bekleriz [186-188].

Çalışmamızda diyabetik rat dokularındaki AA seviyelerine bakıldığında, tedavisiz grup ile tedavi grupları kıyaslandığında, uygulama yapılmış tedavi gruplarında AA düzeylerinde tedavisiz gruplara göre bir azalma gözlemlenmiştir.

Literatür kısıtlı olmasına karşın yapılan çalışmalara baktığımızda, Mushtaq ve diğerleri (2015), diyabetik sıçanların karaciğer ve böbreklerinde oksidatif parametrelerde RA'in etkinliğini araştırıldığı çalışmada RA ile tedavinin, askorbik asit seviyelerindeki azalmayı önemli ölçüde önlediğini gözlemlemişlerdir. 21 gün boyunca RA ile tedavi , diyabetik sıçanların böbreğindeki GSH ve askorbik asit seviyelerindeki azalmayı önemli ölçüde iyileştirmiştir [189].

Aristatile ve diğerleri (2009) yapmış oldukları çalışmada, erkek albino Wistar sıçanlarında d-galaktozamin kaynaklı hepatotoksisite ve oksidatif hasar üzerinde karvakrolün hepatoprotektif ve antioksidan özelliklerini araştırmayı amaçlanmıştır. 21 gün boyunca verilen çeşitli dozlarda oral karvakrol uygulamasının sıçanlarda azalan GSH ve C vitamini seviyeleri karvakrol uygulaması ile normale dönmüştür [41]. Bir başka çalışmada Aristatile ve diğerleri (2011), erkek albino Wistar sıçanlarda d-galaktozamin kaynaklı hepatotoksisitede karvakrolün C vitamini ve GSH düzeylerini önemli ölçüde arttırdığını gözlemlemişlerdir [40].

Askorbik asit, var olan oksidatif stresi azaltma ve oksidatif olayları telafi edici aktivitesi nedeniyle canlı sistemlerde çok önemlidir. Çalışmamızın sonucuna bakıldığında, literatür kısıtlı olmasına karşın yapılan çalışmalarda her iki bileşiğinde AA düzeyini arttırıcı bir aktivitesi vardır fakat çalışmamızda artmış oksidatif durumun ortadan kaldırılması için C vitamini kullanıldığı sonucuna varılabilir. Güleç Peker ve diğerleri (2010) çalışmalarında

değişmemiş AA seviyelerininin aşırı ROS oluşumunu temizlemek için tüketilebileceğini bildirmişlerdir [190]. Ortamda bulunan artmış oksidatif stresi yok etmek için vücut antioksidan sistemden C vitaminini tüketmiş ve bundan dolayı çalışmamızda azalmış AA düzeyleri görmüş olabiliriz. RA ve CAR, yara dokusunun antioksidan kapasitesini güçlendirerek başarılı olmuş olabilir.

Hem insan yaralarında hem de hayvan yara modellerinde yaranılma sürecinin erken dönemlerinde makrofajlardan salınarak yükselen proinflamatuvar sitokinler görülmektedir. Bunlar arasında IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve TNF- α bulunmaktadır. Bu sitokinler yara bölgesindeki çeşitli süreçlerin yönetilmesini etkilerler. İnflamasyon fazında yer alan bu sitokinlerin uzun süreli salınımı kronik inflmasyona neden olmaktadır. Kronik inflamasyonla karakterize olan diyabetik yaralarda da yüksek düzeyde TNF- α bulunmaktadırlar. TNF inhibisyonu, diyabetle güçlendirilmiş TNF- α 'nın etkisini zayıflatmaktadır bu nedenle bu sitokinlerin yaranılmadan belli bir süre sonra down regülasyonları gerekmektedir [191, 192].

Çalışmamızda diyabetik rat serum TNF- α seviyelerine baktığımızda, Serum TNF-a düzeyleri değerlendirildiğinde; Tedavisiz 3 ve 7 günlük gruplar tedavili gruplarla kıyaslandığında, tedavisiz gruplardaki yüksek TNF- α düzeyleri tedavi gruplarında anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p<0.05$).

Hsu ve diğerleri (2011) çalışmalarında, RA'in IL-1 β ve TNF- α salınımını önemli ölçüde azalttığını ve bu durumun RA'nın inflamatuvar eklem bozuklukları için potansiyel yeni bir tedavi olduğunu gösterdiğini rapor etmişlerdir [193].

Chu ve diğerleri (2012) çalışmalarında, RA'nın, lipopolisakkarit tarafından indüklenen in vivo akut akciğer hasarı modellerinde güçlü anti-inflamatuvar etki göstererek, lipopolisakkarit grubuyla karşılaştırıldığında TNF- α , IL-6 ve IL-1 β üretimini önemli ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir [194].

Luan ve diğerleri (2013) çalışmalarında, RA'in deneysel diyabete karşı koruma sağladığını ve TNF- α stimülasyonunun RA tarafından inhibe edildiğini gözlemlemiştir [195]. do Nascimento ve diğerleri (2020) yapmış oldukları çalışmalarında, RA'in farklı hayvan modelleri kullanılarak değerlendirilen tüm dozlarında mide koruyucu aktivite göstererek ülser oluşumunu engellediğini ve RA ile tedavi edilen sülfhidril gruplarında, proinflamatuvar

sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde azalma bulunduğunu gözlemlemiştir [196]. Bir başka çalışmada Yılmaz ve diğerleri (2022), *Rosmarinus officinalis* metanol ekstraktının sıçanlarda ülseratif kolite karşı önemli bir iyileştirici etki sağladığını ve TNF- α düzeyini de düşürdüğünü rapor etmişlerdir [174].

Günel ve diğerleri (2014) çalışmalarında, eksizyonel cilt yaralanmasından sonra karvakrolün doku onarımı boyunca TNF- α ve interlökin 1 β salınımını modüle edebildiğini gözlemlemiştir [197].

Kuo ve diğerleri (2017) yapmış oldukları çalışmada, karvakrolün periodontitis modelinde iyileştirici etkisini değerlendirmişlerdir. Karvakrol (17.5 veya 35.0 mg/kg vücut ağırlığı/gün), ligasyondan 1 gün önce intragastrik olarak uygulanmıştır. Ligasyon+C35 grubu, TNF- α , IL-1 β , IL-6 seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır [163].

Li ve diğerleri (2019) çalışmalarında insan romatoid artrit fibroblast benzeri sinoviyositlerinde lipopolisakkaritlerin neden olduğu inflamatuvar yanıtta karvakrolün rolünü araştırmayı amaçlamıştır. Sonuçta TNF- α , IL-6 ve IL-8 seviyeleri doza bağlı olarak azalmıştır [198].

Kaymaz ve diğerleri (2021) çalışmalarında, ratlarda i.p. karvakrol uygulamasının, TNF- α düzeylerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir [199]. Bir diğer çalışmada ise Daldal ve Nazıroğlu (2022), retina pigment epitel hücrelerinin diyabette plazma yüksek glikoz konsantrasyonuna maruz bırakılmasının TNF- α ve IL-1 β seviyelerinde artışa neden olduğunu ve karvakrol ile tedavinin IL-1 β ve TNF- α aktivitesindeki yüksek glukoz kaynaklı artışı modüle ettiği gözlemlemiştir [200].

