



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI *ALNUS* MILLER TAKSONLARI ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Çiğdem ALTINYAY

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. M. Levent ALTUN**

**Bu tez, TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı tarafından 1002
Hızlı Destek Programı kapsamında 112S014 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2014-ANKARA

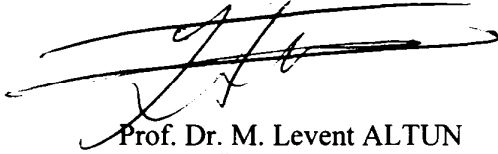
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Doktora **Programı**
çerçevesinde yürütölmüş bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01/04/2014



Prof. Dr. Gülçin SALTAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. M. Levent ALTUN
Ankara Üniversitesi
Raportör



Prof. Dr. Şebnem HARPUR
Hacettepe Üniversitesi



Prof. Dr. Murat KARTAL
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Osman ÜSTÜN
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	xii
Şekiller	xv
Çizelgeler	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Yara	3
1.2. Yara İyileşme Mekanizması	3
1.2.1. İnflamasyon Evresi	5
1.2.1.1. Vasküler Yanıt ve Hemostaz	5
1.2.1.2. Hücrel Yanıt ve İnflamasyon	7
1.2.2. Proliferasyon Evresi	8
1.2.2.1. Granülasyon Dokusunun Oluşumu	9
1.2.2.2. Epitelizasyon	10
1.2.2.3. Yara Kontraksiyonu	10
1.2.3. Maturasyon (Re-modelleme) Evresi	11
1.3. Yara İyileşmesine Etki Eden Faktörler	13
1.4. Yara İyileşmesine Etki Eden Bazı Farmakolojik Aktiviteler	16
1.4.1. Antiinflamatuar Aktivite	16
1.4.2. Antioksidan Aktivite	16
1.4.3. Antimikrobiyal Aktivite	17
1.4.4. Analjezik Aktivite	17
1.5. Yara İyileştirici Aktivite Tayininde Kullanılan Yöntemler	17
1.5.1. <i>In-vitro</i> Yöntemler	17
1.5.1.1. Canlı Hücreler Üzerinde Yapılan Testler	17
1.5.1.2. Enzim Deneyleri	18
1.5.2. <i>In vivo</i> Yöntemler	19

1.5.2.1. <i>In vivo</i> Yöntemlerde Kullanılan Başlıca Yara Modelleri	19
1.5.2.1.1. Eksizyon Yara Modeli	19
1.5.2.1.2. İnsizyon Yara Modeli	20
1.5.2.1.3. Yara Yanık Modeli	20
1.5.2.1.4. Dead Space Yara Modeli	21
1.5.2.2. <i>In vivo</i> Yara Modellerinde Yara İyileşmesinin Saptanmasında Kullanılan Başlıca Yöntemler	21
1.5.2.2.1. Yara Alanının Ölçümü	21
1.5.2.2.2. Yara Kontraksiyonunun Tayini	21
1.5.2.2.3. Epitelizasyon Süresinin Tayini	22
1.5.2.2.4. Yara Gerilim Kuvvetinin Ölçümü	22
1.5.2.2.5. Hidroksiprolin Tayini	22
1.5.2.2.6. Histopatolojik İncelemeler	23
1.5.2.2.7. Diğer Analizler	23
1.6. Enflamasyon	23
1.7. Vücutta Enflamasyona Karşı Oluşturulan Yanıt	24
1.7.1. Enfeksiyonun Tanınması	25
1.7.2. Enfeksiyon Bölgesinde Enflamatuvar Hücrelerin Toplanması ve Patojenin Eliminasyonu	25
1.7.3. Enflamasyonun Giderilmesi	26
1.8. Antienflamatuvar Aktivitenin Pre-klinik Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	27
1.8.1. Akut ve Subakut Enflamasyonun Testleri	27
1.8.1.1. Guinea Piglerde UV Işını ile Oluşturulan Eritem	27
1.8.1.2. Damar Permeabilite Artışı Testi	28
1.8.1.3. Farelerde Oksazolon ile İndüklenen Kulak Ödemi	28
1.8.1.4. Fare ve Sıçanlarda Kroton Yağı ile Oluşturulan Kulak Ödemi	28
1.8.1.5. Sıçanlarda Pençe Ödemi	29
1.8.1.6. Plörezi Testleri	29
1.8.1.7. Granülom Kese Tekniği	30
1.8.2. Enflamasyonun Proliferasyon Evresinin Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler	30

1.8.2.1. Pamuk Pellet Granülom Testi	30
1.8.2.2. Cam Çubuk Granülom Testi	31
1.9. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri (ROS), Oksidatif Stres ve Antioksidan	31
1.10. Antioksidan Etkinin Tayin Edilmesinde Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Yöntemler	33
1.10.1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi	34
1.10.2. Toplam Radikal Tuzaklayıcı Antioksidan Parametre Yöntemi (TRAP)	34
1.10.3. Karotenoid (Krosin) Ağartma Yöntemi	34
1.10.4. Folin-Ciocalteu (FC) Yöntemi	35
1.10.5. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi / (ABTS●+) Radikalini Süpürücü Etki Tayini	35
1.10.6. Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi (FRAP)	36
1.10.7. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi	36
1.10.8. Hidroksil (OH) Radikalini Süpürücü Etki Tayini	36
1.10.9. Cu(II)'nin Oksidan Olarak Kullanıldığı Toplam Antioksidan Potansiyel Yöntemi (CUPRAC)	37
1.10.10. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi	37
1.11. Botanik Bilgiler	38
1.11.1. Betulaceae Familyasının Genel Özellikleri	38
1.11.2. <i>Alnus</i> Miller Cinsinin Genel Özellikleri	39
1.11.3. <i>Alnus</i> Cinsine Ait Tayin Anahtarı	40
1.11.4. <i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertner Türünün Genel Özellikleri	40
1.11.5. <i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertner Türüne Ait Tayin Anahtarı	41
1.11.6. <i>Alnus orientalis</i> Decne Türünün Genel Özellikleri	41
1.11.7. <i>Alnus orientalis</i> Decne Türüne Ait Tayin Anahtarı	42
1.12. <i>Alnus</i> Miller Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	42
1.12.1. <i>Alnus</i> Miller Türlerinin Halk Arasındaki Kullanımı	42
1.12.2. <i>Alnus</i> Miller Türlerinin Kimyasal İçeriği	43
1.12.2.1. Diarilheptanoitler	44

1.12.2.2. Flavonoitler	56
1.12.2.3. Triterpenik Yapılı Bileşikler	63
1.12.2.4. Stilbenler	70
1.12.2.5. Diğer Bileşikler	71
1.12.3. <i>Alnus</i> Miller Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri	75
1.12.3.1. Antibakteriyal Aktivite	75
1.12.3.2. Antienflamatuvar Aktivite	76
1.12.3.3. Antioksidan Etki	78
1.12.3.4. Antitümoral ve Sitotoksik Aktivite	79
1.12.3.5. Antiviral Aktivite	80
1.12.3.6. Hepatoprotektif Etki	81
1.12.3.7. İmmünolojik Özellikler	82
1.12.3.8. Diğer Etkiler	82
1.12.4. Toksisite Çalışmaları	84
2. GEREÇ VE YÖNTEM	85
2.1. Gereç	85
2.1.1. Bitkisel Gereç	85
2.2. Yöntem	92
2.2.1. Bitkisel Ekstrelerin Hazırlanması	92
2.2.1.1. Fitokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözücüler, Cihazlar ve Adsorbanlar	92
2.2.1.2. Metanollü Ekstrelerin Hazırlanması	92
2.2.1.3. Sulu Ekstrelerin Hazırlanması	93
2.2.2. Biyolojik Aktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama (BAYF) Yöntemi İle İzolasyon Çalışmaları	93
2.2.2.1. Metanollü Ekstrenin Hazırlanması	93
2.2.2.2. Vakumlu Sıvı Kromatografisi (VLC) İle Kaba Fraksiyonlama	94
2.2.2.3. Etil asetat-Metanollü Fraksiyonun (FD) Kolon Kromatografisi İle Ayrılması	94
2.2.2.4. FD ₂₇₋₃₈ Fraksiyonundan Silika jel Kolon Kromatografisi ile Aktif Majör Maddenin İzolasyonu	95
2.2.3. İzole Edilen Bileşiğin Yapı Tayini	96

2.2.3.1. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometresi	96
2.2.3.2. İnfrared (IR) Spektroskopisi	96
2.2.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	97
2.2.4.1. <i>In-vivo</i> Çalışmalarda Kullanılan Deney Hayvanları, Test Numunelerinin Hazırlanması ve Referans Maddeler	97
2.2.4.1.1. Deney Hayvanları	97
2.2.4.1.2. Test Numunelerinin Hazırlanması	97
2.2.4.1.3. Referans Maddeler	98
2.2.4.2. Yara İyileştirici Aktivite Tayini	98
2.2.4.2.1. <i>In vivo</i> deneyler	98
2.2.4.2.1.1. Çizgisel İnsizyon Yara Modeli	98
2.2.4.2.1.2. Dairesel Eksizyon Yara Modeli	99
2.2.4.2.2. L (-) Hidroksiprolin Tayini	99
2.2.4.2.3. Histopatolojik İncelemeler	100
2.2.4.2.4. <i>In vitro</i> deneyler	101
2.2.4.2.4.1. Hiyoluronidaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi	101
2.2.4.2.4.2. Kolajenaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi	102
2.2.4.2.4.3. Elastaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi	102
2.2.4.3. Antienflamatuvar Aktivite Tayini	103
2.2.4.3.1. Karragen-nedenli Arka Ayak Ödemi Testi	103
2.2.4.3.2. Asetik Asit-nedenli Kapiller Permeabilite Artışının İnhibisyonu (Whittle Yöntemi)	104
2.2.4.3.3. TPA (12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat)-nedenli Kulak Ödemi Testi	105
2.2.4.4. Antioksidan Etki Çalışmaları	106
2.2.4.4.1. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini	107
2.2.4.4.2. 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS+●) Radikalini Süpürücü Etki Tayini	107
2.2.4.4.3. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi	108
2.2.4.4.4. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-deoksiriboz Bozulması	108

2.2.4.5. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar	109
2.2.4.6. Deneyin Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi	109
2.2.5. HPLC Analizi ile Şikimik Asit Miktar Tayini	110
2.2.5.1. HPLC Analiz Koşulları	110
2.2.5.2. Kullanılan Çözücüler	110
2.2.5.3. Analiz Numunelerinin Hazırlanması	110
2.2.6. Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	111
2.2.7. Analitik Yöntem Validasyonu	112
2.2.7.1. Doğrusallık	112
2.2.7.2. Kesinlik	112
2.2.7.2.1. Tayin Edilebilir En Düşük Limit (Teşhis Sınırı-TS) (Limit of Detection- LOD)	113
2.2.7.2.2. Hesaplanabilir En Düşük Limit (Tayin Alt Sınırı-TAS) (Limit of Quantitation- LOQ)	113
3. BULGULAR	114
3.1. İzole Edilen Bileşiğin Yapı Tayinine İlişkin Bulgular	114
3.1.1. NMR Spektrumu Sonuçları	114
3.1.2. IR Spektrumu Sonuçları	117
3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular	118
3.2.1. Yara İyileştirici Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular	118
3.2.2. Antienflamatuvar Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular	132
3.2.3. Antioksidan Etki Çalışmalarına İlişkin Bulgular	137
3.2.4. Yara İyileştirici Etki Mekanizmasının Belirlenmesi Amacı İle Gerçekleştirilen <i>In-vitro</i> Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına İlişkin Bulgular	138
3.3. Teşhis ve Miktar Tayini Bulguları	139
3.4. Yöntem Validasyon Bulguları	144
4. TARTIŞMA	146
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	152
ÖZET	154
SUMMARY	156
KAYNAKLAR	157
ÖZGEÇMİŞ	164

ÖNSÖZ

Bitkilerin tıbbi amaçlarla kullanımı insanlık tarihiyle birlikte başlamıştır. Dünyada var olan yaklaşık 250 bin bitki türünden 35-70 bin türün tıbbi amaçlarla kullanıldığı tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere dünya nüfusunun yaklaşık %70-80'i ilk basamak tedavide konvansiyonel olmayan ilaçları tercih etmektedir. Bitkisel ilaçların geleneksel tıpta kullanımlarının yanı sıra günümüz ilaçlarının geliştirilmesinde oynadıkları rol de son derece önemlidir. Bu nedenle tedaviye sunulacak yeni ilaçların ve yeni bileşiklerin geliştirilmesi amacı ile bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Alnus türleri dünyada halk arasında antiperspirant olarak, çeşitli cilt rahatsızlıklarında, diş apselerinde, tırnak enflamasyonu, romatizma ve hemoroid tedavisinde, yara iyileştirici ve ateş düşürücü olarak, rahim kanserinde ve çeşitli tümörlere karşı olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır. Türkiye'de ise halk arasında *A. glutinosa* yapraklarından haricen yara iyileştirici olarak dahilen ise romatizma tedavisinde yararlanılmaktadır.

Alnus türleri, Türkiye'de ve dünyada önemli etkileri nedeni ile kullanılıyor olmasına ve bazı türler üzerinde kimyasal içerik ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmış olmasına rağmen, Türkiye'de yetişen *A. glutinosa* alt türleri ve *A. orientalis* üzerinde yapılmış herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasına rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, Türkiye'de doğal olarak yetişen *A. glutinosa* subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis* ve *A. orientalis* var. *pubescens* yaprakları üzerinde yara iyileştirici, antienflamatuvar ve antioksidan etki çalışmaları yapılarak *Alnus* türünün ülkemizdeki geleneksel kullanımını bilimsel verilerle destekleyebilecek sonuçlara ulaşılması, ayrıca etkili bulunan takson üzerinden Biyoaktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama (BAYF) Yöntemi ile izolasyon çalışmaları yapılarak etkili bileşik/lerin izolasyonu ve izole edilen bileşik/lerin çalışılan bitkilerdeki miktarının

kantitatif olarak tayin edilmesi amaçlanmıştır. Bu araştırma ülkemizde yetişen bazı *Alnus* taksonları üzerinde yapılmış bu konudaki ilk ve tek kapsamlı çalışmadır.

Yüksek Lisans eğitimimin başlangıcından itibaren çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, hep yanımda olan, bilgisini ve tecrübelerini benimle paylaşan, çok değerli hocam Prof. Dr. M. Levent Altun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca, laboratuvarımızın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan, desteklerini hep hissettiğim başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Gülçin Saltan olmak üzere Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Antienflamatuvar, yara iyi edici ve antioksidan aktivite çalışmalarını yürüten değerli hocam Prof. Dr. Esra Akkol ile sevgili arkadaşım Dr. Ecz. İpek Süntar'a teşekkürü bir borç bilirim.

Kromatografi analizlerim sırasında LC-MS cihazıyla ilgili yardımlarından dolayı sevgili hocam Prof. Dr. Murat Kartal'a, sevgili arkadaşım Yard. Doç. Dr. Sinem Aslan Erdem'e ve analizlerin her aşamasında yanımda olan, her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan sevgili arkadaşım Uzm. Ecz. Burçin Ergene'ye teşekkür ederim.

Tez bitkilerimi teşhis eden, çok yoğun programında bana her zaman vakit ayıran çok değerli hocam Prof. Dr. Hayri Duman'a teşekkürlerimi sunarım.

İzolasyon ve yapı tayini çalışmalarım sırasında her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan çok değerli arkadaşlarım Doç. Dr. Özlem Bahadır Acıkara ve Dr. Ecz. Alper Gökbulut'a teşekkürü bir borç bilirim.

NMR analizlerimin gerçekleştirilmesi için Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarından faydalanmamı sağlayan başta Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı olmak üzere Prof. Dr. Hakan Göker ile IR analizlerimi gerçekleştiren ve yorumlayan Prof. Dr. Serdar Abacı'ya teşekkür ederim. Ayrıca

NMR sonuçlarını değerlendirerek yapı tayinine büyük katkı sağlayan, yoğun programında bana vakit ayıran değerli hocam Prof. Dr. Şebnem Harput'a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora programıma devam etmeme olanak sağlayan başta Kurum Başkanım Sayın Dr. Saim Kerman olmak üzere tüm yöneticilerime, ayrıca Daire Başkanım ve sevgili arkadaşım Dr. Ecz. Aslı CAN AĞCA'ya teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi manevi desteklerini eksik etmeyen, hep yanımda olan canım aileme ve yaşama sevincim biricik oğlum Sarp'a sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ l	Mikrolitre
AA	Araşidonik Asit
AAPH	2'-azobis(2-amidinopropan)hidroklorit
ABTS	2,2-azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit
AEF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
AGS	Human gastric adenocarcinoma cells
BAYF	Biyoaktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama
BHA	Butillenmiş hidroksianisol
BHT	Butillenmiş hidroksitoluen
BSS	Bağıl Standart Sapma
CAM	Civciv Koryoallantoik Membran
CHCl ₃	Kloroform
COX	Siklooksijenaz
DAD	Diode Array Dedector
dak	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EtOAc	Etil asetat
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1- Hipoksi ile indüklenen faktör-1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration: In vitro testlerde % 50 inhibisyon yaratan inhibitör konsantrasyonu.
IL-1	İnterlökin-1
ILs	İnterlökinler
IR	Infrared
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi

LD	Letal Doz
LOD	Limit of Detection - Tayin Edilebilir En Düşük Limit - Teşhis Sınırı (TS)
LOQ	Limit of Quantitation - Hesaplanabilir En Düşük Limit - Tayin Alt Sınırı - TAS
LOX	Lipooksijenaz
LTs	Lökotrienler
LTB ₄	Lökotrien B ₄
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mm	Milimetre
MIC	Minimum Inhibitory Concentration- Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> -Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> -Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
°C	Santigrat derece
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
PDGF	Platelet-derived growth factor (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü)
PGs	Prostaglandinler
PGE	Prostaglandin E
PKC α	Protein Kinaz C alfa
PL(pro)	Papain-like protease (Papain benzeri proteaz)
RC ₅₀	DPPH radikalinin %50 sinin indirgenebildiği konsantrasyon
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RNS	Reactive Nitrogen Species (Reaktif Nitrojen Türleri)
R _f	Retention factor (Retansiyon faktörü)
R _t	Retension time (Retansiyon zamanı)
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome (Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu) Coronavirüs

T-BHP	Tert-butil hidroperoksit
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TGF	Tümör Büyüme Faktörü
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
UV	Ultraviyole
VLC	Vacuum Liquid Chromatography (Vakumlu Sıvı Kromatografisi)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Yara iyileşme sürecinde görev yapan temel hücreler ve etkileri	4
Şekil 1.2.	Yara iyileşme sürecinin evreleri	12
Şekil 1.3.	Aoki ve ark. tarafından bazı <i>Alnus</i> türlerinden izole edilen diarilheptanoit yapılı bileşikler	45
Şekil 1.4.	Oregonin	46
Şekil 1.5.	Hirsutanonol	47
Şekil 1.6.	<i>A. japonica</i> kabuklarından izole edilen bazı diarilheptanoit yapılı bileşikler (Tung ve ark., 2010a)	49
Şekil 1.7.	Epihirsutanonol	50
Şekil 1.8.	1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-heptan-5- <i>O</i> - β -d-ksilopiranozit	52
Şekil 1.9.	<i>A. formosana</i> yapraklarından izole edilen bazı diarilheptanoit yapılı bileşikler (Lai ve ark., 2012)	53
Şekil 1.10.	Alusenon	54
Şekil 1.11.	1,7-bis-(4-dihidroksifenil)-5-hidroksi-3-heptanon	55
Şekil 1.12.	<i>Alnus</i> dimer	55
Şekil 1.13.	Genkwanin	56
Şekil 1.14.	<i>A. firma</i> yapraklarından izole edilen bazı flavonoit yapılı bileşikler (Yu ve ark., 2007)	58
Şekil 1.15.	<i>A. sieboldiana</i> çiçeklerinden izole edilen bazı flavon ve flavonoller (Asakawa, 1971)	59
Şekil 1.16.	<i>A. sieboldiana</i> çiçeklerinden izole edilen bazı flavan ve flavanoller (Asakawa, 1971)	60
Şekil 1.17.	<i>A. sieboldiana</i> ve <i>A. nepalensis</i> yapraklarından izole edilen bazı flavonol yapılı bileşikler	61
Şekil 1.18.	<i>A. rubra</i> tohum zarından izole edilen bazı flavon yapılı bileşikler (Hanawa ve Towers, 2003)	62
Şekil 1.19.	7,4'-dimetoksi-5-hidroksiflavon	63
Şekil 1.20.	<i>A. serrulatooides</i> , <i>A. sieboldiana</i> ve <i>A. pendula</i> çiçeklerinden izole edilen bazı triterpenik yapılı bileşikler (Aoki ve ark., 1990)	64
Şekil 1.21.	<i>A. pendula</i> ve <i>A. japonica</i> çiçeklerinden izole edilen bazı	65

	triterpenik yapılı bileşikler (Aoki ve ark., 1990)	
Şekil 1.22.	Mangiferonik asit	67
Şekil 1.23.	22-hidroksihopan-3-on	67
Şekil 1.24.	<i>A. firma</i> yapraklarından izole edilen bazı triterpenik yapılı bileşikler (Yu ve ark., 2007)	68
Şekil 1.25.	<i>A. nepalensis</i> bitkisinden izole edilen bazı triterpenik yapılı bileşikler (Phan ve ark., 2010)	69
Şekil 1.26.	<i>A. sieboldiana</i> bitkisinin erkek çiçeklerinden izole edilen bazı stilben yapılı bileşikler (Asakawa, 1971)	70
Şekil 1.27.	Metil gallat	71
Şekil 1.28.	Gallik asit	71
Şekil 1.29.	<i>A. glutinosa</i> ve <i>A. incana</i> yaprak tomurcuklarında bulunan hidroksisinnamik asit türevi bileşikler (Peev ve ark., 2007)	72
Şekil 1.30.	Pedunculagin	73
Şekil 1.31.	5- <i>O</i> -galloil(-)-şikimik asit	73
Şekil 1.32.	<i>A. nepalensis</i> bitkisinden izole edilen hidrokarbon türevi bileşikler (Phan ve ark., 2010)	74
Şekil 1.33.	Physcion (parietin)	74
Şekil 2.1.	<i>A. glutinosa</i> subsp. <i>glutinosa</i> genel görünüş	86
Şekil 2.2.	<i>A. orientalis</i> var. <i>pubescens</i> genel görünüş	87
Şekil 2.3.	<i>A. orientalis</i> var. <i>orientalis</i> genel görünüş	88
Şekil 2.4.	<i>A. glutinosa</i> subsp. <i>glutinosa</i> herbaryum örneği	89
Şekil 2.5.	<i>A. orientalis</i> var. <i>pubescens</i> herbaryum örneği	90
Şekil 2.6.	<i>A. orientalis</i> var. <i>orientalis</i> herbaryum örneği	91
Şekil 3.1.	İzole Edilen Bileşiğe Ait ¹ H-NMR Spektrumu	115
Şekil 3.2.	İzole Edilen Bileşiğe Ait ¹³ C-NMR Spektrumu	116
Şekil 3.3.	İzole Edilen Bileşiğe Ait IR Spektrumu	117
Şekil 3.4.	Metanollü (MB) ve sulu (SB) ekstreler ile hazırlanan test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları	128
Şekil 3.5.	MB ekstrelerinin VLC ile kaba fraksiyonlaması sonucu elde edilen ekstrelerle hazırlanan test numuneleri ile tedavi edilen yara	129

	dokularının histopatoloji sonuçları	
Şekil 3.6.	Etil asetat:Metanollü ekstreden elde edilen alt fraksiyonlar ile hazırlanan test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları	130
Şekil 3.7.	Şikimik asit ile hazırlanan test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları	131
Şekil 3.8.	Şikimik asit HPLC kromatogramı	140
Şekil 3.9.	<i>A. glutinosa</i> subsp. <i>glutinosa</i> metanol ekstresi HPLC kromatogramı	141
Şekil 3.10.	<i>A. orientalis</i> var. <i>orientalis</i> metanol ekstresi HPLC kromatogramı	142
Şekil 3.11.	<i>A. orientalis</i> var. <i>pubescens</i> metanol ekstresi HPLC kromatogramı	143
Şekil 3.12.	Şikimik asit için kullanılan kalibrasyon denklemi ve grafiği	145

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	İnflamasyon evresinde rol oynayan majör medyatörler	8
Çizelge 1.2.	Yara iyileşme sürecine etki eden bazı besin maddeleri	13
Çizelge 1.3.	Yara iyileşmesini geciktiren ilaçlar	15
Çizelge 1.4.	Enflamasyon Tiplerine Ait Özet Bilgiler	24
Çizelge 2.1.	Çalışmada kullanılan bitkiler	85
Çizelge 2.2.	Analiz numunesi hazırlanmasında alınan tam tartım değerleri ve analiz çözeltilerinin konsantrasyonları	111
Çizelge 3.1.	İzole Edilen Bileşiğin ¹³ C-NMR (100 MHz, CD ₃ OD) ve ¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD) Spektrumuna Ait Veriler	114
Çizelge 3.2.	Ekstre ve fraksiyonların insizyon yara modeli üzerindeki etkileri	119
Çizelge 3.3.	Ekstre ve fraksiyonların eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri	121
Çizelge 3.4.	Ekstre ve fraksiyonlar ile tedavi edilen dokuların hidroksiprolin düzeyi üzerindeki etkileri	124
Çizelge 3.5.	Ekstre ve fraksiyonlar ile tedavi edilen dokuların histopatoloji sonuçları	126
Çizelge 3.6.	Ekstre ve fraksiyonların Whittle yöntemi üzerindeki etkileri	132
Çizelge 3.7.	Ekstre ve fraksiyonların farelerde karagen-nedenli arka ayak ödemi üzerindeki etkileri	134
Çizelge 3.8.	Ekstre ve fraksiyonların farelerde TPA-nedenli kulak ödemi üzerindeki etkileri	136
Çizelge 3.9.	Ekstre ve fraksiyonların antioksidan etkileri etkileri	137
Çizelge 3.10.	Fr. 27-38'den izole edilen bileşiğin hiyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz inhibisyonu üzerindeki etkileri	138
Çizelge 3.11.	<i>Alnus</i> taksonlarının içerdiği şikimik asit miktarı	144
Çizelge 3.12.	Doğrusallık sonuçları	144
Çizelge 3.13.	Yöntem validasyonu İçin kesinlik değerleri ve % Bağlı Standart Sapmaları (% BSS)	145

Çizelge 3.14. Tayin Edilebilir En Düşük Limit (Teşhis Sınırı-TS) (LOD)	145
--	-----

1. GİRİŞ

Yumuşak dokuların normal anatomik yapı ve fonksiyonunun bozulması yara olarak isimlendirilir (Karasu ve Bakır, 2008). Yara oluşan dokuda anatomik bütünlüğün ve fonksiyonun tekrar sağlanması için yaranın düzgün biçimde iyileşmesi gerekmektedir (Edwin ve ark., 2008).

Yara iyileşmesi travma ile başlar, sistematik, hücrel ve biyokimyasal olaylar sonucu yeni doku oluşumu ile sonuçlanır (Özkorkmaz ve Özay, 2009). Bu olaylar iç içe geçmiş ve eş zamanlı oluşmasına rağmen yara iyileşmesi temel olarak enflamasyon, proliferasyon ve maturasyon olmak üzere üç evrede gerçekleşir (Karasu ve Bakır, 2008).

Yara iyileşmesinde serbest radikal süpürücü etki gösteren antioksidan etkili bileşiklerin önemi oldukça büyüktür. Yara iyileşmesinin enflamasyon evresinde monositler, nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlar tarafından gerçekleştirilen fagositoz olayı, oksidatif burst olarak bilinen ve oksijen tüketiminin dramatik olarak arttığı bir duruma yol açar. Sonuçta reaktif oksijen ve nitrojen türevleri oluşur. Bunlar mikroorganizmaları doğrudan öldürme yeteneğine sahip olmalarının yanı sıra tetikleyici ve haberci moleküller olarak da rol oynarlar. Ancak yüksek oranlarda bulunmaları enflamasyon bölgesinde hasar oluşumunu artırır (Gomes ve ark., 2008). Reaktif oksijen türevlerinin redüksiyonu, deaktivasyonu ve ortamdan uzaklaştırılmasında vücuttaki sitoprotektif enzim grubu olan serbest radikal süpürücü enzimler önemli rol oynasalar bile bazı durumlarda yetersiz kalabilirler. Serbest radikaller hücre membranı lipidleri, proteinler, enzimler ve nükleik asitler gibi yapılara zarar verebilirler. Antioksidan etki sağlayan bileşikler lipid peroksidasyonunu inhibe ederek hücre hasarını önlemekte ve kolajen fibrillerin dayanıklılığını arttırmaktadır (Edwin ve ark., 2008). Bu nedenle test edilen bitkilerin antioksidan etki bakımından değerlendirilmesi, yara iyileştirici etkileri hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir.

Yara oluşumunun ilk dönemlerinde gerçekleşen akut iltihabik cevap doku büyümesi ve onarımı için gerekli olan faktörlerin oluşumunu sağlar. Ancak bu sürecin uzaması ve kronik hale gelmesi yara iyileşmesinde son aşama olan maturasyon evresine ve matriks sentezlenmesine zarar vererek yaranın iyileşme süresini uzatır ve yaraya bağlı ağrılarda artışa neden olur (Mittal ve ark., 2013). Antienflamatuvar etkiye sahip bileşiklerin yara iyileşmesini kolaylaştırdığı göz önünde bulundurulduğunda antienflamatuvar aktivite deneyleri, yara iyileştirici aktivitenin tespit edilmesinde destekleyici deneyler olarak tercih edilmektedir.

Alnus türleri dünyada halk arasında antiperspirant olarak, kronik herpes, ekzema ve kaşıntılı deri hastalıkları gibi çeşitli cilt rahatsızlıklarında, diş apselerinde, tırnak enfeksiyonu, romatizma ve hemoroid tedavisinde, yara iyileştirici ve ateş düşürücü olarak, rahim kanserinde ve çeşitli tümörlere karşı, Türkiye’de ise *A. glutinosa* yaprakları ezildikten sonra haricen kesik ve yara tedavisinde, yapraklardan hazırlanan infüzyon ise günde 3 öğün birer bardak içilerek romatizma tedavisinde kullanılmasına rağmen literatürde *Alnus* türleri üzerinde yapılmış herhangi bir yara iyi edici aktivite çalışmasına rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, Türkiye’de doğal olarak yetişen *A. glutinosa* subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis* ve *A. orientalis* var. *pubescens* yaprakları üzerinde yara iyileştirici, antienflamatuvar ve antioksidan etki çalışmaları yapılarak *Alnus* türünün ülkemizdeki geleneksel kullanımının bilimsel verilerle desteklenmesine olanak sağlayacak sonuçlara ulaşılması, ayrıca etkili bulunan takson üzerinden Biyoaktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama (BAYF) Yöntemi ile izolasyon çalışmaları yapılarak etkili bileşik/lerin izolasyonu ve izole edilen bileşik/lerin çalışılan bitkilerdeki miktarının kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Yara

Yumuşak dokuların normal anatomik yapı ve fonksiyonunun bozulması yara olarak isimlendirilir (Karasu ve Bakır, 2008).

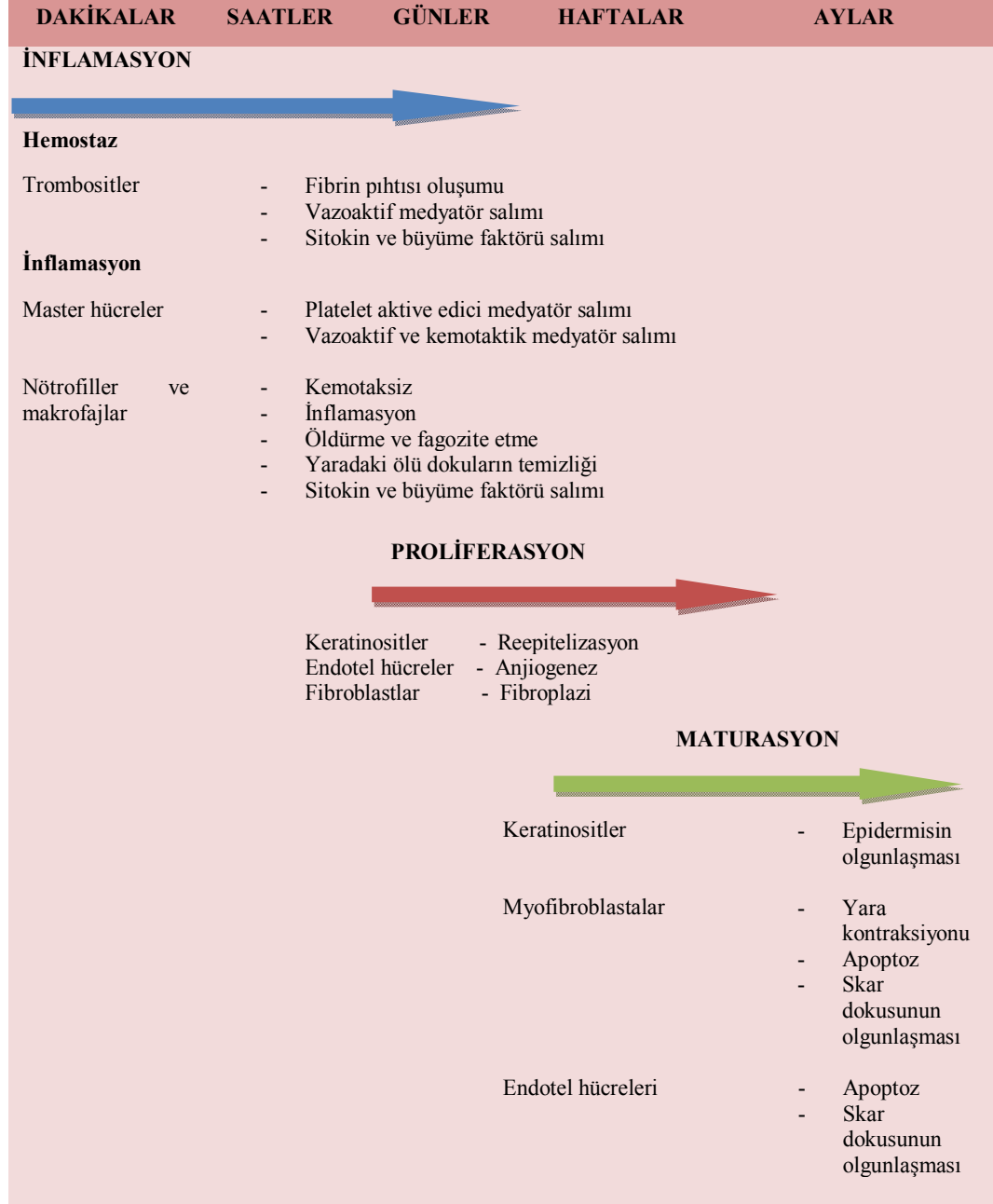
Yara fiziksel ve kimyasal yanma, travma, diyabet hastalığı gibi metabolik bozukluklar, basınç, hayvan ısırığı veya sokması, beslenme bozuklukları, ilaç etkileşimleri gibi çok çeşitli nedenlere bağlı olarak oluşabilmektedir. Yara bölgesinde gözlenen fiziksel hasarlar, kanama, kızarıklık, acı, zonklama hissi, duyu ve fonksiyon kaybı ile bölgedeki dokularda büzüşme ve akıntı en sık rastlanan yara semptomlarıdır (Özkorkmaz ve Özay, 2009).

1.2. Yara İyileşme Mekanizması

Yara iyileşmesi, deri veya başka bir organın ya da dokunun travma veya cerrahi işlemler sonrasında kendini onarma süreci olup oldukça karmaşık biyokimyasal ve hücrel olayları kapsamaktadır. Normal bir deride epidermis ve dermis koruyucu bir bariyer oluşturarak dokuyu dış ortamdan korurlar. Bu koruyucu bariyer zarar gördüğü anda yara iyileşmesinin fizyolojik süreci hızlı bir şekilde başlar. Travma olduğu anda başlayan bu iyileşme sürecinin tamamlanması bazen haftalar, hatta aylar alabilmektedir (Mittal ve ark., 2013).

Yara iyileşmesinde karmaşık olaylar iç içe geçmiş ve eş zamanlı gerçekleşmesine rağmen süreç temel olarak enflamasyon evresi, proliferasyon evresi ve maturasyon evresi olmak üzere 3 aşamada tamamlanmaktadır (Karasu ve Bakır, 2008).

Yara iyileşmesinin evreleri, bu evrelerde görev yapan temel hücreler ile bu hücrelerin etkilerine ilişkin bilgiler Şekil 1.1.de özetlenmiştir (Li ve ark., 2007)



Şekil 1.1. Yara iyileşme sürecinde görev yapan temel hücreler ve etkileri

1.2.1. İnflamasyon Evresi

İnflamasyon vücudun yaraya karşı oluşturduğu oldukça etkili ve ilk cevaptır. Bu evrede organizmayı kan kaybına karşı korumak, yabancı maddelerin invazyonunu önlemek ve yarayı onarım için hazır hale getirmek için bir takım vasküler ve hücrel reaksiyonlar gerçekleşir.

İyileşme sürecinin erken dönemlerinde oluşan bölgesel vazodilatasyon, ekstravasküler boşluğa kan ve sıvı sızması ve lenfatik drenajın engellenmesi ile enflamasyonun temel belirtileri olan yara alanında kızarma, şişme ve ısı artışı gerçekleşir. Bu akut inflamatuvar yanıt genellikle 24 ile 48 saat arasında tamamlanmakla birlikte bazı durumlarda 2 haftaya kadar sürebilmektedir. Doku yaralanması kan damarlarında hasara ve kanamaya neden olur. Trombositler birbirine yapışır, kümeleşir ve pıhtılaşmaya olanak sağlayacak bir çok medyatörün salınımına neden olur. Her ne kadar kan pıhtılaşmasının majör fonksiyonu hemostazı sağlamak olsa da trombositlerin ikinci fakat oldukça önemli bir fonksiyonu da kemoatraktantların ve büyüme faktörlerinin salınımını sağlayarak iyileşme sürecini başlatmaktır. Aynı zamanda oluşan pıhtı ile yara iyileşmesi için geçici bir matriks sağlanmaktadır. Bu önemli medyatörlerin salınımına cevap olarak yara bölgesine hasar gören bölgenin temizlenmesi, hasarlı doku kalıntılarının ve yabancı partiküllerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamak üzere lökositler gelir. Kanama ile başlayan bu evre vazodilatasyon ve permeabilite artışı ile sonuçlanmakta olup vasküler ve hücrel yanıt olmak üzere iki alt evrede tamamlanmaktadır (Li ve ark., 2007).

1.2.1.1. Vasküler Yanıt ve Hemostaz

Yaranın oluşmasını ve kanamayı takiben yara iyileşme sürecindeki ilk basamak hemostazdır. Hemostaz aşamasında fibrin pıhtısı oluşur ve pıhtılaşma gerçekleşir (Li ve ark., 2007).

Yara oluşumunu takiben hücre membranları tromboksan A₂ ve prostoglandin F_{2α} gibi vazoaktif bileşikler salgılayarak kan kaybının önlenmesini ve kan akım miktarının azalmasını sağlayacak 5-10 dakikalık bir vazokonstrüksiyona neden olurlar (Karasu ve Bakır, 2008).

Vazokonstrüksiyonla eş zamanlı olarak damarların hasar görmesini takiben fibrilar kolajen, fibronektin gibi matriks proteinleri tarafından aktive olan trombositler birbirine yapışır ve kümeleşir. Aynı zamanda bu trombositlerin granüllerinden serotonin, adenosin difosfat, tromboksan A₂ gibi birçok medyatör ile fibrinojen, fibronektin, trombospondin, von Willebrand faktör VIII gibi yapıştırıcı proteinleri serbest bırakır. Bu medyatörler ve lokal olarak oluşan trombin, trombositlerin salınımını ve kümeleşmesini indükler. Trombositlerin kümeleşmesi sırasında fibrinojenin trombin tarafından fibrinlere dönüştürülmesi sonucu kanamayı durdurmak üzere fibrin pıhtısı oluşur.

Hemostazda fibrin pıhtısının oluşumunu takip eden ikinci aşama intrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma yolları ile gerçekleşen pıhtılaşmadır. Trombositlerin kümeleşmesi, kanda bulunan Hageman faktör XII isimli özel bir enzimi tetikler. Bu şekilde proenzimlerin aktive olmuş enzimlere dönüşümünü sağlayacak bir dizi pıhtılaşma reaksiyonu başlar ve bu reaksiyonlar protrombinin trombine dönüşümü ile sonuçlanır. Trombin ise fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlar. Hasar gören doku, doku faktörü ismi verilen ve ekstrinsik pıhtılaşma yolağını aktive eden bir proteini serbest bırakır. Aktive olmuş monositler ve endotel hücreleri de bu doku faktörünü açığa çıkartarak pıhtılaşmada rol oynarlar (Li ve ark., 2007).

Hemostaz sırasında oluşan fibrin pıhtısının bir fonksiyonu da bölgede zarar gören lenfatikleri tıkayarak sıvının yaralanmış bölgeden drene olmasını engellemektir. Bu şekilde enflamasyon bölgesel bir olay olarak kalır. İnflamasyonun lokalize olması sonucu yara bölgesinde kızarıklık, şişlik, ısı artışı ve yaradan salınan nöropeptitlerin neden olduğu ağrı oluşur (Karasu ve Bakır, 2008).

1.2.1.2. Hücresel Yanıt ve İnflamasyon

Pıhtılaşma sürecinde salgılanan çeşitli vazoaktif medyatörler ve kemoatraktanlar sonucu lökositlerin yara bölgesine gelmeleri ile enflamasyon evresinin hücresel yanıtı başlamış olur. İnflamasyon evresinin erken dönemlerinde nötrofiller ve makrofajlar en baskın hücrelerdir (Li ve ark., 2007). Nötrofiller yara bölgesine ilk ulaşan hücrelerdir. Bu fagositik hücrelerin ömürleri kısa olmasına rağmen mikroorganizmalara karşı ilk korumayı nötrofiller sağlar (Flanagan, 2000). Bu mekanizmada proinflatuvar sitokinler olarak bilinen IL-1 (İnterlökin-1) ve TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü-alfa) önemli rol oynar. Yarada herhangi bir kontaminasyon bulunmuyorsa nötrofillerin sayısı giderek azalır ve bu hücreler yerlerini makrofajlara bırakırlar.

Yara bölgesine 2-4 gün arasında ulaşan makrofajlar patolojik mikroorganizmaları, doku artıklarını ve fonksiyonu bulunmayan nötrofilleri fagosit ederler. İnflamasyon evresi ile proliferasyon evresi arasında geçiş görevi üstlenirler, yara iyileşmesi için gerekli bir takım faktörleri (TNF- α , IL-1, TGF- β (Tümör Büyüme Faktörü-beta) gibi) salgırlar. Ayrıca nitrik oksit sentezleyerek serbest oksijen radikalleri yardımı ile patojenleri yok ederler (Karasu ve Bakır, 2008).