Barzan ve diğerleri (2023) çalışmalarında, erkek sıçanlarda CAR'ın karaciğer hasarı ve oksidatif stres üzerindeki etkilerine bakmıştır ve ratlar CAR ile tedavi edildikten sonra TNF- α 'nın hem ekspresyon seviyesinin hem de serum seviyesinin önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır [176].

Bizim çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz verilere bakıldığında sonuçlarımız hem RA için hem de CAR için literatür ile paralel gözükmektedir. Diyabetle birlikte inflamasyon bazlı artmış olan TNF- α düzeylerinin, RA ve CAR'ün kombine kullanımı ile hem i.p. hem

de topikal uygulamalarda down regülasyonu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, bileşenlerimizin birlikte uygulanmasının sinerjistik etki göstererek hiperglisemi kaynaklı uzun süreli inflamasyonu baskılayarak yara iyileşmesinde olumlu yönde bir rol oynadığını göstermektedir.

Yaranın kapanması iyileşmenin başladığını gösteren makroskobik bir olaydır. Bu çalışmada tedavi edilmeyen gruba kıyasla, RA ve CAR ile topikal ve i.p. tedavi edilen gruplarda yara boyutunun önemli oranda küçüldüğü gözlemlenmiştir ($P<0,001$).

Literatüre baktığımızda; Abu-al-Basal (2010) yapmış olduğu çalışmada, *Rosmarinus officinalis* L.'nin hem sulu ekstraktının hem de esansiyel yağının iyileştirici etkinliğini değerlendirmiştir. *Rosmarinus officinalis* ile tedavi edilen yaralarda inflamasyonun azaldığı, yara kontraksiyonunun arttığı ve tedavi edilmemiş kontrollerle karşılaştırıldığında, tedavi edilmiş eksizyon yaralarında yara daralma yüzdesinde önemli ilerleme gözlemlendiği görülmüştür [201]. Bir başka çalışmada Küba ve diğerleri (2021), rosmarinik asit grubunun yara boyutunun diğer iki gruba göre daha fazla küçüldüğünü ve daha az yara izi bırakarak yara iyileşmesinde kuvvetli bir ajan olabileceğini gözlemlemiştir [202]. Günal ve diğerleri (2014) yapmış oldukları çalışmada eksizyonel cilt yaralanmasından sonra karvakrolün art arda 5 gün boyunca topikal olarak uygulanması sonucunda karvakrolün 12. günde lezyon yüzeyini önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir [197].

Bizim çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz verilere bakıldığında sonuçlarımız hem RA için hem de CAR için literatür ile paraleldir. RA ve CAR kombinasyonu, i.p. ve topikal uygulamalarla diyabetik ratlarda tam kat eksizyonel yaraların daralma yüzdesinde önemli ilerleme kaydetmiştir ve yara boyutunun küçülmesini desteklemiştir.

Normal cilt dokusu kolajen liflerini ve yağ bezlerini içeren epidermisten ve çok katlı yassı epitel hücrelerini içeren dermis tabakasından oluşmaktadır. Çalışmamızın histopatolojik değerlendirmesine baktığımızda ; normal cilt dokusunda yani kontrol grubunda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır ve tedavi gruplarında tedavisiz grupların aksine sağlam bir deriyle birlikte epitelizasyon, granülasyon, yeniden şekillenme açısından anlamlı bir fark saptanmıştır.

Literatüre baktığımızda; Abu-al-Basal (2010) yapmış olduğu çalışmada, Rosmarinus officinalis esansiyel yağının tedavi edici potansiyelini incelemiştir. Tedavi edilmemiş diyabetik ve diyabetik olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında, tedavi edilen gruplarda yaralanmadan sonraki 6. ve 15. günlerde yara iyileşme sürecinin arttığı gözlemlenmiştir. Tedavi edilen yaralarda yeniden epitelizasyon, granülasyon dokusunun rejenerasyonu, anjiyogenez ve kollajen birikimi tespit edilmiştir [201]. Bir başka çalışmada Labib ve diğerleri (2019), çay ağacı esansiyel yağı, biberiye esansiyel yağı veya her iki yağın bir karışımı ile yüklenmiş kitosan bazlı üç topikal preparatın yara iyileştirme potansiyelini in vivo olarak araştırmıştır. Histopatolojik inceleme, negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bu yağların yeniden epitelizasyonu arttığını göstermiştir [203].

Zeytun ve Özkorkmaz (2021) çalışmalarında, karvakrolün özofagus yanıklarında inflamasyon ve fibroze karşı koruyucu etkisinin immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak araştırmayı amaçlamıştır. Dokuların histolojik incelemesi sonunda; Epitel tabakasının bazal hücrelerinde mitotik aktivitede artış gözlenmiştir. Bağ dokusunun bazı bölgelerinin, kas hücrelerinde az miktarda kollajen birikimi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile apoptotik değişikliklere uğradığı gözlemlenmiştir [204]. Gore Karaali ve diğerleri (2022) çalışmalarında, sıçanlarda bevacizumab'ın neden olabileceği olası oksidatif cilt hasarına karşı karvakrolün etkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılmasını hedeflemiştir. Bevacizumabın karvakrol ile birlikte uygulandığı grupta histopatolojik hasar daha az gözlenmiştir [205]. Bir başka çalışmada ise Çengel Kurnaz ve diğerleri (2022), deneysel bir tavşan modelinde karvakrolün nazal septal perforasyonun iyileşme sürecine etkisini incelemiştir.

Histopatolojik incelemeler karvakrol grubunda perforasyon kenarları boyunca istatistiksel olarak daha fazla fibrosit, fibroblast ve olgunlaşmamış kondrosit birikiminin bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Karvakrolün kıkırdak üzerindeki yenileyici etkisi çalışmanın en dikkat çekici bulgularından biridir [182].

Karvakrol ve rosmarinik asitin kombine uygulamasının yapılmış olduğu çalışmamızda, RA+CAR kombinasyonu farklı uygulamalar ile histopatolojik olarak incelendiğinde yaranın iyileşmesinde ve cilt dokusunun yeniden düzenlenmesinde yeniden epitelizasyonu, keratinizasyonu, granülasyonu, yeniden şekillenmeyi ve kolajen fibril oluşumunu desteklediği gözlemlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, iki güçlü antioksidan olan Rosmarinik Asit ve Karvakrolün farklı uygulamalar ile diyabetik yara iyileşmesindeki oksidatif olaylar üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde çeşitli çıkarımlar yapılmıştır ve bununla birlikte birtakım öneriler aşağıda sunulmuştur;

1. Öncelikle bu iki bileşenin artan doz ve sürelerde yara iyileşmesi üzerindeki aktiviteleri araştırılmıştır. Literatürde, RA ve CAR için tüm uygulamalarda toksisite açısından lethal doz belirlenmiştir ve kullandığımız dozların toksisite açısından kabul edilebilir oranda ve güvenilir olduğu görülmüştür. Sonuç olarak RA ve CAR'ün yara iyileşmesinde kullanımının güvenilir olduğu saptanmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızda RA ve CAR (10 mg/kg) olacak şekilde diyabetik ratlarımızda i.p. ve topikal olarak uygulanmıştır ve birlikte kullanımının sinerjistik aktivite gösterip göstermeyeceğine bakılmıştır.