İnflamasyon evresinde rol oynayan majör medyatörler, bunların görevleri ve kaynakları Çizelge 1.1.de yer almaktadır.

Çizelge 1.1. İnflamasyon evresinde rol oynayan majör medyatörler (Li ve ark.,2007)

MEDYATÖR		GÖREVİ	MAJÖR KAYNAK
Vazoaktif aminler	Histamin	Vazodilatasyon, damar permeabilitesinde artış	Trombositler, mast hücreleri, bazofiller
	Serotonin	Kemotaktik	Trombositler, mast hücreleri
Plazma proteazları	Bradikinin	Vazodilatasyon, damar permeabilitesinde artış, ağrı oluşumu	Plazma proteini
	Komplemanlar	Kemotaktik	Plazma proteini ve makrofajlar
Pıhtılaşma sistemi	Hageman faktör	Damar permeabilitesinde artış, pıhtılaşma	Plazma proteini
	Fibrinopeptitler	Kemotaktik, damar permeabilitesinde artış	Plazma proteini
	Faktör XIIa	Damar permeabilitesinde artış	Plazma proteini
	PAF	Kemotaktik, vazodilatasyon, damar permeabilitesinde artış	Lökositler
	Trombosit medyatörleri	Kemotaktik, vazokonstriksiyon, pıhtılaşma	Trombositler
Araşidonik asit metabolitleri	PGs (prostaglandinler)	Kemotaktik, vazodilatasyon, ağrı ve ateş oluşumu	Membran fosfolipidleri
	LTs (lökotrienler)	Kemotaktik, vazokonstriksiyon, damar permeabilitesinde artış	Lökositler, membran fosfolipidleri
Serbest radikaller	O ₂ metabolitleri	Vazokonstriksiyon, damar permeabilitesinde artış, doku hasarı	Lökositler
	Nitrik oksit	Vazodilatasyon, doku hasarı	Makrofajlar ve endotel
Sitokinler	ILs (interlökinler), TNF	Kemotaktik	Makrofajlar
	PDGF, TGF- β	Kemotaktik	Trombositler, makrofajlar

1.2.2. Proliferasyon Evresi

Yara bölgesinin enfeksiyon, ölü doku, kan pıhtısı ve yabancı cisimlerden temizlenmesini takiben yaralanmadan sonraki 3-5. günlerde başlayan bu dönem, granülasyon dokusunun oluşumu, epitelizasyon ve yara kontraksiyonu ile karakterizedir.

Bu dönemde enflamasyon evresinde salınan kemoatraktantlar, özellikle de TGF- β etkisiyle yara bölgesine göç eden fibroblastlar dokuların yeniden yapılandırılması sürecinde rol oynayan en önemli hücrelerdir (Karasu ve Bakır, 2008).

1.2.2.1. Granülasyon Dokusunun Oluşumu

Granülasyon dokusunun gelişimi fibroplazi ve angiogenez ile karakterize olup, oluşan bu doku hem açık yaraların iyileşmesi sürecinde enfeksiyona karşı bir bariyer görevi görmekte hem de epitel hücrelerinin yara bölgesine göç etmesi için bir zemin oluşturmaktadır (Karasu ve Bakır, 2008).

Yeni kan damarlarının oluşumu angiogenez olarak isimlendirilir. Angiogenez oluşumu, yaralanma sırasında kan akımının zarar görmesi sonucu dokuların oksijensiz kalması (hipoksi) ve makrofajların aktive olması ile uyarılır. Makrofajlar, yeni doku ve kan damarları oluşumunu destekleyen TGF ile nekrotik dokuların yıkımını kolaylaştırarak proliferasyon oluşumunu uyaran TNF'yi de kapsayan bir takım maddeler üreterek angiogenezi stimüle ederler (Flanagan, 2000). Angiogenez sonucu oluşan yeni kan damarları gerekli besin ve oksijenin yeni oluşan dokulara ulaşmasını sağlayarak granülasyon dokusunun oluşumunda rol oynarlar.

Fibroblastların yara bölgesine gelmesi olayına fibroplazi denir. Fibroplazi sonucu yara bölgesine ulaşan fibroblastlar protein sentezine başlayarak kolajen, proteoglikanlar (örneğin hyalüronik asit), glikoproteinler (örneğin fibronektin) ve elastini de içeren kolajence zengin bir matriks oluştururlar. Oluşan hücreler arası matriksin yapısal molekülleri granülasyon dokusu oluşumuna katkı sağlarlar (Li ve ark., 2007). Kolajen, hücrelere destekleyici bir iskelet oluştururken elastin, doku için gerekli esnekliği, hyalüronik asit ise suyun tutulmasına neden olarak yapıların devamlılığını sağlar (Sahasrabudhe ve Deodhar, 2010). Fibronektin ise fibroblastların hücreler arası matrikse bağlanmalarına olanak sağlar ve hücre migrasyonu için yapışkan bir yüzey oluşturur. Ayrıca fibronektin matriks kolajen

fibrilleri için bir yapı iskelesi görevi görerek yara kontraksiyonuna aracılık eder (Li ve ark., 2007).

1.2.2.2. Epitelizasyon

Epidermis iç ve dış ortam arasında bir bariyer oluşturarak zararlı maddelerin girişine engel olur, elektrolit ve sıvı kaybını önler. Epitelizasyon sonucu epitel hücrelerinin yara bölgesine göç ederek çoğalmaları sonucu yara yüzeyi epitel hücreleri ile kaplanır (Karasu ve Bakır, 2008). Hücrelerin migrasyonu tamamlandıktan sonra yara bölgesine ulaşan epitel hücreleri epidermisin farklı tabakalarını oluşturmak üzere farklılaşmaya başlarlar. Yara bölgesinde ölü dokuların ve kalıntıların varlığı epitelizasyon sürecinin tamamlanmasına engel olacağından yaralanmalarda hasarlı bölgenin iyice temizlenmiş olması yara iyileşmesi için önemlidir (Johnstone ve ark., 2005).

1.2.2.3. Yara Kontraksiyonu

Yara kontraksiyonu yaralanmanın hemen sonrasında başlar ve 2. haftada pik düzeye ulaşır. Kontraksiyonun derecesi yaranın derinliğine bağlı olarak farklılık göstermektedir.

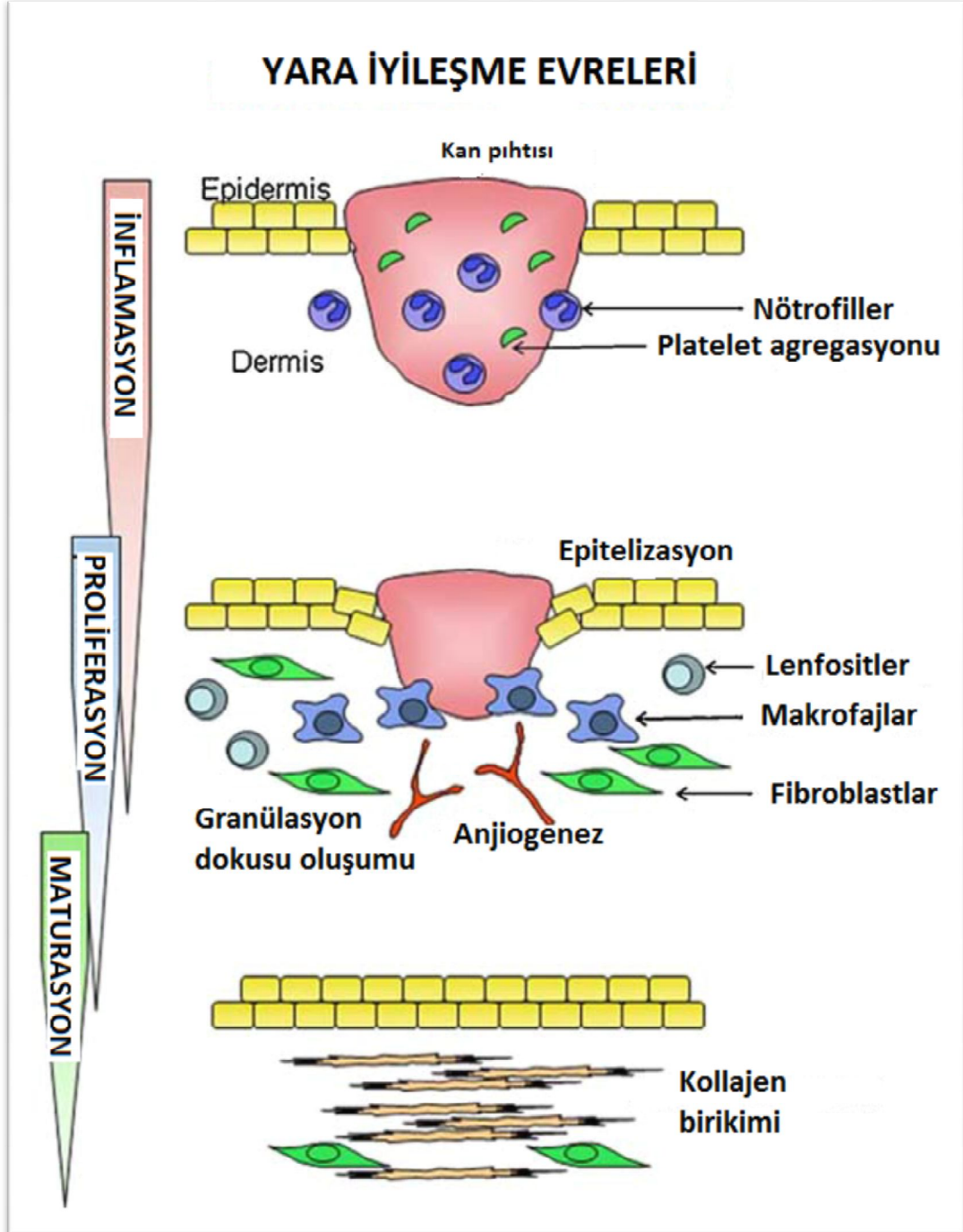
Yara kontraksiyonunda rol oynayan baskın hücreler miyofibroblastlardır. Granülasyon dokusundaki fibroblastların farklılaşması ile oluşan miyofibroblastlar genişlerler ve fibronektine bağlanırlar. Kolajen liflerini beraberlerinde sürükleyerek kontraksiyon yeteneklerine bağlı olarak yara kenarlarını merkeze doğru çekerler ve yara alanının küçülmesini sağlarlar (Li ve ark., 2007).

1.2.3. Maturasyon (Re-modelleme) Evresi

Maturasyon evresi yara iyileşme sürecinin en son ve en uzun evresidir. Bu evrede temel olarak granülasyon dokusu skar dokusuna dönüşür ve hücreler arası matriks olgunlaşır. Yara bölgesindeki fibroblastların sayısı giderek azalır ve kolajen üretimi dengeye ulaşır. Ayrıca yeni epitel dokunun oluşması tamamlanır, yara rengi soluklaşır, yara gerilim direnci artar ve iyileşmiş skar dokusu oluşur. Bu evrede temel görevi doku direncini arttırmak ve şekil almasını sağlamak olan kolajenden oluşan fibriller birbirlerine bağlanırlar ve deri yüzeyinde paralel şekilde tekrar düzenlenirler.

Yara iyileşmesi sürecinin sonunda yara gerilim kuvveti normal doku düzeyine gelir. Yaraya direnç kazandıran temel madde kolajen olup yara gerilim direnci kolajenlerin olgunlaşmasına bağlıdır. Kolajenlerin olgunlaşması ise yaralanmadan sonraki 15. günde başlar ve 12 aya kadar sürer (Karasu ve Bakır, 2008).

Yara iyileşmesinin evreleri Şekil 1.2.de verilmiştir (Kondo ve Ishida, 2010).



Şekil 1.2. Yara iyileşme sürecinin evreleri (Kondo ve Ishida, 2010)

1.3. Yara İyileşmesine Etki Eden Faktörler

Yara iyileşmesi normal biyolojik bir süreçtir. Bu sürece birçok etiyolojik faktör olumsuz yönde etki edebilir. Bu faktörlerin yara iyileşmesi üzerine etkilerinin iyi bilinmesi yara tedavisi için daha iyi stratejiler geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Yara iyileşmesine etki eden bazı faktörler şunlardır:

- Yetersiz Beslenme

Yara iyileşmesi enerji ve besin öğelerinin gerekli olduğu anabolik bir süreçtir. İyi beslenememe durumuna bağlı olarak gerekli besin maddelerinin yeterli düzeyde alınamaması yara iyileşme sürecini olumsuz yönde etkiler.

Bazı besin öğeleri ve bunların yara iyileşme sürecindeki rolleri Çizelge 1.2.de verilmiştir (Mittal ve ark., 2013).

Çizelge 1.2. Yara iyileşme sürecine etki eden bazı besin maddeleri (Mittal ve ark., 2013).

BESİN ÖĞESİ	ETKİSİ
A Vitamini	- Epitel hücrelerinin farklılaşması ve kemik dokusunun oluşumu için gereklidir. - İmmün cevapların stimülasyonu ve lokalizasyonunu geliştirir.
C Vitamini	- Kolajen, proteoglikanlar ve başka birtakım organik bileşiklerin sentezi için gereklidir. - Antioksidan özelliğindedir. - İmmün yanıtı destekler.
E Vitamini	- Lipidleri peroksidasyona karşı koruyan yağda çözünebilir majör antioksidandır.
Bromelain	- Yara oluşumu sonrası iyileşme süreci ile yara bölgesindeki ödem ve ağrıyı azaltır.
Glukozamin	- Yaradaki hyalüronik asit üretimi için hız sınırlayıcı substrattır.
Çinko	- DNA sentezi, hücre bölünmesi ve protein sentezi için gereklidir.
Protein	- Kolajen sentezi için gereklidir. - İyileşme sürecinin uzamasını engeller.
Arjinin	- Yeterli yara onarımı ve immün fonksiyonlar için gereklidir.
Glutamin	- Proliferasyon süreci ve doku onarımı için gereklidir.

- Yara alanında enfeksiyon gelişimi

Yara enfeksiyonları yara iyileşme sürecini uzatan belki de en önemli faktördür. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* yara enfeksiyonuna neden olan bazı önemli mikroorganizmalardır (Mittal ve ark., 2013).

- Yara bölgesinde hipoksi

Yara bölgesinde oksijen miktarının yetersiz kalması iyileşme sürecini olumsuz etkilemektedir. Hipoksi anjiogenez için uyarıcı bir faktör olsa da iyileşme sürecinin ilerleyen evrelerinde dokular iyileşmek için yüksek miktarda oksijene ihtiyaç duyarlar. Oksijen seviyesinin 35 mm Hg'nin altına düştüğü dokularda fibroblastlar replike olamazlar ve kolajen üretimi ciddi düzeyde azalır. Venöz yetersizliğe sahip bireylerde yara iyileşme sürecinde uzama veya yaraların kronikleşmesi önemli problemlerdir. Mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte bilimsel veriler bu problemlerin kaynağının damarların yeterli oksijeni hasarlı dokuya taşıyamaması olduğunu göstermektedir (Burns ve ark., 2003).

- İlaçlar

Yara iyileşmesini geciktiren ilaçlar Çizelge 1.3.de yer almaktadır (Burns ve ark., 2003). Bunlar arasında kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar yara iyileşmesini geciktirdiği bilinen en geniş gruptur. Bir başka grup olan sistemik glukokortikoidler ise kolajen sentezini ve fibroblast proliferasyonunu azaltarak yara iyileşme sürecini olumsuz etkilerler (Mittal ve ark., 2013).

Çizelge 1.3. Yara iyileşmesini geciktiren ilaçlar (Burns ve ark., 2003)

Antikoagülanlar
Antihistaminler
Antimikrobiyaller (bazıları)
Aspirin
Azatiopirin
B-aminopropionitril
Povidon-iyodin
Kemoterapötik ajanlar
Klorheksidin
Kolşisin
Siklosporin
Dakin's çözeltisi (% 0,25 sodyum hipoklorit)
Fenitoin
Glukokortikoidler
İmmunosupresif ajanlar
Latirogenler
Non-steroidal antienflamatuvar ajanlar
Papaverin
Penisilamin
Fenilbutazon
Kinolin sülfat
Retinoidler
Tifenamil hidroklorür

- Yaşlanma

Yaşlı bireylerde oluşan yaralarda fibroblast gelişimi ve aktivitesinin azalması ve kolajen üretiminin yavaşlamasına bağlı olarak yara iyileşme sürecinin uzadığı belirlenmiştir (Mittal ve ark., 2013).

- Diyabet ve diğer hastalıklar

Diyabetli bir hasta üzerinde yapılan bir çalışmada yaranın enfekte olma hızının normal bireylere göre % 11 yüksek olduğu saptanmıştır. Yine çeşitli çalışmalarda

akut ve kronik karaciğer rahatsızlıklarının yara iyileşme sürecini uzattığı belirtilmiştir. Genel olarak bağışıklık sistemi bozulmuş hastaların yara bölgelerinde enfeksiyon gelişme olasılığı normal bireylere göre yüksektir (Mittal ve ark., 2013).

- Diğer faktörler

Yara iyileşme sürecini geciktiren diğer faktörler arasında radyoterapi ve kemoterapi, genetik ve immünolojik bir takım bozukluklar, sigara kullanımı, mekanik stres ile toksik bir takım temizleme ajanlarının kullanımı yer almaktadır (Özkorkmaz ve Özay, 2009; Flanagan, 2000; Burns ve ark., 2003).

1.4. Yara İyileşmesine Etki Eden Bazı Farmakolojik Aktiviteler

1.4.1. Antienflamatuvar Aktivite

Yara iyileşme sürecinin erken dönemlerinde gelişen akut enflamatuvar cevap, doku gelişimi ve onarımı için gerekli bir takım faktörleri oluşturur. Ancak uzamış bir enflamatuvar cevap iyileşme sürecinin maturasyon evresi ve matriks oluşumu üzerinde olumsuz etkiler yaratarak yaranın kapanma sürecini geciktirir ve ağrı oluşumunu arttırır. Bu nedenle antienflamatuvar etki yara iyileşme sürecini kolaylaştırarak hasta konforunu arttıran bir faktördür (Mittal ve ark., 2013).

1.4.2. Antioksidan Aktivite

Yara bölgesinde yüksek oranda serbest radikal oluşumu lipidlerin, proteinlerin, kolajen, proteoglikan ve hyalüronik asitin zarar görmesine neden olarak iyileşme sürecini uzatabilmektedir. Bu nedenle antioksidan etkiye sahip bileşikler canlı dokuyu koruyarak yara iyileşme sürecini kolaylaştırırlar (Mittal ve ark., 2013).

1.4.3. Antimikrobiyal Aktivite

Yara iyileşmesini geciktiren bir faktör de yara bölgesinde fazla miktarda mikroorganizma bulunmasıdır. Hem lokal enflamasyonu azaltmak hem de doku hasarını en aza indirmek için yaradaki bakteri yoğunluğunu azaltmak önemlidir (Mittal ve ark., 2013).

1.4.4. Analjezik Aktivite

Açık yaralarda ağrı ve güçsüzlük olduğu göz önünde bulundurulduğunda tedavi sırasında yaraya uygulanan sargının ağrıyı arttırmaması hatta azaltacak özellikte olması hasta açısından önem taşımaktadır (Mittal ve ark., 2013).

1.5. Yara İyileştirici Aktivite Tayininde Kullanılan Yöntemler

1.5.1. *In-vitro* Yöntemler

1.5.1.1. Canlı Hücreler Üzerinde Yapılan Testler

Yara iyileşme sürecinde temel olaylar olan proliferasyon ve migrasyon ile süreçte önemli rol oynayan fibroblastlar ve keratinositlerin fonksiyonu canlı hücreler üzerinde yapılan yara iyileştirici aktivite tayininin temelini oluşturur. Bu testlerin avantajları kullanışlı, hızlı sonuç veren ve kısmen maliyeti düşük deneyler olmalarıdır.

En çok kullanılan yöntemler CAM (Civciv Koryoallantoik Membran) Testi, Fibroblast Tayini ve Keratinosit Tayini yöntemleridir (Shrimanker ve ark., 2013).

CAM modeli, test edilen numunenin anjiogenik aktivitesinin belirlenmesi amacı ile kullanılır. Bu yöntemde 9 günlük fertilize civciv yumurtalarının kabukları üzerinde 1,0 cm'lik küçük pencereler açılır ve test numunesi yüklü steril metilselüloz diski CAM üzerinde yer alan iki büyük damarın kesişim noktasına yerleştirilir. Pencere bir bant ile kapatılır ve yumurtalar 72 saat boyunca 37°C'de inkübe edilir. Bu süre sonunda yumurtalar açılır. Test numunesi, standart olarak kullanılan bFGF (Fibroblast Büyüme Faktörü) ve kontrol numunesi ile muamele edilen CAM'ler üzerinde gelişen yeni kan damarları oluşumları karşılaştırılır.

Fibroblast Tayini ve Keratinosit Tayini yöntemlerinde test numunesinin fibroblast ve keratinositlerin gelişimi üzerindeki etkisi incelenir (Shrimanker ve ark., 2013).

1.5.1.2. Enzim Deneyleri

Hücreler arası matriks hyalüronik asit gibi proteoglikanlar ve bunlarla iç içe geçmiş kolajen, elastin, fibronektin gibi metallo proteinlerden oluşur. Kolajen, hücrelere destekleyici bir iskelet oluştururken elastin, doku için gerekli esnekliği, hyalüronik asit ise suyun tutulmasına neden olarak yapıların devamlılığı sağlar (Sahasrabudhe ve Deodhar, 2010).

Hyalüronidaz, kolajenaz ve elastaz, ekstraselüler matriks proteinlerinin enzimatik yıkımına neden olan metallo proteaz enzimlerdir. Sağlıklı dokularda bu enzimlerin sentezi ve yıkımı denge halindedir. Ancak dengenin metallo proteazlardan yana bozulması durumunda bağ doku makromolekülleri kontrolsüzce yıkıma uğrar ve yara iyileşme süreci gecikir. Bu enzimler aynı zamanda TGF- β , PDGF, fibronektin, α -1 antiproteaz ve α -2 makroglobin'in yıkımına da neden olarak kronik yaraların patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadırlar (Menke ve ark., 2007; Sahasrabudhe ve Deodhar, 2010).

Yapılan çalışmalarda kronik, iyileşmeyen yaralarda ve yanığa bağlı oluşan yaralarda elastaz miktarının yüksek olduğu, akut yaraların düzgün biçimde iyileşmesi için elastaz ve diğer matriks metalloproteazların miktarının düşük olmasının gerekliliği rapor edilmiştir. Yine kronik yaralarda iyileşme sürecinin kısalması için proteaz seviyelerinin azaltılmasının faydalı olduğu belirtilmiştir (Edwards ve ark., 2004).

Bu nedenlerle yara iyileştirici aktivitenin tayini amacı ile gerçekleştirilen *in-vitro* deneylerde hiyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzim inhibisyonunun ölçülmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

1.5.2. *In vivo* Yöntemler

Yara iyileştirici aktivitenin tayini amacı ile yapılan *in vivo* deneylerde ucuz olmaları, kolayca temin edilebilmeleri, beslenmeleri için gerekli besin ve su miktarının az olması ve insanlara oranla yara iyileşme süreçlerinin hızlı olması gibi nedenlerle küçük memeli hayvanlar tercih edilmektedir.

Yara iyileştirici aktivitenin tayini amacı ile yapılan *in vivo* laboratuvar deneylerinde temel olarak iki tip yara oluşturulur. Bunlar eksizyon-açık yaralar ve insizyon-süturlu (dikiş atılarak kenarları birleştirilmiş) yaralardır. Yara iyileşmesinin değerlendirilmesi tekrar oluşan dokunun değişik parametreler kullanılarak incelenmesi sonucu yapılır. Yaygın olarak kullanılan yara modelleri eksizyon, insizyon, yanık ve dead space yara modelleridir (Shrimanker ve ark., 2013).

1.5.2.1. *In vivo* Yöntemlerde Kullanılan Başlıca Yara Modelleri

1.5.2.1.1. Eksizyon Yara Modeli

Eksizyon yara modeli yaranın iyileşme sürecinde oluşan kontraksiyonun ve epitelizeasyonun değerlendirilmesi amacı ile kullanılır. Hayvanların sırt kısımlarında

vertebral kolonun sağ veya sol tarafında biyopsi punch ile 2-5 cm² lik dairesel yara oluşturulur. Oluşan yara açık bırakılır. Test edilecek numunelerin topikal olarak uygulanması sonucu yara alanındaki küçülme ve epitelizasyon süreci hesaplanır (Shrimanker ve ark., 2013).

1.5.2.1.2. İnsizyon Yara Modeli

Hayvanların sırt kısımlarının orta hattından yaklaşık 1,5 cm uzaklıkta 4-6 cm uzunluğunda iki adet çizgisel insizyon yarası oluşturulur. Oluşturulan yaralar cerrahi iplikle dikilir. Test numuneleri hayvanlara oral veya topikal olarak 7-9 gün boyunca uygulanır. Bu süre sonunda dikişler alınır. 8-10. günde hayvanlar anestezi altında ldrlr ve kesilerek alınan yaralar üzerinde yara gerilim kuvveti ölçümü ile biyokimyasal ve histolojik çalışmalar gerçekleştirilir (Shrimanker ve ark., 2013).

1.5.2.1.3. Yara Yanık Modeli

Oluşturulmak istenen yanığın derecesine göre çeşitli sıcaklıklara kadar ısıtılmış metal levhaların belirli srelerde anestezi altındaki deney hayvanlarının sırt kısımlarına bastırılması ile yanık yaraları oluşturulur. Yanık yarası oluşturmanın bir yolu da metal bir silindir içine 80°C'ye kadar ısıtılarak eritilmiş mumun dökülmesidir. Likit mum soğuyup katılaşınca yara bölgesinden alınmaktadır. Yara yanığı oluşturulan deney hayvanları anestezi etkisi geçtikten sonra kafeslerine alınır ve test numunesi oral veya topikal olarak yara üzerinde oluşan kabuğın düştüğü güne kadar uygulanır. Bu sürenin sonunda % yara kontraksiyonu, hidroksipirolin tayini ve epitelizasyon zamanının saptanması yöntemleri ile yara iyileştirici aktivite tayini yapılır (Verma ve ark., 2012; Shrimanker ve ark., 2013).

1.5.2.1.4. Dead Space Yara Modeli

Bu yara modelinde 2.5 x 0.5 cm boyutlarındaki polipropilen tüp anestezi altındaki hayvanın sırt kısmının lomber bölgesine subkutan olarak implante edilir. 9 gün boyunca test numunesi uygulanan hayvanlara yerleştirilen tüp, 10. günde tüp üzerinde oluşan granülasyon dokusu ile birlikte alınır. Alınan granülasyon dokusu üzerinde yara iyileştirici aktivitenin tayinine yönelik analizler gerçekleştirilir (Ha ve ark., 2010).

1.5.2.2. *In vivo* Yara Modellerinde Yara İyileşmesinin Saptanmasında Kullanılan Başlıca Yöntemler

1.5.2.2.1. Yara Alanının Ölçümü

Yara alanı önceden belirlenmiş günlerde fotoğraf makinesi ile görüntülenir. Daha sonra çekilen fotoğraflar üzerindeki yara alanı üzerine milimetrik çizim kağıdı konularak alan ölçümü yapılır (Shrimanker ve ark., 2013).

1.5.2.2.2. Yara Kontraksiyonunun Tayini

Deney hayvanlarının opere edildiği günden başlamak üzere yaranın tamamen kapandığı güne kadar yara alanları ölçülür. Yara kontraksiyonu orjinal yara alanındaki redüksiyonun % miktarı olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanır (Shrimanker ve ark., 2013).

$$\% \text{ Yara Kontraksiyonu} = \frac{\text{Başlangıçtaki yara alanı} - \text{Ölçüm yapılan gündeki yara alanı}}{\text{Başlangıçtaki yara alanı}} \times 100$$

1.5.2.2.3. Epitelizasyon Süresinin Tayini

Yara kabuğunun arkasında hiç bir yara bırakmadan düşmesi epitelizasyon periyotunun bitiş noktası olarak kabul edilir. Bu olayın tamamlanması için geçen süre kaydedilir.

1.5.2.2.4. Yara Gerilim Kuvvetinin Ölçümü

Dermal yaralarda iyileşme sürecinin en önemli evrelerinden biri dokuda artarak gelişen biyomekanik dirençtir. İyileşme sürecinin sonunda kapanan insizyonu tekrar ayırmak için uygulanan kuvvet yara gerilim kuvveti olarak kaydedilir. Bu değer onarılmış dokunun gerilime ne kadar dayanıklı olduğunu ve bir anlamda da onarılmış dokunun kalitesini ifade eder.

Yara gerilim kuvvetinin tespit edilmesi amacı ile deney hayvanlarında insizyon yaraları oluşturulur ve cerrahi iplikle dikilerek birleştirilir. Test numunesi uygulanan hayvanların dikişleri 7-9 gün sonra alınır. Dikiş alındıktan 1 gün sonra yara bölgesi kesilir ve dokuların ayrılarak tekrar yara oluşturması için uygulanması gereken gerilim kuvveti tensiometre ile ölçülür (Süntar ve ark., 2011; Shrimanker ve ark., 2013).

1.5.2.2.5. Hidroksiprolin Tayini

Yapısında hidroksiprolin bulunan kolajen, hücreler arası dokunun en önemli bileşenidir. Kolajenin hidroliz olması ile peptitler ve serbest hidroksiprolin açığa çıkar. Açığa çıkan hidroksiprolinin tayini ile dokularda bulunan kolajen miktarı belirlenir (Shrimanker ve ark., 2013).

Yara bölgesinde oluşan granülasyon dokusundaki hidroksiprolin miktarının belirlenmesi amacı ile farklı konsantrasyonlardaki hidroksiprolin çözeltileri

hazırlanır, çözeltiler renklendirilerek absorbensları ölçülüp bir standart eğri oluşturulur. Eksizyon yarasından alınan dokular hidroliz edilerek kolajenin yapısında bulunan hidroksiprolinin açığa çıkması sağlandıktan sonra çözelti renklendirilerek absorbensı ölçülür. Daha önceden oluşturulan standart eğri yardımı ile granülasyon dokusundaki L-hidroksiprolin miktarı saptanır (Panda ve ark., 2011).

1.5.2.2.6. Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik incelemelerin yapılması amacı ile %10'luk formaldehit içinde saklanan yara bölgelerinden alınan ince kesiler hematoxilen-eozin, Per-iodic Acid Schiff (PAS) ve Giemsa/Wright gibi boyalar kullanılarak boyanır ve mikroskop altında incelenir. Elde edilen görüntüler değerlendirilerek yaranın iyileşme süreci hakkında bilgi edinilir (Süntar, 2011).

1.5.2.2.7. Diğer Analizler

Yara iyileşme sürecinin değerlendirilmesinde heksozamin ve total protein tayinleri ile mukopolisakkarit, DNA ve kolajen ölçümleri gibi biyokimyasal analizler de yapılabilmektedir (Shrimanker ve ark., 2013).

1.6. Enflamasyon

Enflamasyon, vücudun enfeksiyon, irritasyon ve diğer yaralanmalara karşı geliştirdiği, bu olaylara neden olan ajanları nötralize etmeyi, zarar gören dokuyu onarmayı amaçlayan non-spesifik immün yanıttır (Guyton ve Hall, 1996).

Enflamasyon bakteri, virüs, mantar ve parazitlerin neden olduğu antijen-antikor reaksiyonlarına, mekanik travma, organik-inorganik zehirler ile yabancı maddelere bağlı olarak gelişebilir. Erken enflamatuvar yanıt ve iyileşme olmak üzere iki temel

süreci kapsayan enflamasyonun belirtileri arasında enflamasyon bölgesinde oluşan kızarıklık, şişme, ısı artışı, ağrı ve fonksiyon kaybı sayılabilir (Patel ve ark., 2012).

Akut ve kronik enflamasyon olmak üzere iki tip enflamasyon vardır. Akut enflamasyon kandan hasarlı dokuya doğru nötrofiller, makrofajlar gibi bağışıklık sistemi hücreleri ve plazma geçişinin artmasıyla karakterize olan ilk yanıttır. Kronik enflamasyon ise enflamasyon bölgesinde yer alan hücre tiplerinin sürekli olarak değiştiği, doku yıkımı ve hasarlı dokunun iyileşmesi ile karakterizedir (Sa ve ark., 2013).

Akut ve kronik enflamasyona neden olan ajanlar, süreçte yer alan önemli medyatörler ile görev yapan majör hücreler ve ortaya çıkış sürelerine ilişkin özet bilgiler Çizelge 1.4.te verilmiştir (Beg ve ark., 2011).

Çizelge 1.4. Enflamasyon Tiplerine Ait Özet Bilgiler (Beg ve ark., 2011)

Enflamasyon Tipi	Neden Olan Ajanlar	Önemli Medyatörler	Önemli Hücreler	Süre
Akut	Patojenler, hasarlı dokular	Monositler, makrofajlar, nötrofiller	Vazoaktif aminler, eikosanoitler	Birkaç gün
Kronik	Degrade olmayan patojenler, kalıcı yabancı maddeler, otoimmün reaksiyonlar	Mononükleer hücreler (monositler, makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri), fibroblastlar	Reaktif oksijen türleri, hidrolitik enzimler, sitokinler, büyüme faktörleri, interferon- γ	Ay-yıl

1.7. Vücutta Enflamasyona Karşı Oluşturulan Yanıt

Enflamasyonun temel fonksiyonu enfeksiyonu gidermek veya hasarı onararak homeostazı tekrar sağlamaktır. İdeal enflamatuvar cevap hızlı, gerektiğinde yok edici, spesifik ve kendi kendini sınırlayan cevaptır.

Enflamasyonu tetikleyen ana unsur, vücuda giren mikropların yine vücutta kalıtsal olarak bulunan bağışıklık sistemi reseptörleri tarafından tanınmasıdır. Vücutta oluşan

bir enflamasyona karşı oluşturulan cevap geleneksel olarak dört fazda özetlenebilir. Bu fazlar enfeksiyonun tanınması, enfeksiyon bölgesinde enflamatuvar hücrelerin toplanması, patojenin eliminasyonu ve enflamasyonun giderilmesidir (Barton, 2008).

1.7.1. Enfeksiyonun Tanınması

Enfeksiyondan önce dokularda mevcut olan çok sayıda hücre çeşiti mikrobiyal organizmaları tanıma yeteneğine sahip enzimleri açığa çıkartır. Enfeksiyonun erken dönemlerinde görev yapan en etkili hücreler dokularda bulunan makrofajlar ve dendritik hücrelerdir. Mast hücreleri de enflamasyonun erken evrelerinde sitokinler ile histamin, prostaglandinler ve lökotrienleri açığa çıkartarak rol oynarlar. Makrofajlar ve dendritik hücreler hücre yüzeylerinde bulunan reseptörler aracılığı ile tanımladıkları mikropları yutarak yok ederler. Patojenin fark edilmesinin net sonucu fagosit ve mast hücrelerinin aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinlerin ve medyatörlerin serbest bırakılmasıdır. Bu moleküllerin serbest bırakılması ile dokunun çevresinde ve damar sisteminde değişikliklere neden olacak olaylar kaskadı başlar (Barton, 2008).

1.7.2. Enfeksiyon Bölgesinde Enflamatuvar Hücrelerin Toplanması ve Patojenin Eliminasyonu

Sitokinler ve diğer proinflamatuvar medyatörler lokal kan damarlarının endotel hücrelerindeki değişiklikleri indükleyerek enfekte dokunun iltahaplı duruma geçmesini teşvik ederler. Özellikle TNF- α , IL-1 ve lipid medyatörleri bir seri morfolojik ve moleküler değişikliklere neden olarak enflamasyon bölgesine doğru artan miktarda lökosit migrasyonu ve plazma akışı sağlarlar. Pek çok durumda bölgeye ilk olarak nötrofiller ve onu takiben monositler ulaşır. Nötrofiller enflamasyon bölgesine ulaştıklarında mikrobiyal organizmalar yanında normal dokularda da hasara neden olabilecek bir takım mekanizmalarla donatılmış durumdadırlar. Fagosit edilmiş materyali degrade edebilecek proteaz yüklü

granüllere sahip olmanın yanında reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üreterek proteinlerde denatürasyon, lipidlerde parçalanma ve sonuçta DNA hasarına neden olurlar. Enflamasyon bölgesine ulaştıktan sonra nötrofiller patojenleri fagozite ederler ve granüllerini fagozite edilmiş materyal üzerine yönlendirirler. Bu granüller sadece patojenlere değil aynı zamanda normal doku ve hücrelere karşı da toksik etki gösterirler. Sonuç olarak nötrofiller apoptoz ile ölürlər ve bölgeye ulaşan makrofajlar tarafından temizlenirler. Makrofajlar ölü nötrofil hücrelerini temizlemenin yanında mikrobiyal organizmaların yok edilmesinde de rol oynarlar. Proteazları, antimikrobiyal peptitleri, ROS ve RNS'leri kullanarak mikrobiyal organizmayı yutarlar ve degrade ederler (Barton, 2008).

1.7.3. Enflamasyonun Giderilmesi

Enflamatuvar yanıt mikrobiyal enfeksiyonu baskılayabilirse tüm yanıt antienflamatuvar sinyaller oluşturulması ve enflamasyonun giderilmesi yönüne odaklanır. Özellikle lipoksinler, protektinler ve resolvinler aktif olarak enflamasyonun giderilmesini ve doku onarımını teşvik eden antienflamatuvar sinyaller oluştururlar. Bu bileşiklerden en iyi tanımlanmış olanlar lipooksijenazlar tarafından oluşturulan lipoksinler ve arasıdonik asit (AA) türevleridir. Lipoksinler nötrofillerin enflamasyon bölgesine akışını durdururlar, apoptoza uğrayan nötrofillerin makrofajlar tarafından alınmasını desteklerler ve daha fazla monositin bölgede toplanmasını sağlayarak ölü hücrelerle doku atıklarının temizlenmesine olanak sağlarlar. Bu medyatörlere ek olarak makrofajlar, nötrofiller ve epitel hücreler tarafından üretilen sekretuvar lökosit proteaz inhibitörü (SLPI), nötrofil granüllerinden salınan proteazları inaktive ederek enflamasyonun giderilmesi evresine katkı sağlar (Barton, 2008).

1.8. Antienflamatuvar Aktivitenin Pre-klinik Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

Antienflamatuvar aktivite testleri deney hayvanlarının çeşitli bölgelerinde enflamasyon oluşturuıcı ajan uygulanması suretiyle enflamasyon oluşturulması ve daha sonra uygulanan test numunesinin oluşan enflamasyonu ne oranda gerilettiğinin tayin edilmesi temeline dayanmaktadır. Test numunesinin etkisi bilinen bir antienflamatuvar ajanın etkisiyle karşılaştırılarak sonuçlar elde edilmektedir (Özbek ve Öztürk, 2003).

1.8.1. Akut ve Subakut Enflamasyonun Testleri

1.8.1.1. Guinea Piglerde UV Işını ile Oluşturulan Eritem

Eritem enflamasyonun en erken gelişen sinyalıdır. Deney hayvanlarının 280-320 nm arasında UV radyasyonuna tabi tutulmalarını takip eden 24 saat boyunca derideki PEG seviyelerinin arttığı gözlenmiştir (Patel ve ark., 2012). Eritem oluşumunun lokal olarak PGs salınımına bağlı olarak ortaya çıktığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Yine indometazin ve piroprofen gibi prostaglandin sentezi inhibitörlerinin UV ile oluşturulan eritemin baskılanmasında etkili olduğu çeşitli çalışmalarda saptanmıştır (Peters ve ark., 1977).

Bu deney modelinde deney hayvanlarının sırt kısımlarına UV ışığı uygulanmasını takiben oluşan eritemin test numuneleri ile muamele sonucu ne oranda engellendiği tespit edilmektedir (Patel ve ark., 2012).

1.8.1.2. Damar Permeabilite Artışı Testi

Enflamasyon süresince antikor ve komplementler gibi plazma bileşenlerinin hasarlı veya enfekte dokuya ulaşması için damar permeabilitesinde artış olur. Bu test ile test numunesinin damar geçirgenliğindeki artışı ne oranda inhibe ettiği araştırılmaktadır (Patel ve ark., 2012). Bu amaçla intravenöz yolla deney hayvanına uygulanan Evans blue boyasının damarlardan periton sıvısına geçme derecesi spektrofotometre aracılığı ile ölçülmektedir (Özbek ve Öztürk, 2003). Periton sıvısına geçen boya konsantrasyonunun azalması damar geçirgenliğinin azaldığını göstermektedir (Patel ve ark., 2012).

1.8.1.3. Farelerde Oksazolon ile İndüklenen Kulak Ödemi

Farelerde oksazolon ile indüklenen kulak ödemi modeli bir gecikmiş kontakt hipersensitivite modeli olup topikal ve sistemik antienflamatuvar aktivitenin kantitatif tayinine olanak sağlamaktadır. Deney hayvanları önce oksazolon uygulanarak duyarlı hale getirilir. Daha sonra oksazolon ve test numunesi ile birlikte oksazolon içeren çözeltiler uygulandıktan 24 saat sonra anestezi altında öldürülen hayvanlarda uygulanan test numunesinin ödem oluşumunu ne oranda azalttığı kulak ağırlıklarının belirlenmesi sureti ile saptanır (Patel ve ark., 2012).

1.8.1.4. Fare ve Sıçanlarda Kroton Yağı ile Oluşturulan Kulak Ödemi

Kroton yağının bileşiminde bulunan temel irritan maddeler 12-*O*-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) ve başka bir takım forbol esterleridir. TPA, fosfolipaz A₂ (PLA₂) gibi bir takım enzimatik kaskadları aktive eden protein kinaz C'yi aktive etme yeteneğine sahiptir. Bu aktivasyon sonucu PAF ve AA aktive olarak bir dizi olay gerçekleşmeye başlar. Bu reaksiyonlar sonucu damar geçirgenliği stimüle olur, vazodilasyon, polimorfonükleer lökositlerin migrasyonu, histamin ve serotoninin

serbest bırakılması ile COX ve 5-LOX tarafından enflamatuvar eikosanoitlerin sentezlenmesi olayları gerçekleşir.

Bu deney modelinde deney hayvanlarının kulaklarında TPA uygulanarak indüklenen enflamasyonun test numunesi ile ne oranda inhibe edildiği belirlenmektedir (Patel ve ark., 2012).

1.8.1.5. Sıçanlarda Pençe Ödemi

Bu deneyde formaldehit, dekstran, yumurta albümini, kaolin, karragen gibi iritanlarda sıçanların arka pençelerinde oluşturulan ödemin test numunesi uygulaması ile ne oranda inhibe olduğu saptanmaktadır. Enjeksiyonun yapılacağı pençenin hacmi enjeksiyon öncesinde, iritanın uygulanmasından sonra ve test numuneleri ile muamele edildikten sonra ölçülür. Kontrol grupları ile karşılaştırılarak sonuçlar elde edilir.

Karragen ile indüklenen sıçan pençe ödemi 3 evreyi içerir. İlk evrede mast hücrelerinin degranülasyonu ve histamin ile serotonin salımı gerçekleşir. 1 saat süren bu evrenin ardından 60-150. dakikalar arasında bradikininin açığa çıkması ve ağrı oluşumu ile karakterize ikinci evre tamamlanır. Son evrede ise eikosanoid üretimi gerçekleşir. Bu nedenle karragen ile indüklenen sıçan pençe ödemi testinde antienflamatuvar etkisi ölçülen test numunesinin hangi medyatörü inhibe ederek bu etkiyi gösterdiği de belirlenebilmektedir (Patel ve ark., 2012).

1.8.1.6. Plörezi Testleri

Bu deney, sıçanlara 3-5. interkostal aralıktan enjekte edilen iritan ile enflamasyon oluşturulduktan sonra bu enflamasyona bağlı olarak intraplevral aralığa göç eden yangı hücrelerinin plevral sıvıda sayılması esasına dayanmaktadır (Özbek ve Öztürk, 2003).

İrritan olarak histamin, bradikinin, prostaglandinler, dekstran, enzimler, mikroplar, terebentin ve karragen kullanılabilir. Sıçanlarda karragenle indüklenen plörezi, enflamatuvar cevapta oluşan sıvı ekstrevasyonu, lökosit migrasyonu ile çeşitli biyokimyasal parametrelerin plevral sıvıda kolaylıkla saptanabildiği oldukça iyi bir akut enflamasyon modeli olarak görülmektedir (Patel ve ark., 2012).

1.8.1.7. Granülom Kese Tekniği

Deney hayvanlarında oluşturulan deri altı boşluğuna subkutan irritan uygulanması ile granülasyon dokusu gelişmeye başlar ve boşluğu kaplar. Bu dokunun bileşiminde fibroblastlar, endotel hücreleri, makrofaj infiltratı ve polimononükleer lökositler bulunmaktadır.

Bu teknikte deney hayvanlarının deri altında bir boşluk oluşturulur. Bu boşluğa susam yağında çözülmüş karragen gibi bir irritan enjekte edilerek granülasyon dokusunun oluşumu başlatılır. Deney sonunda oluşan eksuda alınarak hacmi ölçülür. Kontrol ve test grupları karşılaştırılarak sonuçlara ulaşılır (Patel ve ark., 2012).

1.8.2. Enflamasyonun Proliferasyon Evresinin Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

1.8.2.1. Pamuk Pellet Granülom Testi

Bu test modelinde sterilize edilmiş pamuk pellet deney hayvanının interscapular bölgesi deri altı dokusuna yerleştirilir. Bir hafta sonra çıkartılarak pamuk pellet ve etrafında oluşan granülom dokusu kurutulup tartılır. Kontrol ve test grupları karşılaştırılarak sonuçlara ulaşılır (Özbek ve Öztürk, 2003).

1.8.2.2. Cam Çubuk Granülom Testi

Bu testte deney hayvanlarında subkutan olarak oluşturulan boşluğa cam çubuk yerleştirilir. Cam çubuk etrafında oluşan granülom dokusu tartılarak sonuçlara ulaşılır. Antienflamatuvar etkili bileşiğin uygulandığı çubuk etrafında oluşan granülom dokusunun ağırlığındaki azalma standart ile karşılaştırılır (Patel ve ark., 2012).

1.9. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri (ROS), Oksidatif Stres ve Antioksidan

Atomlar çoğunlukla merkezde bir çekirdek ve bunun etrafında yörüngede dönen elektron çiftlerinden oluşmaktadır. Ancak bazı atomlar yörüngelerinde çiftleşmemiş elektronlar içerirler. Çiftleşmemiş elektronlarından dolayı yüksek derecede reaktif ve non-stabil olan ve diğer moleküllerden elektron alarak veya bu moleküllere elektron vererek stabil hale gelmeye çalışan bu moleküllere serbest radikaller denilmektedir (Yoshikawa ve Naito, 2002).

ROS, serbest radikalleri veya serbest radikal oluşturma yeteneğine sahip molekülleri ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikalleri ile nitrik oksit ($NO^{\bullet}$) radikalleri hücre içinde oluşan ROS'lardır. Normal fizyolojik koşullar altında mitokondriyal solunum ve fagositoz gibi olaylar neticesinde vücutta üretilen oksijenin yaklaşık %2'si $O_2^{\bullet-}$ ye dönüşmektedir. Ancak enfeksiyon durumlarında, egzersiz yapıldığında, çevre kirliliğine maruz kalındığında, UV ışığı, iyonize edici radyasyon gibi faktörlerle karşı karşıya gelindiğinde oluşan ROS miktarı artmaktadır. $NO^{\bullet}$ ve $O_2^{\bullet-}$ radikalleri, kompleks dönüşüm reaksiyonları ile hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$), alkoksi radikalleri ($RO^{\bullet}$), peroksil radikalleri ($ROO^{\bullet}$) ve singlet oksijen (1O_2) gibi çok güçlü okside edici radikallere dönüşmektedir.

Düşük konsantrasyonlardaki ROS'lar gen ekspresyonu, hücresel büyüme ve enfeksiyonlara karşı vücudun savunulmasında gerekli moleküllerdir. Bazı durumlarda hücre içindeki biyokimyasal işlemlerde stimüle edici ajan olarak rol oynarlar. Bunun yanında gelişmeye yönelik prosesleri hızlandıran tiroksin, prostaglandin gibi moleküllerin biyosentezinde görev yaparlar. Son olarak bağışıklık sisteminin önemli parçalarıdır. Örneğin fagositleri ortadan kaldırılması sürecinde makrofajlar ve nötrofiller tarafından oluşturulurlar.

Hücrelerde kontrolsüz biçimde üretilen ROS'ların lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerle reaksiyona girmesi sonucu lipid radikalleri, şeker ve baz türevi radikaller gibi farklı sekonder radikaller oluşur. Bu radikaller oksijen varlığında zincir reaksiyonları indükleyen peroksil radikallerine dönüşürler. Örneğin hücre membranlarında yüksek konsantrasyonlarda bulunan doymamış yağ asitleri ile ROS'ların reaksiyona girmeleri sonucu gerçekleşen lipid peroksidasyonu sonucu hücre fonksiyonları zarar görmektedir.

Kontrolsüz olarak üretilen ROS'lar hücrelerde birikerek oksidatif stres denilen duruma yol açarlar. Bu durum da Alzheimer hastalığı, ateroskleroz, kanser, Parkinson hastalığı, artrit, nörodejeneratif bozukluklar gibi ciddi rahatsızlıklara neden olabilecek bir dizi zincir reaksiyonun başlamasına neden olur. Bu nedenle hücrelerde ROS birikimine bağlı oksidatif strese karşı koruyucu antioksidan mekanizmalar mevcuttur. Antioksidan, düşük konsantrasyonlarda bulunan ve oksitlenme özelliğine sahip substratın okside olmasını önleyen veya geciktiren maddedir. Antioksidanlar kendi bünyelerindeki elektronları ROS'lara vererek onları nötralize ederler.

Genellikle bir antioksidan vücutta 3 şekilde etkisini göstermektedir:

1. Koruma - reaktif türlerin oluşumunu en alt seviyede tutarak (desferrioksamin gibi)
2. Durdurma – serbest radikalleri süpürerek (α - tokoferol ve askorbik asit gibi)
3. Onarma – hasar görmüş hedef hücreleri onararak (glutatyon gibi)

Antioksidan sistemler enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere iki majör grup altında sınıflandırılmaktadır.

1. Enzimatik antioksidanlar: Bunlar ROS'ların daha az reaktif veya inert türlere dönüşmelerini katalizleyerek serbest radikallere karşı ilk savunma sistemini oluştururlar. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz bu grupta yer alan enzimlerdir.
2. Enzimatik olmayan antioksidanlar: Bunlar hücreler içinde bulunan, düşük molekül ağırlığına sahip olan ve serbest radikallere karşı vücudun sekonder savunma sistemini oluşturan moleküllerdir. Bu moleküller ROS'ları direkt olarak süpürerek veya üretimlerini engelleyerek etkilerini gösterirler. Glutatyon, α -tokoferol, askorbat, bilirubin bu grup antioksidanlara örnektir (Kunwar ve Priyadarsini, 2011).

1.10. Antioksidan Etkinin Tayin Edilmesinde Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Yöntemler

Bir bileşiğin antioksidan kapasitenin ölçülmesinde kullanılmak üzere bugüne kadar geliştirilmiş çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlayan yöntemler temel olarak hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferi (ET)ne dayanan yöntemler olmak üzere iki grup altında incelenebilmektedir (Albayrak ve ark., 2010).

HAT reaksiyonlarına dayanan yöntemlerin çoğunda azo bileşiklerinin bozulması sonucu açığa çıkan peroksil radikalleri için antioksidan ve substrat yarışmaktadır. Bu reaksiyonlarda sonuç olarak peroksil ve hedef molekül arasındaki reaksiyon antioksidan tarafından inhibe edilmekte veya geciktirilmektedir (Büyüktuncel, 2013).

ET temelli yöntemlerde antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneği renk değişimi ile ölçülmektedir. Renk değişiminin derecesi antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir (Albayrak ve ark., 2010).

Üçüncü bir grup ise her iki reaksiyon mekanizmasını da içeren yöntemlerdir (Büyüktuncel, 2013).

1.10.1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

HAT reaksiyonlarına dayanan bu yöntem, maddelerin toplam antioksidan güçlerini ölçen, peroksil radikalının neden olduğu oksidasyonun antioksidan tarafından ne oranda inhibe edildiğini gösteren bir yöntemdir (Albayrak ve ark., 2010).

Ortamda bulunan floresans verici madde peroksil radikali ile reaksiyona girerek floresans vermeyen bir maddeye dönüşür. Antioksidan özellikli bileşik, floresans verici maddenin peroksil radikali ile reaksiyona girmesini engelleyerek floresans kaybına engel olur. Sonuç olarak antioksidanın peroksil radikali ile oksitlenen bir hedef molekülü oksidasyona karşı ne oranda koruduğu , floresans özellik gösteren maddenin floresans takibi ile bulunur (Büyüktuncel, 2013).

1.10.2. Toplam Radikal Tuzaklayıcı Antioksidan Parametre Yöntemi (TRAP)

Çoğunlukla plazmanın antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi amacı ile kullanılan bu metot, bir azo bileşiğinin termal bozunması ile indüklenen lipid peroksidasyon reaksiyonu esasına dayanmakta olup HAT temelli bir yöntemdir. İlk defa Wayner ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntemde oluşturulan kontrollü lipid peroksidasyonu boyunca oksijen tüketimi ölçülmektedir (Albayrak ve ark., 2010).

1.10.3. Karotenoid (Krosin) Ağartma Yöntemi

HAT temelli bu kolorimetrik yöntemde 2'-azobis(2-amidinopropan)hidroklorit (AAPH)'in sıcaklıkta bozulması ile oluşan peroksil radikallerinin bir karotenoid olan

krosini beyazlatma derecesi ölçülmektedir. Ortamda bulunan antioksidan bileşik bu beyazlamayı önlemektedir (Albayrak ve ark., 2010).

1.10.4. Folin-Ciocalteu (FC) Yöntemi

Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir ($3 \text{ H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13 \text{ WO}_3 \cdot 5 \text{ MoO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$). Varsayılan aktif merkezi Mo(VI) dır. Sarı renkli Mo(VI) bir antioksidan tarafından indirgendiğinde mavi renkli kompleks (Mo(V)) ve bu kompleksin oluşumu 765 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür. Yöntemde standart olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak (mg/L) verilir (Büyüktuncel, 2013).

Bu yöntemde test numunesinin indirgeme kapasitesi ölçülmektedir (Albayrak ve ark., 2010).

1.10.5. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi / (ABTS^{•+}) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

İlk olarak Miller ve Rice-Evans tarafından 1993 yılında rapor edilen TEAC yöntemi, Re ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Geliştirilmiş yöntemde, 2,2’-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) persülfatla oksidasyona uğratılarak ABTS^{•+} radikaline dönüştürülür. Oluşturulan bu radikal koyu mavi renklidir. Antioksidan etkili bileşikler varlığında ABTS^{•+} radikali tekrar indirgenerek renksiz ABTS’ye dönüşür. Bu metotta moleküllerin kararlı serbest radikali süpürme yetenekleri, vitamin E’nin suda çözünebilen bir analogu olan Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırılarak belirlenmektedir (Büyüktuncel, 2013).

1.10.6. Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi (FRAP)

Düşük pH değerinde Fe^{+3} -tripridiltriazin (TPTZ) kompleksi indirgendiği zaman koyu mavi renkli Fe^{+2} -TPTZ kompleksi oluşur. Bu bileşik 593 nm’de maksimum absorbands verir (Benzie ve Strain, 1996).

TEAC ve FRAP yöntemleri benzer yöntemler olup, TEAC yöntemi nötral pH’da, FRAP yöntemi ise demirin çözünürlüğünün sağlanması amacı ile asidik koşullarda (pH 3.6)’da gerçekleştirilmektedir (Büyüktuncel, 2013).

1.10.7. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi

Basit ve hızlı bir yöntemdir. 515 nm’de maksimum absorbanda sahip olan koyu menekşe renkli DPPH radikali bir antioksidan varlığında indirgendiğinde rengi açılır. Absorbandaki azalma spektrofotometre ile ölçülür (Büyüktuncel, 2013).

1.10.8. Hidroksil (OH) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Hidroksil radikali biyolojik sistemler için en güçlü reaktif oksijen türlerinden biridir. Hücre membran fosfolipitlerinin yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek hücrelerde hasara neden olur.

Deoksiriboz bozulmasına dayanan test yönteminde ortamda bulunan askorbik asit, demir ve EDTA’nın reaksiyona girmeleri ile OH radikalleri oluşur. Oluşan OH radikalleri deoksiribozu degrade ederler. Deoksiribozun degradasyonu sonucu açığa çıkan bileşikler ise TBA varlığında ısıtıldıklarında 532 nm’de absorbands veren pembe renkli bileşik oluştururlar (Pattanayak ve ark., 2012). Test numunesi tarafından hidroksil radikallerinin süpürülme yeteneği gallik asit, mannitol, kateşin, E vitamini, kersetin, BHA (butillenmiş hidroksianisol), α -tokoferol, rutin veya askorbik asit referans alınarak saptanır (Chanda ve Dave, 2009).

1.10.9. Cu(II)'nin Oksidan Olarak Kullanıldığı Toplam Antioksidan Potansiyel Yöntemi (CUPRAC)

Bir numunedeki antioksidanlar tarafından Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi temeline dayanan bu yöntem Apak ve arkadaşları (2004) tarafından geliştirilmiştir. Yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin)'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)-neokuproin kompleksinin (Cu (II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır (I) neokuproin [Cu (I)-Nc] şelatına indirgenme yeteneğinden faydalanılarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır (Büyüktuncel, 2013).

1.10.10. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi

İndirgeme gücü, antioksidan etkinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir yöntemdir. İndirgeme gücü bulunan bileşikler elektron donörleridir ve lipid peroksidasyon proseslerinde okside olmuş bileşikleri indirgeyerek antioksidan özellik gösterirler.

İndirgeme gücü bulunan bileşikler potasyum ferrisiyanit (Fe^{+3}) ile reaksiyona girerek potasyum ferrosiyanit (Fe^{+2}) oluştururlar. Oluşan potasyum ferrosiyanit (Fe^{+2}) ise FeCl_3 ile reaksiyona girdiğinde 700 nm de absorbans veren $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ kompleksini meydana getirir (Hemalatha ve ark., 2010). Deneyde pozitif kontrol olarak askorbik asit, butillenmiş hidroksitoluen (BHT), α -tokoferol, troloks veya BHA kullanılabilmektedir (Chanda ve Dave, 2009).

1.11. Botanik Bilgiler

1.11.1. Betulaceae Familyasının Genel Özellikleri

Yaprak döken ağaç ve ağaççıkların bulunduğu bir familya olan Betulaceae familyası dünyada 6 cins (*Alnus* Miller., *Betula* L., *Corylus* L., *Carpinus* L., *Ostrya* Scop., *Ostryopsis* Decne.) ve yaklaşık 130 tür ile temsil edilmekte olup başlıca kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde dağılım göstermektedir (Alan, 2010).

Yapraklar alternan dizilişli, basit, stipulalı ve serrattır. Çiçekler tek eşeyli olup çoğu zaman yapraklardan önce açar. Erken gelişen erkek çiçekler, uzamış ve çok sayıda braktelerin üst üste gelmesiyle oluşmuş sarkık başak durumundadır. Dişi çiçek durumu bir eksen üzerinde sık dizilmiş olup sarkık ya da dik, kısa ya da uzun başak şeklindedir. Periant ya bulunmaz ya da küçük, pula benzeyen parçalar şeklinde ve değişik sayıdadır. Stamen 2-12 tanedir. Dişi çiçek 2 karpelden meydana gelmiş, ovaryum alt durumludur. Meyve taşıyan başaklar sık, silindirik ve genelde sarkık bir kozalak şeklinde olup meyveler kanatlı veya kanatsız, tek tohumlu bir nukstur (Tanker ve ark., 2004; Alan, 2010).

Betulaceae familyasına ait iki alt familyadan biri olan Betuloideae alt familyası, ki bu alt familya Türkiye Florası'nda Betulaceae familyası şeklinde değerlendirilmiştir, ülkemizde *Betula* L. ve *Alnus* Miller olmak üzere iki cins ile temsil edilmektedir.

1. Stamenler 2, 2 loblu; meyve veren sarkık başaklar silindirik, pullar 3 loblu, meyve ile beraber düşer; çiçekler yapraklarla beraber ortaya çıkar; tomurcuk sessil

..... **1. *Betula***

1. Stamenler 4, tam; meyva veren sarkık başaklar kozalak şeklinde, pullar 5 loblu ve kalıcı; çiçekler yapraklardan önce oluşur; tomurcuk saplı

..... **2. *Alnus***

(Alan, 2010)

1.11.2. *Alnus* Miller Cinsinin Genel Özellikleri

Betulaceae familyasında yer alan *Alnus* Miller cinsi dünyada yaklaşık olarak 35 tür ile temsil edilmekte olup kuzey yarımkürenin sıcak bölgelerinde dağılım göstermektedir (Ludwiczuk ve ark., 2011).

Alnus Miller cinsinin sistematikteki yeri şu şekildedir:

Alem	: Plantae
Bölüm	: Spermatophyta
Alt Bölüm	: Angiospermae
Sınıf	: Dicotyledones
Alt Sınıf	: Apetalae
Takım	: Fagales
Familya	: Betulaceae
Cins	: <i>Alnus</i> Miller

(Tanker ve ark., 2004)

Alnus cinsinde gövde kabuğu koyu renkli olup çiçekler yapraklardan önce görülür. Dişi çiçek durumu dik, küresel ya da biraz uzamış haldedir ve olgunlukta odunsu bir kozalak haline dönüşür. Brakteler 5 loblu ve kalıcı, stamen 4 tane, filamentler basittir. Meyve kanatlı veya kanatsızdır (Tanker ve ark., 2004).

Alnus cinsi Türkiye’de iki tür, altı takson ile temsil edilmektedir.

Alnus glutinosa (L.) Gaertner

A. glutinosa subsp. *glutinosa*

A. glutinosa subsp. *barbata* (C.A. Meyer) Yalt.

A. glutinosa subsp. *antitaurica* Yalt.

(Davis, 1982)

A. glutinosa subsp. *betuloides* Anşin

(Davis, 2000).

Alnus orientalis Decne.

A. orientalis var. *orientalis*

A. orientalis var. *pubescens* Dippel

(Davis, 1982)

1.11.3. *Alnus* Cinsine Ait Tayin Anahtarı

1. Yapraklar obovat-eliptik şekilden suborbikulara kadar değişen şekillerde. Meyveli kozalak 1-1.8 x 0.6-1.1 cm boyutlarında, fındıksı meyve koyu kahverengi, kanatlı ve 2-3 mm **1. *glutinosa***

1. Yapraklar ovat şekilli. Meyveli kozalak 1.8-2.6 x 1-1.6 cm boyutlarında, fındıksı meyve açık kahverengi, kanatsız ve 4-6 mm **2. *orientalis***

(Davis, 1982)

1.11.4. *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner Türünün Genel Özellikleri

20 (-30) m'ye kadar yükselebilen üzerinde koyu kahverengi yarıkları bulunan kabuğa sahip ağaçlardır. Genç sürgünler yapışkan, tüysüz ya da az çok tomentoz tüylerle kaplıdır. Yapraklar obovattan suborbikulara kadar değişen şekillerde veya genişçe oblong-eliptik şekilde, 3.5-13 x 3-11 cm boyutlarında, tepede yuvarlak, retus veya hafifçe akut biçimli, tabanda genişçe kuneattır. Yaprak kenarları biserrate, 4-11 çift damarlı, altta pubesent-piloz veya damarların koltuğunda bulunan küme halindeki tüyler hariç tüysüzdür. Yaprak sapı hemen hemen tüysüz veya tomentoz tüylü ve 0.7-3 cm boyundadır. Meyveli çiçek durumu 1-1.8 x 0.6-1.1 cm boyutlarında, belirgin şekilde saplıdır. Fındıksı meyve koyu veya kırmızımsı-kahverengi renkte, 2-3 mm ve dar şekilde kanatlıdır (Davis, 1982).

1.11.5. *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner Türüne Ait Tayin Anahtarı

1. İnce dallar ve yaprak sapı tomentoz tüylü, yaprak altı pubesent-piloz tüylü
..... subsp. *antitaurica*
1. İnce dallar, yaprak sapı ve yapraklar az çok tüysüz
 2. Yapraklar 4-8(-9) çift lateral (yan) damarlı, obovattan suborbikulara kadar değişen şekillerde, tepesi retus..... subsp. *glutinosa*
 2. Yapraklar 8-11 çift lateral damarlı, genişçe oblong-eliptik şekilde, tepesi hafifçe akut veya yuvarlakça..... subsp. *barbata*

(Davis, 1982)

Yukarıda tanımlanan *Alnus glutinosa* taksonu alt türlerinin yanı sıra *A. glutinosa* subsp. *betuloides* Anşin alt türü de tanımlanmıştır. Bu alt tür *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* alt türünden gövde, dallar ve yaşlı sürgünlerinin beyaz ya da grimsi kabuğuyla ayrılmaktadır (Davis, 2000).

1.11.6. *Alnus orientalis* Decne Türünün Genel Özellikleri

20(-50) m'ye kadar boylanabilen ağaçlardır. Genç sürgünler tüysüz veya pubesenttir. Yapraklar ovat- eliptik, 5-11 x 2,6-6,5 cm boyutlarında, tepesi akut veya obtus, yaprağın her iki tarafı tüysüz veya damarların alt kısımlarında ya da sadece ana damarların yan damarlarla birleştiği yerler tüylü olmak üzere üst tarafları tüsüzdür. Yaprak kenarı düzensiz şekilde biserrat, tabanda yuvarlakça veya kuneat olup yaprağın üst yüzeyi gözeneklidir. Yaprak sapı tüysüz veya tüylü, 1-4 cm boyundadır. Meyveli çiçek durumu 1,8-2,6 x 1-1,6 cm boyutlarındadır. Fındıksı meyve kanatsız, 4 mm, genellikle açık kahverengi rengindedir. Dere kenarlarında, 0-1000 m arasındaki yüksekliklerde bulunabilmektedir (Davis, 1982).

1.11.7. *Alnus orientalis* Decne Türüne Ait Tayin Anahtarı

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Sürgün ve yaprak sapı tüysüz..... | var. <i>orientalis</i> |
| 1. Sürgün ve yaprak sapı pubesent..... | var. <i>pubescens</i> |
- (Davis, 1982).

1.12. *Alnus* Miller Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

1.12.1. *Alnus* Miller Türlerinin Halk Arasındaki Kullanımı

Alnus cinsinin doğu tıbbında cilt hastalıkları ile bağlantılı olduğu düşünülen ısıyı azaltıcı etkisi olduğuna inanılmaktadır. Benzer olarak Amerika'da bu cinse ait bitkiler kronik herpes, ekzema ve kaşıntılı deri hastalıklarında geleneksel olarak kullanılmaktadır (Choi ve ark., 2011).

Peru'da *A. acuminata* subsp. *acuminata* yapraklarından hazırlanan dekoksasyon rahim kanseri ve romatizma tedavisinde kullanılan preparatların içinde yer almaktadır (Hammond ve ark., 1998).

Kuzey Portekiz'de *A. glutinosa*'nın kurutulmuş kabuklarından hazırlanan dekoksasyon hemoroid tedavisinde, yara iyileştirici ve ateş düşürücü olarak kullanılmaktadır (Neves ve ark., 2009).

İtalya'da *A. glutinosa* yapraklarından yakı olarak diş apselerinde, işlem görmemiş halde tırnak enflamasyonunda ve dekoksasyon halinde anti-perspirant olarak yararlanılmaktadır (Loi ve ark., 2004).

Ludwiczuk ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada *Alnus* cinsinin, özellikle de *A. glutinosa*'nın yapraklarından hazırlanan dekoksasyonun göğüs, duodenum, özofagus, pankreas, rektum, gırtlak, dil ve uterus kanserinde kullanıldığı belirtilmiştir. Aynı

çalışmada bitkinin kabuklarının ve/veya köklerinin kanserde ve gırtlakta oluşan enflamasyonlu tümörlerin tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Ludwiczuk ve ark., 2011).

Sati ve arkadaşları *Alnus* cinsinin kimyasal içeriği ve tıbbi önemi konusunda yaptıkları bir derleme çalışmada, *A. japonica*'nın Kore'de halk arasında kanser ve hepatit tedavisinde kullanıldığını, *A. glutinosa* kabuklarının astrenjan, katartik, ateş düşürücü, tonik özelliklere sahip olduğunu ve ağız-boğaz enfeksiyonlarının tedavisinde yararlandığını, ayrıca aynı bitkinin kabuklarının iç kısmından hazırlanan sirkeli ekstrenin yıkama çözeltisi halinde bitlenmeye karşı ve uyuz gibi çeşitli cilt rahatsızlıklarında kullanıldığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada *A. nepalensis* yaprakları, kökleri ve kabuklarından Ayurvedik tıpta dizanteri, karın ağrısı ve diyarenin tedavisinde faydalandığı, *A. hirsuta* kabuklarının Kore ve Çin geleneksel tıbbında ateş, kanama, alkolizm ve diyareye karşı kullanıldığı rapor edilmiştir (Sati ve ark., 2011).

Başka bir çalışmada *A. nepalensis* yapraklarından hazırlanan patın kesik ve yaralara hemostatik amaçla uygulandığı belirtilmiştir (Yadav ve ark., 2013 a).

Türkiye'de halk arasında *A. glutinosa* yaprakları ezildikten sonra haricen kesik ve yara tedavisinde, yapraklardan hazırlanan infüzyon ise günde 3 öğün birer bardak içilmek sureti ile romatizma tedavisinde kullanılmaktadır (Tuzlacı, 2006).

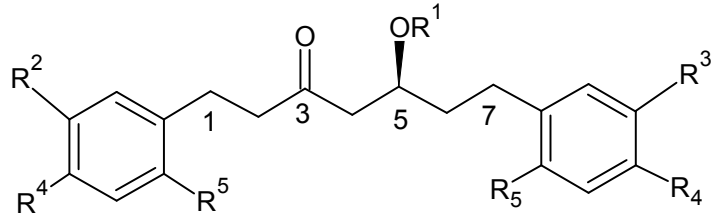
1.12.2. *Alnus* Miller Türlerinin Kimyasal İçeriği

Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda *Alnus* türlerinden terpenoitler, flavonoitler, diarilheptanoitler, fenoller, steroidler ve tanenlerin izole edildiği rapor edilmiştir. Bu bileşikler içinde en baskın grup diarilheptanoitlerdir (Sati ve ark., 2011).

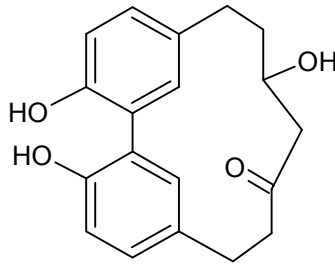
1.12.2.1. Diarilheptanoitler

Diarilheptanoitler yapılarında 1,7-difenilheptan iskeleti taşıyan bileşikler olup gösterdikleri antienflamatuvar, antioksidan, antitümör, östrojenik, hepatoprotektif, nöroprotektif gibi fizyolojik etkileri ile günümüzde giderek önem kazanan bileşiklerdir (Lv ve She, 2012).

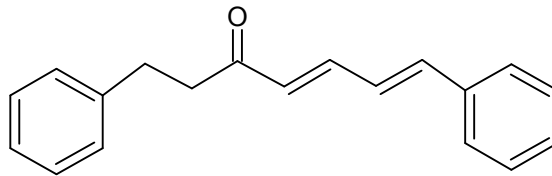
Aoki ve arkadaşlarının bazı *Alnus* türlerinin dişi ve erkek çiçeklerinden elde ettikleri asetonlu ekstratlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda *A. serrulatooides* ve *A. japonica* çiçeklerinden (5*S*)-1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-5-hidroksiheptan-3-on (1) ile (5*S*)-1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-5-(β -D-ksilopiranozil-oksi)heptan-3-on (2), *A. serrulatooides* çiçeklerinden (5*S*)-1-(4-hidroksifenil)-7(3,4-dihidroksifenil)-5-(β -D-ksilopiranoziloksi)heptan-3-on (3), (5*S*)-1-(3,4-dihidroksifenil)-7-(4-hidroksifenil)-5-(β -D-ksilopiranoziloksi)heptan-3-on (4) ile (5*S*)-1,7-bis(3,4-dihidroksifenil)-5-(β -D-glukopiranoziloksi)heptan-3-on (5); *A. japonica* çiçeklerinden alnusunol (6), (5*S*)-1,7-bis(4-hidroksifenil)-5-hidroksiheptan-3-on (7) ile (5*S*)-1-(3,4-dihidroksifenil)-7-(4-hidroksifenil)-5-hidroksiheptan-3-on (8); *A. sieboldiana* çiçeklerinden dihidroyashabuşiketon (9) ve *A. pendula* çiçeklerinden alnuston (10) bileşiklerini izole ettiklerini rapor etmişlerdir (Aoki ve ark., 1990).



- (1) $R^1=R^5=H$, $R^2=R^3=R^4=OH$
 (2) $R^1=\beta\text{-D-ksilopiranozil}$, $R^2=R^3=R^4=OH$, $R^5=H$
 (3) $R^1=\beta\text{-D-ksilopiranozil}$, $R^2=R^5=H$, $R^3=R^4=OH$
 (4) $R^1=\beta\text{-D-ksilopiranozil}$, $R^2=R^4=OH$, $R^3=R^5=H$
 (5) $R^1=\beta\text{-D-glukopiranozil}$, $R^2=R^3=R^4=OH$, $R^5=H$
 (7) $R^1=R^2=R^3=R^5=H$, $R^4=OH$
 (8) $R^1=R^3=R^5=H$, $R^2=R^4=OH$
 (9) $R^1=R^2=R^3=R^4=R^5=H$



(6) = Alnusol

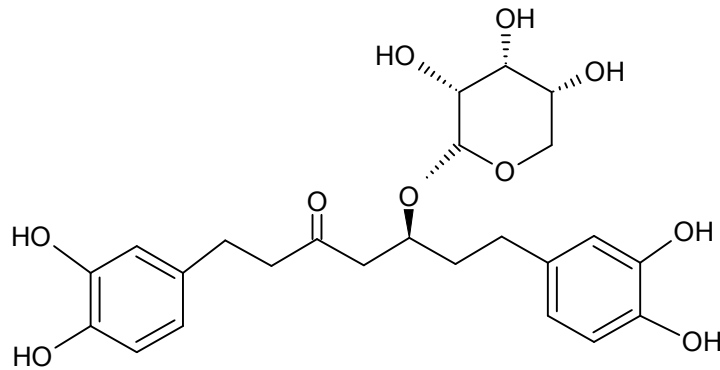


(10) = Alnuston

Şekil 1.3. Aoki ve ark. tarafından bazı *Alnus* türlerinden izole edilen diarilheptanoit yapılı bileşikler

Tori ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *A. sieboldiana* bitkisinden yashabuşiketo, dihidroyashabuşiketo, yashabuşidol A ve B, yashabuşiketodiol A ve B ile yashabuşitriol izole edildiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada *A. maximowiczii* bitkisinden 1,7-difenilhept-3-en-5-on bileşiğinin izole edildiği belirtilmiştir (Tori ve ark., 1995).

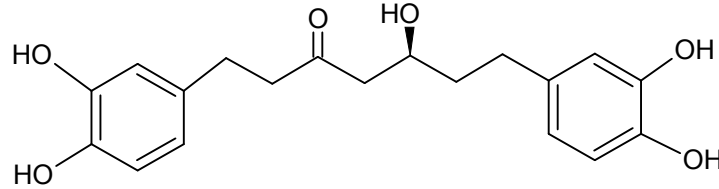
Guz ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada Almanya'dan toplanan *A. glutinosa* kabuklarından hareketle diarilheptanoit yapısındaki oregonin bileşiği izole edilmiştir. Önce taze kabuklar MeOH ile 3'er kere ekstre edilmiş, ekstreler birleştirilmiş ve solvan rotavaporda uzaklaştırılmıştır. Artık EtOAc (3x250 ml) ile ekstre edilmiş, EtOAc uzaklaştırıldıktan sonra kalan artık MeOH (3x250 ml) ile tekrar ekstre edilmiş, MeOH'lü ekstreler birleştirilerek vakum altında kahverengi şurup kıvamında ekstre elde edilene kadar yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen yoğun ekstre vakum sıvı kromatografisi (VLC) tekniği ile fraksiyonlanmıştır. Mobil faz olarak MeOH'ün CHCl₃ içindeki çözeltisi (%50→%80) kullanılmıştır. Fraksiyonlar solvan olarak CHCl₃:MeOH:H₂O (100:50:10) sisteminin kullandığı İTK yöntemi ile incelenerek mor renkli leke (R_f=0.54) veren 5 fraksiyon belirlenmiştir (Belirteç: *p*-anisaldehit/H₂SO₄ reaktifi). Fraksiyonlardan B ve C birleştirilmiş ve VLC tekniği ile 6 alt fraksiyon elde edildikten sonra 2. ve 3. fraksiyonlardan saflaştırma ile oregonin bileşiği izole edilmiş, yapısı NMR ve MS teknikleri kullanılarak aydınlatılmıştır.



Şekil 1.4. Oregonin

Aynı çalışmada *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. viridis* ve *A. cordata* kabukları ile *A. incana* ve *A. viridis* yapraklarından MeOH:H₂O (4:1) solvan sistemi ile elde edilen ekstrelerin HPLC (Mobil Faz: MeOH:H₂O (4:1); Kolon: C-18; Akış hızı: 2.53 ml/dk; Dalga boyu: 254 ve 283 nm) yöntemi ile incelendiği ve *A. viridis* yaprakları dışındaki tüm ekstrelerde oregonin varlığının saptandığı rapor edilmiştir (Guz ve ark., 2002).

O'Rourke ve arkadaşları tarafından *A. glutinosa* tohumları üzerinde gerçekleştirilen çalışmada oregonin yanında başka bir diarilheptanoit yapılı bileşik olan hirsutanonol'un izole edildiği rapor edilmiştir. Öğütülmüş tohumlar Soxhlet apareyinde sırasıyla *n*-hekzan, diklorometan ve metanol ile ekstre edilmiş, MeOH'lü ekstre, MeOH'ün sudaki çözeltilerinin (%30, %60, %80 ve %100) kullanıldığı kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmış ve %60 MeOH ile elüe edilen fraksiyondan hareketle preparatif HPLC yöntemi kullanılarak hirsutanonol (R_t= 10 dk) ile oregonin (R_t=8 dk) izole edilmiştir (O'Rourke ve ark., 2005).

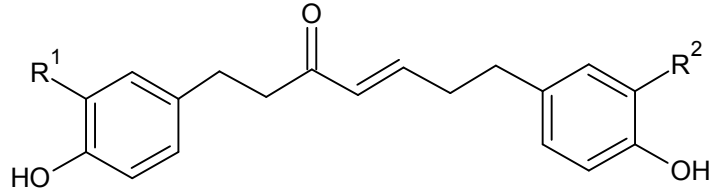


Şekil 1.5. Hirsutanonol

Kuo ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada *A. formosana* yaprakları ile *A. incana* tohumlarında oregonin bileşiğinin bulunduğu ve bu bileşiğin miktarının kapiller zon elektroforez metodu kullanılarak sırasıyla 1.983 ve 0.131 mg/g olarak belirlendiği belirtilmiştir (Kuo ve ark., 2008).

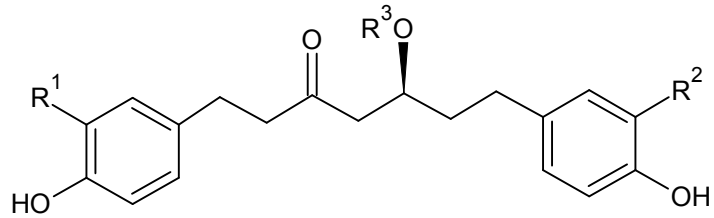
Tung ve arkadaşlarının *A. japonica* kabuklarında bulunan anti-influenza etkili bileşikleri araştırdıkları çalışmada, Çin'den toplanan bitkinin kurutulmuş kabukları

önce %95'lik sıcak EtOH ile ekstre edilmiş, elde edilen ekstre yoğunlaştırılmış, su ile süspande edildikten sonra sırasıyla diklorometan, etil asetat ve *n*-butanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Anti-influenza etkisi daha yüksek bulunan etil asetat fraksiyonundan kolon kromatografisi tekniği kullanılarak platifillenon (1), hirsutanon (2), hirsutanonol (3), oregonin (4), oregonil A (5), oregonil B (6), alnusit A (7), alnusit B (8), platifillonol-5-ksilopiranozit (9), platifillon (10) ve platifillozit (11) bileşikleri izole edilmiştir (Tung ve ark., 2010 a).



(1) $R^1 = R^2 = H$

(2) $R^1 = R^2 = OH$



(3) $R^1 = R^2 = OH, R^3 = H$

(4) $R^1 = R^2 = OH, R^3 = xyl$

(5) $R^1 = R^2 = OH, R^3 = xyl\text{-kumaroil}$

(6) $R^1 = R^2 = OH, R^3 = xyl\text{-feruloil}$

(7) $R^1 = OH, R^2 = H, R^3 = xyl$

(8) $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = xyl$

(9) $R^1 = R^2 = H, R^3 = xyl$

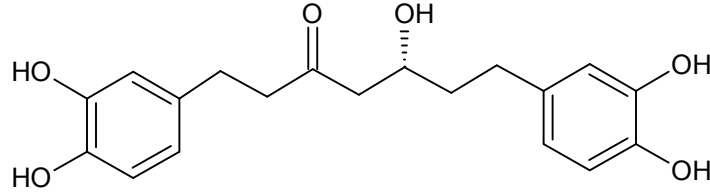
(10) $R^1 = R^2 = R^3 = H$

(11) $R^1 = R^2 = H, R^3 = glc$

xyl: β -D-ksilopiranozil; glc: β -D-glukopiranozil

Şekil 1.6. *A. japonica* kabuklarından izole edilen bazı diarilheptanoit yapılı bileşikler (Tung ve ark., 2010a)

Tung ve arkadaşlarının *A. japonica* kabuklarında bulunan bileşiklerin izole edilmesi amacı ile gerçekleştirdikleri bir başka çalışmada Çin'den toplanan ve kurutulan bitkinin kabukları (1.0 kg) %95'lik EtOH (3 x 3 L) ile oda sıcaklığında ekstre edilmiş, ekstreler birleştirilerek yoğunlaştırılmış, artık (308 g) 2 L su ile süspande edilmiş ve sırasıyla CH₂Cl₂, EtOAc ve n-BUOH ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. EtOAc fraksiyonundan kolon kromatografisi tekniği kullanılarak epihirsutanonol, 5*S*-1-(3,4-dihidroksifenil)-7-(4-hidroksifenil)-5-hidroksiheptan-3-on ile 5*S*-1-(4-hidroksifenil)-7-(3,4-dihidroksifenil)-5-hidroksiheptan-3-on bileşikleri izole edilmiştir (Tung ve ark., 2010 b).



Şekil 1.7. Epihirsutanonol

A. japonica ham ekstresi üzerinde gerçekleştirilen online HPLC-ABTS analizinde antioksidan etki gösteren hirsutanonol 5-*O*- β -D-glukopiranozit, 3-deoksohirsutenonol 5-*O*- β -D-glukopiranozit ve hirsutenon bileşikleri yüksek hızda karşı akım kromatografisi yöntemi ile izole edilmiş ve yapıları NMR spektroskopi teknikleri kullanılarak aydınlatılmıştır (Lim ve ark., 2011).

Kore'den toplanan *A. hirsuta* bitkisinin yapraklarından %80'lik aseton çözeltisi ile elde edilen ekstreden kolon kromatografisi tekniğinin kullanıldığı çalışmada hirsutanonol, oregonin, (5*R*)-1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-heptan-5-*O*- β -D-ksilopiranozit ve (5*R*)-1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-heptan-5-*O*- β -D-glukopiranozit bileşiklerinin izole edildiği rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2000).

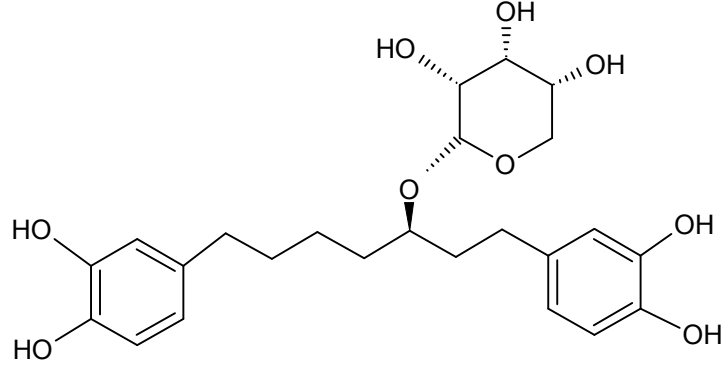
A. hirsuta dal kabuklarının metanollü ekstresinin etilasetatta çözünen fraksiyonu üzerinde *in vitro* HIF-1 analizi kullanılarak gerçekleştirilen BAYF çalışması sonucu HIF-1 aktivasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettikleri saptanan 2-oksatrisiklo[13.2.2.13,7]eikosa-3,5,7(20),15,17,18-hekzen-10-16-diol ile 2-oksatrisiklo[13.2.2.13,7]eikosa-3,5,7(20),15,17,18-hekzen-10-on bileşikleri izole edilmiştir (Jin ve ark., 2007).