2. Çalışmamızda bu iki bileşenin antioksidan aktivitelerinin oksidatif olaylar üzerindeki aktivitesine bakmak üzere çeşitli tayinler yapılmıştır. Bu tayinler neticesinde RA ve CAR'ün ayrı ayrı oksidatif stres parametreleri üzerinde literatürle paralel giden bir aktivitesi vardır. RA ve CAR'in diyabetik yara iyileşmesinde oksidatif stres parametreleri üzerinde birlikte kullanıldığı bir çalışma yoktur. Çalışmamızda bu iki fenolik bileşenin kombine kullanımı sinerjistik bir etki göstererek oksidatif stres parametreleri üzerinde olumlu bir etki yaratmıştır. RA ve CAR, NOx seviyelerinin down regülasyonunu destekleyerek, protein karbonilasyonunu baskılayarak, MMP'ların ve proinflamatuvar sitokinlerin yüksek seviyelerini dengeleyip down regülasyonunu sağlayarak ve kolajen oluşumunu arttırarak yara iyileşme sürecini çeşitli yollarla olumlu desteklemiştir.

3. ROS, yara iyileşmesinde inflamasyon fazının uzamasını takiben diğer fazların gecikmesine ve yaranın kronikleşmesine neden olmaktadır. Çalışmamızın sonucunda, bileşenlerimizin yara iyileşmesinin çeşitli fazlarındaki serbest radikalleri süpürerek yara iyileşmesinin sağlıklı ilerlemesini desteklediği görülmüştür. Literatür sonuçlarıyla tutarlı olarak rosmarinik asit özellikle iki o-difenol kısmı sayesinde hidroksil radikallerini, karvakrol ise yapısındaki hidroksil varlığı ile süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerini

güçlü bir şekilde temizleyerek, endojen antioksidanların aktivitesini arttırarak güçlü birer ROS temizliği yapmaktadırlar. İki fenolik bileşenimizin birlikte kullanımı da birbirlerinin aktivitelerini potansiye etmesiyle yara iyileşmesine olumlu yönde katkı sağlamıştır. Sahip oldukları bu özellikler nedeniyle yara iyileşmesinde potansiyel terapötik ajanlar olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir. Yapılan diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bu düşüncemizi destekler nitelikte görülmektedir.

4. Fenolik bileşenler yara iyileşmesinde yüksek düzeydeki pro-inflamatuar sitokinlerin uzun süreli salınımını baskılayarak kronik yara gelişimini önleyebilmektedirler. Çalışmamızda RA ve CAR'ün kombine kullanımının i.p. ve topikal uygulamalar ile pro-inflamatuar sitokinler üzerindeki etkileri serumda TNF- α tayini ile incelenmiştir. Diyabetik yara iyileşmesinde artış gösteren TNF- α düzeyi RA ve CAR kombine kullanımı ile pro-inflamatuar sitokinler üzerinde etkili oldukları böylelikle de pro-inflamatuar sitokinlerin uzun süreli salınımını baskılayarak yaranın kronikleşmesini önledikleri söylenebilmektedir.

5. Çalışmamızın yara boyutunu ve kontraksiyonunu incelemiş olduğumuz morfolojik inceleme bulgularında, rosmarinik asit ve karvakrolün kombine uygulamasının yara alanlarında belirgin bir küçülme sağladığını gözlemledik. Yara alanına ve yara kontraksiyon yüzdelere baktığımızda rosmarinik asit ve karvakrol kombinasyonun diyabetik ratlarda yara kapanmasını hızlandırıcı aktiviteleri oldukça önemlidir.

6. Çalışmamızın histopatolojik bulgularına baktığımızda; rosmarinik asit ve karvakrol kombinasyonunun uygulanması histopatolojik bulguları hafifletmiştir ve tedavi edilen yaralarda yeniden epitelizasyonu, granülasyon dokusunun rejenerasyonunu ve yeniden şekillenmeyi destekleyerek yara iyileşmesini ve cilt dokusu organizasyonunu desteklemiştir.

7. Rosmarinik asit ve karvakrol kombinasyonunun farklı uygulama şekilleriyle hiperglisemik ratlarda yara iyileşmesini desteklediği ve oksidatif olayları etkilediği gözlemlenmiştir. Tüm tayinlerimizin sonucu doğrultusunda, RA ve CAR birlikte kullanımı yarada çeşitli olayları aktive ederek veya baskılayarak inflamasyon sürecinin uzamasını engelleyip, sürecin normal akışında ilerlemesine yardımcı olmuştur ve bu durumda, yaranın kronikleşmesini ve yara iyileşme sürecini her açıdan desteklemiştir. Yara iyileşme sürecindeki en önemli problem yaranın kronikleşmesidir ve diyabetin uzamış bir inflamasyonla bu süreci daha da ilerletmiş olduğu literatürde, çalışmamızın tartışma ve

sonuç kısımlarında açıkça belirtilmiştir. Bu çalışmada, elde ettiğimiz sonuçlara göre fenolik bileşenlerimizin hem inflamasyonu baskılayıcı hem de kronik yara ortamındaki serbest radikalleri süpürücü ve antioksidan aktivite göstererek diyabetik yaralardaki destekleyici rolü belirlenmiştir. RA ve CAR'ün ayrı ayrı yara iyileşmesinde üzerindeki olumlu kullanımlarını gösteren kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Bu bileşenlerin kombine kullanımlarının hiperglisemik ratlar üzerinde oksidatif olaylardaki etkileri ilk kez ele alınmıştır. Bu durum, çalışmamızın özgün yanını göstermektedir. Bununla beraber çalışmamızın devamı niteliğinde olması açısından bu bileşiklerin yara iyileşme mekanizmasına ve moleküler yollar üzerinden aktivitesine bakılması ve hücre çalışmalarıyla desteklenmesi önemli olabilir. Aynı zamanda çalışmamızın sınırlamalarından biri de nesnelerdir. Çalışmamızın devamı niteliğinde olması açısından ilerleyen çalışmalarda bileşenlerimizin dişi ratlarla farklı doz ve süreler kullanılarak yara iyileşmesindeki etkileri detaylı bakılabilir.

8. Çalışmamızda, yara iyileşmesinin 3. ve 7. günlerinde gerçekleşen olaylara, bizim bileşiklerimizin vermiş olduğu yanıt ele alınmıştır. Bilindiği üzere diyabetik yara iyileşmesinde uzamış bir inflamatuvar süreç vardır ve yaranın 0. ve 3. günleri inflamasyona, 8. güne kadar olan süreçte proliferasyona tekabül etmektedir. Bu çalışmada, kronik yara iyileşmesinde temel problem olan inflamasyona yani 3. ve 7. günlere yer verilmiştir. Çalışmanın devamı niteliğinde olması ve yara iyileşme süreçlerinin her adımında bu bileşenlerin kombine aktivilerini görmek açısından, yara iyileşmesinin yeniden şekillenme sürecine denk gelen 14. ve 21. günlerde de bu fenolik bileşiklerin aktivitelerinin incelenmesi çalışmamızı güçlendirecektir. Aynı zamanda kemirgen deri modelinin insan derisinden farklılıkları göz önüne alınarak sonuçların insan çalışmalarıyla desteklenmesi bizim sonuçlarımızı güçlendirmesi açısından önemli olabilir.

9. Bu çalışmanın en önemli bulgularından birisi de Rosmarinik asit ve Karvakrol'ün birlikte kullanımının birbirlerinin etkilerini, özellikle ortamdaki farklı reaktif oksijen türlerini karşılayarak (süpürerek) yara iyileşmesinin özellikle inflamasyon fazında potansiye ederek inflamasyonu baskılamış olmalarıdır. Önerimiz şudur ki; sadece yara iyileşmesi değil inflamasyon bazlı Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif rahatsızlıklarda da Rosmarinik asit ve Karvakrol'ün birlikte kullanımının olası olumlu etkileri farklı deney modelleri ile değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Lindley, L. E., Stojadinovic, O., Pastar, I., Tomic-Canic, M. (2016). Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 138(3), 18–28.
2. Robson, M. C., Steed, D. L., Franz, M. G. (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery*, 38(2), 72–140.
3. Strodbeck, F. (2001). Physiology of wound healing. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 1(1), 43–52.
4. Eckes, B., Nischt, R., Krieg, T. (2010). Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 11, 3-4.
5. Barker, T. H. (2011). The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. *Biomaterials*, 32(18), 4211-4214.
6. Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I., Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 56–66.
7. Greenhalgh, D. G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 30(9), 1019–1030.
8. Page-McCaw, A., Ewald, A. J., Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 221-233.
9. Levenson, S. M., Geever, E. F., Crowley, L. V., Oates, J. F., 3rd, Berard, C. W., Rosen, H. (1965). The Healing Of Rat Skin Wounds. *Annals of Surgery*, 161(2), 293–308.
10. Guo, S. A., DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229.
11. Khan, M. A. B., Hashim, M. J., King, J. K., Govender, R. D., Mustafa, H., Al Kaabi, J. (2020). Epidemiology of type 2 diabetes–global burden of disease and forecasted trends. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 10(1), 107-111.
12. Kharroubi, A. T., Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6(6), 850-867.
13. ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D. ... and Gabbay, R. A. (2023). 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of care in diabetes 2023. *Diabetes Care*, 46(1), 19-40.
14. Burgess, J. L., Wyant, W. A., Abdo Abujamra, B., Kirsner, R. S., Jozic, I. (2021). Diabetic Wound-Healing Science. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(10), 1072.

15. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., ... and IDF Diabetes Atlas Committee. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157, 107843.
16. Goyal, R., Singhal, M., Jialal I. (2023). Type 2 Diabetes. In *StatPearls*, StatPearls Publishing, 1-19.
17. Viigimaa, M., Sachinidis, A., Toumpourleka, M., Koutsampasopoulos, K., Alliksoo, S., Titma, T. (2020). Macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Current Vascular Pharmacology*, 18(2), 110-116.
18. Ganesh, G. V., Ramkumar, K. M. (2020). Macrophage mediation in normal and diabetic wound healing responses. *Inflammation Research*, 69, 347-363.
19. Jetten, N., Roumans, N., Gijbels, M. J., Romano, A., Post, M. J., de Winther, M. P., van der Hulst, R. R., Xanthoulea, S. (2014). Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. *PloS One*, 9(7), e102994.
20. Mirza, R., Koh, T. J. (2011). Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine*, 56(2), 256-264.
21. Cano Sanchez, M., Lancel, S., Boulanger, E., Nevriere, R. (2018). Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants*, 7(8), 98.
22. Deng, L., Du, C., Song, P., Chen, T., Rui, S., Armstrong, D. G., Deng, W. (2021). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 8852759.
23. Yang, S., Xu, M., Meng, G., Lu, Y. (2020). SIRT3 deficiency delays diabetic skin wound healing via oxidative stress and necroptosis enhancement. *Journal Of Cellular and Molecular Medicine*, 24(8), 4415–4427.
24. Ti, Y. L., Song, F., Fang, Z., Zhang, P. (2022). Plants and phytochemicals inhibit scar formation: A systematic review. *Industrial Crops and Products*, 185, 115113.
25. Vitale, S., Colanero, S., Placidi, M., Di Emidio, G., Tatone, C., Amicarelli, F., D'Alessandro, A. M. (2022). Phytochemistry and biological activity of medicinal plants in wound healing: an overview of current research. *Molecules*, 27(11), 3566.
26. Criollo-Mendoza, M. S., Contreras-Angulo, L. A., Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Jiménez-Ortega, L. A., Heredia, J. B. (2023). Wound healing properties of natural products: Mechanisms of action. *Molecules*, 28(2), 598.

27. Mohd Zaid, N. A., Sekar, M., Bonam, S. R., Gan, S. H., Lum, P. T., Begum, M. Y., Mat Rani, N. N. I., Vaijanathappa, J., Wu, Y. S., Subramaniyan, V., Fuloria, N. K., Fuloria, S. (2022). Promising natural products in new drug design, development, and therapy for skin disorders: An overview of scientific evidence and understanding their mechanism of action. *Drug Design, Development and Therapy*, 16, 23-66.
28. Berk, A., Dokumacı, A., Kaymaz, M. (2015). Yara iyileşmesi ve diyabetik yara tedavisinde kullanılan tıbbi bitkiler. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 24(3), 185-192.
29. Fazel Nabavi, S., Carlo Tenore, G., Daglia, M., Tundis, R., Rosa Loizzo, M., Mohammad Nabavi, S. (2015). The cellular protective effects of rosmarinic acid: from bench to bedside. *Current Neurovascular Research*, 12(1), 98-105.
30. Swamy, M. K., Sinniah, U. R., Ghasemzadeh, A. (2018). Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7775-7793.
31. Elufioye, T. O., Habtemariam, S. (2019). Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108600.
32. Hasanein, P., Mohammad Zaheri, L. (2014). Effects of rosmarinic acid on an experimental model of painful diabetic neuropathy in rats. *Pharmaceutical Biology*, 52(11), 1398-1402.
33. Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Yoshikawa, T. (2004). Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 25(4), 549-557.
34. Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y. S., Dhama, K. (2017). Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews*, 18(2), 167-176.
35. Govindaraj, J., Sorimuthu Pillai, S. (2015). Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protects pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 404(1-2), 143-159.
36. Ngo, Y. L., Lau, C. H., Chua, L. S. (2018). Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 687-700.
37. Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., Del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675-1687.
38. Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., Alipour, M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304-318.