Kuo ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada aynı bitkinin tohumlarında oregonin bileşiğinin bulunduğu ve bu bileşiğin miktarının kapiller zon elektroforez metodu kullanılarak 0.231 mg/g olarak belirlendiği belirtilmiştir (Kuo ve ark., 2008).

A. hirsuta dal kabuklarının etilasetatta çözünebilen fraksiyonu üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda diarilheptanoit yapısındaki (3R)-1,7-bis-(4-dihidroksifenil)-3-heptanol 3-*O*- β -D-glukopiranozil (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-ksilopiranozit, oregonin, rubranozit A, hirsutanonol 5-*O*- β -D-glukopiranozit, rubranozit B, rubranozit C, hirsutanonol, hirsutenon, (5S)-*O*-metilhirsutanonol, platifillozit, platifillonon 5-*O*- β -D-ksilopiranozit, aserozit VII ve platifillenon bileşikleri izole edilmiştir (Park ve ark., 2010).

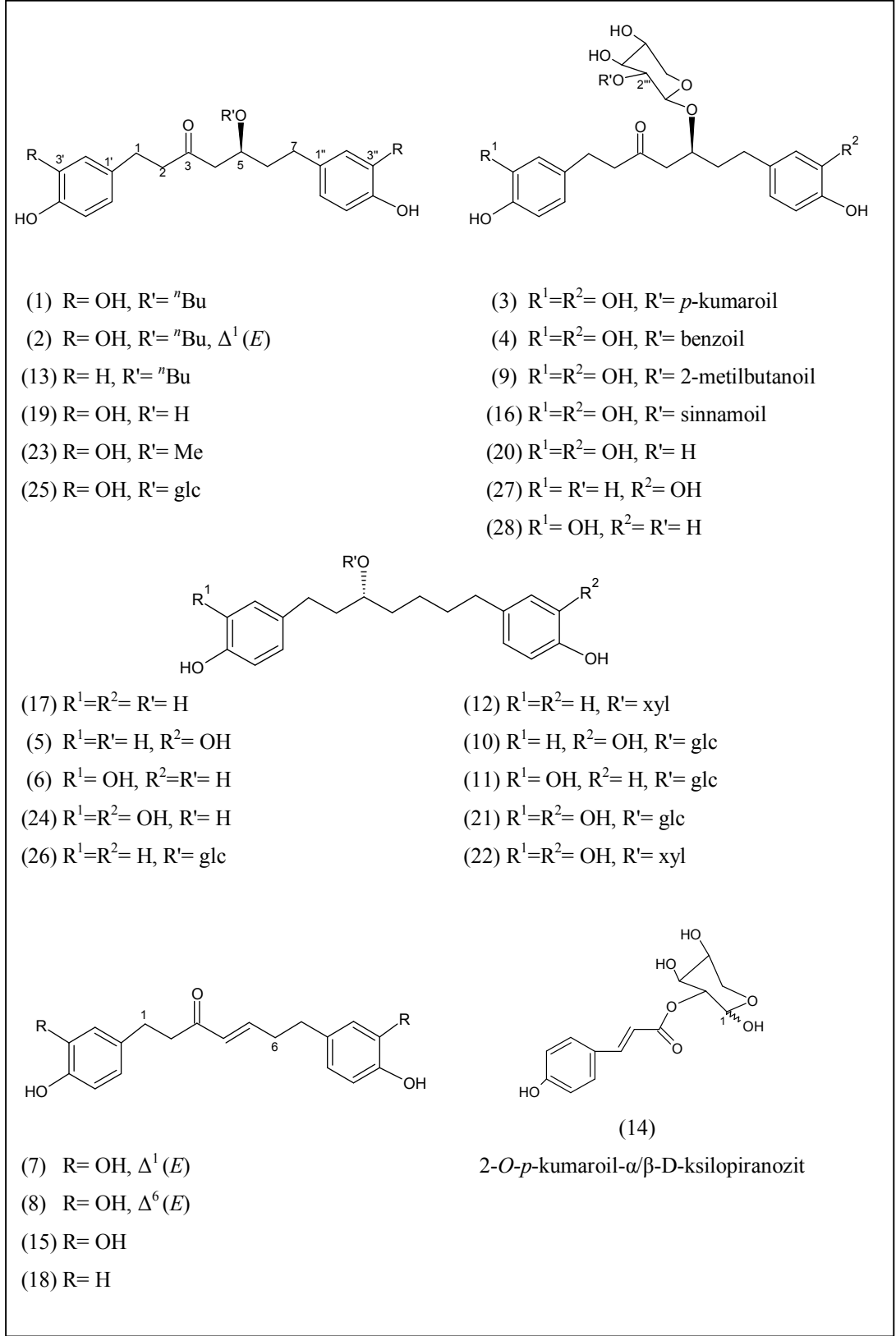
Aynı bitkinin kabuklarının MeOH'lü ekstresinden izole edilen diarilheptanoit yapısındaki bileşiklerinin antioksidan ve antienflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada oregonin ile 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-heptan-5-*O*- β -D-ksilopiranozit'in izole edildiği rapor edilmiştir (Hu ve Wang, 2011).

Letonya'dan toplanan *A. incana* kabukları üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, bitkinin kurutulmuş kabuklarının EtOAC'lı ekstresinden hareketle oregonin ve 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-3-hidroksiheptan-5-*O*- β -D-ksilopiranozit izole edilmiştir. Aynı çalışmada HPLC yöntemi kullanılarak bitkinin kabuklarındaki oregonin miktarı %20 olarak belirlenmiştir (Roze ve ark., 2011).



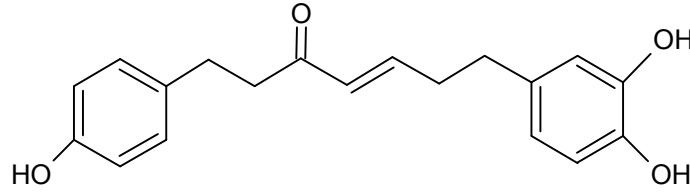
Şekil 1.8. 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-heptan-5-*O*-β-d-ksilopiranozit

Başka bir çalışmada Tayvan'dan toplanan *A. formosana* yapraklarından hazırlanan MeOH'lü ekstrenin *n*-BuOH fraksiyonundan hareketle 5(*S*)-butiloksi-1,7-di(3,4-dihidroksifenil)-3-heptanon (5-*O*-butilhirsutanonol (1), 5(*S*)-butiloksi-1,7-di(3,4-dihidroksifenil)-1-hepten-3-on (2), 2'''-*O*-*p*-kumaroiloregonin (3), 2'''-*O*-benzoiloregonin (4), 7-(3,4-Dihidroksifenil)-1-(4-hidroksifenil)-3(*R*)-heptanol (5), 1-(3,4-dihidroksifenil)-7-(4-hidroksifenil)-3(*R*)-heptanol (6), 1,7-Di(3,4-dihidroksifenil)-hepta-1*E*,4*E*-dien-3-on (7), 1,7-Di(3,4-dihidroksifenil)-hepta-4*E*,6*E*-dien-3-on (8), 2'''-*O*-(2-Metilbutanoil)-oregonin (9), 7-(3,4-Dihidroksifenil)-1-(4-hidroksifenil)-3(*R*)-β-D-glukoziloksi-heptan (10), 1-(3,4-Dihidroksifenil)-7-(4-hidroksifenil)-3(*R*)-β-D-glukoziloksi-heptan (11), 1,7-Di(4-hidroksifenil)-3(*R*)-β-D-ksiloksifenil-heptan (12), 5(*S*)-Butiloksi-1,7-di(4-hidroksifenil)-3-heptanon (13), 2-*O*-*p*-kumaroil-α/β-D-ksilopiranozit (14), hirsutenon (15), 2'''-sinnamoiloregonin (16), sentrolobol (17), 1,7-di(4-hidroksifenil)-4-hepten-3-on (18), hirsutanonol (19), oregonin (20), rubranosit A (21), rubranosit B (22), 5-*O*-metilhirsutanonol (23), rubranol (24), 1,7-di(3,4-dihidroksifenil)-5(*S*)-glukopiranoziloksi-3-heptanon (25), aserozit VII (26) alnusit A (27) ve alnusit B (28) izole edilmiştir (Lai ve ark., 2012).



Şekil 1.9. *A. formosana* yapraklarından izole edilen bazı diarilheptanoit yapılu bileşikler (Lai ve ark., 2012)

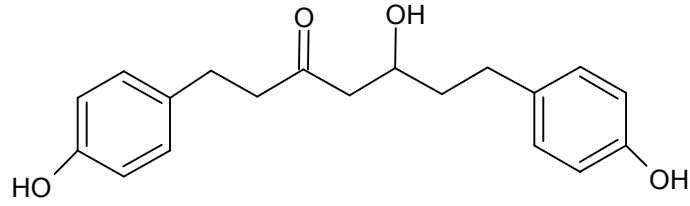
A. nepalensis bitkisinde yer alan antifilarial etkili bileşiklerin araştırıldığı bir çalışmada Hindistan'dan toplanan bitkinin kurutulmuş yaprakları önce MeOH ile ekstre edilmiş, elde edilen ekstre rotavaporda yoğunlaştırılmış, suyla süspande edilip sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile hekzan, kloroform ve butanollü fraksiyonlarına ayrılmıştır. Kloroformlu ekstre silikajel kolona uygulanmış ve vakumlu sıvı kromatografisi (VLC) tekniği ile hekzan ve etilasetatın değişik oranlardaki karışımları ile elüe edilmiştir. Elüsyon sonucu toplanan 11 fraksiyondan 6. fraksiyonun ters faz preparatif HPLC'ye uygulanması (Mobil faz: MeOH:H₂O, 65:35, 15 ml/dak) ile platifillenon (R_t = 7.6), 8. fraksiyonun ters faz preparatif HPLC'ye uygulanmasıyla (Mobil faz: MeOH:H₂O, 50:50, 15 ml/dak) alusenon (R_t = 15.6), 9. fraksiyonun ters faz preparatif HPLC'ye uygulanmasıyla ise (Mobil faz: MeOH:H₂O, 50:50, 15 ml/dak) hirsutenon (R_t = 7.5) ve hirsutanonol (R_t = 4.7) izole edilmiştir. Aynı çalışmada bu bileşiklerin miktar tayinlerinin yapılabilmesi amacı ile HPTLC metodu geliştirilerek valide edilmiştir (Yadav ve ark., 2013 a).



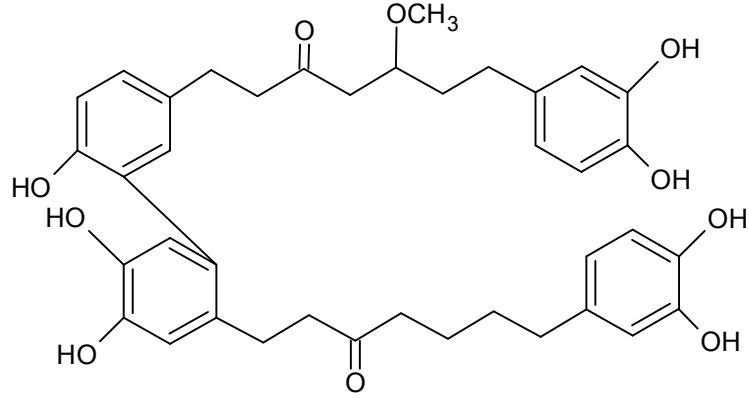
Şekil 1.10. Alusenon

Yadav ve arkadaşlarının yine *A. nepalensis* yaprakları üzerinde antifilarial bileşiklerini araştırdıkları bir diğer çalışmada Hindistan'dan toplanan bitkinin kurutulmuş ve toz edilmiş yaprakları MeOH ile ekstre edilmiş, hekzanlı, kloroformlu ve butanollü fraksiyonlarına ayrılmış ve kuruluğa kadar uçurulmuş butanollü ekstreden VLC tekniği ile 12 alt fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlardan 2. fraksiyonun ters faz preparatif HPLC'ye uygulanması (Mobil faz: MeOH:H₂O, 65:35, 15 ml/dak) ile 1,7-bis-(*p*-hidroksifenil)-3-heptanon, 6. fraksiyonun ters faz preparatif HPLC'ye uygulanmasıyla (Mobil faz: MeOH:H₂O, 50:50, 15 ml/dak) 1,7-bis-(4-dihidroksifenil)-5-hidroksi-3-heptanon, 7. fraksiyonun ters faz preparatif HPLC'ye

uygulanmasıyla (Mobil faz: MeOH:H₂O, 55:45, 15 ml/dak) *Alnus* dimer, (5*S*)-5-hidroksi-1-(4-hidroksifenil)-7-(3,4-dihidroksifenil)-3-heptanon ile 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-5-metoksi-3-heptanon izole edilmiştir. Çalışmada 1,7-bis-(4-dihidroksifenil)-5-hidroksi-3-heptanon ile *Alnus* dimer bileşiklerinin yeni bileşikler olduğu, tüm izole edilen bileşiklerin yapılarının ise ¹H ve ¹³C NMR spektroskopileri ile aydınlatıldığı rapor edilmiştir (Yadav ve ark., 2013 b).



Şekil 1.11. 1,7-bis-(4-dihidroksifenil)-5-hidroksi-3-heptanon

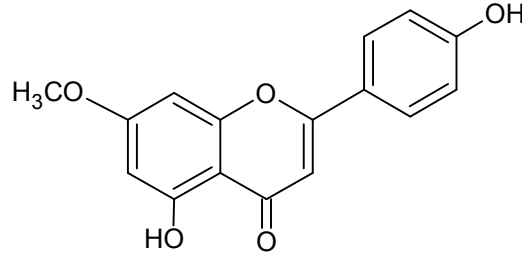


Şekil 1.12. *Alnus* dimer

A. pendula bitkisinin kabuklarının antibakteriyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kabukların %80 EtOH'lü ekstresinden hareketle oregonin ve hirsutanon izole edilmiş ve yapıları NMR spektroskopisi kullanılarak aydınlatılmıştır (Choi ve ark., 2012).

1.12.2.2. Flavonoitler

O'Rourke ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada *A. glutinosa*'nın öğütülmüş tohumları Soxhlet apareyinde sırasıyla *n*-hekzan, diklorometan ve metanol ile ekstre edilmiş, MeOH'lü ekstre, MeOH'ün sudaki çözeltilerinin (%30, %60, %80 ve %100) kullanıldığı kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmış ve %60 MeOH ile elüe edilen fraksiyonun preparatif HPLC yöntemi ile saflaştırılması sonucu flavon yapısındaki genkwanin (5,4'-dihidroksi-7-metoksiflavon) bileşiğinin izole edildiği rapor edilmiştir (O'Rourke ve ark., 2005).

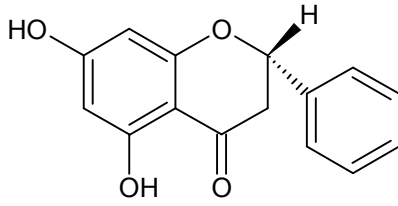


Şekil 1.13. Genkwanin

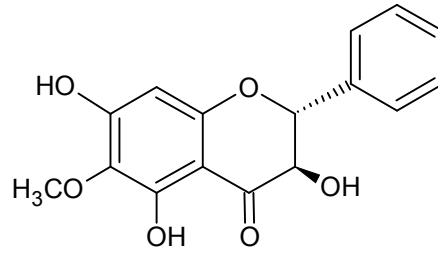
A. glutinosa ve *A. incana* bitkilerinin yaprak tomurcuklarında bulunan fenolik yapıları bileşiklerin ters faz HPLC yöntemi kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, *A. glutinosa* yaprak tomurcuklarında hiperozit ve kersetin, *A. incana* yaprak tomurcuklarında ise hiperozit, izokersitrin, ve kersetin bileşiklerinin varlığı kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmiştir (Peev ve ark., 2007).

A. firma yapraklarının MeOH'lü ekstresinin ve bu ekstreden izole edilen bileşiklerin HIV-1 viral enzimleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada flavonoit yapısında 9 bileşik izole edilmiş ve yapıları NMR ile MS yöntemleri ile aydınlatılmıştır.

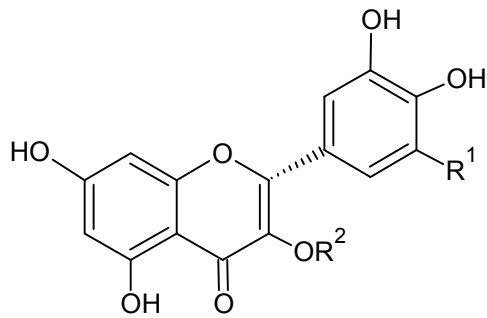
İzolasyon için Kore'de yetişen bitkinin kurutulmuş ve toz edilmiş yaprakları MeOH ile ekstre edilmiş, elde edilen ekstre süzölmüş ve düşük basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılmış ekstre %10 MeOH çözeltisi ile süspande edildikten sonra sırasıyla *n*-hekzan, kloroform ve etilasetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. CHCl₃'lü ekstre silikajel kolonuna uygulanarak *n*-hekzan-EtOAc karışımı ile elüe edilmiş ve elde edilen alt fraksiyonlardan pinosembrin (1) ile alnustinol (2) izole edilmiştir. EtOAc fraksiyonunun ise önce silikajel kolonunda CHCl₃-MeOH-H₂O ile daha sonra Sephadex LH-20 kolonunda MeOH-H₂O ile elüe edilmesi sonucunda kersetin (3), kersetin-3-*O*- α -L-arabinofuranozit (4), kersitrin, izokersitrin, mirsetin-3-*O*- β -D-galaktopiranozit (5), (+)-kateşin (6) ile (-)-epikateşin (7) izole edilmiştir (Yu ve ark., 2007).



(1) Pinosembrin



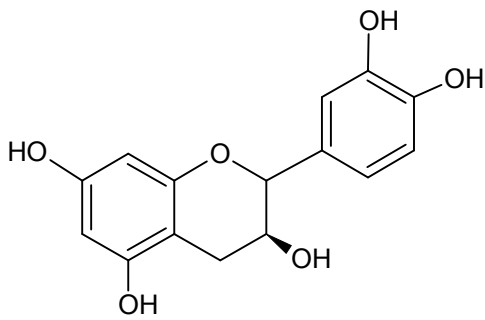
(2) Alnustinol



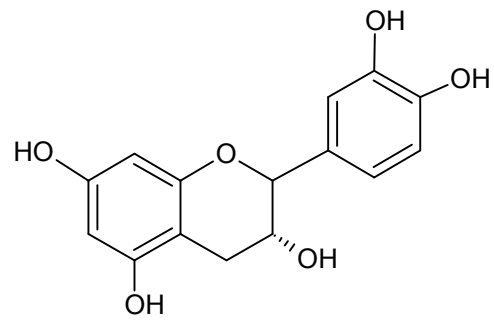
(3) $R^1 = R^2 = H \rightarrow$ Kersetin

(4) $R^1 = H, R^2 = \alpha\text{-L-arabinofuranoz} \rightarrow$ Kersetin-3- $O\text{-}\alpha\text{-L-arabinofuranozit}$

(5) $R^1 = OH, R^2 = \beta\text{-D-galaktopiranoz} \rightarrow$ Mirsetin-3- $O\text{-}\beta\text{-D-galaktopiranozit}$



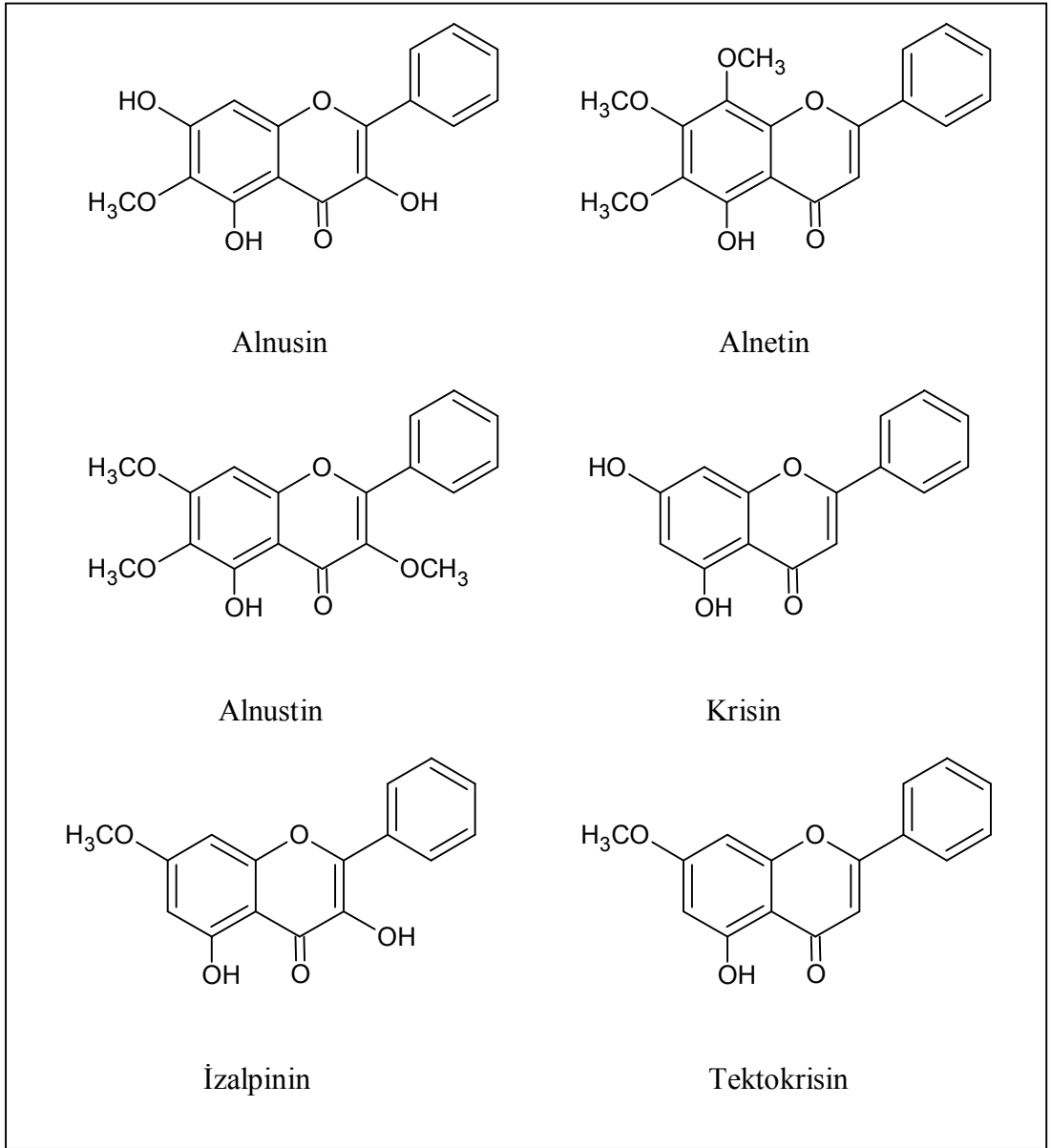
(6) (+)-kateşin



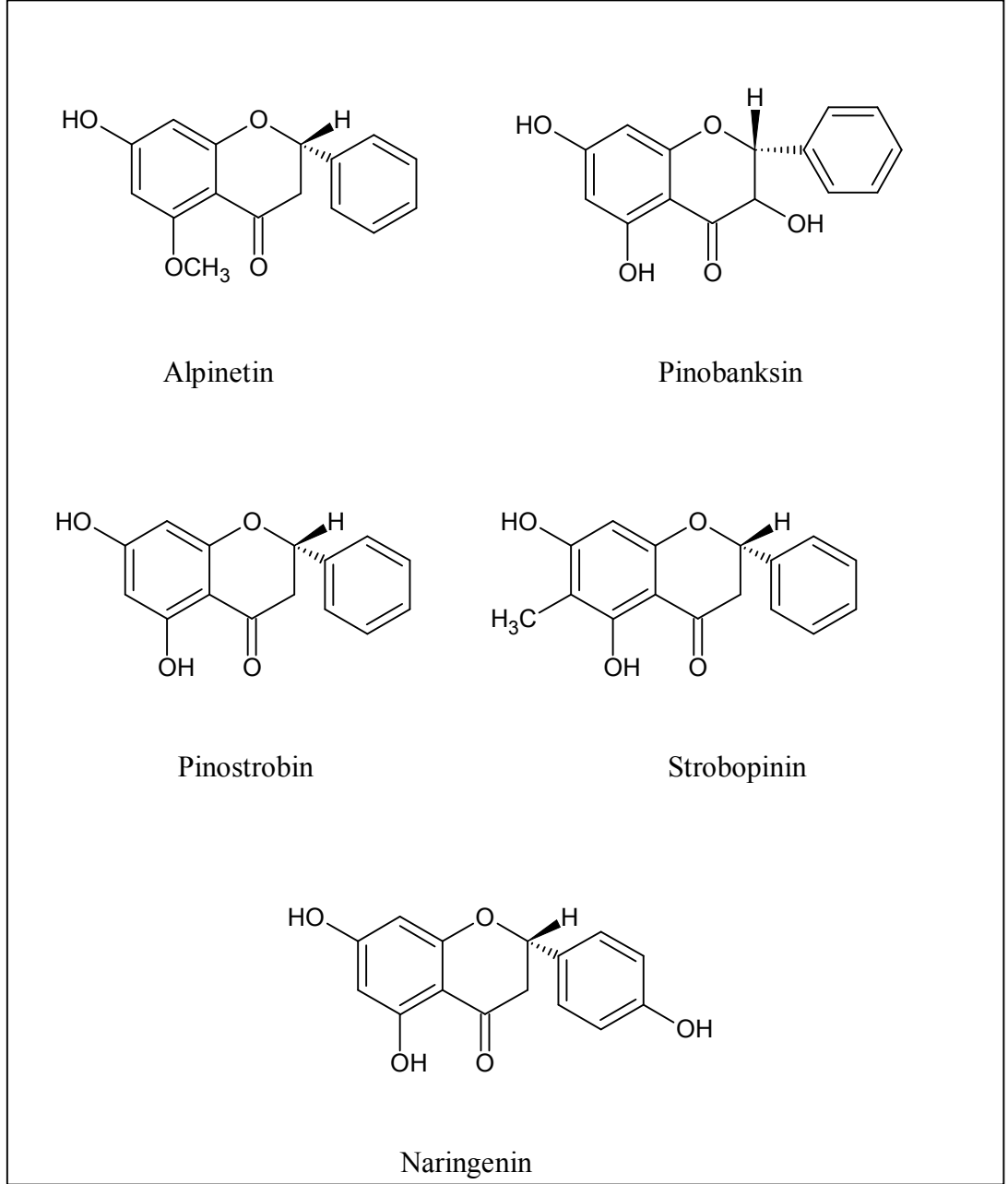
(7) (-)-epikateşin

Şekil 1.14. *A. firma* yapraklarından izole edilen bazı flavonoit yapılı bileşikler (Yu ve ark., 2007)

Hiroşima'dan toplanan *A. sieboldiana* bitkisinin erkek çiçeklerinin benzenli ekstresinden hareketle kolon kromatografisi ve preparatif İTK teknikleri kullanılarak yapılan izolasyon çalışmasında daha önce izole edilen flavonoit yapıları olan krisin, izalpinin, tektokrisin, pinosembrin, pinobanksin, strobopinin ve naringenin yanında 4 yeni bileşik olarak alnusun, alnetin, alnustin ve alnustinol'un izole edildiği rapor edilmiştir. Çalışmada daha önce yapılan izolasyon çalışmalarında aynı bitkinin erkek çiçeklerinin benzenli ekstresinden pinostrobin ve alpinetin bileşiklerinin izole edilmiş olduğu belirtilmiştir (Asakawa, 1971).



Şekil 1.15. *A. sieboldiana* çiçeklerinden izole edilen bazı flavon ve flavonoller (Asakawa, 1971)

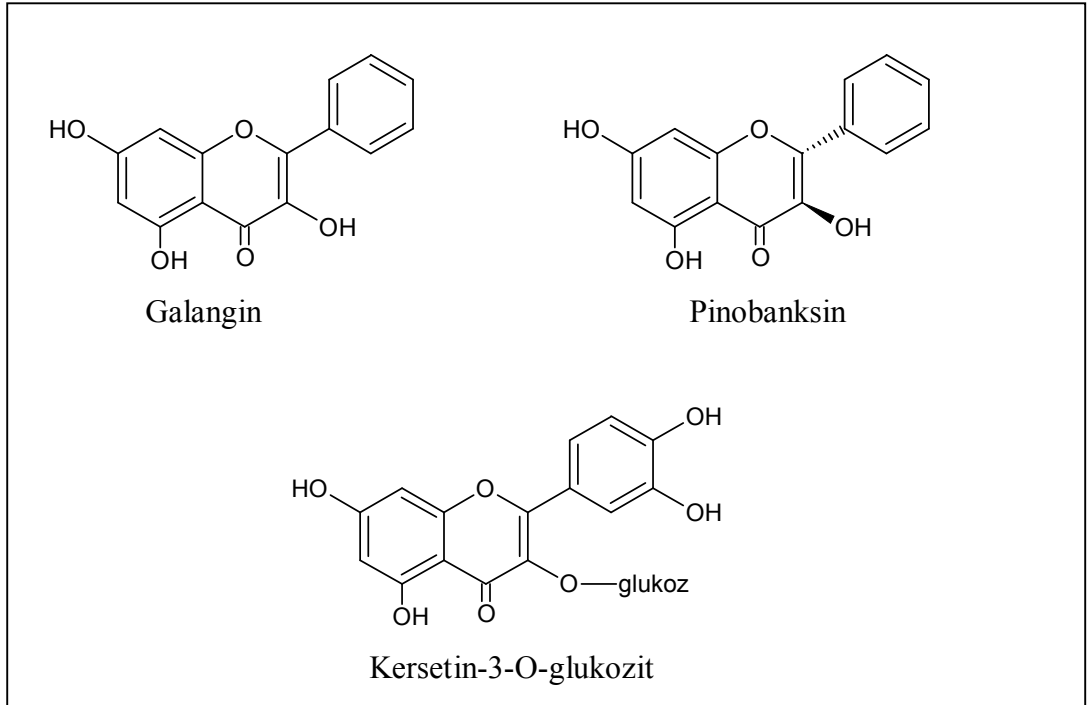


Şekil 1.16. *A. sieboldiana* çiçeklerinden izole edilen bazı flavan ve flavanoller (Asakawa, 1971)

A. sieboldiana yapraklarında bulunan antikanser etkili bileşiklerin izole edilmesi amacı ile BAYF tekniği kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada 7 bileşik izole edilmiştir. İzolasyon amacı ile Japonya'dan toplanan bitkinin kurutulmuş yaprakları önce *n*-hekzan ile kalan artık ise MeOH ile 2'şer ay boyunca maserasyona tabi

tutulmuştur. Elde edilen MeOH'lü ekstre kuruluğa kadar yoğunlaştırılmış, su ile süspande edildikten sonra EtOAc ve BuOH ile sıvı sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. EtOAc'lı fraksiyonun silikajel kolonuna uygulanması ve değişen polaritelerde *n*-hekzan: EtOAc ile elüe edilmesi sonucu 12 fraksiyon elde edilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen fraksiyonlardan hareketle pinosembirin, galangin, pinobanksin, alnustinol ve kersetin izole edilmiştir (Ludwiczuk ve ark., 2011).

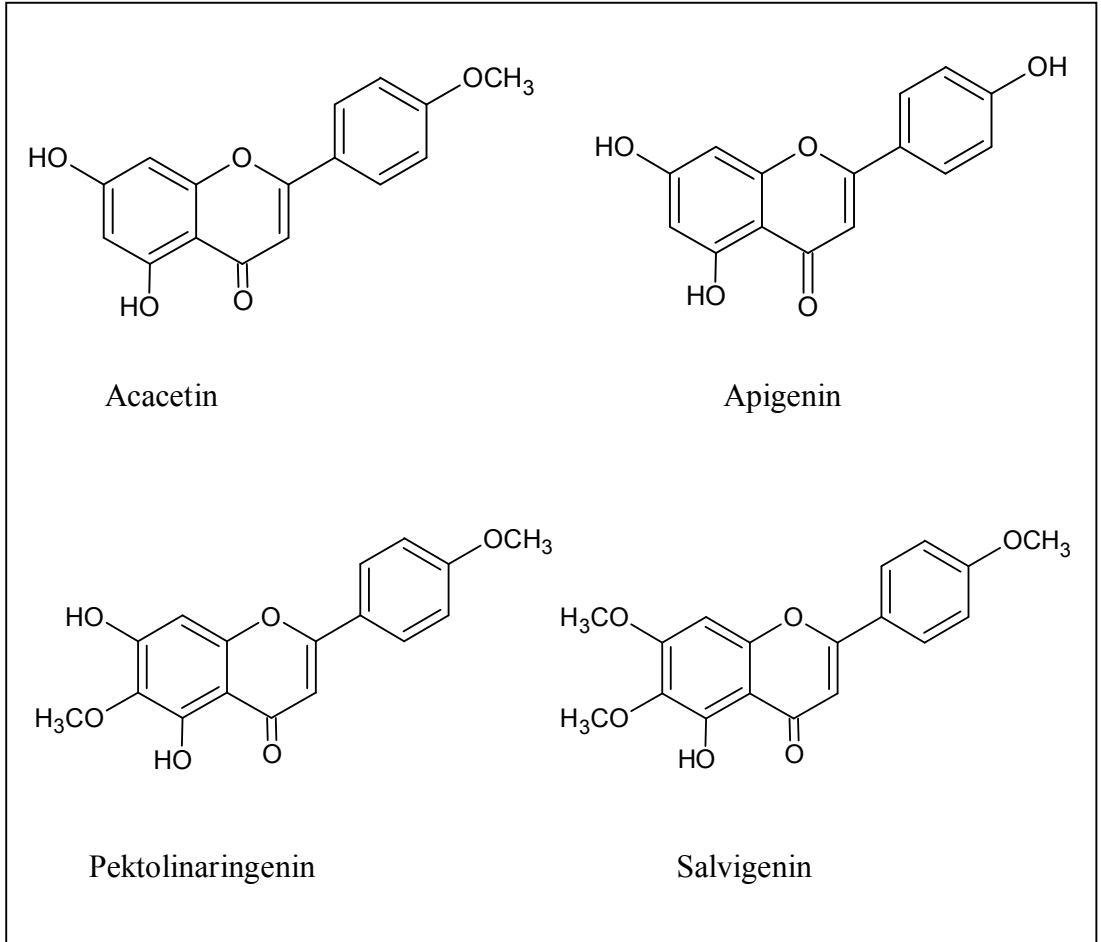
Hindistan'dan toplanan *A. nepalensis* bitkinin kurutulmuş ve toz edilmiş yaprakları üzerinde antifilarial etkili bileşiklerin araştırıldığı bir çalışmada, MeOH ile ekstre edilmiş, hekzanlı, kloroformlu ve butanollü fraksiyonlarına ayrılmış ve kuruluğa kadar uçurulmuş butanollü ekstreden VLC tekniği ile 12 alt fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlardan 7. fraksiyonun ters faz preparatif HPLC'ye uygulanması sonucu kersetin-3-O-glukozit izole edilmiş ve yapısı ^1H ve ^{13}C NMR spektroskopileri ile aydınlatılmıştır (Yadav ve ark., 2013 b).



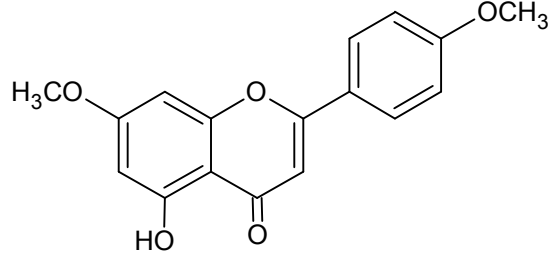
Şekil 1.17. *A. sieboldiana* ve *A. nepalensis* yapraklarından izole edilen bazı flavonol yapılı bileşikler

A. nepalensis bitkisi üzerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada Vietnam'dan toplanan ve kurutulan yaprakların MeOH'lü ekstresinin EtOAc'lı fraksiyonundan hareketle kersetin, kersetin 3-O- β -D-galaktopiranozit ile kersitrin bileşikleri izole edilmiştir (Phan ve ark., 2010).

Hanawa ve Towers tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *A. rubra* tohum zarından kolon kromatografisi tekniği kullanılarak flavon yapısındaki 7,4'-dimetoksi-5-hidroksiflavon, pektolinarinenin, acacetin, salvigenin ve apigenin bileşikleri izole edilmiştir. Aynı çalışmada NMR spektroskopisi yöntemleri kullanılarak izole edilen bileşiklerin yapılarının aydınlatıldığı rapor edilmiştir (Hanawa ve Towers, 2003).



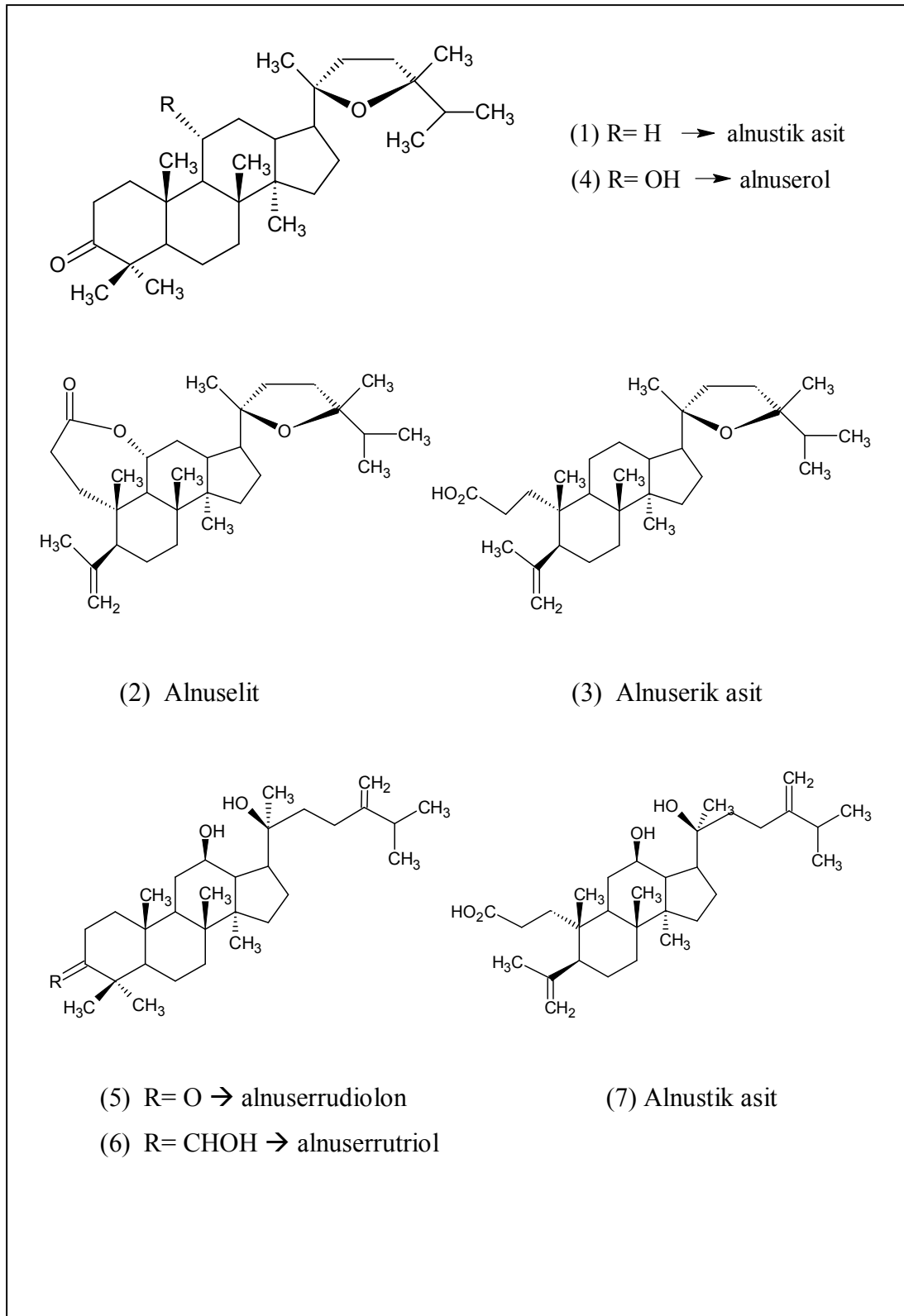
Şekil 1.18. *A. rubra* tohum zarından izole edilen bazı flavon yapıları (Hanawa ve Towers, 2003)



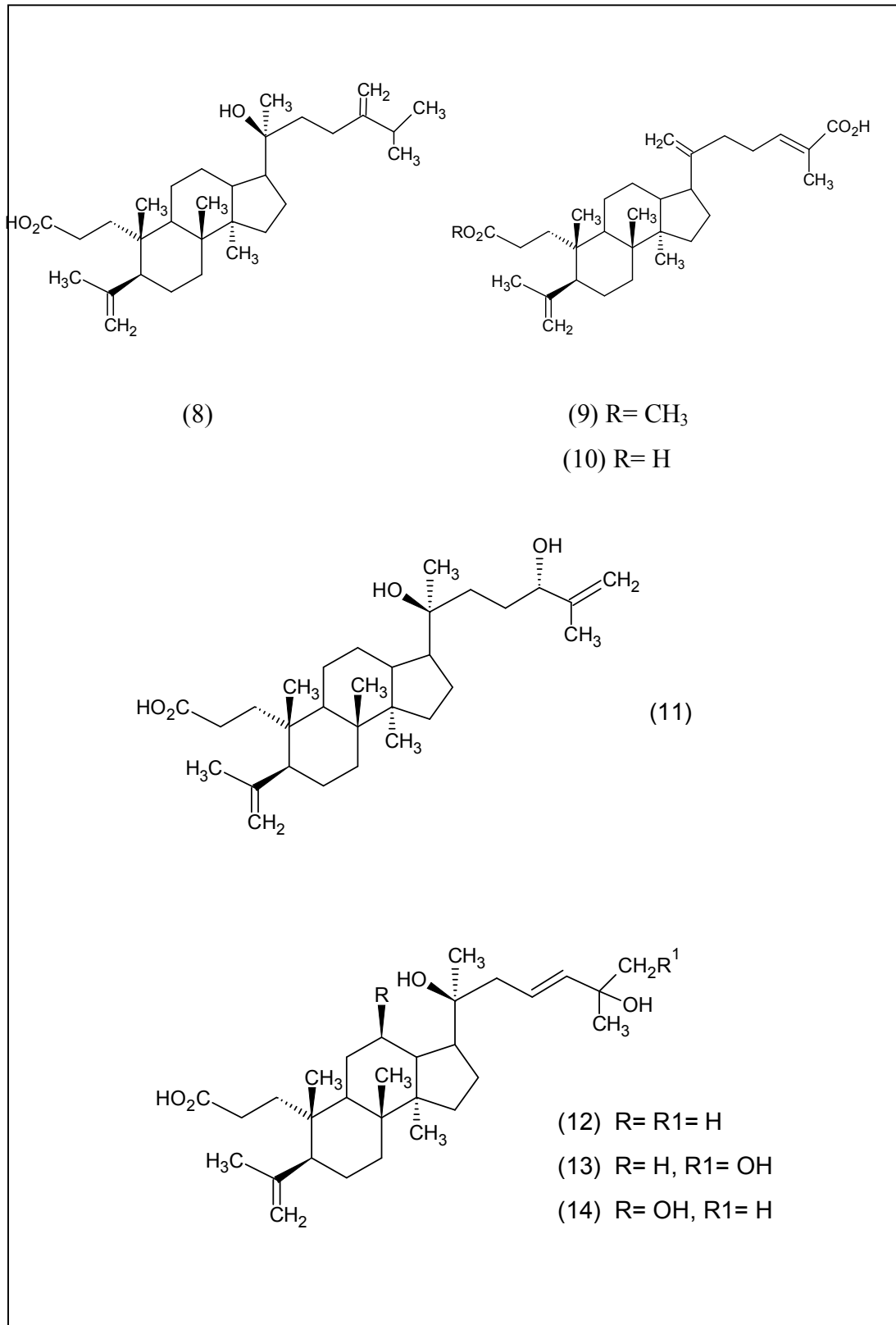
Şekil 1.19. 7,4'-dimetoksi-5-hidroksiflavon

1.12.2.3. Triterpenik Yapılı Bileşikler

Aoki ve arkadaşlarının bazı *Alnus* türlerinin dişi ve erkek çiçeklerinden elde ettikleri asetonlu ekstratlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda *A. serrulatoides* çiçeklerinden alninkanon (1), alnusetit (2), alnuserik asit (3), alnuserol (4), alnuserrudiolon (5), alnuserrutiol (6), alnustik asit (7) ile alnustik asitin glikozitleri (12-*O*-(2'-*O*-asetil)- α -L-arabinofuranozit, 12-*O*- α -L-arabinofuranozit, 12-*O*-(2'-*O*-asetil)- β -D-ksilopiranozit, 12-*O*- β -D-ksilopiranozit, 12-*O*-(2'-*O*-asetil)- β -D-glukopiranozit, 12-*O*- β -D-glukopiranozit glikozitleri), *A. sieboldiana* çiçeklerinden alnuserrudiolon (5), alnustik asit (7) ile alnustik asitin 12-*O*- α -L-arabinofuranozit, 12-*O*- β -D-ksilopiranozit ve 12-*O*- β -D-glukopiranozit glikozitleri, *A. pendula* çiçeklerinden alnuserik asit (3), alnustik asit (7), alnustik asitin glikozitleri (12-*O*-(2'-*O*-asetil)- α -L-arabinofuranozit, 12-*O*- α -L-arabinofuranozit, 12-*O*-(2'-*O*-asetil)- β -D-ksilopiranozit, 12-*O*- β -D-ksilopiranozit, 12-*O*-(2'-*O*-asetil)- β -D-glukopiranozit, 12-*O*- β -D-glukopiranozit glikozitleri) ve 12-deoksialnustik asit (8), *A. japonica* çiçeklerinden ise metil (24*E*)-3,4-sekodamara-4(28),20,24-trien-26-oik asit-3-oat (9), (24*E*)-3,4-sekodamara-4(28),20,24-trien-3,26-dioik asit (10), (20*S*,24*S*)-20,24-dihidroksi-3,4-sekodamara-4(28),25-dien-3-oik asit (11), (23*E*)-(20*S*)-20,25-dihidroksi-3,4-sekodamara-4(28),23-dien-3-oik asit (12), (23*E*)-(20*S*)-20,25,26-trihidroksi-3,4-sekodamara-4(28),23-dien-3-oik asit (13) ile (23*E*)-(12*R*,20*S*)-12,20,25-trihidroksi-3,4-sekodamara-4(28),23-dien-3-oik asit (14) izole edilmiştir (Aoki ve ark., 1990).