39. Gilling, D. H., Kitajima, M., Torrey, J. R., Bright, K. R. (2014). Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1149-1163.
40. Aristatile, B., Al-Numair, K. S., Al-Assaf, A. H., Pugalendi, K. V. (2011). Pharmacological effect of carvacrol on D-galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis. *Journal of Natural Medicines*, 65(3-4), 568-577.
41. Aristatile, B., Al-Numair, K. S., Veeramani, C., Pugalendi, K. V. (2009). Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in d-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23(6), 757-765.
42. Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17(8-9), 581-588.
43. Li, Y., Mai, Y., Qiu, X., Chen, X., Li, C., Yuan, W., Hou, N. (2020). Effect of long-term treatment of Carvacrol on glucose metabolism in Streptozotocin-induced diabetic mice. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 142.
44. Ozgok Kangal, M. K., Regan, J. P. (2023). Wound Healing. In *StatPearls*. StatPearls Publishing, 1-12.
45. Robson M. C. (1997). Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *The Surgical Clinics of North America*, 77(3), 637-650.
46. Bischoff, M., Kinzl, L., Schmelz, A. (1999). Die komplizierte Wunde [The complicated wound]. *Der Unfallchirurg*, 102(10), 797-804.
47. Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Pecoraro, R. E., Rodeheaver, G., Robson, M. C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Archives of Dermatology*, 130(4), 489-493.
48. Sorg, H., Sorg, C. G. (2023). Skin Wound Healing: Of Players, Patterns, and Processes. *European Surgical Research*, 64(2), 141-157.
49. Monavarian, M., Kader, S., Moeinzadeh, S., Jabbari, E. (2019). Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 25(4), 294-311.
50. Tennent, G. A., Brennan, S. O., Stangou, A. J., O'Grady, J., Hawkins, P. N., Pepys, M. B. (2007). Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood*, 109(5), 1971-1974.
51. Senzel, L., Gnatenko, D. V., Bahou, W. F. (2009). The platelet proteome. *Current Opinion in Hematology*, 16(5), 329-333.
52. Hart J. (2002). Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care*, 11(6), 205-209.

53. Lansdown A. B. (2002). Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair and Regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 10(5), 271–285.
54. Van der Vliet, A., Janssen-Heininger, Y. M. (2014). Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger?. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(3), 427-435.
55. Gillitzer, R., Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. *Journal of Leukocyte Biology*, 9(4), 513-521.
56. Wilgus, T. A., Roy, S., McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care*, 2(7), 379–388.
57. Yanez, D. A., Lacher, R. K., Vidyarthi, A., Colegio, O. R. (2017). The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 469(3-4), 455–463.
58. Li, J., Chen, J., Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 9–18.
59. Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V. (2009). The wound healing process:an Overview of the cellular and molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
60. Reinke, J.M., Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49,35–43.
61. Enoch, S., Leaper, D. J. (2008). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 26(2), 31-37.
62. Raziyeveva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., Saparov, A. (2021). Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*, 11(5), 700.
63. Herrick, S. E., Sloan, P., McGurk, M., Freak, L., McCollum, C. N., Ferguson, M. W. (1992). Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *The American Journal of Pathology*, 141(5), 1085–1095.
64. Martin, P., Nunan, R. (2015). Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *The British Journal of Dermatology*, 173(2), 370–378.
65. Leoni, G., Neumann, P. A., Sumagin, R., Denning, T. L., Nusrat, A. (2015). Wound repair: role of immune-epithelial interactions. *Mucosal Immunology*, 8(5), 959–968.
66. Schreml, S., Szeimies, R. M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M., Babilas, P. (2010). Oxygen in acute and chronic wound healing. *The British Journal of Dermatology*, 163(2), 257–268.

67. Tandara, A.A., Mustoe, T.A. (2004). Oxygen in wound healing more than a nutrient. *World Journal of Surgery*, 28,294-300.
68. Davis, S. C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W. H., Mertz, P. M. (2008). Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair and Regeneration*, 16(1), 23-29.
69. Gantwerker, E. A., Hom, D. B. (2011). Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 19(3), 441–453.
70. Reiber, G. E., McDonell, M. B., Schleyer, A. M., Fihn, S. D., Reda, D. J. (1995). A comprehensive system for quality improvement in ambulatory care: assessing the quality of diabetes care. *Patient Education and Counseling*, 26(1-3), 337–341.
71. Godbout, J. P., Glaser, R. (2006). Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *Journal of Neuroimmune Pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 1(4), 421–427.
72. Vileikyte L. (2007). Stress and wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 49–55.
73. Chhabra, S., Chhabra, N., Kaur, A., Gupta, N. (2017). Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 16(4), 403–423.
74. Lindholm, C., Searle, R. (2016). Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *International Wound Journal*, 13 (2), 5–15.
75. Clayton Jr, W., Elasy, T. A. (2009). A review of the pathophysiology, classification, and treatment of foot ulcers in diabetic patients. *Clinical Diabetes*, 27(2), 52-58.
76. Sen C. K. (2019). Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Advances in Wound Care*, 8(2), 39–48.
77. Chen, L., Cheng, L., Gao, W., Chen, D., Wang, C., Ran, X. (2020). Telemedicine in Chronic Wound Management: Systematic Review And Meta-Analysis. *JMIR mHealth and uHealth*, 8(6), e15574.
78. Jørgensen, S. F., Nygaard, R., Posnett, J. (2013). Meeting the challenges of wound care in Danish home care. *Journal of Wound Care*, 22(10), 540–545.
79. Drew, P., Posnett, J., Rusling, L., Wound Care Audit Team (2007). The cost of wound care for a local population in England. *International Wound Journal*, 4(2), 149–155.
80. Harreiter, J., Roden, M. (2023). [Diabetes mellitus: definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023)]. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 135(1), 7–17.
81. American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(1), 81–90.

82. Vanderniet, J. A., Jenkins, A. J., Donaghue, K. C. (2022). Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Current Cardiology Reports*, 24(10), 1455–1465.
83. Leslie, R. D., Evans-Molina, C., Freund-Brown, J., Buzzetti, R., Dabelea, D., Gillespie, K. M., Goland, R., Jones, A. G., Kacher, M., Phillips, L. S., Rolandsson, O., Wardian, J. L., Dunne, J. L. (2021). Adult-Onset Type 1 Diabetes: Current Understanding and Challenges. *Diabetes Care*, 44(11), 2449–2456.
84. Klink D. J., 2nd (2008). Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus. *PloS One*, 3(1), e1374.
85. Januszewski, A. S., Cho, Y. H., Joglekar, M. V., Farr, R. J., Scott, E. S., Wong, W. K. M., Carroll, L. M., Loh, Y. W., Benitez-Aguirre, P. Z., Keech, A. C., O'Neal, D. N., Craig, M. E., Hardikar, A. A., Donaghue, K. C., Jenkins, A. J. (2021). Insulin micro-secretion in Type 1 diabetes and related microRNA profiles. *Scientific Reports*, 11(1), 11727.
86. Green, A., Hede, S. M., Patterson, C. C., Wild, S. H., Imperatore, G., Roglic, G., Beran, D. (2021). Type 1 diabetes in 2017: global estimates of incident and prevalent cases in children and adults. *Diabetologia*, 64(12), 2741–2750.
87. Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6275.
88. Roden, M., Shulman, G. I. (2019). The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*, 576(7785), 51–60.
89. Javeed, N., Matveyenko, A. V. (2018). Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 33(2), 138–150.
90. Kc, K., Shakya, S., Zhang, H. (2015). Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 66(2), 14–20.
91. Coustan D. R. (2013). Gestational diabetes mellitus. *Clinical Chemistry*, 59(9), 1310–1321.
92. Blumer, I., Hadar, E., Hadden, D. R., Jovanović, L., Mestman, J. H., Murad, M. H., Yogeve, Y. (2013). Diabetes and pregnancy: an endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(11), 4227–4249.
93. Forbes, J. M., Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137–188.
94. Nouwen, A., Nefs, G., Caramlau, I., Connock, M., Winkley, K., Lloyd, C. E., Peyrot, M., Pouwer, F., European Depression in Diabetes Research Consortium (2011). Prevalence of depression in individuals with impaired glucose metabolism or undiagnosed diabetes: a systematic review and meta-analysis of the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. *Diabetes Care*, 34(3), 752–762.