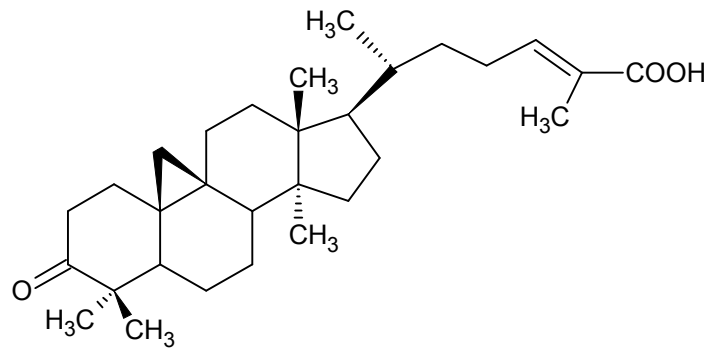
Şekil 1.20. *A. serrulatoides*, *A. sieboldiana* ve *A. pendula* çiçeklerinden izole edilen bazı triterpenik yapılu bileşikler (Aoki ve ark., 1990)



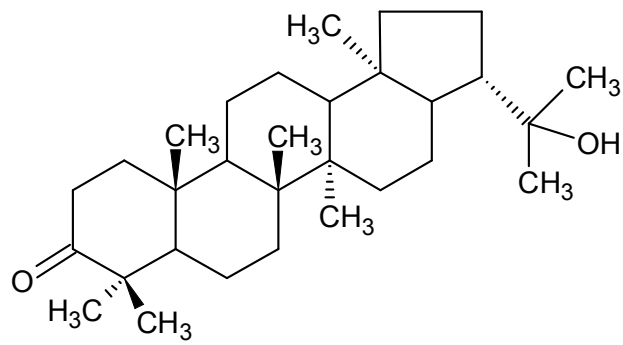
Şekil 1.21. *A. pendula* ve *A. japonica* çiçeklerinden izole edilen bazı triterpenik yapıları bileşikler (Aoki ve ark., 1990)

A. firma yapraklarının MeOH'lü ekstresinin ve bu ekstreden izole edilen bileşiklerin HIV-1 viral enzimleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada Kore'den toplanan bitkinin kurutulmuş ve toz edilmiş yaprakları MeOH ile ekstre edilmiş, elde edilen ekstre süzölmüş ve düşük basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılmış ekstre %10 MeOH çözeltisi ile süspande edildikten sonra sırasıyla *n*-hekzan, kloroform ve etilasetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. *n*-hekzan'lı ekstrenin silikajel kolonuna uygulanmasını takiben giderek artan polaritede *n*-hekzan:EtOAc ile elüsyon sonucu β -amirin asetat (1), β -amirin (2), β -sitosterol (3), alnustik asit metil esteri (4) ile β -sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozit (5) izole edilmiştir (Yu ve ark., 2007).

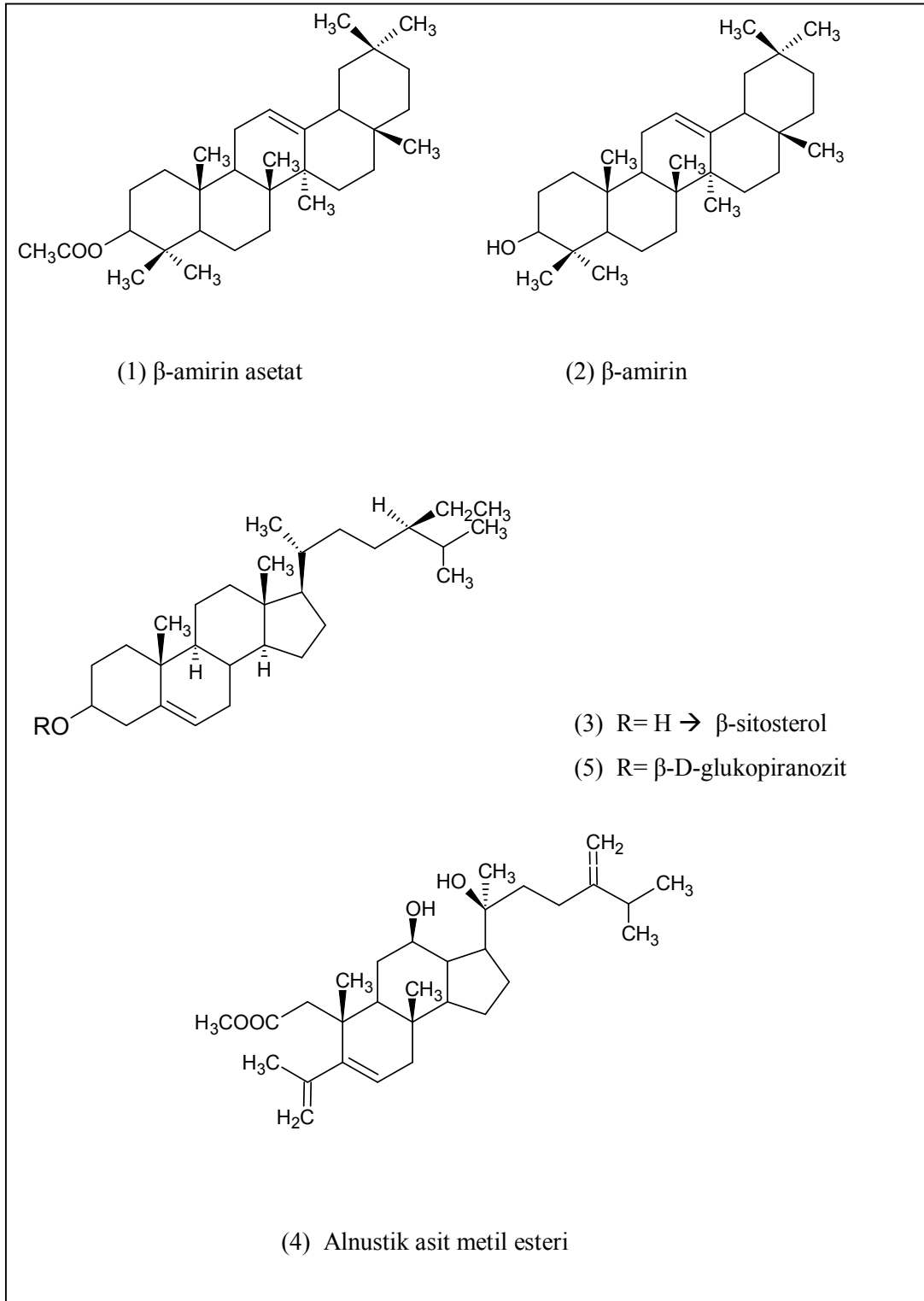
Phan ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Vietnam'dan toplanan *A. nepalensis* bitkisinin kurutulmuş yaprakları, dalları ve dal kabukları toz edildikten sonra MeOH ile oda sıcaklığında ekstre edilmiş, elde edilen ekstreler kuruluğa kadar yoğunlaştırılmış ve su ile süspande edildikten sonra *n*-hekzan, CH₂Cl₂ ve EtOAc'lı fraksiyonlarına ayrılmıştır. Kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak yaprakların *n*-hekzanlı fraksiyonundan tarakseril asetat, 2-hidroksidiploterol; CH₂Cl₂'li fraksiyonundan tarakseril asetat, tarakserol, betulinik asit, mangiferonik asit, 22-hidroksihopan-3-on ve 2-hidroksiploterol; EtOAc'lı fraksiyonundan ise β -sitosterol 3-*O*- β -D-glukopiranozit izole edilmiştir. Dallardan hazırlanan *n*-hekzanlı fraksiyondan hareketle tarakseril asetat, betulin; CH₂Cl₂'li fraksiyondan tarakserol ile betulin; EtOAc'lı fraksiyondan ise β -sitosterol 3-*O*- β -D-glukopiranozit izole edilirken dal kabuklarının *n*-hekzanlı fraksiyonundan β -sitosterol bileşiğinin izole edildiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada daha önce yapılan araştırmalarda *Alnus* türlerinde mangiferonik asit ile 22-hidroksihopan-3-on bileşiğinin izole edildiğine dair bir yayına rastlanmadığı, dolayısı ile bu bileşiklerin *A. nepalensis* için kimyasal markerlar olabileceği belirtilmiştir (Phan ve ark., 2010).



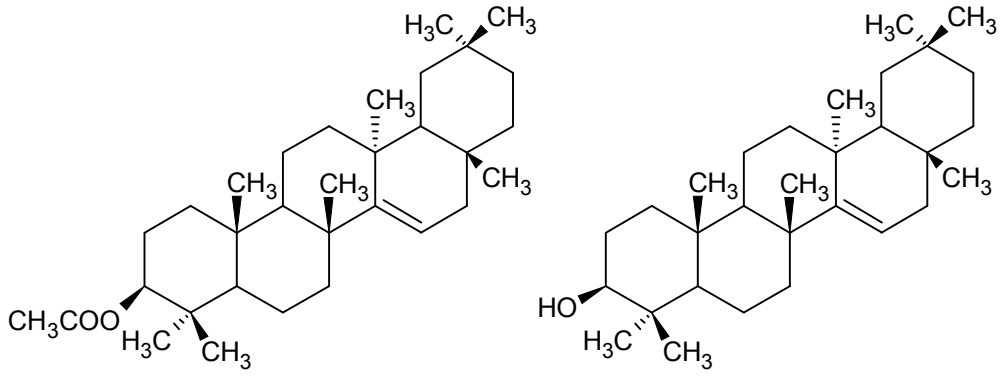
Şekil 1.22. Mangiferonik asit



Şekil 1.23. 22-hidroksihopan-3-on

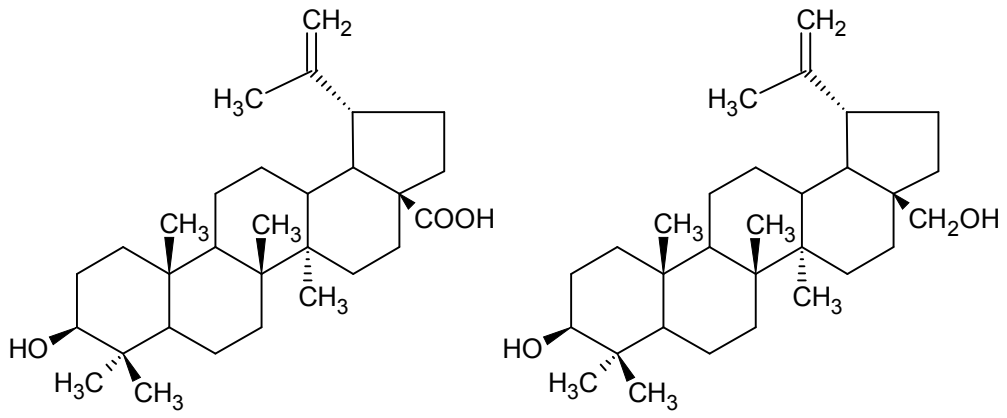


Şekil 1.24. *A. firma* yapraklarından izole edilen bazı triterpenik yapıli bileşikler (Yu ve ark., 2007)



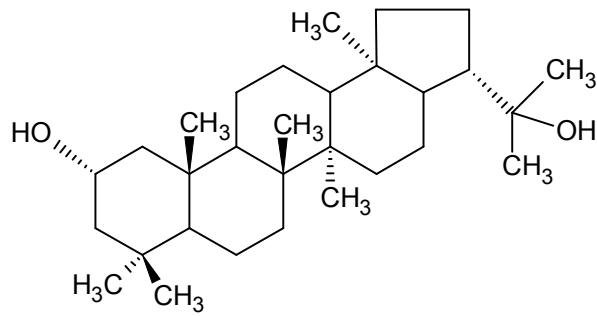
Tarakseril asetat

Tarakserol



Betulinik asit

Betulin

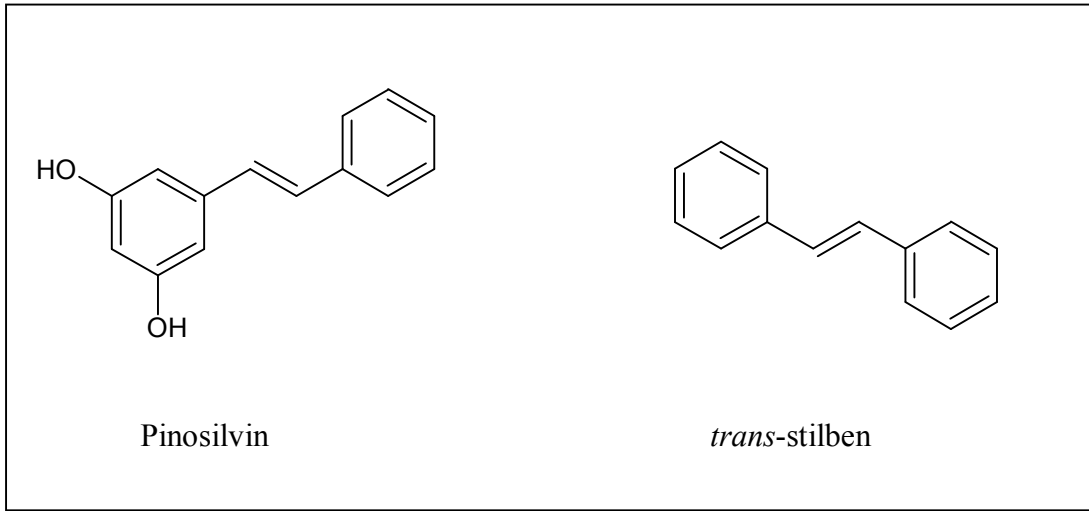


2-hidroksiploterol

Şekil 1.25. *A.nepalensis* bitkisinden izole edilen bazı triterpenik yapıli bileşikler (Phan ve ark., 2010)

1.12.2.4. Stilbenler

Hiroşima'dan toplanan *A. sieboldiana* bitkisinin erkek çiçeklerinin benzenli ekstresinden hareketle kolon kromatografisi ve preparatif İTK teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen izolasyon çalışmasında pinosilvin, pinosilvin monometil eter, pinosilvin dimetil eter ve *trans*-stilben bileşikleri izole edilmiştir (Asakawa, 1971).

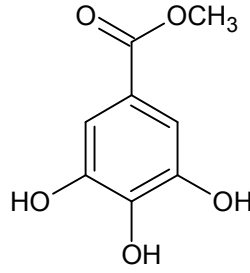


Şekil 1.26. *A. sieboldiana* bitkisinin erkek çiçeklerinden izole edilen bazı stilben yapıları (Asakawa, 1971)

Aynı bitkinin yapraklarında bulunan antikanser etkili bileşiklerin izole edilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada Japonya'dan toplanan bitkinin kurutulmuş yaprakları önce *n*-hekzan ile kalan artık ise MeOH ile 2'şer ay boyunca maserasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen MeOH'lü ekstrenin EtOAC'lı fraksiyonunun silikajel kolonuna uygulanması ve değişen polaritelerde *n*-hekzan: EtOAC ile elüe edilmesi sonucu elde edilen 3. fraksiyon Sephadex LH-20 kolonuna tatbik edilerek CH₂Cl₂:MeOH (1:1) ile elüe edilmiştir. 4. alt fraksiyonun silikajel kolonunda değişen polaritelerde *n*-hekzan: EtOAC ile elüe edilmesi sonucunda pinosilvin izole edilmiştir (Ludwiczuk ve ark., 2011).

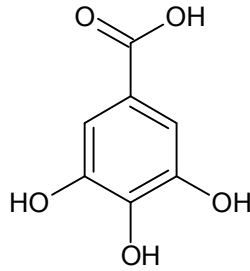
1.12.2.5. Diğer Bileşikler

Ludwiczuk ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen ve antikanser etkili bileşiklerin izolasyonunu amaçlayan BAYF çalışmasında Japonya kaynaklı *A. sieboldiana* yaprakları önce *n*-hekzan ile kalan artık ise MeOH ile 2'şer ay boyunca maserasyona tabi tutulmuştur. MeOH'lü ekstrenin EtOAC'lı fraksiyonunun silikajel kolonuna uygulanması ve değişen polaritelerde *n*-hekzan: EtOAC ile elüe edilmesi sonucu elde edilen 8. fraksiyon Sephadex LH-20 kolonuna tatbik edilerek CH₂Cl₂:MeOH (1:1) ile elüe edilmiş ve 5 tane alt fraksiyon toplanmıştır. Bu alt fraksiyonlardan 2. alt fraksiyonun silikajel kolonunda değişen polaritelerde *n*-hekzan: EtOAC ile elüe edilmesi sonucunda fenolik yapıli metil gallat izole edilmiştir (Ludwiczuk ve ark., 2011).



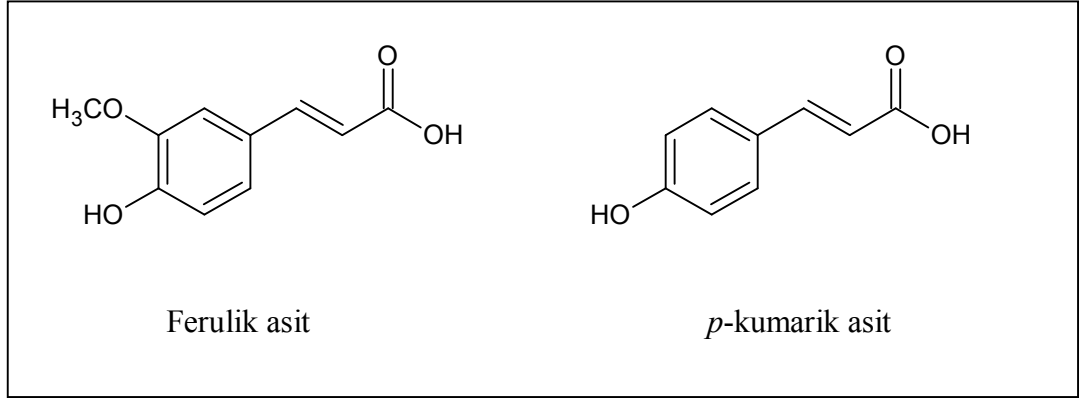
Şekil 1.27. Metil gallat

Vietnam kaynaklı *A. nepalensis* bitkisinin yapraklarından hazırlanan MeOH'lü ekstrenin EtOAc fraksiyonundan kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak gallik asitin izole edildiği rapor edilmiştir (Phan ve ark., 2010).



Şekil 1.28. Gallik asit

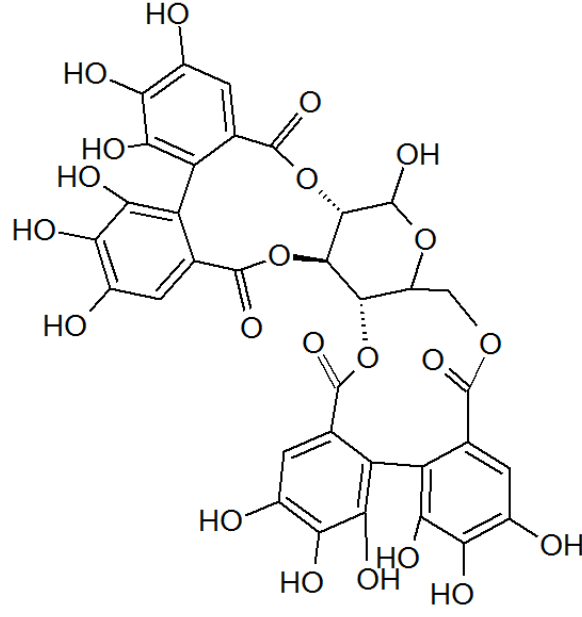
Peev ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada *A. glutinosa* ve *A. incana* bitkilerinin yaprak tomurcuklarında hidroksisinnamik asit türevi bileşikler olan *p*-kumarik asit ve ferulik asitin bulunduğu belirlenmiştir (Peev ve ark., 2007).



Şekil 1.29. *A. glutinosa* ve *A. incana* yaprak tomurcuklarında bulunan hidroksisinnamik asit türevi bileşikler (Peev ve ark., 2007)

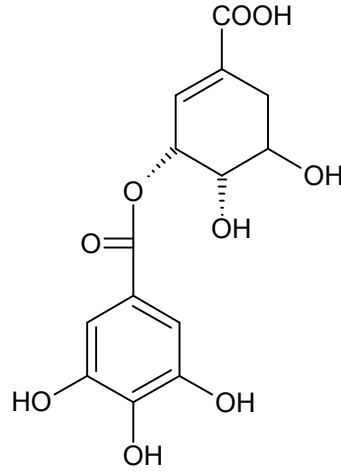
Hanawa ve Towers tarafından gerçekleştirilen ve tohum zarflarından flavon yapıları bileşiklerin izole edildiği çalışmada *A. sieboldiana* kabuklarında kondanse tanenlerin bulunduğu ilişkin yayınlar olduğu (Hanawa ve Towers, 2003), başka bir çalışmada ise *A. nepalensis* kabuklarının %7 oranında tanen taşıdığı rapor edilmiştir (Phan ve ark., 2010).

Ivanow ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *A. glutinosa* kozalaklarından elde edilen sulu etanollü ekstre, su ve çeşitli organik solvanlar arasında sıvı-sıvı partitasyon kromatografisine tabi tutulmuş ve DPPH radikalini süpürücü etkisi saptanan sulu ve butanollü fazlardan hareketle elajitanen yapısındaki glutinoin, pedunculagin ve praecoxin D izole edilmiştir (Ivanov ve ark., 2012).



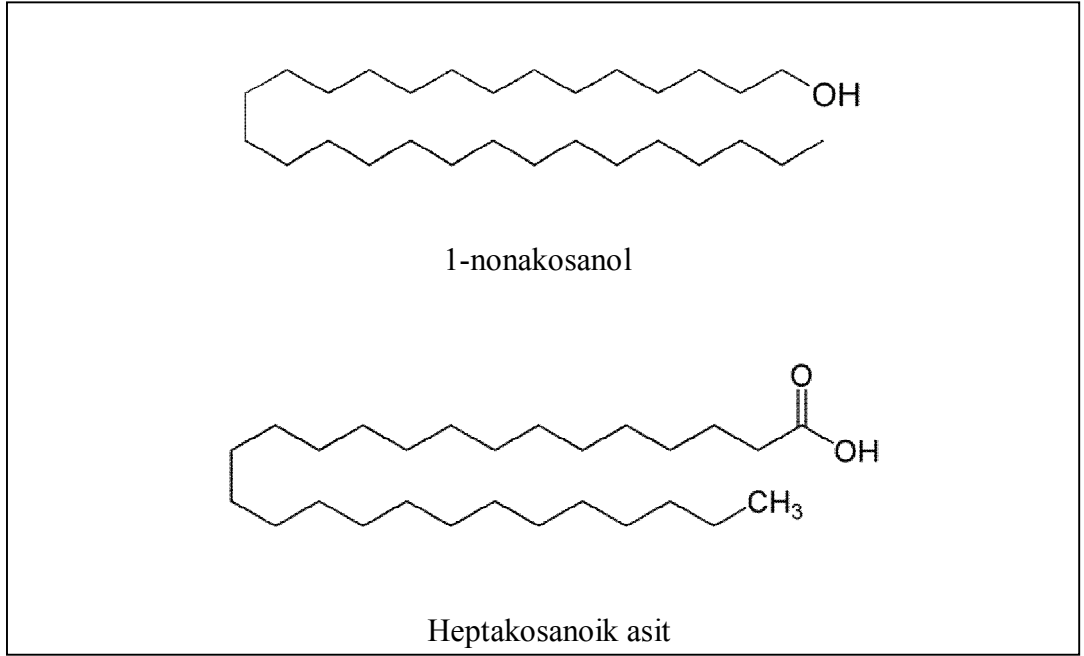
Şekil 1.30. Pedunculagin

A. japonica yapraklarından hareketle yapılan izolasyon çalışmasında hidroliz olabilen tanenlerden alnusjaponin A ve B, 5-*O*-galloil-($-$)-şikimik asit, 2,3-(*S*)-hekzahidroksidifenoil-D-glukoz, 4,6-di-*O*-galloil-D-glukoz, 1,4-di-*O*-galloil- β -D-glukoz, 4,6-(*S*)-valoneoil-D-glukoz, striktinin, gemin D, pedunculagin, praecoxin A, flosin A, stachyurin ve casuarinin bileşiklerinin izole edildiği rapor edilmiştir (Lee ve ark., 1992).

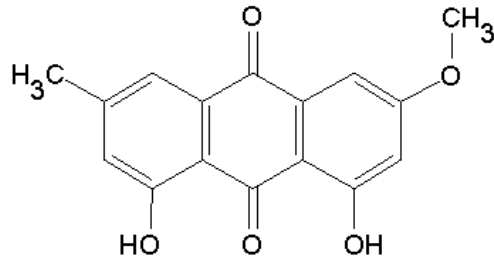


Şekil 1.31. 5-*O*-galloil-($-$)-şikimik asit

Phan ve arkadaşları tarafından *A. nepalensis* bitkisinin yaprakları ve dallarından hazırlanan metanollü ekstrelerin n-hekzanlı, CH_2Cl_2 'li ve EtOAc'lı fraksiyonlarından hareketle gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında, yaprakların n-hekzanlı fraksiyonundan alifatik hidrokarbon türevi bileşikler olan 1-nonakosanol ile heptakosanoik asitin, CH_2Cl_2 'li fraksiyonundan antrakinin türevi olan physcion bileşiğinin, dalların n-hekzanlı fraksiyonundan ise 1-nonakosanol'ün izole edildiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada *Alnus* türlerinden physcion (parietin) bileşiğinin daha önce izole edilmemiş olması nedeni ile bu bileşiğin *A. nepalensis* için kimyasal marker olabileceği belirtilmiştir (Phan ve ark., 2010).



Şekil 1.32. *A. nepalensis* bitkisinden izole edilen hidrokarbon türevi bileşikler (Phan ve ark., 2010)



Şekil 1.33. Physcion (parietin)

1.12.3. *Alnus* Miller Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri

1.12.3.1. Antibakteriyal Aktivite

1995 yılında Saxena ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *A. rubra* kabuklarından hazırlanan metanollü ekstrenin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi test edilmiştir. Aktiviteden sorumlu bileşiklerin oregonin ve onun glikoziti olduğu saptanmıştır (Sati ve ark., 2011).

A. glutinosa tohumlarından hareketle hazırlanan *n*-hekzan, diklorometan ve MeOH'lü ekstrelerin *Citrobacter freundii* NCTC 9750, *Escherichia coli* NCIMB 8110, *Escherichia coli* NCIMB 4174, *Klebsiella aerogenes* NCTC 9528, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 6376, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6750, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 ve *Staphylococcus aureus* NCTC 11940 (MRSA) suşlarına karşı antibakteriyal etkisinin araştırıldığı çalışmada MeOH'lü ekstrenin tüm bakteri türlerine karşı etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada MeOH'lü ekstrenin en güçlü etkiyi 1.25×10^{-1} mg/ml MIC değeri ile *E. coli* (8110)'ye karşı gösterdiği rapor edilmiştir (Middleton ve ark., 2005).

Stevic ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada *A. incana* ssp. *incana* ile *A. viridis* ssp. *viridis* bitkilerinin yaprak, kabuk ve kozalak ekstrelerinin 15 mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etki gösterdiği en güçlü etkinin ise kozalak ekstrelerinde gözlemlendiği (MIC= 0,117-0,129 mg/mL) belirlenmiştir (Stevic ve ark., 2010).

A. pendula kabuklarının antibakteriyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kabuklardan elde edilen EtOH'lü ekstre ile bu ekstrenin fraksiyonlanması sonucu izole edilen oregonin ve hirsutanon bileşiklerinin güçlü antibakteriyal etki gösterdiği saptanmıştır. Broth mikrodilüsyon yönteminin kullanıldığı çalışmada test edilen *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA), *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA) ve 16 klinik izolata karşı EtOH'lü ekstre 125-250 µg/ml MIC değerleri ile etkili bulunmuştur. Daha

sonra EtOH'lü ektreden izole edilen oregonin ve hirsutanon bileşiklerinin farklı MRSA suşları üzerinde antibakteriyal etkisi araştırılmış ve 31.25-125 125-250 µg/ml MIC değerleri ile etkili oldukları belirlenmiştir. Bu bileşiklerden en güçlü etkiyi hirsutanon'un gösterdiği rapor edilmiştir (Choi ve ark., 2012).

1.12.3.2. Antienflamatuvar Aktivite

Choi ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, *A. japonica* yaprak ve kabuklarından %60'lık etanol ile elde edilen kuru ekstreler, atopik lezyonlar oluşturulan NC/Nga farelere uygulanmış ve atopik dermatit benzeri cilt lezyonu gelişiminin baskılandığı belirlenmiştir. Topikal olarak uygulanan ekstrelerin fazla miktarda Th2 sitokin ekspresyonunu, kan eozinofil sayısını ve serum IgE konsantrasyonunu azalttığı, ayrıca iNOS ve COX-2'yi anlamlı şekilde baskıladığı rapor edilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler neticesinde *A. japonica* yaprak ve kabuk ekstrelerinin atopik dermatit ve diğer alerjik cilt hastalıklarında kullanımının tedavide yararlı olabileceği belirtilmiştir.

Aynı çalışmada, oregonin'in serbest radikalleri süpürdüğüne, nitrik oksit üretimini ve prostoglandin E₂ sentezini inhibe ettiğine, COX-2 ekspresyonunu, oksijen radikallerinin, reaktif nitrojen türlerinin ve bazı proenflamatuvar moleküllerin sentezini baskıladığına , NC/Nga farelerde atopik dermatit benzeri durumları azalttığına dair çalışma bulunduğu rapor edilmiştir (Choi ve ark., 2010).

Çeşitli çalışmalarda oregonin'in COX-2 enzim aktivitesini, NO sentezini, murin makrofajların stimülasyonunu ve PKCα'yı inhibe ederek antienflamatuvar etki gösterdiği ve antioksidan etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2005 a; Kuo ve ark., 2008).

Lee ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *A. hirsuta* yaprak ekstresinin NO üretimini inhibe edici etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda oregonin ve hirsutanonol, potansiyel indüklenebilen nitrik oksit sentaz

(iNOS) inhibitörleri olarak belirlenmiştir. Bu iki bileşiğin NO üretimini iNOS'u baskılayarak gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada *A. hirsuta* kabuklarından izole edilen oregonin ve hirsutanonol'un insan göğüs epitel MCF10A hücrelerinde 12-*O*-tetradekanoilforbol-13-asetat ile indüklenen COX-2 ekspresyonunu inhibe ettiği saptanmıştır (Sati ve ark., 2011).

A. firma kabuklarından elde edilen metanollü ekstrenin ve kabuklardan izole edilen 4-hidroksi-2,6-dimetoksifenil-6'-*O*-şiringoil- β -D-glukopiranozit ile diarilheptanoit ve fenolik glikozit yapılı bazı bileşiklerin LPS ile stimüle edilen BV₂ mikrogliya hücrelerinde NO üretimini anlamlı şekilde azalttığı rapor edilmiştir (Sati ve ark., 2011).

A. formosana yapraklarından hazırlanan MeOH'lü ekstrenin *n*-BuOH fraksiyonundan izole edilen diarilheptanoit yapısındaki bileşiklerden 5(*S*)-butiloksi-1,7-di(3,4-dihidroksifenil)-3-heptanon (5-*O*-butilhirsutanonol), alnusit A, alnusit B, 2'''-*O*-benzoiloregonin, 2'''-sinnamoiloregonin ile 5-*O*-metilhirsutanonol'un lipopolisakkarit ile indüklenen NO üretimine karşı inhibitör aktivite gösterdiği, bu bileşiklerden 5-*O*-butilhirsutanonol ve alnusit A'nın anlamlı bir sitotoksik etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir (Lai ve ark., 2012).

Meksika'da halk arasında dal kabuklarından hazırlanan infüzyonun akut enflamasyon tedavisinde kullanıldığı *A. acuminata* subsp. *arguta* bitkisinin antienflamatuvar etkisi, karragen ile indüklenen sıçan arka pençe ödemi modeli ile araştırılmıştır. Ödem oluşturulan sıçanlara oral yolla uygulanan *n*-hekzanlı, kloroformlu ve metanollü dal kabuğu ekstrelerinden en yüksek etkiyi metanollü ekstrenin gösterdiği belirlenmiştir (Aguilar ve ark., 2011).

A. hirsuta kabuklarının MeOH'lü ekstresinden izole edilen oregonin ve 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-heptan-5-*O*- β -d-ksilopiranozit'in nitrik oksit ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile iNOS ve COX-2 gibi proinflamatuvar moleküllerin ekspresyonunu inhibe ettikleri rapor edilmiştir (Hu ve Wang, 2011).

1.12.3.3. Antioksidan Etki

A. glutinosa tohumlarının DPPH radikalini süpürme yeteneğinin kalitatif ve kantitatif olarak araştırıldığı çalışmada tohumlardan hazırlanan *n*-hekzan, diklorometan ve MeOH'lü ekstrelerden MeOH'lü ekstrenin antioksidan etki gösterdiği ($RC_{50} = 1.27 \times 10^{-1}$ mg/ml) belirlenmiştir (Middleton ve ark., 2005).

A. glutinosa ve *A. incana* yapraklarının antioksidan etkisinin araştırılması için gerçekleştirilen bir başka çalışmada yaprakların sulu, sulu-etanollü (9:1→2:8) ve etanollü çözeltileri hazırlanmış ve bu ekstrelerin DPPH radikalini süpürme yetenekleri test edilmiştir. Çalışmada *A. glutinosa* yapraklarının en yüksek aktiviteyi su:etanol (7:3→3:7) karışımı ile hazırlanan ekstrelerde %49.21-49.42 oranında, *A. incana* yapraklarının ise aynı solvan sisteminde %41.28-41.67 oranında gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada standart olarak kersetin kullanılmıştır (Mushkina ve ark., 2013).

A. incana ssp. *incana* ile *A. viridis* ssp. *viridis* bitkilerinin yaprak, kabuk ve kozalaklarının antioksidan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada tüm ekstrelerin güçlü bir şekilde DPPH radikali süpürücü etki ($IC_{50} = 3.3-18.9$ µg/mL) ve lipid peroksidasyon inhibisyonu etkisi ($IC_{50} = 38.5-157.4$ µg/mL) gösterdikleri belirlenmiştir (Stevic ve ark., 2010).

Kang ve arkadaşlarının *A. japonica* meyvelerinin metanollü ekstresinden izole ettikleri siklik diarilheptanoid yapılı garugambin-3 ve acerogenin L'nin insan LDL oksidasyonunu inhibe ettiği ($IC_{50} = 2,9$ ve $1,7$ µM) belirlenmiştir. Ayrıca 10 µM konsantrasyonda iyi bilinen bir antioksidan olan probucol'den daha yüksek bir etki ile hücre yönlendirmeli LDL oksidasyonunu inhibe ettikleri saptanmıştır (Sati ve ark., 2011).

Lee ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada *A. japonica* yapraklarından BAYF tekniği kullanılarak izole edilen diarilheptanoit yapılı

oregonin ve hirsutanonun insan LDL oksidasyonu üzerinde antioksidan etkileri olduğu saptanmıştır (Lee ve ark., 2005 b).

A. japonica bitkisinden elde edilen ham ekstrenin antioksidan etkisinin online HPLC-ABTS yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada ise ABTS radikalini süpürücü etkisi olduğu belirlenen hirsutanonol 5-O- β -D-glukopiranozit, 3-deoksohirsutenonol 5-O- β -D-glukopiranozit ve hirsutenon bileşikleri izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Lim ve ark., 2011).

A. hirsuta kabuklarının MeOH'lü ekstresinden izole edilen oregonin ve 1,7-bis-(3,4-dihidroksifenil)-heptan-5-O- β -d-ksilopiranozit'in DPPH radikaline karşı sırasıyla $8,36 \pm 0,54$ ve $8,67 \pm 1,46$ μ M IC₅₀ değerleri ile güçlü antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Hu ve Wang, 2011).

1.12.3.4. Antitümoral ve Sitotoksik Aktivite

A. hirsuta dal kabuklarının metanollü ekstresinin etilasetatta çözünen fraksiyonu üzerinde *in vitro* HIF-1 analizi kullanılarak gerçekleştirilen BAYF çalışması sonucu izole edilen triterpen ve diarilheptanoit yapılı bileşiklerden diarilheptanoit yapısındaki 2-oksatrisiklo[13.2.2.13,7]eikosa-3,5,7(20),15,17,18-hekzen-10-16-diol ile 2-oksatrisiklo[13.2.2.13,7]eikosa-3,5,7(20),15,17,18-hekzen-10-on bileşiklerinin AGS hücrelerinde bulunan HIF-1 aktivasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettikleri (IC₅₀= 11.2 μ M ve 12.3 μ M) saptanmıştır (Jin ve ark., 2007).

A. incana ssp. *incana* ile *A. viridis* ssp. *viridis* bitkilerinin yaprak, kabuk ve kozalaklarının sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada tüm ekstrelerin HeLa hücrelerine karşı anlamlı sitotoksik etki gösterdiği (IC₅₀= 26,02-68.5 μ g/mL), en güçlü etkiyi gösteren kabuk ekstresinin ise yüksek oranda fenolik bileşik (316,2 mg gallik asit eşdeğeri/g) içerdiğinin belirlendiği rapor edilmiştir (Stevic ve ark., 2010).

Ludwiczuk ve arkadaşları tarafından *A. sieboldiana* yapraklarından biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ile antikanser bileşiklerin izole edildiği bir çalışmada, TNF- α inhibitör aktiviteye sahip 4 bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerin (pinosilvin, galangin, kersetin, metilgallat) TNF- α inhibitör ve küçük hücreli olmayan insan akciğer karsinom hücreleri (A549)nin gelişimi üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonunda dört bileşiğin de karsinom hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği, bu bileşiklerden en iyi aktiviteyi galangin'in gösterdiği saptanmıştır.

Aynı çalışmada Choi ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada *A. japonica* yapraklarından izole edilen diarilheptanoit yapısındaki bileşiklerin murine B16 melanom hücrelerine ve insan SNU-C1 gastrik kanser hücrelerine karşı potent sitotoksik etki gösterdiğini belirledikleri rapor edilmiştir (Ludwiczuk ve ark., 2011).

Sheth ve arkadaşları 1973 yılında yaptıkları bir çalışmada *A. oregona*'dan izole edilen betulin bileşiğinin Walker 256 (5WA16) tümör sistemleri için antitümör aktivite gösterdiğini saptamışlardır (Sati ve ark., 2011).

1.12.3.5. Antiviral Aktivite

Yu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada *A. firma* yapraklarından elde edilen metanollü ekstrenin MT-4 hücrelerinde HIV-1 ile indüklenen sitopatik etkiyi güçlü biçimde inhibe ettiği belirlenmiştir. Etkiden sorumlu bileşiklerin izole edilmesi amacı ile yapılan çalışma sonucunda izole edilen bileşiklerden alnustik asit metil esterinin HIV-1 proteaz'a karşı inhibisyon etki gösterdiği (IC_{50} = 15,8 μ M), kersetin, kersitrin ve mirsetin 3-*O*- β -D-galaktopiranozit'in ise HIV-1 ters transkriptaz enzimini 60 μ M IC_{50} değerleri ile inhibe ettikleri saptanmıştır. Elde edilen verilerden yola çıkılarak *A. firma* yapraklarının metanollü ekstresinin viral replikasyon inhibisyonu etkisinin HIV-1 proteaz ve HIV-1 ters transkriptaz inhibitör etkileri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Yu ve ark., 2007).

A. japonica kabuklarının içerdiği anti-influenza etkili bileşiklerin araştırıldığı bir çalışmada oregonil A, oregonil B, platifillenon, hirsutanon, hirsutanonol, oregonin, alnusit A, alnusit B, platifillonol-5-ksilopiranozit, platifillon ve platifillozit izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır. Zanamivirin pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada izole edilen bileşiklerden platifillon'un güçlü, platifillonol-5-ksilopiranozit'in ise orta derecede antiviral etki gösterdiği belirlenmiştir (Tung ve ark., 2010 a).

SARS-CoV (Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu coronavirüs) replikasyonunu kontrol eden papain benzeri proteaz (PL(pro)) enziminin inhibisyonu hastalıkla mücadelede kullanılacak ilaç geliştirilmesinde önemli bir hedeftir. *A. japonica* bitkisinden izole edilen diarilheptanoitlerin PL(pro) inhibitör etkisinin araştırıldığı bir çalışmada hirsutenonun güçlü etki gösterdiği ($IC_{50} = 4.1 \mu M$) belirlenmiştir. Yapı-etki çalışmalarında hirsutenon yapısında bulunan kateşol ile α, β -doymamış karbonil gruplarının SARS-CoV sistein proteaz inhibisyonunda anahtar yapılar olduğu saptanmıştır (Park ve ark., 2012).

1.12.3.6. Hepatoprotektif Etki

Park ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada, *A. hirsuta* dal kabuklarının etil asetatta çözünen fraksiyonundan izole edilen diarilheptanoit türevleri, HepG₂ hücrelerinde tert-butil hidroperoksit (t-BHP) ile indüklenen toksisiteye karşı hepatoprotektif etkileri yönünden test edilmiştir. HepG₂ hücrelerinde T-BHP ile indüklenen hasara karşı anlamlı derecede hepatoprotektif etki gösteren diarilheptanoitlerden en yüksek aktiviteyi (5S)-O-metilhirsutanonol'un gösterdiği rapor edilmiştir (Park ve ark., 2010).

Başka bir çalışmada *A. japonica* kabuklarından izole edilen epihirsutanonol'un sıçan hepatosit hücrelerinde t-BHP ile indüklenen toksisiteye karşı hepatoprotektif etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak silibinin kullanılmıştır (Tung ve ark., 2010 b).

Buniatian ve arkadaşları, *A. glutinosa* kozalaklarından elde edilen elajitanenlerden yola çıkılarak hazırlanan “Altan”ın tetraklorometan ile indüklenen akut karaciğer hasarı modeli üzerinde hepatoprotektif özelliklerini araştırdıkları çalışmada, Altan’ın 1 mg/kg dozda bile hepatoprotektif aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Altan’ın kolepoez rahatsızlığını sınırladığı, antienflamatuvar ve membran stabilize edici etki gösterdiği, ayrıca fizyolojik antioksidan sistemi desteklediği rapor edilmiştir (Sati ve ark., 2011).

1.12.3.7. İmmünolojik Özellikler

A. japonica’nın kabuklarından izole edilen hirsutenon’un atopik dermatit gelişimi üzerine etkisinin araştırıldığı *in vitro* çalışmada, hirsutenon’un aktive olmuş T hücrelerinin nükleer faktörünün defosforilasyonunu bloke ederek bu hücreleri inhibe ettiği belirlenmiştir. Çalışma sonucunda hirsutenon’un T hücreleri ve mast hücrelerinde kalsiyum ile aktive olan prosesleri spesifik olarak inhibe edebileceği ve muhtemelen kalsinörin inhibitör mekanizmalarını taklit ederek etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Joo ve ark., 2009).

1.12.3.8. Diğer Etkiler

Chung ve arkadaşlarının doğal ürünlerdeki diaçilgliserol açıltransferaz (DGAT) inhibitörlerini inceledikleri çalışmada, *A. hirsuta*’nın metanollü ekstresinden izole edilen betulinik asitin sıçan karaciğer mikrozomlarında DGAT’ı güçlü biçimde ve nonkompetitif olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada betulinik asitin insan HepG₂ hücreleri tarafından oluşturulan trigliseriti de inhibe ettiği saptanmıştır. Bu veriler ışığında betulinik asitin obezitenin tedavisinde potansiyel bir öncü bileşik olabileceği rapor edilmiştir.

Aynı çalışmada, *A. japonica* yapraklarının metanollü ekstresinden izole edilen diarilheptanoid yapısındaki oregonin ve 5-O-metilhirsutanonol'un NF- κ B aktivasyonunun inhibiyonu etkilerine bağlı olarak aterosklerozun tedavisinde ve ateroskleroza karşı koruyucu olarak yararlı olabileceklerinin belirlendiği, Cho ve arkadaşları tarafından *A. hirsuta* kabuklarından izole edilen diarilheptanoitlerin B16 melanoma hücrelerinde melanogenezi inhibe ettiğinin saptandığı rapor edilmiştir (Sati ve ark., 2011).

Hepatik stellate hücrelerinin (HSC) gelişimi ve aktivasyonunun baskılanması karaciğer fibrozuna karşı korunmada ve bu durumun tedavisinde yararlanılan terapötik stratejilerden biridir. Doğal ürünlerin antifibrotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *A. firma* kabuklarından elde edilen metanollü ekstrenin HSC-T6 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada MeOH'lü ekstreden hareketle BAYF yöntemi kullanılarak izole edilen diarilheptanoitlerden dehidrohirsutanonol (=hirsutenon) ile triterpenik yapılu betulin-3-kaffeate'in doza ve zamana bağlı olarak 10 ile 100 μ M arasındaki konsantrasyonlarda HSC proliferasyonunu anlamlı biçimde inhibe ettikleri saptanmıştır (Lee ve ark., 2011).

Başka bir çalışmada *A. japonica*'dan izole edilen hirsutenon'un oksidatif stres ile indüklenen transforme retinal gangliyon hücreleri (RGC-5) nin ölümü üzerine koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışmada hirsutenon'un doza bağlı olarak RGC-5 hücrelerini koruduğu, apoptotik protein ekspresyonundaki artışını ve sıçan beyin homojenatında sodyum nitroprusid ile indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, ayrıca *in vivo* olarak N-metil-D-aspartat ile indüklenen retinanın iç plexiform tabakasının incelmelerini azalttığı belirlenmiştir. Bu verilerden yola çıkılarak hirsutenonun nöroprotektif ajan olarak etki edebileceği rapor edilmiştir (Jo ve ark., 2013).

A. rugosa dallarının asetilkolinesteraz inhibitör etkisinin araştırıldığı bir çalışmada dallardan hazırlanan metanollü ekstrenin etkili bulunduğu (IC_{50} = 0.588 mg/ml) belirlenmiştir (Rashed ve ark., 2013).

A. nepalensis yapraklarında bulunan diarilheptanoid yapılu bileşiklerin antifilarial etkisinin araştırıldığı bir çalışmada izole edilen bileşiklerden hirsutenon isimli diarilheptanoitin antifilarial etkisinin bulunduğu *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarla belirlenmiştir (Yadav ve ark., 2013 a). Başka bir çalışmada yine aynı bitkiden izole edilen (5*S*)-5-hidroksi-1-(4-hidroksifenil)-7-(3,4-dihidroksifenil)-3-heptanon ile *Alnus* dimer bileşiklerinin güçlü mikrofilarisidal ve makrofilarisidal etki gösterdiği ve bu bileşiklerin yeni antifilarial ajanlar geliştirilmesinde temel teşkil edebileceği rapor edilmiştir (Yadav ve ark., 2013 b).

1.12.4. Toksisite Çalışmaları

A. glutinosa tohumlarından hazırlanan n-hekzan, diklorometan ve MeOH'lü ekstraktların toksisitesinin brine-shrimp toksisite testi ile araştırıldığı çalışmada her üç ekstraktın da düşük düzeyde ($LD_{50} = 1.29 \times 10^{-1} - 8.30 \times 10^{-1}$ mg/ml) toksisite gösterdiği belirlenmiştir (Middleton ve ark., 2005).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç:

2.1.1. Bitkisel Gereç

Çalışmada kullanılan bitkisel materyalin isimleri, toplandıkları lokaliteler, toplanma tarihleri ile herbaryum kayıt numaraları Çizelge 2.1.de verilmiştir.

Tüm bitkiler Prof. Dr. Hayri Duman tarafından teşhis edildikten sonra bitki örnekleri preslenip kurutulmuş ve muhafaza edilmek üzere Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumuna (AEF) kaldırılmıştır.

Kurutulmuş yapraklar değirmende toz edilerek analize hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan bitkiler

BİTKİ ADI	LOKALİTE	TARİH	HERBARYUM (AEF) NUMARASI
<i>A. glutinosa</i> (L.) Gaertner subsp. <i>glutinosa</i>	Bolu-Sakarya arası, Beylice Çukurhan Köyü, dere kenarı, 261 m	15.05.2011	25991
<i>A. orientalis</i> Decne var. <i>orientalis</i>	Köyceğiz, Sandıras Dağı, Ağla, 766 m	20.05.2011	25990
<i>A. orientalis</i> Decne var. <i>pubescens</i> Dippel	Köyceğiz, tekne çekme yeri, göl kenarı	20.05.2011	25989



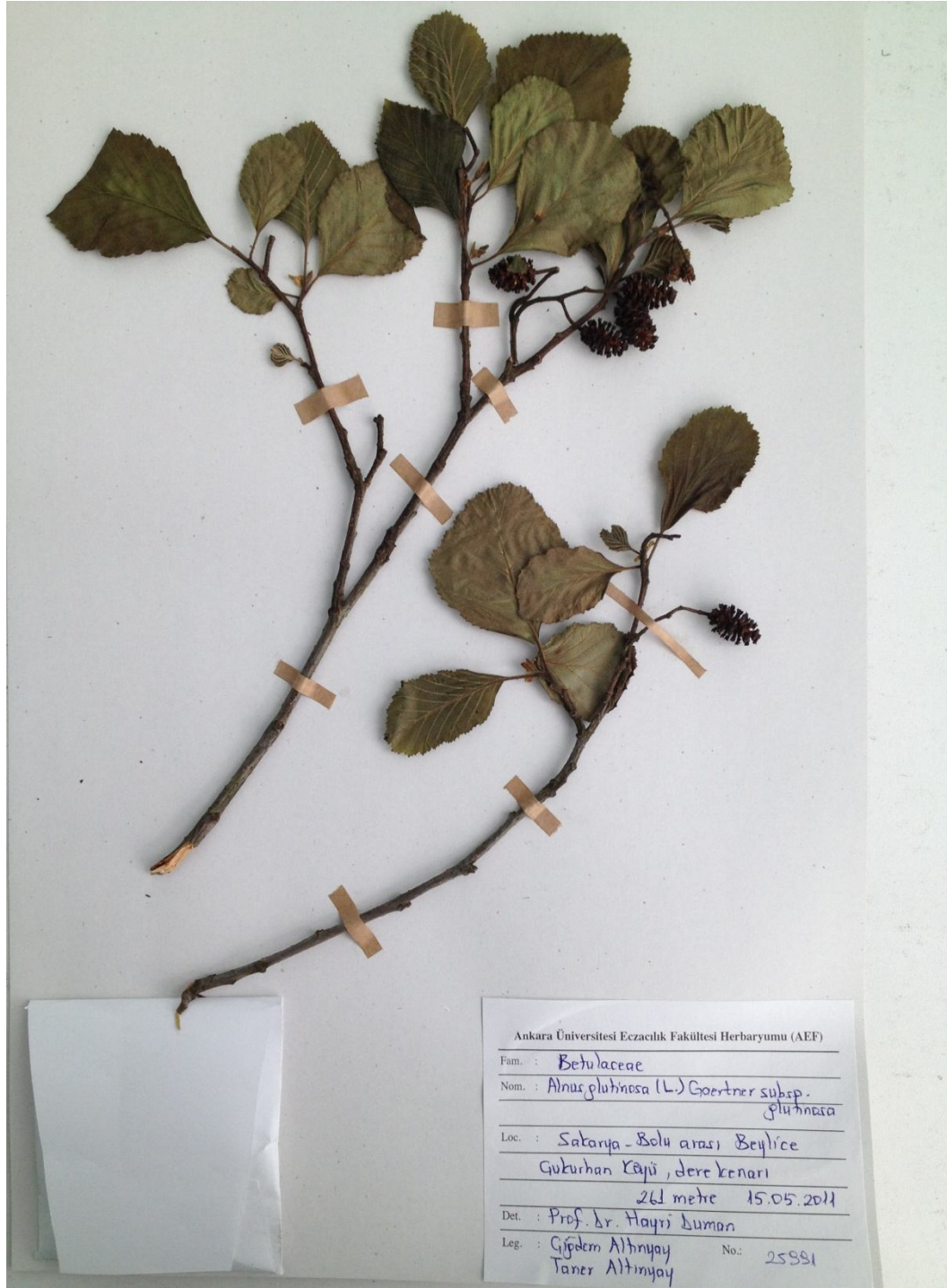
Şekil 2.1. *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* genel görünüş



Şekil 2.2. *A. orientalis* var. *pubescens* genel görünüş



Şekil 2.3. *A. orientalis* var. *orientalis* genel görünüş



Şekil 2.4. *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* herbarium örneği



Şekil 2.5. *A. orientalis* var. *pubescens* herbarium örneği



Şekil 2.6. *A. orientalis* var. *orientalis* herbarium örneği

2.2. Yöntem

2.2.1. Bitkisel Ekstrelerin Hazırlanması

2.2.1.1. Fitokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözücüler, Cihazlar ve Adsorbanlar

Manyetik karıştırıcı	: DAIHAN Scientific Wise Stir
Rotavapor	: BÜCHI Rotavapor R-200
Liyofilizatör	: Christ Gamma 2-16 LSC
Metanol	: Tekkim % 99,9
Hekzan	: Riedel-de Haen, min. % 95 saflıkta
Etil asetat	: Tekkim % 99,5 saflıkta
Kloroform	: Riedel-de Haen Puriss UN 1888
Karıştırıcı	: Heidolph Typ. 743 karıştırıcı
Silika jel	: Sigma Aldrich, Grade 7734, 70-230 mesh
İTK Plağı	: Kieselgel 60 HF254 (Merck 5554)

2.2.1.2. Metanollü Ekstrelerin Hazırlanması

30 g civarında tam olarak tartılmış materyaller üzerine 500'er mL metanol eklenerek manyetik karıştırıcıda 2 saat süreyle 550 rpm hızda hareketli maserasyon yapıldı, bu sürenin sonunda elde edilen ekstreler pilili süzgeç kağıdından süzüldü. Kalan artıklar üzerine tekrar 500'er mL metanol eklenerek 2 saat süreyle aynı işlem tekrarlandı ve süzüntüler birleştirilerek rotavaporda 35-45°C sıcaklıkta yoğunlaştırıldı. Yoğunlaştırılan ekstreler, daraları alınmış beherlerde çeker ocak altında kuruluğa kadar uçurularak aktivite çalışmaları için hazır hale getirildi.

2.2.1.3. Sulu Ekstrelerin Hazırlanması

30 g civarında tam olarak tartılmış bitkisel materyaller üzerine 500'er mL kaynar distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda 2 saat süreyle 550 rpm hızda hareketli maserasyon yapıldı, bu sürenin sonunda elde edilen ekstreler pilili süzgeç kağıdından süzüldü. Kalan artıklar üzerine tekrar 500'er mL kaynar distile su eklenerek 2 saat süreyle aynı işlem tekrarlandı, süzüntüler birleştirilerek daraları alınmış beherlere konuldu ve -40°C'de dondurulduktan sonra liyofilize edildi.

2.2.2. Biyolojik Aktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama (BAYF) Yöntemi İle İzolasyon Çalışmaları

Tüm bitkilerin yapraklarından hazırlanan MeOH'lü ve sulu ekstreler üzerinde yara iyi edici, antienflamatuvar ve antioksidan etki çalışmaları yapıldı. Sonuçlar karşılaştırılarak daha yüksek aktiviteye sahip ekstre olarak belirlenen MeOH'lü *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* ekstresi üzerinden izolasyon çalışmalarının yapılmasına karar verildi.

2.2.2.1. Metanollü Ekstrenin Hazırlanması

750 g bitkisel materyal üzerine 5 L metanol ilave edilerek 12 saat boyunca hareketli maserasyona tabi tutuldu. Elde edilen ekstre 12 saat dinlendirildikten sonra pilili süzgeç kağıdından süzüldü. Kalan artık üzerine tekrar 5 L metanol eklenerek aynı işlem tekrarlandı. Elde edilen ekstre süzüldü. Süzüntüler birleştirildi ve rotavaporda 40°C'yi geçmeyen sıcaklıklarda kuruluğa kadar yoğunlaştırılarak metanollü ekstre (165 g) elde edildi.

2.2.2.2. Vakumlu Sıvı Kromatografisi (VLC) İle Kaba Fraksiyonlama

Sabit faz olarak kullanılan 300 g silika jel hekzan ile karıştırılarak süspande edildi, 33 cm boy ve 7 cm çapındaki kolona yüklendi. Elde edilen metanollü ekstreden 50 g alınarak metanolde çözüldü, üzerine 50 g silika jel eklenerek su banyosunda kuruluğa kadar karıştırıldı. Hazırlanan silika jele emdirilmiş 50 g ekstre kolona uygulandı.

Kolona uygulanan metanollü ekstre sırasıyla aşağıdaki solvanlar ile elüe edildi.

Hekzan: 2,5 L → FA

Hekzan: Etil asetat (50:50): 1,5 L → FB

Etil asetat: 2,5 L → FC

Etil asetat: Metanol (50:50): 2,5 L → FD

Metanol: 6 L → FE

Her bir fraksiyon rotavaporda kuruluğa kadar yoğunlaştırılarak hekzanlı (FA), hekzan-etil asetatlı (FB), etil asetatlı (FC), etil asetat-metanollü (FD) ve metanollü (FE) ekstreler elde edildi.

Vakumlu sıvı kromatografisi sonucu elde edilen ekstreler üzerinde gerçekleştirilen biyolojik aktivite çalışmaları sonuçları değerlendirilerek izolasyon çalışmalarına etil asetat-metanollü fraksiyon (FD) üzerinden devam edilmesine karar verildi.

2.2.2.3. Etil asetat-Metanollü Fraksiyonun (FD) Kolon Kromatografisi İle Ayrılması

Sabit faz olarak kullanılan 200 g silika jel hekzan ile karıştırılarak süspande edildi, 80 cm boy ve 3,2 cm çapındaki kolona yüklendi. 30 g etil asetat-metanollü ekstre (FD) metanolde çözüldü, üzerine 30 g silika jel eklenerek su banyosunda kuruluğa kadar karıştırıldı. Hazırlanan silika jele emdirilmiş 30 g FD kolona uygulandı. Ekstre

sırasıyla 250 ml hekzan, 250 ml hekzan-etil asetat (75:25), 250 ml hekzan-etil asetat (50:50) ve 500 ml hekzan-etil asetat (25:75) ile elüe edildi ve 250 ml'lik fraksiyonlar halinde toplam 5 fraksiyon toplandı.

Daha sonra ekstre 500'er ml etil asetat, etil asetat-metanol (98:2), (95:5), (90:10), (80:20), (70:30), (60:40), (50:50), (40:60), (30:70), (20:80), (10:90), (5:95), (2:98) ve son olarak 750 ml metanol ile elüe edildi, 100 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Toplanan 76 fraksiyon rotavaporda yoğunlaştırıldı ve İTK (İnce Tabaka Kromatografisi) ile incelenerek benzer fraksiyonlar birleştirildi.

İTK analizlerinde Kieselgel 60 HF254 hazır plaklar ile mobil faz olarak hekzan:etil asetat (9:1), hekzan:etil asetat (5:5), kloroform:metanol:su (61:32:7), kloroform:metanol:su (10:5:1) solvan sistemleri, revelatör olarak ise anisaldehit-sülfirik asit veya vanilin-sülfirik asit reaktifleri kullanıldı.

İTK profili göz önünde bulundurularak seçilen fraksiyonlar üzerinde gerçekleştirilen aktivite çalışmalarında etkili bileşik/lere yönelik izolasyon çalışmalarına FD₂₇₋₃₈ (4,65 g) üzerinden devam edilmesine karar verildi.

2.2.2.4. FD₂₇₋₃₈ Fraksiyonundan Silika jel Kolon Kromatografisi ile Aktif Majör Maddenin İzolasyonu

Sabit faz olarak kullanılan 50 g silika jel, etil asetat ile karıştırılarak süspande edildi, 80 cm boy ve 3,2 cm çapındaki kolona yüklendi. 4,65 g FD₂₇₋₃₈ etil asetat-metanol (50:50) karışımında çözüldü, üzerine 4,65 g silika jel eklenerek su banyosunda kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı. Hazırlanan silika jele emdirilmiş FD₂₇₋₃₈ kolona yüklenerek önce 500 ml etil asetat ile elüe edildi ve 100'er ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Daha sonra ekstre 250'şer ml etil asetat-metanol (98:2), (95:5), (90:10), (85:15), (80:20), (75:25), (70:30), (65:35), (60:40), (55:45) ile elüe edildi ve 50 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Son olarak kolondan 250 ml etil asetat-metanol (50:50) karışımı ile 500 ml %100 metanol geçirildi.

Elde edilen fraksiyonlar İTK ile incelenerek benzer fraksiyonlar birleştirildi.

İTK analizlerinde Kieselgel 60 HF254 hazır plaklar ile mobil faz olarak kloroform: metanol: su (15:10:1) solvan sistemi kullanıldı.

Birleştirilen fraksiyonlardan FD₂₇₋₃₈ (6-9) fraksiyonunun yoğunlaştırılması sırasında çöken bileşik (169,4 mg) süzülerek ayrıldı, kurutuldu.

2.2.3. İzole Edilen Bileşiğin Yapı Tayini

2.2.3.1. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

BAYF ile izolasyon çalışmaları sonucunda izole edilen bileşiğin yapısının tayin edilmesi amacı ile ¹H-NMR ve ¹³C-NMR analizleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında Varian Mercury 400, 400 MHz Digital FT-NMR Spektrometre cihazı kullanılarak 22°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Analizde çözücü olarak CD₃OD (Dötörometanol) kullanıldı.

2.2.3.2. İnfrared (IR) Spektroskopisi

IR analizleri Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Laboratuvarında FT&IR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Kullanılan cihaz: Thermo Scientific-Nicolet IS10

Sayım: 128

Resolüsyon: 4x10⁻¹

2.2.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.2.4.1. *In-vivo* Çalışmalarda Kullanılan Deney Hayvanları, Test Numunelerinin Hazırlanması ve Referans Maddeler

2.2.4.1.1. Deney Hayvanları

Deneylerde 160-180 g ağırlığında erkek Sprague&Dawley sıçanlar ve 25-30 g ağırlığında erkek Swiss Albino fareler kullanıldı. Hayvanlar ortama adapte olabilmeleri için deneye başlamadan önce laboratuvar şartlarında üç gün bekletildi. Bu bekleme süresince standart pellet yem ve su ile beslenerek 12 saat aydınlık 12 saat karanlık uygulaması yapılan laboratuvar da sıcaklığında barındırıldılar.

Deneylerde her grupta altı hayvan kullanıldı.

2.2.4.1.2. Test Numunelerinin Hazırlanması

Yara iyi edici deneylerde kullanılacak merhemlerin hazırlanması için Madecassol® Pomat' ın bazı olan glikol stearat: 1,2 propilen glikol: sıvı parafin (3:6:1) karışımı kullanıldı. Merhemler % 1 oranında ekstre içerecek şekilde hazırlandı.

Antienflamatuvar aktivite deney modelinde, test numuneleri % 0,5'lik sodyum karboksimetil selüloz (CMC) çözeltisi içerisinde, gerekli durumlarda ultrasonik banyo yardımıyla süspande edildi ve deney hayvanlarına özel mide gavajı vasıtasıyla oral yolla uygulandı. Kontrol grubu hayvanlarına ise sadece test numunelerinin hazırlanmasında kullanılan % 0,5'lik CMC verildi.

2.2.4.1.3. Referans Maddeler

Yara iyileştirici aktivite deneylerinde sonuçların karşılaştırılması amacıyla, standart yara iyileştirici madde olarak; referans madde grubundaki her deney hayvanının yarası üzerine haricen 500'er mg Madecassol® pomat uygulandı.

Antienflamatuvar etkinin değerlendirilmesinde referans madde olarak % 0,5'lik CMC içinde hazırlanmış 10 mg/kg indometasin kullanıldı.

2.2.4.2. Yara İyileştirici Aktivite Tayini

Yara iyileştirici aktivitenin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen *in-vivo* deneyler için fare ve sıçanlarda linear insizyon, dairesel eksizyon yöntemleri uygulandı ve L (-) Hidroksiprolin tayini yapıldı.

2.2.4.2.1. *İn vivo* deneyler

2.2.4.2.1.1. Çizgisel İnsizyon Yara Modeli

Çizgisel insizyon yara modelinde deney süresince uygulanan merhemlerin kolajen yapımı ve yara gerilimini arttırıcı etkisi Lodhi ve ark. ile Suguna ve ark.'nın yöntemi kullanılarak değerlendirildi (Lodhi ve ark., 2006; Suguna ve ark., 2002).

Sıçanlara zayıf eter anestezisi altında intraperitoneal yolla 0,15 cc Ketazol enjeksiyonu uygulanarak genel anestezi yapıldı. Sırt kısımlarının orta hattından 2 cm uzaklıkta bistüri ile iki adet 5 cm'lik çizgisel insizyon yarası oluşturulup cerrahi ipek iplikle eşit aralıklarla 3 adet dikiş atıldı. 9 gün boyunca günde bir defa 500'er mg % 1 ekstre/fraksiyon/madde içeren merhem formülasyonları yaralara haricen uygulandı. 9. gün sonunda dikişler alındı, 10. gün hayvanlar eter anestezisi ile öldürüldü ve yara oluşturulan bölgeler yara kenarlarının 2' şer cm uzağından cerrahi makasla kesildi.

Yaralardan biri histopatolojik incelemeler için ayrıldıktan sonra diğer yaranın tensiometre ile gerilim kuvveti ölçüldü (Süntar ve ark., 2011 a).

2.2.4.2.1.2. Dairesel Eksizyon Yara Modeli

Dairesel eksizyon yara modelinde gün aşırı ölçülen yara alanlarındaki küçülmenin tespiti için Sadaf ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem bazı değişiklikler yapılarak farelerde uygulandı (Sadaf ve ark., 2006).

Deney için farelere zayıf eter anestezisi altında intraperitoneal yolla 0,01 cc Ketazol enjeksiyonu ile genel anestezi yapıp biopsi punch ile 5 mm çapında daireseleksizyon yarası oluşturulduktan sonra 12 gün boyunca 500'er mg % 1 ekstre/fraksiyon/madde içeren merhem formülasyonları yaralara haricen uygulandı. Yara alanlarının resimleri her gün dijital fotoğraf makinesi ile çekildi ve AutoCAD programı kullanılarak yara alanlarındaki küçülme hesaplandı (Küpeli Akkol ve ark., 2011).

2.2.4.2.2. L (-) Hidroksiprolin Tayini

Ekstraselüler matriks, metalloproteinlerinden kolajen hücrelere destekleyici bir iskelet oluşturan, proteoglikan yapıda, yara iyileşmesinde rol oynayan ana yapısal bir proteindir. Dokulardaki kolajen miktarı, kolajenin yapısında bulunan hidroksiprolinin ölçümü ile belirlenir. Hidroksiprolin miktarının fazla olması dokuda kolajenin fazla olduğunu gösterir (Rasik ve ark., 1999). Bu amaçla Woessner tarafından geliştirilen L (-) Hidroksiprolin tayini yöntemi çeşitli modifikasyonlar yapılarak çalışıldı (Woessner, 1961; Değim ve ark., 2002).

Hidroksiprolin standartının ölçümü için 5 mg hidroksiprolin 50 ml 0,001 N HCl'de çözülerek hazırlanan stok çözeltisinden bir seri dilüsyon çözeltisi (0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 1,5 µg/ml; 2 µg/ml ve 2,5 µg/ml) hazırlanıp her çözeltiden 2 ml tüplere alındı.

Diğer taraftan ölçümü yapılacak dokular tartılıp ağzı kapaklı pyrex tüplere konuldu ve üzerine 5 ml 6 N HCl ilave edilerek 130°C'de 3 saat hidroliz edildi. İndikatör olarak birkaç damla % 0,02'lik metil kırmızısı ilave edildikten sonra çözeltinin rengi sarıya dönene ve pH 6-7 arasında olana kadar 2,5 N NaOH eklendi.

Hem standart hem de test çözeltilerinden 2 ml alınıp üzerine 1ml taze hazırlanmış Kloramin T eklendikten sonra çözeltiler 20 dk oda ısısında bekletildi. Bu süre sonunda 1 ml perklorik asit ve 1 ml taze hazırlanmış 0,2 g/ml *p*-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi eklenip tabakalanma kayboluncaya kadar çalkalandı. 60°C'lik su banyosunda 20 dk bekletilip, 5 dk musluk suyunda soğutulduktan sonra çözeltilerin absorbansı 557 nm'de ölçüldü (Değim ve ark., 2002).

2.2.4.2.3. Histopatolojik İncelemeler

Deneysel aşamanın sonunda histopatolojik incelemeler için uygun büyüklükteki deri biyopsileri % 10'luk tamponlu formaldehitte tespit edildi. Rutin doku takibine alınan dokular dehidrasyon ve şeffaflaştırma aşamalarından sonra parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında alınan kesitler lama transfer edilerek hematoksilin-eozin (HE) ve Van Gieson (VG) boya ile boyandı. Işık mikroskobu (Nikon Eclipse Ci bağlı Kameram® Dijital Image Analiz Sistemi) ile incelenip morfolometrik ve kolorometrik olarak analiz edilen dokularda epidermal ve dermal re-modelleme hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olmak üzere derecelendirildi. Epidermis re-epitelizasyon veya ülser; dermis ise fibroblast proliferasyonu, mononükleer ve/veya polimorfonükleer hücreler, neovaskülarizasyon ve kolajen birikimi yönünden incelendikten sonra epidermal ve/veya dermal re-modelleme derecelendirildi. Van Gieson boyanmış kesitlerde kolajen birikimi gözlemlendi. Tüm bu incelemelerin ardından yara iyileşmesi ile ilgili bulgular birleştirilerek iyileşme aşamaları yangısal evre, proliferasyon evresi ve re-modelleme evresi yönünden evrelendirildi (Küpeli Akkol ve ark., 2011).

2.2.4.2.4. *İn vitro* deneyler

Ekstraselüler matriks kolajen, elastin ve fibronektin gibi proteoglikan yapıda matriks metallo proteinlerinden oluşur. Özellikle kolajen, hücrelere destekleyici bir iskelet oluşturan ana yapısal bir proteindir. Elastin, doku için gerekli esnekliği, hiyoluronik asit ise suyun tutulmasına neden olarak yapıların devamlılığını sağlar. Hiyoluronidaz, kolajenaz ve elastaz, ekstraselüler matriks proteinlerinin enzimatik yıkımına neden olan metallo proteaz enzimlerdir. Normal fizyolojik koşullarda bu endojen inhibitörler dokuların sağlıklı yapısını korurlar. Ancak dengenin metallo proteazlardan yana bozulması bağ doku makromoleküllerinin kontrolsüzce yıkımına, dolayısıyla yara iyileşmesinde gecikmeye ve sonuçta akciğerler ile kardiyovasküler sistemde rahatsızlıklara neden olmaktadır. Bu enzimler, TGF- β , PDGF, fibronektin, α -1 antiproteaz ve α -2 makroglobin'in yıkımına da neden olarak kronik yaraların patofizyolojisinde önemli rol oynarlar (Menke ve ark., 2007; Sahasrabudhe ve Deodhar 2010).

Yapılan çalışmalarda iyileşmeyen kronik yaralardaki metalloproteazların miktarının fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu enzimlerin minimal seviyede tutulmasının düzgün yara iyileşmesi için gerekli olabileceği düşünülmektedir (Edwards ve ark., 2004).

Bu nedenlerle yara iyileştirici aktivitenin tayini amacı ile gerçekleştirilen *in-vitro* deneylerde hiyoluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzim inhibisyonunun ölçülmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

2.2.4.2.4.1. Hiyoluronidaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi

Çalışmamızda anti-hiyoluronidaz aktivitenin belirlenmesi amacıyla Lee ve Choi (1999) ve Sahasrabudhe ve Deodhar (2010) tarafından geliştirilen sodyum hyaluronattan salınan *N*-asetilglukozamin miktarının belirlenmesi ile ölçülmesine dayalı yöntem uygulandı.

50 µl sığır hiyaluronidazı (7900 ünite/ml) 0,1M asetat tamponunda çözüldükten sonra (pH 3,6), değişik konsantrasyonlarda % 5 DMSO içinde çözünmüş 50 µl ekstre çözeltisi ile karıştırıldı. Kontrol grubu için 50 µl % 5 DMSO kullanıldı. 37°C’ de 20 dakika inkübasyonun ardından karışıma 50 µl kalsiyum klorür (12,5 mM) ilave edilip tekrar 37°C’ de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. 250 µl sodyum hyaluronat (1,2 mg/ml) eklenip, 37°C’ de 40 dakika inkübe edildikten sonra karışıma 50 µl 0,4 M NaOH ve 100 µl 0,2 M sodyum borat ilave edilip 3 dk kaynayan su banyosunda bekletildi. Soğuduktan sonra 1,5 ml *p*-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi eklenip 37°C’ de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Çözeltinin absorbansı spektrofotometre kullanılarak 585 nm’de ölçüldü.

100 µg/ml konsantrasyonda tannik asit referans madde olarak kullanıldı.

2.2.4.2.4.2. Kolajenaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi

Clostridium histolyticum kolajenaz enzimi (ChC) 0.8 ünite/ml olacak şekilde 50 mM trisin tamponu (10 mM CaCl₂ ve 400 mM NaCl ile) içinde çözüldü. Substrat N-[3-(2-furil) akrilolil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) aynı tampon içinde 2 mM olacak şekilde hazırlandı. 25 µL tampon, 25 µL ekstre ve 25 µL enzim her kuyucuğa eklenip 15 dakika inkübasyona bırakıldı. 50 µL substrat eklenip absorban 340 nm’de ölçüldü. Her bir örnek için iki tekrar yapıldı.

100 µg/ml konsantrasyonda epigallokateşin gallat referans madde olarak kullanıldı (Barrantes ve Guinea, 2003).

2.2.4.2.4.3. Elastaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi

Ekstre ve insan nötrofil elastaz enzimi (HNE) (17 mU/ml) 0,1M Tris-HCl tamponu (pH 7,5) ile 25°C’de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışıma HNE’nin substratı N-(metoksisukkinil)-Ala-Ala-Pro-Val 4-nitroanilid (MAAPVN) eklenip 37°C’de 1 saat

inkübe edildikten sonra karışıma 1 mg/ml soya tripsin inhibitörü eklendi. *p*-nitroanilin oluşumuna bağlı olarak 405 nm’de absorpsiyon ölçüldü (Melzig ve ark., 2001).

2.2.4.3. Antienflamatuvar Aktivite Tayini

Antienflamatuvar etkinin tespiti amacıyla farelerde akut yöntemlerden karragen-nedenli arka ayak ödemi testi, kapiller permeabilitenin artışına dayanan inhibisyon yöntemi (Whittle yöntemi) ve TPA (12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat)-nedenli kulak ödemi testleri uygulandı.

2.2.4.3.1. Karragen-nedenli Arka Ayak Ödemi Testi

Karagenin ödemi, antienflamatuvar aktivite araştırmalarında yaygın olarak kullanılan *in vivo* deney modellerinden biridir. İlk olarak Winter ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemde, böbreküstü bezi çıkarılmış (adrenolektomize) ve çıkarılmamış dişi ve erkek sıçanlarda, karagenin ile oluşturulan pençe ödemi üzerinde indometasin ve kortikosteronun antienflamatuvar etkileri incelenmiştir.

Deney sonucunda indometasinin böbreküstü bezi çıkarılmış ve çıkarılmamış sıçanlarda eşit antienflamatuvar etki gösterdiği ve dolayısıyla antienflamatuvar etkisinin plazma kortikosteron derişimi ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışma ile nonsteroidal antienflamatuvar bileşiklerin etkilerini endojen steroidlerden bağımsız olarak gösterdikleri ortaya konulmuştur (Winter ve ark., 1968).

Çalışmamızda Kasahara ve arkadaşları (1985) tarafından farelerde uygulanmak üzere geliştirilen yöntem, bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır (Yeşilada ve Küpeli, 2007).

Farelere test numuneleri ve referans olarak kullanılan indometasin (10mg/kg) oral

yolla uygulandıktan 1 saat sonra, ödem oluşturmak amacıyla, hayvanların sağ arka ayaklarının subplantar dokularına 25 µl karagenin süspansiyonu (Carrageenan, Sigma Co., No:C-1013) (50 mg'ı 2,5 mL serum fizyolojik içerisinde süspande edilmiş) enjekte edildi. Hayvanların sol arka ayaklarının subplantar dokusuna ise kontrol amacıyla 25 µl serum fizyolojik solüsyonu enjekte edildi. Ödem oluşumundan itibaren 90 dakika ara ile her iki ayak kalınlıkları mikrometrik kompas (Ozaki Co, Tokyo, Japonya) yardımıyla ölçülerek aralarındaki şişme farkı ödem miktarları olarak kaydedildi. Test numuneleri ve kontrol grubu hayvanlar ile elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

2.2.4.3.2. Asetik Asit-nedenli Kapiller Permeabilite Artışının İnhibisyonu (Whittle Yöntemi)

Asetik asit, kapiller damarların proteinlere olan permeabilitesinin artışına neden olarak plazmanın kapillerlerden vücut boşluklarına eksudasyonuna yol açar. Bu durumda antienflamatuvar amaçla kullanılan test numunesinin eksudasyonu inhibe etmesi istenen bir durumdur.

Whittle'in deney hayvanlarında uygulanmak üzere geliştirdiği modelde, asetik asit ile oluşturulan eksudasyonun tespit edilmesi amacıyla proteine bağlanma yeteneğine sahip Pontamine Sky Blue veya Evans Blue gibi boyar maddelerden yararlanılmaktadır. Toplanan abdominal eksudadan ekstre edilen boyar maddenin renk yoğunluğu spektrofotometrik yöntemle ölçülerek test numunesinin sağladığı inhibisyon antienflamatuvar aktivite olarak değerlendirilmektedir (Küpeli, 2000).

Yara iyileşmesinde akut iltihabın seyri ve bu sürecin kontrollü bir şekilde devam ettiğinin gözlenebilmesi amacıyla çalışma materyallerinin yara iyileştirici etkilerinin yanında asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışının inhibisyonu (*Whittle metodu*) deneyi de yapılmıştır.

Farelere test numuneleri ve referans olarak kullanılan indometasin uygulandıktan 30

dakika sonra her farenin marjinal kuyruk venasına % 4'lük Evans Blue çözeltisinden 0,1 ml enjekte edildi. 10 dakika sonra % 0,5'lik asetik asit çözeltisinden 0,4 ml intraperitoneal yolla uygulandı. Hayvanlar 20 dakika sonra servikal dislokasyonla öldürüldükten sonra periton açıldı ve içeriği, distile su ile yıkanarak içinde 0,1 N NaOH bulunan 10 ml'lik balon jojelere aktarılıp distile su ile 10 ml' ye tamamlandı. Boyanın absorbansı 590 nm'de Beckman Due Spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Boyar madde olarak kullanılan Evans Blue'nun değişik konsantrasyonlarda (2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml) bir seri çözeltisi hazırlandı ve Lambert-Beer kanunu esası ile 590 nm'de absorbansları ölçülüp bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

Eksudadan ekstre edilen boyar maddenin absorbansı ölçüldü ve aşağıdaki formül kullanılarak iltihaplanmanın inhibisyonu hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(A_a - A_b)}{A_a} \times 100$$

A_a : Kontrol grubundaki boyar maddenin absorbansı

A_b : Test numunesi uygulanan gruptaki boyar maddenin absorbansı

2.2.4.3.3. TPA (12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat)-nedenli Kulak Ödemi Testi

TPA, protein kinaz C'yi aktive etme yeteneğine sahiptir. Protein kinaz C'nin aktivasyonu ile platelet aktivasyon faktörü (PAF) ve araşidonik asitin (AA) salınımına neden olan bir grup zincir enzimatik reaksiyon başlar. Sonuç olarak damar geçirgenliği, vazodilatasyon, polimorfonükleer lökosit migrasyon, histamin ve serotonin salımı stimüle olarak enflamasyon oluşumuna neden olur (Patel ve ark., 2012).

Çalışmamızda TPA uygulanan ve uygulanmayan farelerin iki kulak arasındaki ağırlık farkından hareketle % inhibisyon değeri hesaplanmıştır.

2,5µg TPA 20µl % 70'lik etanol içerisinde çözüldükten sonra farenin sağ kulağının iç ve dış tarafına otomatik pipet ile 10µl damlatıldı. Sol kulağa ise sadece TPA'yı çözdüğümüz % 70'lik etanol aynı şekilde damlatıldı. TPA damlatıldıktan hemen sonra sağ kulağa % 70'lik etanol içerisinde çözülmüş olan test maddesi 1 mg/kulak ve referans madde olarak indometasin 0,5 mg/kulak dozda uygulandı. Uygulamadan 4 saat sonra hayvanlar eter anestezisi altında öldürüldü, her iki kulak kalınlığı mikrometrik kumpas (Ozaki Co, Tokyo, Japonya) yardımıyla ölçülerek aralarındaki şişme farkı ödem miktarı olarak kaydedildi. Hemen sonra kulaklar bir mantar deleceği ile 5 mm'lik çapta kesilip hassas terazide tartıldı. Her iki kulak arasındaki ağırlık farkından hareketle % inhibisyon değeri hesaplandı.