95. Cukierman, T., Gerstein, H. C., Williamson, J. D. (2005). Cognitive decline and dementia in diabetes systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia*, 48(12), 2460–2469.
96. Adeniyi, A. F., Adeleye, J. O., Adeniyi, C. Y. (2010). Diabetes, sexual dysfunction and therapeutic exercise: a 20 year review. *Current Diabetes Reviews*, 6(4), 201–206.
97. Reardon, R., Simring, D., Kim, B., Mortensen, J., Williams, D., Leslie, A. (2020). The diabetic foot ulcer. *Australian Journal of General Practice*, 49(5), 250–255.
98. Monteiro-Soares, M., Boyko, E. J., Ribeiro, J., Ribeiro, I., Dinis-Ribeiro, M. (2012). Predictive factors for diabetic foot ulceration: a systematic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28(7), 574–600.
99. den Dekker, A., Davis, F. M., Kunkel, S. L., Gallagher, K. A. (2019). Targeting epigenetic mechanisms in diabetic wound healing. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 204, 39–50.
100. Cho, H., Blatchley, M. R., Duh, E. J., Gerecht, S. (2019). Acellular and cellular approaches to improve diabetic wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146, 267–288.
101. Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 18(10), 872–879.
102. Gilbert, D. L. (2000). Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 1-14.
103. Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
104. Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687–704.
105. Husain, N., Kumar, A. (2012). Reactive oxygen species and natural antioxidants: a review. *Advances in BioResearch*, 3(4), 164-175.
106. Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., Janda, K. (2020). Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 48(284), 124–127.
107. Nakai, K., Tsuruta, D. (2021). What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10799.
108. Lushchak V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.
109. Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *The FASEB Journal*, 11(2), 118-124.

110. Mao, H., Schnetz-Boutaud, N. C., Weisenseel, J. P., Marnett, L. J., Stone, M. P. (1999). Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 96(12), 6615–6620.
111. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
112. de Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N., Vermeulen, N. P. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(1-2), 202–226.
113. Cadenas E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors (Oxford, England)*, 6(4), 391–397.
114. Young, I. S., Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176–186.
115. Moseley, R., Stewart, J. E., Stephens, P., Waddington, R. J., Thomas, D. W. (2004). Extracellular matrix metabolites as potential biomarkers of disease activity in wound fluid: lessons learned from other inflammatory diseases? *The British Journal of Dermatology*, 150(3), 401–413.
116. Ponugoti, B., Xu, F., Zhang, C., Tian, C., Pacios, S., Graves, D. T. (2013). FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF- β 1 and prevention of oxidative stress. *The Journal of Cell Biology*, 203(2), 327–343.
117. Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., Leaper, D., Georgopoulos, N. T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, 14(1), 89–96.
118. Nathan, C. F., Root, R. K. (1977). Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. *The Journal of Experimental Medicine*, 146(6), 1648–1662.
119. Fang F. C. (2011). Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *mBio*, 2(5), e00141-11.
120. Ayuk, S. M., Abrahamse, H., Houreld, N. N. (2016). The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 2897656.
121. Vitlianova, K., Georgieva, J., Milanova, M., Tzonev, S. (2015). Blood pressure control predicts plasma matrix metalloproteinase-9 in diabetes mellitus type II. *Archives of Medical Science*, 11(1), 85-91.
122. Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827–839.

123. Yadav, S. S., Singh, M. K., Dwivedi, P., Mandal, R. K., Usman, K., Khattri, S., Pant, K. K. (2014). Significance of impaired serum gelatinases activities in metabolic syndrome. *Toxicology International*, 21(1), 107.
124. Chen, J., Qin, S., Liu, S., Zhong, K., Jing, Y., Wu, X., Peng, F., Li, D., Peng, C. (2023). Targeting matrix metalloproteases in diabetic wound healing. *Frontiers in Immunology*, 14, 1089001.
125. Sabino, F., auf dem Keller, U. (2015). Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. *Metalloproteinases In Medicine*, 1-8.
126. Martins, V. L., Caley, M., O'Toole, E. A. (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and Tissue Research*, 351, 255-268.
127. Mirastschijski, U., Impola, U., Jahkola, T., Karlsmark, T., AGren, M. S., Saarialho-Kere, U. (2002). Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Human Pathology*, 33(3), 355–364.
128. Lin, P., Zhang, G., Li, H. (2023). The Role of Extracellular Matrix in Wound Healing. *Dermatologic Surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 49(5S), 41–48.
129. Ricard-Blum S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a004978.
130. Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., Sen, C. K. (2021). Collagen in Wound Healing. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 8(5), 63.
131. Schultz, G. S., Chin, G. A., Moldawer, L., Diegelmann, R. F. (2011). 23 principles of wound healing. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*, 423.
132. Kirkpatrick, N. D., Andreou, S., Hoying, J. B., Utzinger, U. (2007). Live imaging of collagen remodeling during angiogenesis. *American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology*, 292(6), H3198–H3206.
133. Profyris, C., Tziotziou, C., Do Vale, I. (2012). Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(1), 1–12.
134. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
135. Randhir, R., Lin, Y. T., Shetty, K., Lin, Y. T. (2004). Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(3).

136. Afanas' ev, I. B., Dcrozko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38(11), 1763-1769.
137. Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247.
138. Jin, B., Liu, J., Gao, D., Xu, Y., He, L., Zang, Y., ... Lin, D. (2020). Detailed studies on the anticancer action of rosmarinic acid in human Hep-G2 liver carcinoma cells: evaluating its effects on cellular apoptosis, caspase activation and suppression of cell migration and invasion. *J. BUON*, 25(3), 1383-1389.
139. Diao, J., Wei, J., Yan, R., Liu, X., Li, Q., Lin, L., ... Li, H. (2016). Rosmarinic acid suppressed high glucose-induced apoptosis in H9c2 cells by ameliorating the mitochondrial function and activating STAT3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477(4), 1024-1030.
140. Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevão-Silva, C. F., Carvalho, M. D., Cunha, J. M., Grespan, R., Bersani-Amado, C. A., Cuman, R. K. (2012). Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2012, 657026.
141. Samarghandian, S., Farkhondeh, T., Samini, F., Borji, A. (2016). Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. *Biochemistry Research International*, 2016, 2645237.
142. Marchese, A., Arciola, C. R., Coppo, E., Barbieri, R., Barreca, D., Chebaibi, S., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., Daglia, M. (2018). The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling*, 34(6), 630–656.
143. Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide : Biology and Chemistry*, 5(1), 62–71.
144. Reznick, A. Z., Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233, 357–363.
145. Berger, J., Shepard, D., Morrow, F., Taylor, A. (1989). Relationship between dietary intake and tissue levels of reduced and total vitamin C in the nonscorbutic guinea pig. *The Journal of Nutrition*, 19(5), 734–740.
146. Nouvong, A., Ambrus, A. M., Zhang, E. R., Hultman, L., Collier, H. A. (2016). Reactive oxygen species and bacterial biofilms in diabetic wound healing. *Physiological Genomics*, 48(12), 889–896.