Sonuçlar iki şekilde değerlendirildi:

1. Her iki kulak arasındaki şişme farkı
2. Her iki kulak arasındaki ödemin ağırlık cinsinden farkı

2.2.4.4. Antioksidan Etki Çalışmaları

Yara iyileşmesinde antioksidan etkinin önemi oldukça büyüktür. Antioksidan etki sağlayan bileşikler lipid peroksidasyonunu inhibe ederek hücre hasarını önlemekte ve kolajen fibrillerin dayanıklılığını arttırmaktadır. Test edilen bitkilerin antioksidan etki bakımından değerlendirilmesi yara iyileştirici etkileri hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir (Getie ve ark, 2002; Shetty ve ark., 2008).

Bu amaçla çalışmamızda antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi için DPPH ve ABTS⁺ üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini, indirgenme gücünün belirlenmesi ve spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasına dayanan yöntemler kullanılmıştır.

2.2.4.4.1. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

DPPH radikali menekşe renkli bir bileşik olup bir antioksidan ile muamele edildiğinde indirgenir ve menekşe renk kaybolur. Bir antioksidan tarafından proton transferi reaksiyonu ile 517 nm’de absorbansın azalmasına neden olur. Bu süreç bir spektrofotometre ile görünür alanda absorbans sabitlenene kadar takip edilir (Albayrak ve ark., 2010).

Test numuneleri metanolde çözüldükten sonra 80 µg/ml konsantrasyonda metanolde hazırlanmış olan DPPH çözeltisi ile karıştırıldı. 30 dakika inkübasyonun ardından DPPH çözeltisinin rengi, 517 nm’de spektrofotometre kullanılarak ölçüldü (Pattanayak ve ark., 2012).

2.2.4.4.2. 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS⁺•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite Yöntemi (TEAC) ilk kez Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş, daha sonra Re ve arkadaşları tarafından değiştirilmiş olup esas, 660, 734 ve 820 nm’de maksimum olan karakteristik uzun dalga boylu absorpsiyon spektrumu gösteren ABST radikal katyonun (ABTS⁺•) absorbansının antioksidan tarafından inhibisyonuna dayanmaktadır. ABTS²⁻ nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşan ABTS⁺• absorpsiyon verirken, ABTS²⁻ renksizdir (Albayrak ve ark., 2010).

ABTS⁺• radikali (7 mM) ABTS’in sulu çözeltisi ile K₂S₂O₈ (2,45 mM, son konsantrasyon)’nun karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle oluşturuldu ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm de 0,700 (±0,030) olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (1,485µL) ile ekstre çözeltileri (15µL) karıştırıldı ve 734 nm de 1 dakikalık aralıklarla 15 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü.

Konsantrasyona karşılık ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplandı (Pattanayak ve ark., 2012).

2.2.4.4.3. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi

1 mL ekstre çözeltisi 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH 6,6) ve 2,5 mL % 1 lik potasyum hekzasiyanoferrat çözeltisi ile karıştırılıp, 50°C de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2,5 mL % 10 luk trikloro asetik asit (TCA) çözeltisi ilave edildi ve karışım 10 dakika süreyle santrifüjlendi. Son olarak, 2,5 mL üst kısım, 2,5 mL su ve 0,5 mL % 0,1 lik FeCl₃ ilave edilip karıştırılarak 700 nm de absorbansları okundu. Ekstrelerin indirgeme güçleri askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak verildi (Singhal ve ark., 2011).

Tüm analizler iki tekrar yapılarak ortalama değerler olarak verildi.

2.2.4.4.4. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-deoksiriboz Bozulması

Reaksiyon karışımı 100 µL ekstre çözeltisi, 500 µL 5,6 mM 2-deoksiriboz (50 mM KH₂PO₄-NaOH tamponu, pH 7,4 içerisinde), 200 µL önceden karıştırılmış 100 µL FeCl₃ ve 104 mM EDTA (1:1, h/h) çözeltisi, 100 µL 1,0 mM H₂O₂ ve 100 µL 1,0 mM sulu askorbik asit çözeltisinden oluşmaktadır.

Karışım vorteksle karıştırılıp 50°C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 1 mL % 2,8 trikloroasetik asit ile 1 mL % 1,0 tiyobarbitürik asit eklendi ve karışım tekrar 50°C'de 30 dakika inkübe edildi. Oluşan oksidasyon 532 nm' de ölçüldü.

İnhibisyon yüzdesi kontrolün absorbansı (A_k) ve örnek absorbansı (A_ö) kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı ve mannitole eşdeğer (mmol_{mannitol}/g_{örnek}) olarak verildi (Pattanayak ve ark., 2012).

Sonuçlar iki paralel deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

$$[(A_k - A_0) / A_k] \times 100$$

2.2.4.5. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

Fotoğraf makinesi	: Fuji S20 Pro
Tıraş makinesi	: Oster Golden A5
Tensiometre	: Zwick/Roell Z0.5, Germany
Işık mikroskobu	: Olympus CX41 bağlı Kameram [®] Dijital Image Analiz Sistemi
Spektrofotometre	: Beckman Due Spektrofotometre

2.2.4.6. Deneyin Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

Deney sonuçları değerlendirilirken tek yönlü “ANOVA” testini içeren “Instat” (Windows) istatistik programı ve aktif çıkan ekstre ve fraksiyonlarda ayrıca Students-Newman-Keuls posthoc testi kullanıldı.

Kontrol ve referans grubu ile karşılaştırılan deney sonuçlarındaki istatistiksel belirginlik aşağıdaki şekillerle ifade edildi:

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

2.2.5. HPLC Analizi ile Şikimik Asit Miktar Tayini

Şikimik asitin HPLC yöntemi ile kalitatif ve kantitatif tayin edilmesine yönelik yapılan literatür araştırmasında analiz için NH_2 ve C_{18} olmak üzere iki çeşit kolon kullanıldığı belirlendiğinden en iyi sonucun elde edilmesi amacı ile her iki kolonla da ön çalışmalar gerçekleştirildi ve miktar tayini için C_{18} kolon kullanılmasına karar verildi.

2.2.5.1. HPLC Analiz Koşulları

Cihaz	: Agilent Technologies 1200 Series
Kolon	: ACE 5 μ , C_{18} (150 mm x 4,6 mm)
Enjeksiyon Hacmi	: 10 μ l
Akış Hızı	: 0,5 ml/dk
Dedektör	: G1215D DAD dedektör
Taranan Dalga Boyları	: 210 nm
Mobil Faz	: % 2 <i>o</i> -fosforik asit (% 85)
Analiz süresi	: 20 dk

2.2.5.2. Kullanılan Çözücüler

o-fosforik asit (% 85): Merck

Bidistile su

2.2.5.3. Analiz Numunelerinin Hazırlanması

Alnus taksonlarından 2.2.1.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanan metanollü ekstraktlardan 2 mg civarında tam tartım alındı, üzerlerine 1 mL metanol eklendi. Hazırlanan çözeltiler 0,45 μ l'lik filtrelerden süzüldü.

Analiz numunelerinin hazırlanması sürecinde bitkisel toz materyalden başlayarak alınan tam tartım değerleri ile analiz numunelerinin konsantrasyonları Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Analiz numunesi hazırlanmasında alınan tam tartım değerleri ve analiz çözeltilerinin konsantrasyonları

BİTKİ ADI	Toz Materyal (g)	MEOH'lı ekstre (g)	HPLC analizi için hazırlanan çözelti (mg/mL)
<i>A. glutinosa</i> subsp. <i>glutinosa</i>	30,3336	9,1781 (MB)	2,4
<i>A. orientalis</i> var. <i>orientalis</i>	30,1433	8,1118 (MA)	2,5
<i>A. orientalis</i> var. <i>pubescens</i>	30,1665	8,4270 (MG)	1,9

2.2.6. Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Analizi yapılacak olan şikimik asitin metanol içindeki 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml ve 1 mg/ml'lik konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı.

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için hazırlanan çözeltilerin her biri 10 µL hacimde 3'er kere kolona enjekte edildi ve analiz sonucu pik altında kalan alanların ortalaması konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi.

2.2.7. Analitik Yöntem Validasyonu

2.2.7.1. Doğrusallık

Konsantrasyona karşı analit cevabının doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte cevap noktalarının düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon(r) ve/veya determinasyon (tanımlayıcılık) (r^2) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir. Doğrusallığın sağlanması için “r” ve “ r^2 ” değerlerinin mümkün olduğunca 1’e yakın olması (0,999) ve analitin cevap değerlerinin çizilen doğru üzerinde yer alması gerekmektedir.

$$y = mx + n$$

Y= Alan [hesaplanan]

X = Konsantrasyon [mg / mL]

m = Regresyon doğrusunun eğimi

n = Doğrunun Y-eksenini kestiği nokta

r^2 = Korelasyon katsayısı

Kabul Kriterleri; $r^2 > 0,995$, doğrunun y-eksenini kestiği nokta doğrunun eğim değerinin $\pm \% 2.0$ aralığında olmalıdır.

2.2.7.2. Kesinlik

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Bir numuneye aynı yöntem birden fazla sayıda uygulandığı zaman analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar % BSS (Bağıl Standart Sapma) olarak ifade edilir. Deney sonuçlarının % BSS sı teorik değerlerin % 5’inden daha fazla sapma göstermemelidir.

2.2.7.2.1. Tayin Edilebilir En Düşük Limit (Teşhis Sınırı-TS) (Limit of Detection- LOD)

Analizi yapılan örneğin belirlediği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt konsantrasyondur. Yapılan deneylerden elde edilen verilerin Sinyal/Gürültü oranı 3 olarak alınır.

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan konsantrasyonlardan en düşüğü olan 0,0027 mg/ml konsantrasyondaki şikimik asit kromatogramında bulunan gürültü sinyalinin 3 katı alınarak hesaplandı.

2.2.7.2.2. Hesaplanabilir En Düşük Limit (Tayin Alt Sınırı-TAS) (Limit of Quantitation- LOQ)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisinde olmayan fakat kalibrasyon eğrisinin en alt konsantrasyonunu oluşturan veya onun da altında olabilen konsantrasyon düzeyidir. Yapılan deneylerden elde edilen verilerin Sinyal/Gürültü oranı 9 olarak alınır.

Tayin edilebilir en düşük limitin 3 katı alınarak hesaplandı.

Kabul Kriterleri;

Analiz sonuçları aralarındaki bağıl standart sapma (BSS) maksimum % 5 olmalıdır.

3. BULGULAR

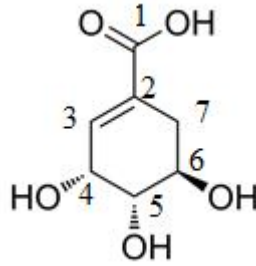
3.1. İzole Edilen Bileşiğin Yapı Tayinine İlişkin Bulgular

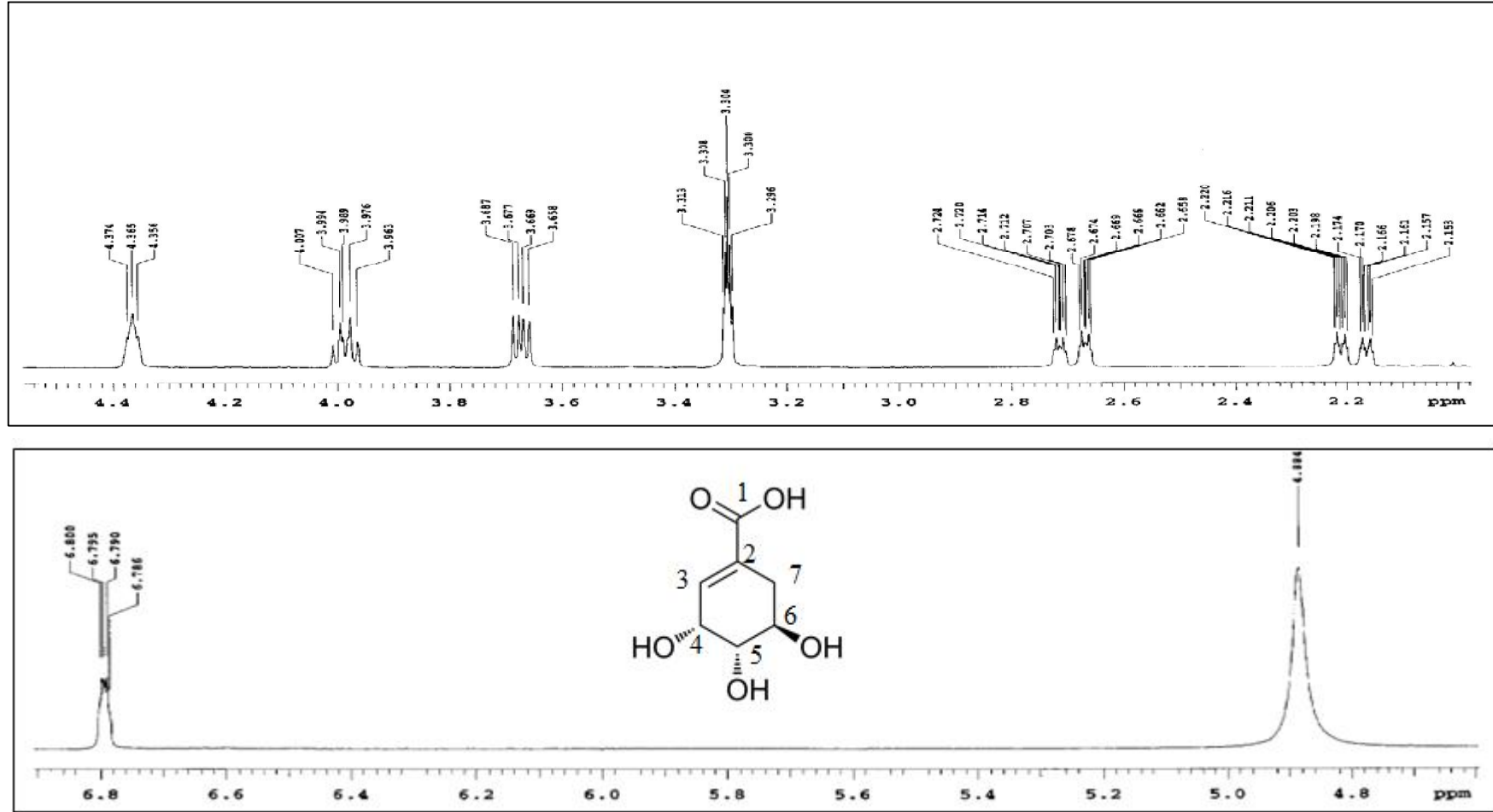
3.1.1. NMR Spektrumu Sonuçları

İzole edilen bileşiğin ^{13}C -NMR ve ^1H -NMR spektrumlarına ait veriler Çizelge 3.1’de, spektrumlar ise Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.’de yer almaktadır.

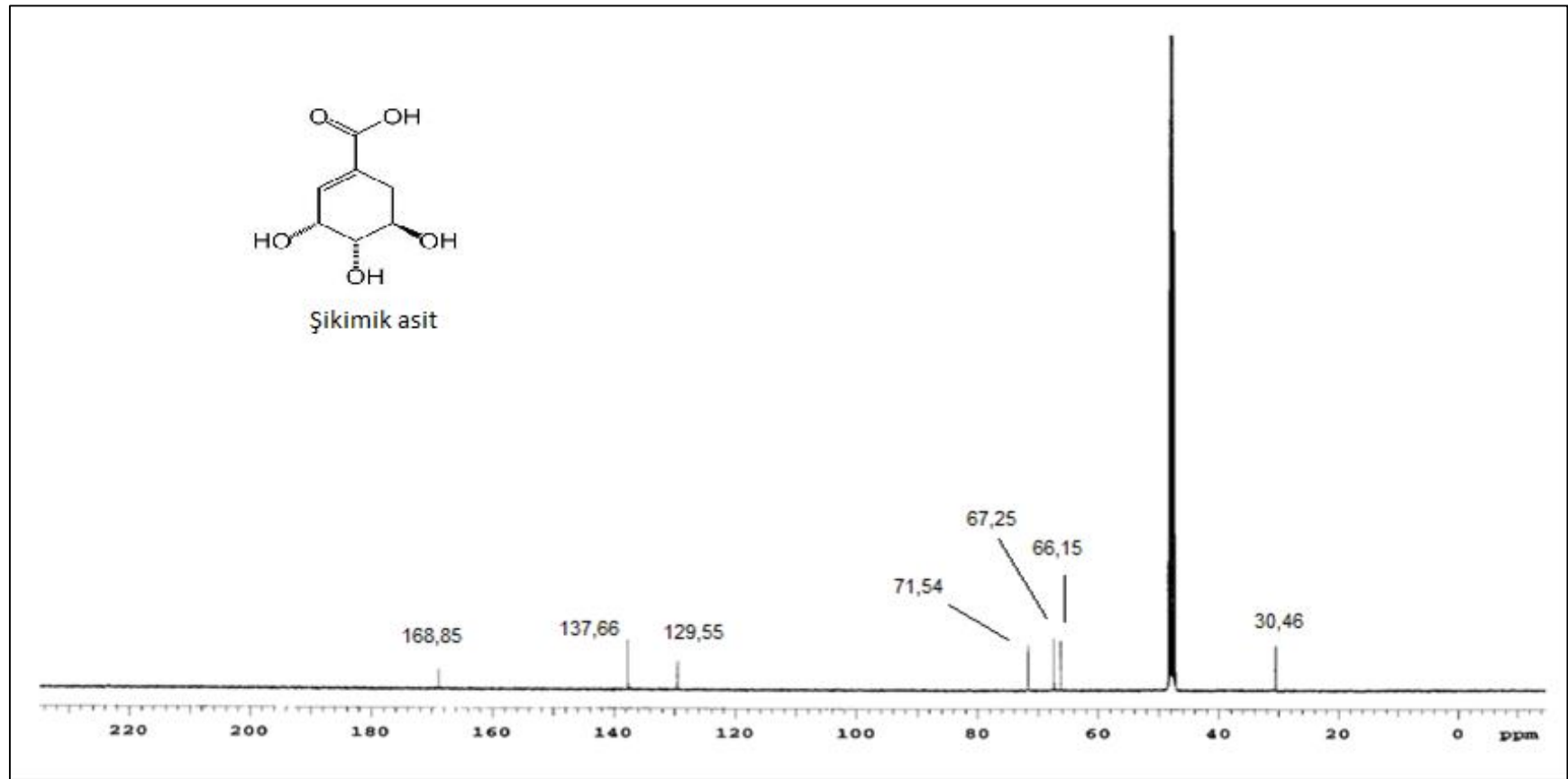
Çizelge 3.1. İzole Edilen Bileşiğin ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) ve ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) Spektrumuna Ait Veriler

	^{13}C -NMR	^1H -NMR
1	168,85	
2	129,55	
3	137,66	6,79 dd (4/8)
4	71,54	4,36 t (3,6)
5	67,25	3,67 dd (4,2/7,4)
6	66,15	3,98 dd (5,2/12,4)
7	30,46	2,7 dd (mm) (8,4/8,0) 2,18 dd (mm) (8,8/8,4)





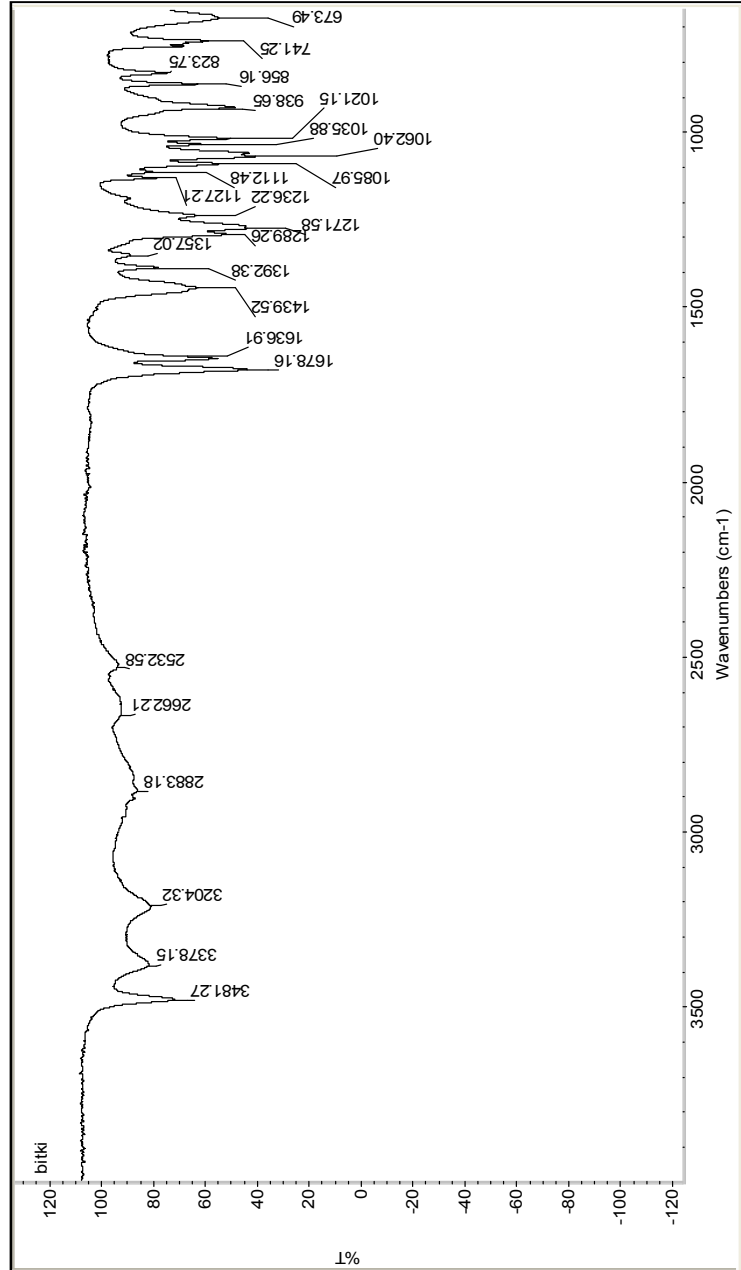
Şekil 3.1. İzole Edilen Bileşiğe Ait ^1H -NMR Spektrumu (CD_3OD , 400 MHz)



Şekil 3.2. İzole Edilen Bileşiğe Ait ^{13}C -NMR Spektrumu

3.1.2. IR Spektrumu Sonuçları

İzole edilen bileşiğe ait IR spektrumu Şekil 3.3.'te yer almaktadır.



Şekil 3.3. İzole Edilen Bileşiğe Ait IR Spektrumu

3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

3.2.1. Yara İyileştirici Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Alnus glutinosa subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis* ve *A. orientalis* var. *pubescens* bitkilerinin toz edilmiş yapraklarından hazırlanan metanollü (MB, MA, MG) ve sulu (SB, SA, SG) ekstrelerin ve daha etkili olduğu saptanan *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarının metanollü ekstresinden (MB) elde edilen alt ekstre, fraksiyonlar ile izole edilen bileşiğin yara iyileştirici aktivite çalışmalarına ilişkin bulgular Çizelge 3.2.-3.5. ile Şekil 3.4.-3.7.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Ekstre ve fraksiyonların insizyon yara modeli üzerindeki etkileri

Materyal	Yara gerilme kuvveti $\pm$ O.S.H.	(% Yara gerilimi)
Baz Merhem	12,34 $\pm$ 1,51	7,87
Negatif Kontrol	11,44 $\pm$ 1,63	-
MB	17,62 $\pm$ 0,35	42,79**
MA	15,03 $\pm$ 1,37	21,79
MG	16,68 $\pm$ 0,42	35,17*
SB	12,82 $\pm$ 1,57	3,89
SA	13,64 $\pm$ 1,40	10,53
SG	12,20 $\pm$ 1,48	-
Madecassol®	19,67 $\pm$ 0,62	59,40***
Baz Merhem	10,23 $\pm$ 1,64	4,18
Negatif Kontrol	9,82 $\pm$ 1,55	-
Hekzan	11,12 $\pm$ 1,49	8,69
Hekzan:EtOAc	13,06 $\pm$ 1,57	27,66
EtOAc	13,47 $\pm$ 0,56	31,67*
EtOAc:MeOH	13,94 $\pm$ 0,64	36,27*
MeOH	11,16 $\pm$ 1,69	9,09
Madecassol®	15,58 $\pm$ 0,32	52,29***
Baz Merhem	13,22 $\pm$ 1,26	6,09
Negatif Kontrol	12,46 $\pm$ 1,12	-
Fr. 4-6	12,21 $\pm$ 1,14	-
Fr. 7-14	13,39 $\pm$ 1,31	1,29
Fr. 15-26	14,05 $\pm$ 1,19	6,28
Fr. 27-38	16,96 $\pm$ 0,51	28,29**
Fr. 39-76	16,34 $\pm$ 1,79	23,60
Madecassol®	18,93 $\pm$ 0,25	43,19***
Baz Merhem	11,51 $\pm$ 1,18	4,35
Negatif Kontrol	11,03 $\pm$ 1,21	-
Şikimik asit	14,31 $\pm$ 1,01	24,33*
Madecassol®	17,02 $\pm$ 0,47	47,87***

* : p < 0.05; ** : p < 0.01; *** : p < 0.001; O.S.H: Ortalama Standart Hata

Yüzde yara gerilimi: Baz merhem sonuçları negatif kontrol grubuyla; Ekstre ve referans merhem grupları baz merhem grubuyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

Çizelge 3.2.'de de görüldüğü gibi, *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarının metanollü ekstresinin (MB) % 42,79 oranında yara gerilim kuvveti oluşturarak, anlamlı derecede etkili bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, sulu ekstrelerin insizyon yara modelinde etkili olmadığı belirlenmiştir. MB'den elde edilen fraksiyonlardan EtOAc:MeOH fraksiyonu ile Fr. 27-38'in sırası ile % 36,27 ve % 28,29 oranında anlamlı derecede etki gösterdikleri saptanmıştır. Fr. 27-38 kodlu kolon fraksiyonundan izole edilen şikimik asit, % 24,33 oranında aktivite göstermiştir.

Çizelge 3.3. Ekstre ve fraksiyonların eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri

Materyal	Yara alanı (mm ²) ± O.S.H. (% Kontraksiyon)						
	0. gün	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün	10. gün	12. gün
Baz Merhem	19,40±2,07	18,02±1,56 (1,48)	16,14±1,42 (1,41)	14,27±1,35 (4,93)	8,66±1,21 (5,46)	4,85±0,51 (10,68)	3,49±0,68 (10,97)
Negatif Kontrol	19,34±2,23	18,29±1,59	16,37±1,20	15,01±1,28	9,16±1,04	5,43±0,66	3,92±0,74
MB	19,59±2,18	16,72±1,40 (7,21)	13,82±1,40 (14,37)	13,40±1,27 (6,09)	6,44±0,92 (25,64)	3,01±0,40 (37,94)*	1,69±0,22 (51,58)**
MA	19,51±2,05	16,82±1,47 (6,66)	15,29±1,32 (5,27)	13,07±1,25 (8,41)	7,25±1,30 (16,28)	3,46±0,13 (28,66)	2,27±0,26 (34,96)*
MG	19,63±2,46	17,10±1,51 (5,11)	14,37±1,23 (10,97)	13,29±1,39 (6,87)	7,13±1,10 (17,67)	3,78±0,20 (22,06)	2,08±0,16 (40,40)**
SB	19,34±2,11	16,91±1,59 (6,16)	16,02±1,26 (0,74)	15,27±1,72 -	8,31±1,13 (4,04)	4,10±0,37 (15,46)	2,68±0,51 (23,21)
SA	19,49±2,20	18,23±1,49 -	15,61±1,37 (3,28)	14,62±1,16 -	8,12±1,09 (6,24)	3,93±0,46 (18,97)	2,60±0,66 (25,50)
SG	19,80±2,32	17,48±1,38 (2,99)	15,92±1,39 (1,36)	15,29±1,41 -	7,97±1,22 (7,97)	4,19±0,43 (13,61)	2,91±0,42 (16,62)
Madecassol®	19,57±2,04	16,22±1,45 (9,99)	13,27±1,13 (17,78)	10,24±0,63 (28,24)	4,91±0,50 (43,30)**	1,51±0,18 (68,87)**	0,00±0,00 (100,00)***
Baz Merhem	19,63±2,41	17,79±1,63 (3,73)	15,47±1,38 (5,27)	13,25±1,23 (6,76)	8,08±1,17 (9,42)	4,78±0,46 (6,27)	3,67±0,71 (6,14)
Negatif Kontrol	19,30±2,12	18,48±1,57	16,33±1,61	14,21±1,28	8,92±1,07	5,10±0,79	3,91±0,62

Hekzan	19,38±2,04	17,82±1,44 -	15,29±1,24 (1,16)	12,10±1,36 (8,68)	7,18±1,02 (11,14)	4,58±0,35 (4,18)	3,11±0,56 (15,26)
Hekzan:EtOAc	19,44±1,97	16,99±1,50 (4,49)	14,82±1,13 (4,20)	11,28±1,11 (14,86)	6,85±0,54 (15,22)	4,17±0,51 (12,76)	2,72±0,40 (25,89)
EtOAc	19,27±1,90	17,24±1,66 (3,09)	14,05±1,04 (9,18)	12,27±1,41 (7,55)	7,22±0,96 (10,64)	3,24±0,24 (32,22)*	2,04±0,36 (44,41)**
EtOAc:MeOH	19,42±1,93	16,87±1,38 (5,17)	13,96±0,98 (9,76)	11,96±1,17 (9,74)	6,98±1,10 (13,61)	2,15±0,17 (55,02)**	1,24±0,29 (66,21)**
MeOH	19,29±2,15	17,40±1,75 (2,19)	14,89±1,17 (3,75)	12,37±1,26 (6,64)	6,89±0,88 (14,73)	4,16±0,39 (12,97)	3,09±0,41 (15,80)
Madecassol ®	19,49±1,99	16,84±1,20 (5,34)	13,56±1,26 (12,35)	9,49±0,61 (28,38)	4,89±0,63 (39,48)*	1,62±0,26 (66,11)**	0,00±0,00 (100,00)***
Baz Merhem	19,33±2,50	17,38±1,76 (2,41)	16,02±1,27 (3,44)	11,82±1,13 (8,23)	6,16±0,79 (15,50)	4,55±0,82 (10,61)	3,59±0,40 (12,01)
Negatif Kontrol	19,44±2,06	17,81±1,54	16,59±1,32	12,88±1,16	7,29±1,21	5,09±0,79	4,08±0,63
Fr. 4-6	19,51±2,13	17,71±1,63 -	15,99±1,14 (0,19)	12,27±1,05 -	7,01±0,82 -	4,22±0,66 (7,25)	3,45±0,41 (3,89)
Fr. 7-14	19,41±2,02	17,22±1,36 (0,92)	15,26±1,16 (4,74)	11,02±1,07 (6,77)	5,93±0,56 (3,73)	4,12±0,58 (9,45)	3,11±0,72 (13,37)
Fr. 15-26	19,36±2,11	17,40±1,48 -	16,11±1,01 -	11,39±1,25 (3,64)	7,02±1,03 -	5,48±0,83 -	3,17±0,39 (11,69)
Fr. 27-38	19,49±2,18	16,15±1,19 (7,08)	13,04±0,91 (18,60)	8,20±0,73 (30,63)*	3,87±0,37 (37,18)**	2,77±0,24 (39,12)**	2,02±0,16 (43,73)**
Fr. 39-76	19,55±1,88	16,70±1,04	13,76±1,08	10,03±0,96	5,09±0,54	3,62±0,55	2,58±0,29

		(3,91)	(14,11)	(15,14)	(17,37)	(20,44)	(28,13)
Madecassol®	19,58±2,05	16,12±1,34 (7,25)	12,04±1,08 (24,84)	7,28±0,79 (38,41)*	2,18±0,52 (64,61)**	0,96±0,10 (78,90)***	0,00±0,00 (100,00)***
Baz Merhem	19,85±2,72	17,10±1,66 (5,26)	15,96±1,08 (4,89)	12,26±1,15 (5,74)	7,91±0,79 (7,05)	5,08±0,62 (9,65)	3,76±0,55 (6,47)
Negatif Kontrol	19,38±2,15	18,05±1,41	16,78±1,27	13,01±1,08	8,51±1,62	4,59±0,54	4,02±0,73
Şikimik asit	19,64±2,40	15,85±1,02 (7,31)	12,99±0,95 (1,61)	8,68±0,79 (29,20)*	5,06±0,61 (36,03)**	3,54±0,30 (30,31)*	1,99±0,16 (47,07)**
Madecassol®	19,31±2,18	15,46±1,07 (9,59)	12,39±1,02 (22,37)	8,55±0,61 (30,26)*	3,21±0,43 (59,42)**	1,42±0,19 (72,05)***	0,00±0,00 (100,00)***

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; O.S.H: Ortalama Standart Hata

Yüzde kontraksiyon: Baz merhem sonuçları negatif kontrol grubuyla; Fraksiyon ve referans merhem grupları baz merhem grubuyla karşılaştırılarak değerlendirildi

Dairesel eksizyon yara modeli sonuçları, *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarının metanollü ekstresi ile bu ekstrenin fraksiyonları olan EtOAc:MeOH, Fr. 27-38 ve izole edilen şikimik asitin sırasıyla % 51,58, % 66,24, % 43,73 ve % 47,07 oranlarında kontraksiyon sağlayarak yara iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.4. Ekstre ve fraksiyonlar ile tedavi edilen dokuların hidroksiprolin düzeyi üzerindeki etkileri

Materyal	Hidroksiprolin ($\mu\text{g}/\text{mg}$) $\pm$ O.S.H.
Baz Merhem	6,43 $\pm$ 1,50
Negatif Kontrol	5,17 $\pm$ 1,71
MB	29,08 $\pm$ 1,07**
MA	19,22 $\pm$ 1,39
MG	21,62 $\pm$ 1,26*
SB	13,43 $\pm$ 1,83
SA	15,31 $\pm$ 1,59
SG	9,71 $\pm$ 1,88
Madecassol®	50,77 $\pm$ 1,05***
Baz Merhem	8,35 $\pm$ 1,61
Negatif Kontrol	8,13 $\pm$ 1,72
Hekzan	10,52 $\pm$ 1,88
Hekzan:EtOAc	13,21 $\pm$ 1,54
EtOAc	22,52 $\pm$ 1,89
EtOAc:MeOH	30,33 $\pm$ 0,99**
MeOH	15,27 $\pm$ 1,39
Madecassol®	45,36 $\pm$ 0,73***
Baz Merhem	9,33 $\pm$ 1,95
Negatif Kontrol	7,26 $\pm$ 1,99
Fr. 4-6	9,98 $\pm$ 2,01
Fr. 7-14	12,20 $\pm$ 1,90
Fr. 15-26	14,08 $\pm$ 1,67
Fr. 27-38	26,91 $\pm$ 1,12**
Fr. 39-76	19,42 $\pm$ 1,75
Madecassol®	48,35 $\pm$ 0,92***
Baz Merhem	6,54 $\pm$ 1,82
Negatif Kontrol	6,01 $\pm$ 1,89
Şikimik asit	25,12 $\pm$ 1,25*
Madecassol®	42,29 $\pm$ 1,17***

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

O.S.H.: Ortalama Standart Hata

Paralel sonuçlar hidroksiprolin tayini deneyinde de elde edilmiştir. Buna göre, *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarının metanollü ekstresi, EtOAc: MeOH

fraksiyonu, Fr. 27-38 ve şikimik asit ile tedavi edilen dokulardaki hidroksiprolin miktarları artış göstermiştir.

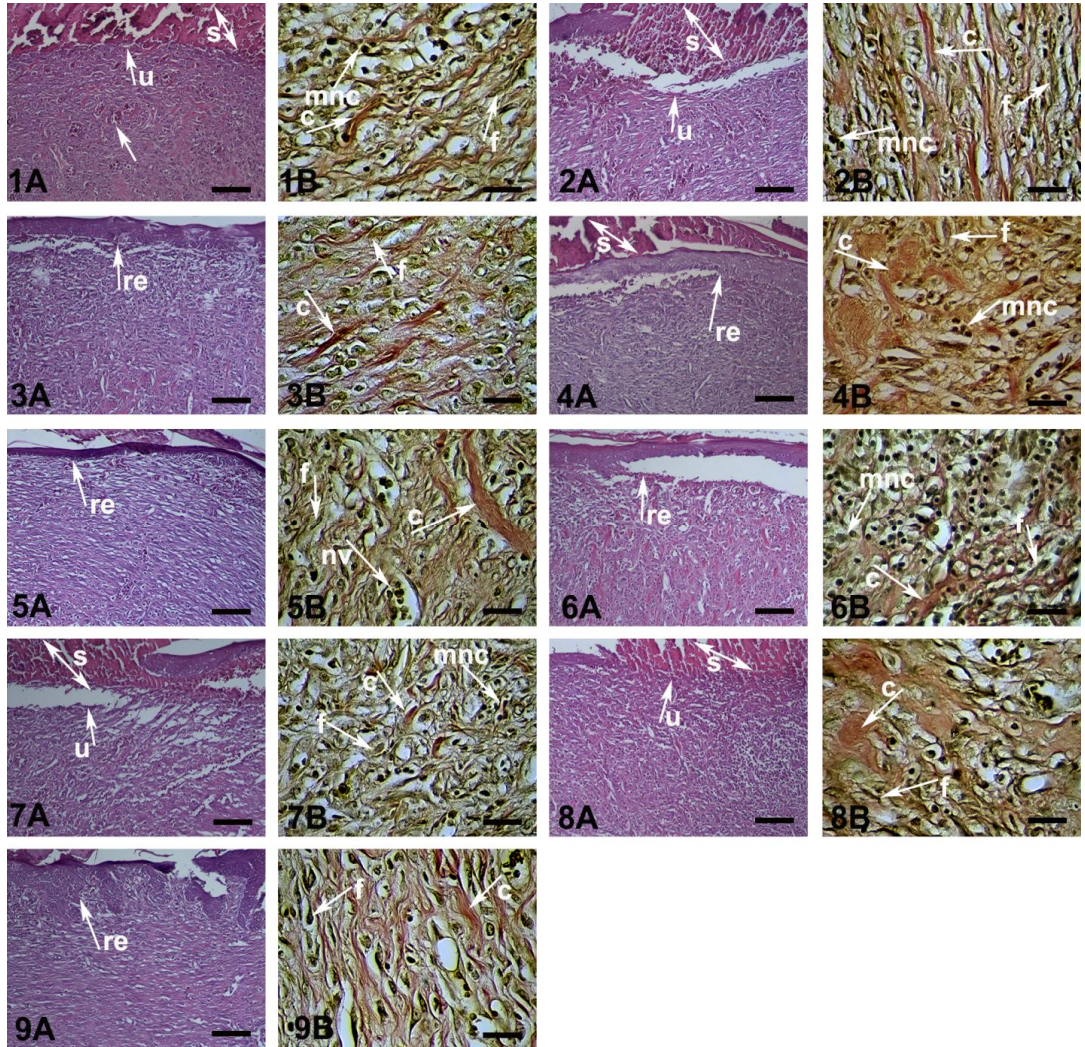
Çizelge 3.5. Ekstre ve fraksiyonlar ile tedavi edilen dokuların histopatoloji sonuçları

[illegible]

Baz Merhem	++/+++	++/+++	-/+	++/+++	++/+++	++/+++	++	++/+++	++/+++	+++	-/+
Negatif Kontrol	++/+++	++/+++	-/+	+++	++/+++	++/+++	++	++/+++	++/+++	+++	-/+
Şikimik asit	++/+++	++/+++	-/+	++	++/+++	++/+++	++	++/+++	++/+++	+++	-/+
Madecassol®	++/+++	++	-/+	++/+++	++	+/++	+/++	++	++	++/+++	-/+

HE ve VG ile boyanan dokular hafif (+), orta (++) , şiddetli (++) olmak üzere derecelendirildi.

s: Yara kabuğu, u: Ülser, re: Re-epitelizasyon, fp: Fibroblast proliferasyonu, cd: Kolajen depolanması, mn: Mononükleer hücreler, pmn: Polimorfonükleer hücreler, nv: Neovaskülerizasyon, i: Enflamasyon fazı, p: Proliferasyon fazı, r: Re-modeling fazı.



Şekil 3.4. Metanollü (MB) ve sulu (SB) ekstrakter ile hazırlanan test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları

1. Baz Merhem, 2. Negatif Kontrol, 3. MA, 4. MB, 5. MG, 6. SA, 7. SB, 8. SG 9. Madecassol;

A: Hematoksilen-eozin ile boyanmış epidermis ve dermis;

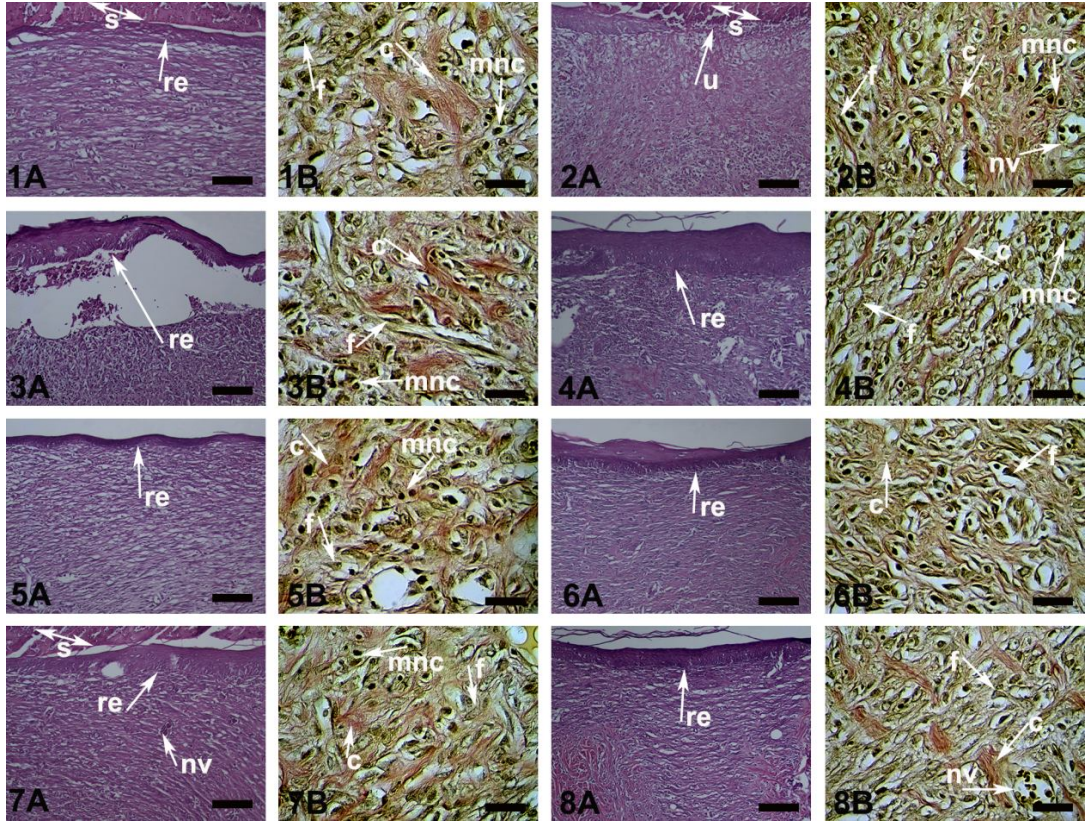
B: Van Gieson ile boyanmış dermis;

A kodlu resimlerin orijinal büyütmesi x 100 olup büyütme barı 120 µm.