147. O'Toole, E. A., Goel, M., Woodley, D. T. (1996). Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration. *Dermatologic Surgery : Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 22(6), 525–529.
148. Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O. I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published For the British Industrial Biological Research Association*, 32(1), 31–36.
149. Mir, M., Permana, A. D., Ahmed, N., Khan, G. M., Rehman, A. U., Donnelly, R. F. (2020). Enhancement in site-specific delivery of carvacrol for potential treatment of infected wounds using infection responsive nanoparticles loaded into dissolving microneedles: A proof of concept study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 147, 57–68.
150. Imran, M., Aslam, M., Alsagaby, S. A., Saeed, F., Ahmad, I., Afzaal, M., Arshad, M. U., Abdelgawad, M. A., El-Ghorab, A. H., Khames, A., Shariati, M. A., Ahmad, A., Hussain, M., Imran, A., Islam, S. (2022). Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Science & Nutrition*, 10(11), 3544–3561.
151. Swarup, V., Ghosh, J., Ghosh, S., Saxena, A., Basu, A. (2007). Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3367–3370.
152. Zych, M., Kaczmarczyk-Sedlak, I., Wojnar, W., Folwarczna, J. (2019). Effect of Rosmarinic Acid on the Serum Parameters of Glucose and Lipid Metabolism and Oxidative Stress in Estrogen-Deficient Rats. *Nutrients*, 11(2), 267.
153. Zhang, Y., Chen, X., Yang, L., Zu, Y., Lu, Q. (2015). Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food & Function*, 6(3), 927–931.
154. Nakamura, Y., Ohto, Y., Murakami, A., Ohigashi, H. (1998). Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* f. *viridis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4545–4550.
155. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*, 28, 25–30.
156. Malone-Povolny, M. J., Maloney, S. E., Schoenfisch, M. H. (2019). Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, 8(12), e1801210.
157. Brecht, D. S., Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 87(2), 682–685.
158. Knowles, R. G., Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical Journal*, 298 (Pt 2)(Pt 2), 249–258.

159. Förstermann, U., Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–837d.
160. Efron, D. T., Most, D., Barbul, A. (2000). Role of nitric oxide in wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 3(3), 197–204.
161. Rizk, M., Witte, M. B., Barbul, A. (2004). Nitric oxide and wound healing. *World Journal of Surgery*, 28(3), 301–306.
162. Mahoney, E., Reichner, J., Bostom, L. R., Mastrofrancesco, B., Henry, W., Albina, J. (2002). Bacterial colonization and the expression of inducible nitric oxide synthase in murine wounds. *The American Journal of Pathology*, 161(6), 2143–2152.
163. Zhao, L., Zhang, Y., Liu, G., Hao, S., Wang, C., Wang, Y., (2018). Black rice anthocyanin-rich extract and rosmarinic acid, alone and in combination, protect against DSS-induced colitis in mice. *Food & Function*, 9(5), 2796–2808.
164. Ou, J., Huang, J., Zhao, D., Du, B., Wang, M., (2018). Protective effect of rosmarinic acid and carnosic acid against streptozotocin-induced oxidation, glycation, inflammation and microbiota imbalance in diabetic rats. *Food & Function*, 9(2), 851–860.
165. Sadeghi, A., Bastin, A. R., Ghahremani, H., Doustimotlagh, A. H. (2020). The effects of rosmarinic acid on oxidative stress parameters and inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-induced peripheral blood mononuclear cells. *Molecular Biology Reports*, 47(5), 3557–3566.
166. Guimarães, A.G., Oliveira, G.F., Melo, M.S., Cavalcanti, S.C., Antonioli, A.R., Bonjardim, L. R., Silva, F. A., Santos, J. P., Rocha, R. F., Moreira, J. C., Araújo, A.A., Gelain, D.P., Quintans-Júnior, L.J. (2010). Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107(6), 949–957.
167. Kuo, P. J., Hung, T. F., Lin, C. Y., Hsiao, H. Y., Fu, M. W., Hong, P. D., Chiu, H. C., Fu, E. (2017). Carvacrol Ameliorates Ligation-Induced Periodontitis in Rats. *Journal of Periodontology*, 88(7), e120–e128.
168. Xiao, Y., Li, B., Liu, J., Ma, X. (2018). Carvacrol ameliorates inflammatory response in interleukin 1 β -stimulated human chondrocytes. *Molecular Medicine Reports*, 17(3), 3987–3992.
169. Khan, I., Bhardwaj, M., Shukla, S., Min, S. H., Choi, D. K., Bajpai, V. K., Huh, Y. S., Kang, S. C. (2019). Carvacrol inhibits cytochrome P450 and protects against binge alcohol-induced liver toxicity. *Food and Chemical Toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 131, 110582.

170. El-Gendy, Z. A., Ramadan, A., El-Batran, S. A., Ahmed, R. F., El-Marasy, S. A., Abd El-Rahman, S. S., Youssef, S. (2021). Carvacrol hinders the progression of hepatic fibrosis via targeting autotaxin and thioredoxin in thioacetamide-induced liver fibrosis in rat. *Human & Experimental Toxicology*, 40(12), 2188–2201.
171. Aksoy, H., Demirbağ, Ç., Şen, A., Şekerler, T., Özakpınar, Ö., Şener, A., Ahmad, S., Tetik, S. (2020). Evaluation of biochemical parameters in *Rubus tereticaulis* treated rats and its implications in wound healing. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 472(1-2), 67–78.
172. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 329(1-2), 23–38.
173. Kim, H. K., Hwang, S., Sung, B., Kim, Y. H., Chang, Y. (2020). Gd-Complex of a Rosmarinic Acid Conjugate as an Anti-Inflammatory Theranostic Agent via Reactive Oxygen Species Scavenging. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(8), 744.
174. Yilmaz, A., Uckaya, F., Bayindir, N., Guler, E. M., Toprak, A., Kocyigit, A., Esrefoglu, M., Topcu, G. (2022). Comparing healing effect against ulcerative colitis and toxicological effects of *Rosmarinus officinalis*: A comprehensive in vivo study of an edible plant in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 46(11), e14299.
175. Dagli Gul, A. S., Fadillioglu, E., Karabulut, I., Yesilyurt, A., Delibasi, T. (2013). The effects of oral carvacrol treatment against H₂O₂ induced injury on isolated pancreas islet cells of rats. *Islets*, 5(4), 149–155.
176. Barzan, M., Heydari, M., Mirshekari-Jahangiri, H., Firouzi, H., Dastan, M., Najafi, M., Khaledi, M., Nouri, A., Shah-Abadi, M. E. (2023). Carvacrol Exerts Anti-Inflammatory, Anti-Oxidative Stress and Hepatoprotective Effects Against Diclofenac-Induced Liver Injury in Male Rats. *International Journal of Preventive Medicine*, 14, 61.
177. Armstrong, D. G., Jude, E. B. (2002). The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 92(1), 12–18.
178. Widgerow A. D. (2011). Chronic wound fluid thinking outside the box. *Wound Repair and Regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 19(3), 287–291.
179. Rocha, J., Eduardo-Figueira, M., Barateiro, A., Fernandes, A., Brites, D., Bronze, R., Duarte, C. M., Serra, A. T., Pinto, R., Freitas, M., Fernandes, E., Silva-Lima, B., Mota-Filipe, H., Sepodes, B. (2015). Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(5), 398–413.
180. Sutkowska, J., Hupert, N., Gawron, K., Strawa, J. W., Tomczyk, M., Forlino, A., Galicka, A. (2021). The Stimulating Effect of Rosmarinic Acid and Extracts from Rosemary and Lemon Balm on Collagen Type I Biosynthesis in Osteogenesis Imperfecta Type I Skin Fibroblasts. *Pharmaceutics*, 13(7), 938.

181. Galicka, A., Sutkowska-Skolimowska, J. (2021). The Beneficial Effect of Rosmarinic Acid on Benzophenone-3-Induced Alterations in Human Skin Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11451.
182. Çengel Kurnaz, S., Kuruca, N., Güvenç, D., Kaya, M. T., Güvenç, T. (2022). Topical Administration of Carvacrol Improves Healing in Nasal Septal Perforation: An Experimental Animal Study. *American Journal of Rhinology & Allergy*, 36(4), 503–509.
183. Ince, B., Yildirim, A. M., Okur, M. I., Dadaci, M., Yoruk, E. (2015). Effects of *Rosmarinus officinalis* on the survivability of random-patterned skin flaps: an experimental study. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 49(2), 83–87.
184. Han, X., Parker, T. L. (2017). Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. *Biochimie Open*, 4, 73–77.
185. Valdés F. (2006). Vitamina C [Vitamin C]. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 97(9), 557–568.
186. Moores J. (2013). Vitamin C: a wound healing perspective. *British Journal of Community Nursing, Suppl*, 6–11.
187. Pullar, J. M., Carr, A. C., Vissers, M. C. M. (2017). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*, 9(8), 866.
188. Ivanov, V., Ivanova, S., Kalinovsky, T., Niedzwiecki, A., Rath, M. (2016). Inhibition of collagen synthesis by select calcium and sodium channel blockers can be mitigated by ascorbic acid and ascorbyl palmitate. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 6(2), 26–35.
189. Mushtaq, N., Schmatz, R., Ahmed, M., Pereira, L. B., da Costa, P., Reichert, K. P., Dalenogare, D., Pelinson, L. P., Vieira, J. M., Stefanello, N., de Oliveira, L. S., Mulinacci, N., Bellumori, M., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. (2015). Protective effect of rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71(4), 743–751.
190. Güleç Peker, E. G., Coşkun, Ş., Özer, Ç., Barbaros Balabanlı, K., Gönül, B. (2010). The effect of ascorbic acid supplementation on brain oxidative events in experimental diabetes. *Medicinal Chemistry Research*, 19, 364-374.
191. Xu, F., Zhang, C., Graves, D. T. (2013). Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing. *BioMed Research International*, 2013, 754802.
192. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 16(5), 585–601.

193. Hsu, Y. C., Cheng, C. P., Chang, D. M. (2011). Plectranthus amboinicus attenuates inflammatory bone erosion in mice with collagen-induced arthritis by down regulation of RANKL-induced NFATc1 expression. *The Journal of Rheumatology*, 38(9), 1844–1857.
194. Chu, X., Ci, X., He, J., Jiang, L., Wei, M., Cao, Q., Guan, M., Xie, X., Deng, X., He, J. (2012). Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic acid, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(3), 3586–3598.
195. Luan, H., Kan, Z., Xu, Y., Lv, C., Jiang, W. (2013). Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: relation to inflammation response. *Journal of Neuroinflammation* 10, 810.
196. do Nascimento, R. F., de Oliveira Formiga, R., Machado, F. D. F., de Sales, I. R. P., de Lima, G. M., Alves Júnior, E. B., Vieira, G. C., Pereira, R. F., de Araújo, A. A., de Araújo Junior, R. F., Barbosa Filho, J. M., Batista, L. M. (2020). Rosmarinic acid prevents gastric ulcers via sulfhydryl groups reinforcement, antioxidant and immunomodulatory effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(12), 2265–2278.
197. Günel, M.Y., Okçu Heper, A. Zaloğlu, N. (2014). The effects of topical carvacrol application on wound healing process in male rats. *Pharmacognosy Journal*, 6(3), 10–14.
198. Li, Y., Xu, J. Z., Gu, C. X., Liu, G. L., Tian, K. (2019). Carvacrol suppresses inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(5), 8169–8176.
199. Kaymaz, A., Ulaş, F., Çetinkaya, A., Erimşah, S. (2021). Investigating the effects of carvacrol in rats using oxygen-induced retinopathy model. *Indian Journal of Ophthalmology*, 69(5), 1219–1223.
200. Daldal, H., Nazıroğlu, M. (2022). Carvacrol protects the ARPE19 retinal pigment epithelial cells against high glucose-induced oxidative stress, apoptosis, and inflammation by suppressing the TRPM2 channel signaling pathways. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology=Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 260(8), 2567–2583.
201. Abu-Al-Basal M. A. (2010). Healing potential of Rosmarinus officinalis L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2), 443–450.
202. Küba, M. C., Türkoğlu, A., Oğuz, A., Tuncer, M. C., Kaya, Ş., Başol, Ö., Bilge, H., Tatlı, F. (2021). Comparison of local rosmarinic acid and topical dexpanthenol applications on wound healing in a rat experimental wound model. *Folia Morphologica*, 80(3), 618–624.

203. Labib, R. M., Ayoub, I. M., Michel, H. E., Mehanny, M., Kamil, V., Hany, M., Magdy, M., Moataz, A., Maged, B., Mohamed, A. (2019). Appraisal on the wound healing potential of *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil-loaded chitosan topical preparations. *PloS One*, 14(9), e0219561.
204. Zeytun, H., Özkorkmaz, E. G. (2021). Effects of Carvacrol in an Experimentally Induced Esophageal Burn Model: Expression of VEGF and Caspase-3 Proteins. *Journal of Investigative Surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 34(4), 408–416.
205. Gore Karaali, M., Karaali, S., Demir, D., Yazıcı, G. N., Coban, A., Mammadov, R., Suleyman, B., Suleyman, H. (2022). The protective effect of carvacrol on bevacizumab-related skin injury in rats: a biochemical and histopathological evaluation. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 41(4), 285–290.



Gazili olmak ayrıcalıktır