B kodlu resimlerin orijinal büyütmesi x 400 olup büyütme barı 40 µm.

Bilgiler her gruptaki 6'şar hayvanın ortalamasını yansıttığı şekildedir.

c: Kolajen, dl: Dermal lipoit materyal birikimi, f: Fibroblast, mn: Mononükleer hücreler, nv: Neovaskülerizasyon, pm: Polimorfonükleer hücreler, re: Re-epitelizasyon, s: Yara Kabuğu, u: Ülser



Şekil 3.5. MB ekstresinin VLC ile kaba fraksiyonlaması sonucu elde edilen ekstratlarla hazırlanan test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları

1. Baz Merhem, 2. Negatif Kontrol, 3. Hekzan, 4. Hekzan:EtOAc, 5. EtOAc, 6. EtOAc:MeOH, 7. MeOH, 8. Madecassol;

A: Hematoksilen-eozin ile boyanmış epidermis ve dermis;

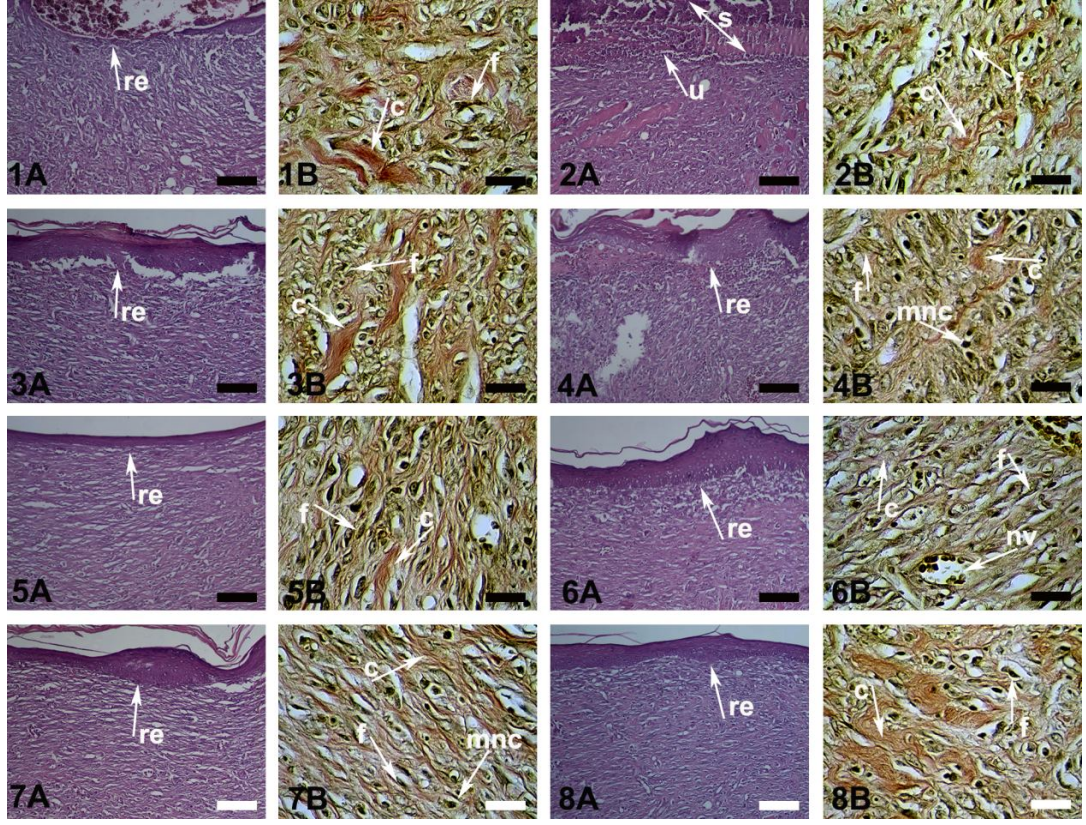
B: Van Gieson ile boyanmış dermis;

A kodlu resimlerin orijinal büyütmesi x 100 olup büyütme barı 120 µm

B kodlu resimlerin orijinal büyütmesi x 400 olup büyütme barı 40 µm.

Bilgiler her gruptaki 6'şar hayvanın ortalamasını yansıtabilecek şekildedir.

c: Kolajen, dl: Dermal lipoit materyal birikimi, f: Fibroblast, mn: Mononükleer hücreler, nv: Neovaskülerizasyon, pm: Polimorfonükleer hücreler, re: Re-epitelizasyon, s: Yara Kabuğu, u: Ülser



Şekil 3.6. Etil asetat:Metanollü ekstreden elde edilen alt fraksiyonlar ile hazırlanan test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları

1. Baz Merhem, 2. Negatif Kontrol, 3. Fr. 4-6, 4. Fr. 7-14, 5. Fr. 15-26, 6. Fr. 27-38, 7. Fr. 39-76, 8. Madecassol;

A: Hematoksilen-eozin ile boyanmış epidermis ve dermis;

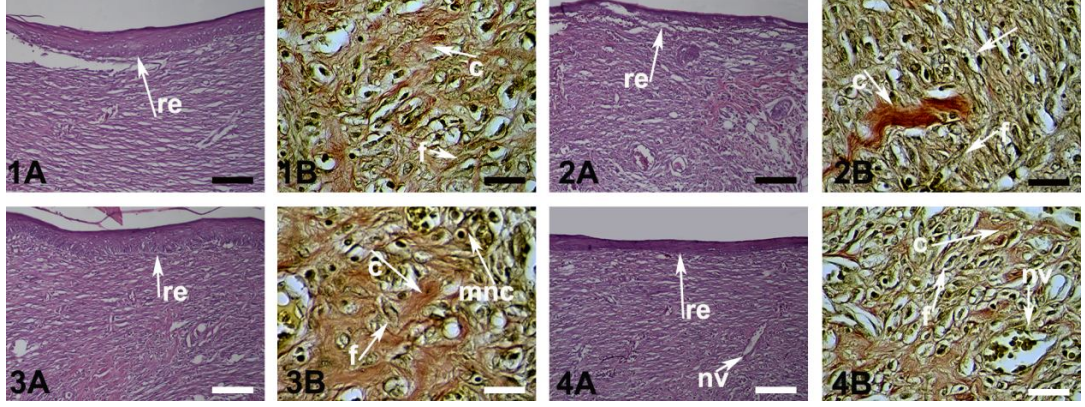
B: Van Gieson ile boyanmış dermis;

A kodlu resimlerin orijinal büyütmesi x 100 olup büyütme barı 120 µm

B kodlu resimlerin orijinal büyütmesi x 400 olup büyütme barı 40 µm.

Bilgiler her gruptaki 6'şar hayvanın ortalamasını yansıttığı şekildedir.

c: Kolajen, dl: Dermal lipoit materyal birikimi, f: Fibroblast, mn: Mononükleer hücreler, nv: Neovaskülerizasyon, pm: Polimorfonükleer hücreler, re: Re-epitelizasyon, s: Yara Kabuğu, u: Ülser



Şekil 3.7. Şikimik asit ile hazırlanan test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları

1. Baz Merhem, 2. Negatif Kontrol, 3. Şikimik asit, 4. Madecassol®;

A: Hematoksilen-eozin ile boyanmış epidermis ve dermis;

B: Van Gieson ile boyanmış dermis;

A kodlu resimlerin orijinal büyütmesi x 100 olup büyütme barı 120 µm

B kodlu resimlerin orijinal büyütmesi x 400 olup büyütme barı 40 µm.

Bilgiler her gruptaki 6'şar hayvanın ortalamasını yansıtacak şekildedir.

c: Kolajen, dl: Dermal lipoit materyal birikimi, f: Fibroblast, mn: Mononükleer hücreler, nv: Neovaskülerizasyon, pm: Polimorfonükleer hücreler, re: Re-epitelizasyon, s: Yara Kabuğu, u: Ülser

Histopatolojik incelemelerde, inflamasyon, proliferasyon ve remodelleme fazları göz önünde bulundurulduğunda MB, EtOAc:MeOH, Fr. 27-38 ve şikimik asit ile hazırlanan merhemler ile tedavi edilen gruplarda iyileşmenin düzgün seyrettiği görülmekte olup sonuçlar çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon yara modelinde elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

3.2.2. Antienflamatuvar Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Alnus glutinosa subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis* ve *A. orientalis* var. *pubescens* bitkilerinin toz edilmiş yapraklarından hazırlanan metanollü (MB, MA, MG) ve sulu (SB, SA, SG) ekstrelerin ve daha etkili olduğu saptanan *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarının metanollü ekstresinden (MB) VLC yöntemi ile elde edilen ekstreler, EtOAc:MeOH ekstresinden elde edilen fraksiyonlar ile izole edilen bileşiğin antienflamatuvar aktivite çalışmalarına ilişkin bulgular Çizelge 3.6.-3.8.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Ekstre ve fraksiyonların Whittle yöntemi üzerindeki etkileri

Materyal	Doz (mg/kg)	Evans blue konsantrasyonu (µg/ml) ± O.S.H.	İnhibisyon (%)
Kontrol		11,78 ± 0,46	
MA	100	10,69 ± 0,61	9,25
	200	9,96 ± 0,79	15,45
MB	100	9,75 ± 0,59	17,23
	200	8,22 ± 0,13	30,22**
MG	100	10,40 ± 0,85	11,71
	200	9,05 ± 0,18	23,17**
SA	100	11,46 ± 0,76	2,72
	200	10,92 ± 0,81	7,30
SB	100	11,21 ± 0,72	4,83
	200	11,00 ± 0,66	6,62
SG	100	11,91 ± 0,90	-
	200	11,15 ± 0,74	5,35
Indometasin	10.0	6,23 ± 0,16	47,11***
Kontrol		13,31 ± 0,69	
Hekzan	100	13,72 ± 0,88	-
	200	13,02 ± 0,79	2,18
Hekzan:EtOAc	100	12,60 ± 1,02	5,33
	200	11,28 ± 0,57	15,25
EtOAc	100	11,52 ± 0,66	13,45
	200	9,43 ± 0,31	29,15**
EtOAc:MeOH	100	10,89 ± 0,54	18,18
	200	8,99 ± 0,22	32,46**
MeOH	100	12,41 ± 0,46	6,76
	200	11,78 ± 0,49	11,49
Indometasin	10.0	6,97 ± 0,20	47,63***
		12,29 ± 0,73	

Kontrol			
Fr. 4-6	100	11,99± 0,61	2,44
	200	11,85 ± 0,96	3,58
Fr. 7-14	100	13,03 ± 1,10	-
	200	11,75 ± 0,88	4,39
Fr. 15-26	100	11,35 ± 0,69	7,65
	200	10,87 ± 0,76	11,55
Fr. 27-38	100	9,81 ± 0,62	20,18
	200	7,59 ± 0,35	38,24**
Fr. 39-76	100	10,68 ± 0,81	13,10
	200	10,03 ± 0,78	18,39
Indometasin	10.0	7,11 ± 0,19	42,15***
Kontrol		13,35 ± 0,82	
Şikimik asit	100	10,59 ± 0,23	20,67
	200	9,72 ± 0,31	27,19**
Indometasin	10.0	7,98 ± 0,14	40,22***

* : p < 0.05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; O.S.H.: Ortalama Standart Hata

Asetik asit-nedenli kapiller permeabilitenin inhibisyonuna dayanan Whittle Yöntemi'nde metanollü ve sulu ekstraler içinde en yüksek inhibisyon etkiyi % 30,22 oranı ile *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa* metanollü ekstresinin gösterdiği görülmektedir. Bu ekstreten hareketle elde edilen EtOAc:MeOH fraksiyonunun % 32,46, bu fraksiyonun alt fraksiyonu olan Fr.27-38'in % 38,24 ve Fr.27-38'den izole edilen şikimik asit'in ise % 27,19 oranlarında inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 3.7. Ekstre ve fraksiyonların farelerde karagen-nedenli arka ayak ödemi üzerindeki etkileri

Materyal	Doz (mg/kg)	Şişme kalınlığı (x 10 ⁻² mm)±O.S.H (% İnhibisyon)			
		90 dk	180 dk	270 dk	360 dk
Kontrol		44,5 ±2,9	49,8±2,6	52,8±3,3	59,0±3,1
MA	100	43,2±3,3 (2,9)	47,5±2,9 (4,6)	53,7±3,4 -	60,9±3,3 -
	200	42,4±3,2 (4,7)	45,8±2,8 (8,0)	52,9±2,6 -	57,1±3,0 (3,2)
MB	100	40,3±2,2 (9,4)	40,2±2,1 (19,3)	46,9±3,1 (11,2)	55,1±3,2 (6,6)
	200	35,7±2,5 (19,8)	35,3±1,9 (29,1)**	40,5±2,8 (23,3)*	52,2±3,5 (11,5)
MG	100	43,1±2,6 (3,1)	50,3±2,8 -	50,6±2,7 (4,2)	58,6±3,3 (0,7)
	200	40,5±3,2 (8,9)	47,5±3,5 (4,6)	47,1±2,3 (10,8)	53,9±3,1 (8,6)
SA	100	45,3±3,3 -	48,1±2,9 (3,4)	51,5±3,2 (2,5)	57,1±3,4 (3,2)
	200	43,2±3,6 (2,9)	49,3±2,5 (1,0)	53,7±3,3 -	56,9±3,7 (3,6)
SB	100	45,9±2,9 -	50,1±3,2 -	55,0±3,1 -	60,5±3,8 -
	200	46,1±2,7 -	49,1±2,9 (1,4)	51,5±3,8 (2,5)	56,2±3,6 (4,7)
SG	100	49,5±3,0 -	48,2±2,5 (3,2)	50,7±3,2 (3,9)	53,1±2,5 (10,0)
	200	42,2±3,5 (5,2)	45,0±2,3 (9,6)	49,3±3,5 (6,6)	58,1±3,1 (1,5)
Indometasin	10	28,9±2,1 (35,1)**	33,0±2,5 (33,7)**	36,5±2,0 (30,8)**	35,5±1,8 (39,8)***
Kontrol		50,7 ±3,7	52,4±2,5	54,1±3,2	55,9±3,1
Hekzan	100	5,8±3,5 -	55,1±3,3 -	55,8±3,7 -	56,0±3,3 -
	200	49,1±3,0 (3,2)	50,7±2,8 (3,2)	53,1±2,7 (1,8)	53,2±3,1 (4,8)
Hekzan:EtOAc	100	51,7±3,2 -	48,5±2,5 (7,4)	48,2±3,1 (10,9)	51,7±3,4 (7,5)
	200	50,1±2,5 (1,2)	47,3±2,8 (9,7)	46,1±3,0 (14,8)	50,6±3,1 (9,5)
EtOAc	100	48,5±2,2 (4,3)	51,5±3,2 (1,7)	49,1±2,8 (1,8)	47,1±3,2 (1,8)
	200	43,0±3,1 (15,2)	50,2±3,4 (4,2)	47,1±2,5 (12,9)	45,1±2,9 (19,3)
EtOAc:MeOH	100	40,1±2,9 (20,9)	41,5±2,5 (20,8)	42,6±3,0 (21,3)	46,3±2,5 (17,2)
	200	38,1±2,5 (24,9)*	36,3±2,4 (30,7)**	40,3±2,3 (25,5)*	48,1±3,0 (13,9)
MeOH	100	45,3±3,1 (10,7)	53,0±3,3 -	51,5±3,2 (2,5)	52,5±2,8 (6,1)
	200	44,2±3,2 (12,8)	51,9±2,9 (1,9)	55,1±3,9 -	56,2±3,2 -

Indometasin	10	32,1±2,0 (36,7)**	32,7±2,0 (37,6)**	39,9±2,1 (26,2)*	33,8±2,2 (39,5)***
Kontrol		45,5 ±3,1	49,7±2,9	52,0±3,5	53,3±2,8
Fr. 4-6	100	48,1±3,0 -	50,1±3,2 -	56,8±3,1 -	55,9±3,2 -
	200	45,1±3,5 (0,9)	48,1±2,8 (3,2)	53,0±2,9 -	54,1±3,8 -
Fr. 7-14	100	49,7±3,3 -	52,3±3,5 -	55,1±3,0 -	57,5±3,3 -
	200	43,8±2,9 (3,7)	51,0±3,6 -	50,2±3,1 (3,5)	54,0±3,5 -
Fr. 15-26	100	42,1±2,6 (7,5)	48,1±3,3 (3,2)	50,8±3,4 (2,3)	51,2±3,6 (3,9)
	200	39,5±3,1 (13,2)	42,6±3,7 (14,3)	48,1±2,9 (7,5)	50,3±2,9 (5,6)
Fr. 27-38	100	40,2±3,4 (11,6)	41,9±2,8 (15,7)	43,3±3,2 (16,7)	48,6±2,8 (8,8)
	200	32,1±2,8 (29,5)*	34,1±1,9 (31,4)**	40,5±3,0 (22,1)*	44,7±2,3 (16,1)
Fr. 39-76	100	47,4±3,5 -	50,3±3,4 -	55,1±3,7 -	54,5±3,2 -
	200	41,9±3,1 (7,9)	48,7±2,8 (2,0)	53,8±3,4 -	55,5±3,3 -
Indometasin	10	30,2±2,1 (33,6)**	32,3±2,2 (35,0)**	38,2±2,9 (26,5)*	31,5±2,1 (40,9)***
Kontrol		45,3 ±3,3	47,5±2,9	49,8±3,1	51,2±3,2
Şikimik asit	100	39,5±3,5 (12,8)	38,1±2,5 (19,8)	42,4±2,9 (14,9)	45,1±2,7 (11,9)
	200	32,3±2,5 (28,7)*	35,3±2,6 (25,7)*	40,3±2,2 (19,1)	44,6±2,1 (12,9)
Indometasin	10	29,5±2,1 (34,9)**	31,5±2,5 (33,7)**	36,4±1,1 (26,9)*	33,6±1,5 (34,4)**

* : p < 0.05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; O.S.H.: Ortalama Standart Hata

Karagen-nedenli arka ayak ödemi testinde, *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa* metanollü ekstresinin 200 mg/kg dozda, 180. dakikada % 29,1; 270. dakikada % 23,3 oranında inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır. Benzer şekilde diğer ekstrelere göre daha aktif bulunan bu ekstrenin EtOAc:MeOH'lü fraksiyonu, bu fraksiyonun alt fraksiyonlarından olan Fr. 27-38 ve izole edilen şikimik asit anlamlı derecede antienflamatuar etki göstermiştir.

Çizelge 3.8. Ekstre ve fraksiyonların farelerde TPA-nedenli kulak ödemi üzerindeki etkileri

Materyal	Doz (mg/kulak)	Şişme kalınlığı (µm) ± O.S.H.	% İnhibisyon	Ödem ağırlığı (mg) ± O.S.H.	% İnhibisyon
Kontrol		361,2 ± 25,1		29,5 ± 3,3	
MA	0,5	335,1 ± 22,4	7,2	26,1 ± 3,5	11,5
MB	0,5	328,4 ± 18,3	9,1	23,7 ± 3,7	19,7
MG	0,5	332,5 ± 20,2	7,9	25,2 ± 2,1	14,6
SA	0,5	369,4 ± 29,5	-	27,5 ± 2,9	6,8
SB	0,5	352,3 ± 27,4	2,5	29,9 ± 2,8	-
SG	0,5	355,7 ± 25,9	1,5	28,0 ± 3,1	5,1
Indometasin	0,5	125,7 ± 14,6	65,2***	10,9 ± 3,4	63,1***
Kontrol		358,5 ± 29,7		30,3 ± 3,5	
Hekzan	0,5	363,1 ± 27,5	-	31,7 ± 3,1	-
Hekzan:EtOAc	0,5	336,6 ± 25,1	6,1	30,5 ± 3,9	-
EtOAc	0,5	309,4 ± 26,3	13,7	25,1 ± 3,6	17,2
EtOAc:MeOH	0,5	300,2 ± 19,5	16,3	24,1 ± 2,9	20,5
MeOH	0,5	323,0 ± 23,0	9,9	27,8 ± 3,5	8,3
Indometasin	0,5	146,6 ± 13,3	59,1***	8,3 ± 1,7	72,6***
Kontrol		355,1 ± 29,2		31,3 ± 3,2	
Fr. 4-6	0,5	339,5 ± 24,9	4,4	32,5 ± 3,4	-
Fr. 7-14	0,5	359,1 ± 29,0	-	34,8 ± 3,1	-
Fr. 15-26	0,5	303,3 ± 25,2	14,6	25,1 ± 3,0	19,8
Fr. 27-38	0,5	299,4 ± 21,1	15,7	24,9 ± 2,7	20,4
Fr. 39-76	0,5	354,5 ± 27,8	0,2	31,9 ± 3,5	-
Indometasin	0,5	128,1 ± 14,3	63,9***	12,5 ± 1,9	60,1***
Kontrol	0,5	340,1 ± 25,9		29,1 ± 3,5	
Şikimik asit	0,5	302,8 ± 21,2	10,9	25,8 ± 2,7	11,3
Indometasin	0,5	84,3 ± 17,6	75,2***	8,5 ± 2,3	70,8***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; O.S.H.: Ortalama Standart Hata

Çizelge 3.8. deki veriler incelendiğinde çalışılan ekstreler ve fraksiyonlar ile şikimik asitin TPA-nedenli kulak ödemi testinde anlamlı derecede etki göstermediği görülmektedir.

3.2.3. Antioksidan Etki Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Alnus glutinosa subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis* ve *A. orientalis* var. *pubescens* bitkilerinin toz edilmiş yapraklarından hazırlanan metanollü (MB, MA, MG) ve sulu (SB, SA, SG) ekstrelerin ve daha etkili olduğu saptanan *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarının metanollü ekstresinden (MB) elde edilen alt ekstre, fraksiyonlar ile izole edilen bileşiğin antioksidan çalışmalarına ilişkin bulgular Çizelge 3.9.'da sunulmuştur.

Çizelge 3.9. Ekstre ve fraksiyonların antioksidan etkileri etkileri

Materyal	DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	ABTS IC ₅₀ (µg/ml)	İndirgenme gücündeki artış (%)	OH-radikal inhibisyonu IC ₅₀ (µg/ml)
MA	74,56	85,12	24,56	92,15
MB	51,15	69,54	30,23	63,47
MG	92,82	112,26	19,91	100,76
SA	129,55	145,34	15,12	132,56
SB	188,45	171,40	26,29	191,10
SG	170,53	160,13	13,85	154,33
Hekzan	115,36	139,47	17,12	112,61
Hekzan:EtOAc	96,44	126,24	25,92	108,89
EtOAc	59,17	61,37	32,61	67,43
EtOAc:MeOH	57,41	49,15	48,36	59,17
MeOH	85,52	90,12	30,16	74,19
Fr. 4-6	328,96	389,29	19,84	356,13
Fr. 7-14	301,02	298,45	15,63	300,42
Fr. 15-26	75,39	83,36	36,22	79,80
Fr. 27-38	38,81	41,28	52,15	37,54
Fr. 39-76	49,54	57,15	28,17	52,23
Şikimik asit	25,24	33,48	43,03	38,25
Askorbik asit	4,07	7,12	61,24	4,86

Çizelge 3.9. daki veriler incelendiğinde, yara iyileştirici ve antienflamatuvar etkileri diğer ekstrele göre yüksek bulunan *Alnus glutinosa* subsp. *glutinosa* metanollü ekstresi, EtOAc:MeOH, Fr. 27-38 ve şikimik asitin diğer ekstre ve fraksiyonlara göre DPPH ve ABTS radikal süpürücü etkileri ile OH-radikal inhibisyonu deneylerindeki

IC₅₀ değerlerinin düşük, indirgenme gücündeki artış değerlerinin ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, söz konusu materyallerin antioksidan etkilerinin bulunduğunu ve antioksidan etkinin yara iyileştirici ve antienflamatuvar etkiler ile paralellik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

3.2.4. Yara İyileştirici Etki Mekanizmasının Belirlenmesi Amacı İle Gerçekleştirilen *İn-vitro* Enzim İnhibisyonu Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Çizelge 3.10. Fr. 27-38'den izole edilen bileşiğin hiyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz inhibisyonu üzerindeki etkileri

Materyal	Konsantrasyon (µg/ml)	% Hiyaluronidaz İnhibisyonu ± O.S.H.	% Kolajenaz İnhibisyonu ± O.S.H.	% Elastaz İnhibisyonu ± O.S.H.
Şikimik asit	50	20,43 ± 1,39	19,57 ± 1,26	18,51 ± 1,36
	100	38,24 ± 0,91*	21,13 ± 1,51	26,31 ± 1,14
Tannik asit	100	81,46 ± 0,96***	-	-
Epigallokateşin gallat	100	-	45,36± 1,19**	91,24± 1,38***

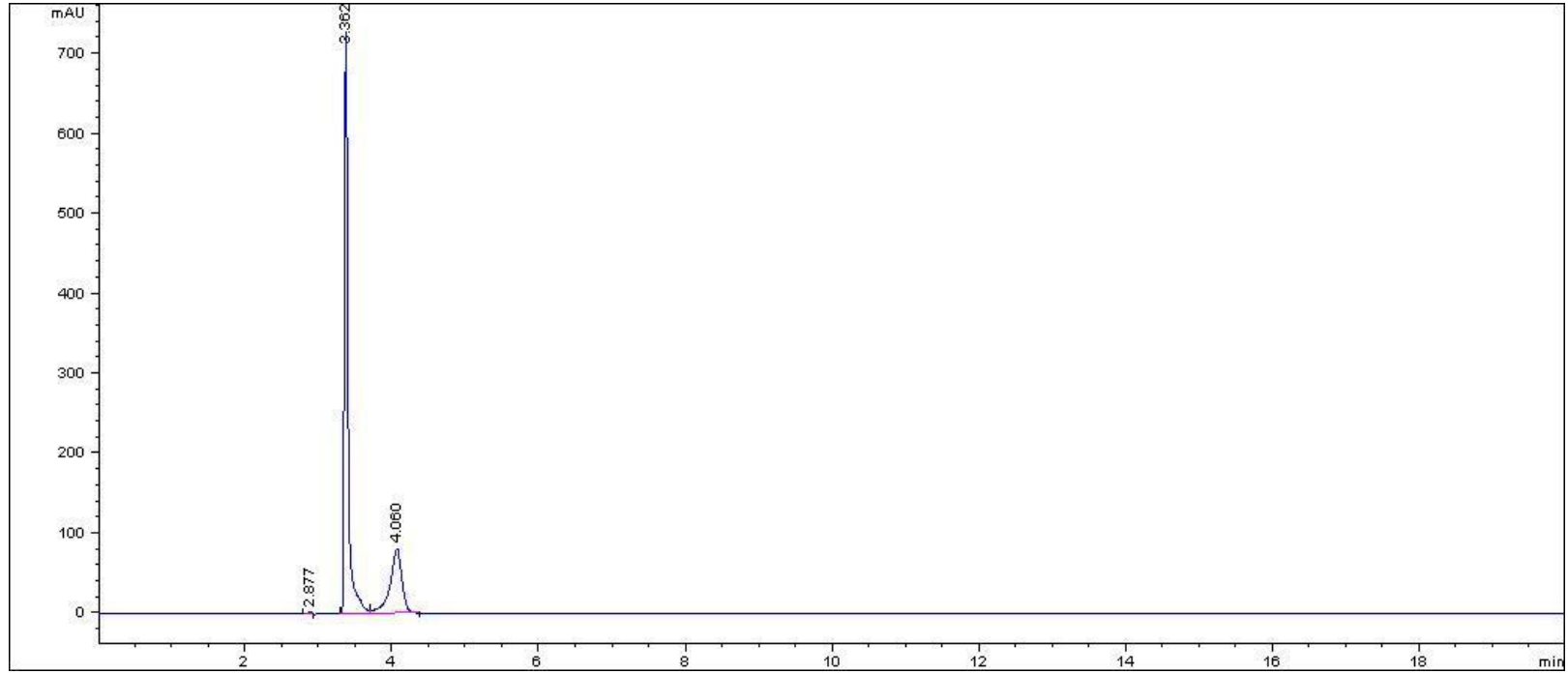
* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; O.S.H: Ortalama Standart Hata

Şikimik asit üzerinde yapılan mekanizma aydınlatma çalışmalarında, bileşiğin hiyaluronidaz enzim inhibisyonu göstererek yara iyileşmesine katkı sağladığı tespit edilmiştir.

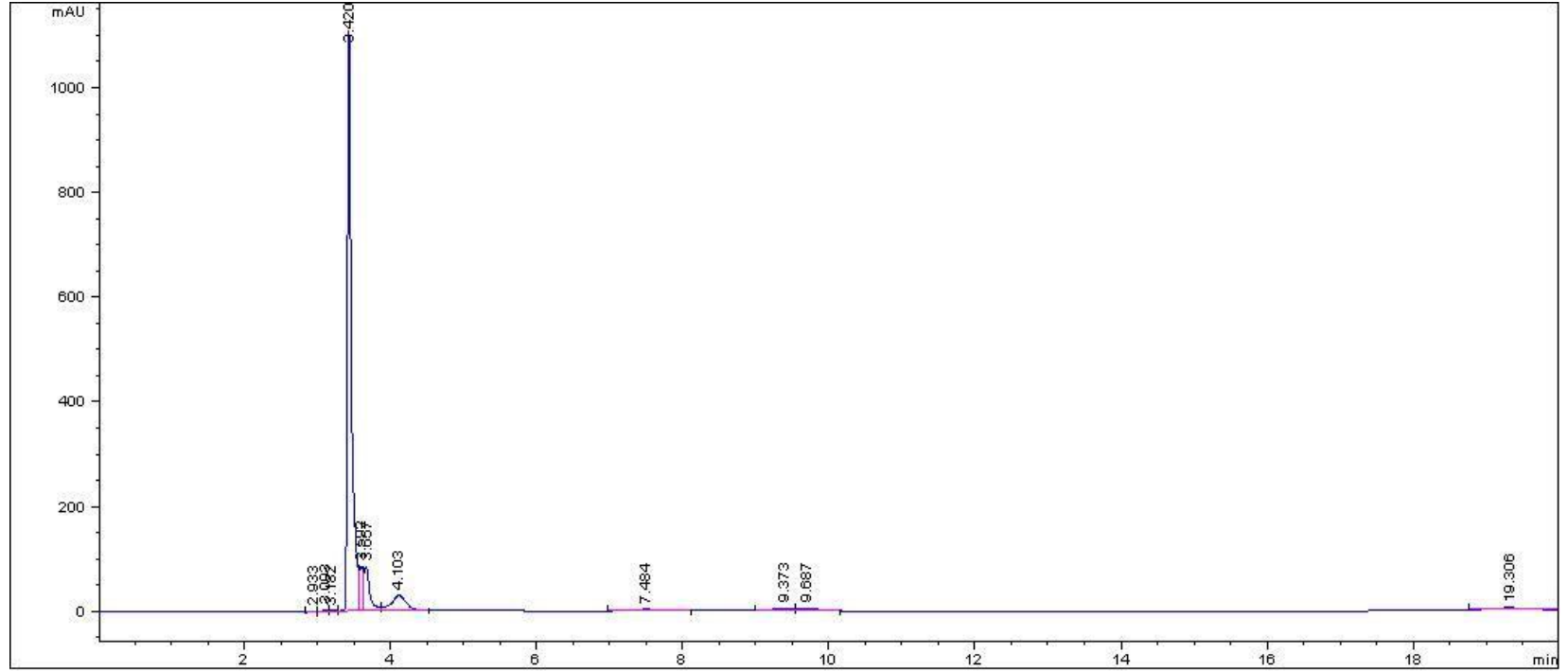
3.3. Teşhis ve Miktar Tayini Bulguları

İzole edilen madde olan şikimik asite ait HPLC kromatogramı ile çalışılan *Alnus* taksonlarının metanollü ekstrelerine ait HPLC kromatogramları Şekil 3.8-3.11 de verilmiştir.

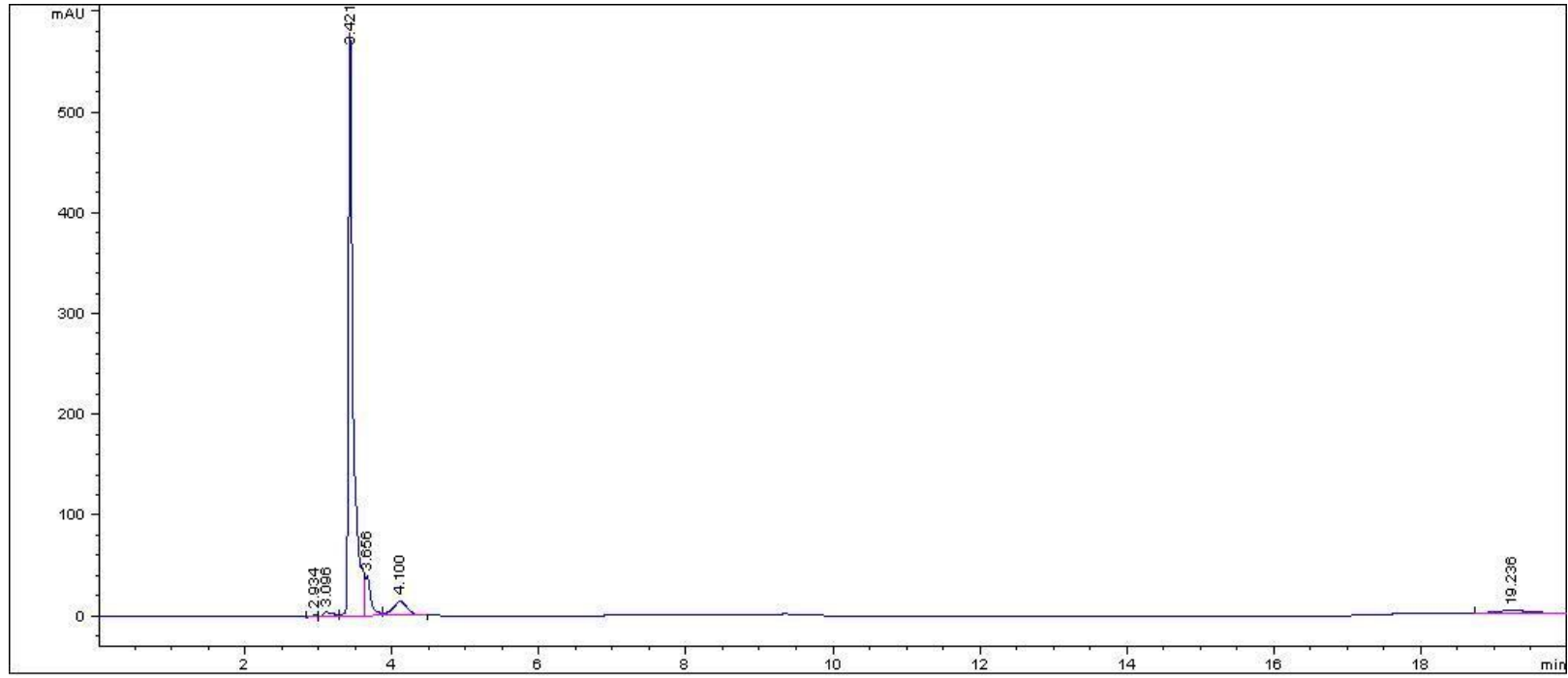
Şikimik asit için alıkonma zamanı 3,362 dak. olarak bulunmuştur. Ekstrelerin içerdiği şikimik asit miktarları Çizelge 3.11’de verilmiştir.



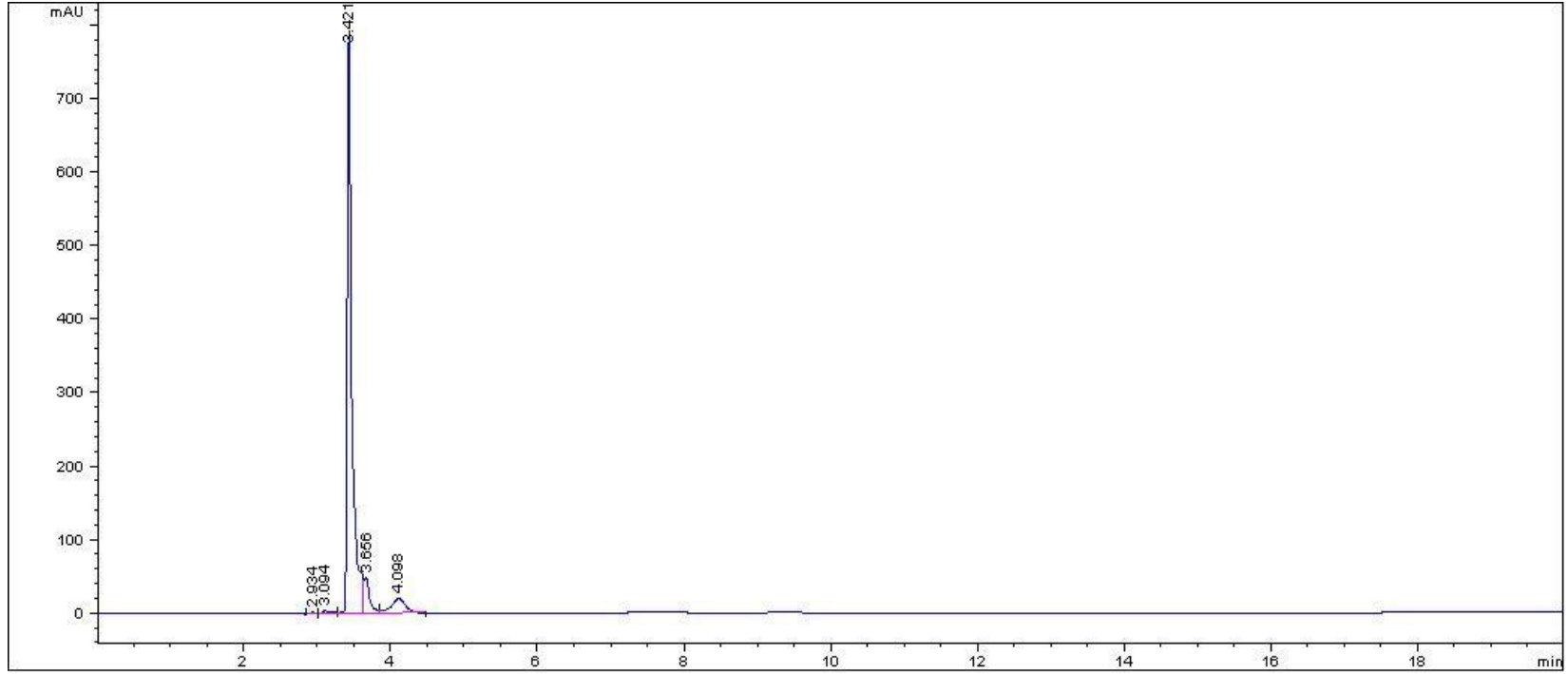
Şekil 3.8. Şikimik asit HPLC kromatogramı



Şekil 3.9. *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* metanol ekstresi HPLC kromatogramı



Şekil 3.10. *A. orientalis* var. *orientalis* metanol ekstresi HPLC kromatogramı



Şekil 3.11. *A. orientalis* var. *pubescens* metanol ekstresi HPLC kromatogramı

Çizelge 3.11. *Alnus* taksonlarının içerdiği şikimik asit miktarı

Bitki adı	Şikimik Asit (mg/ml)	Şikimik Asit (%a/a)
<i>A. glutinosa</i> subsp. <i>glutinosa</i>	0,1969	0,6491
<i>A. orientalis</i> var. <i>orientalis</i>	0,0739	0,2452
<i>A. orientalis</i> var. <i>pubescens</i>	0,1300	0,4309

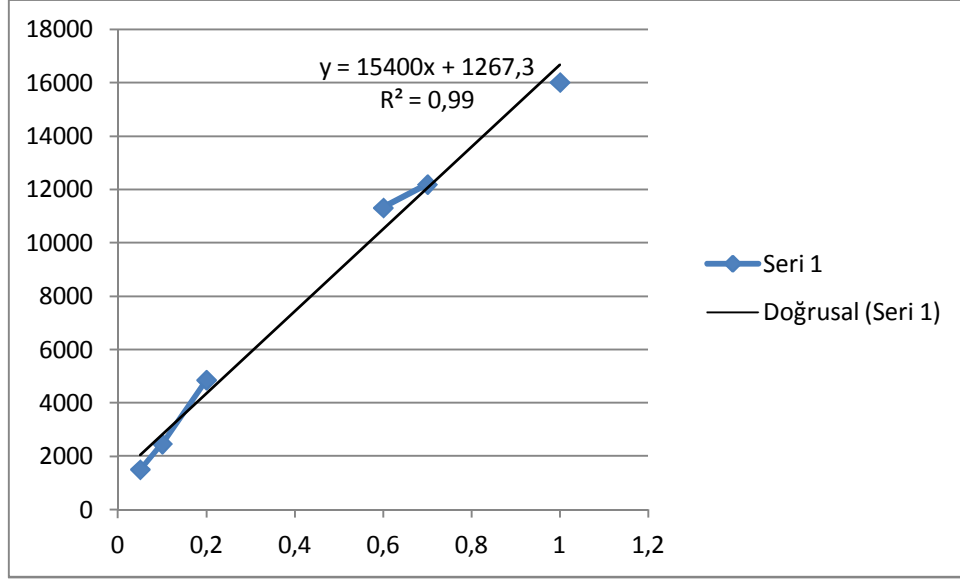
3.4. Yöntem Validasyon Bulguları

Validasyon bulguları doğrusallık (Çizelge 3.12.) , kesinlik (Çizelge 3.13.) ve TS-LOD (Çizelge 3.14.) hesaplamaları şeklinde verilmiştir.

Çizelge 3.12. Doğrusallık sonuçları

İzole Edilen Madde	λ	Kalibrasyon Denklemi	r^2	Eğim (%BSS)	Kesişim (%BSS)	LOQ $\mu\text{g/ml}$	LOD $\mu\text{g/ml}$
Şikimik Asit	210	$y=15400x+1267$	0,9900	1,032	2,098	8,000	2,700

$$\% \text{ BSS} = (\text{Standart Sapma/Ortalama}) \times 100$$



Şekil 3.12. Şikimik asit için kullanılan kalibrasyon denklemi ve grafiği

Çizelge 3.13. Yöntem validasyonu İçin kesinlik değerleri ve % Bağıl Standart Sapmaları (% BSS)

Standart	λ	Pik Alanı (Ortalama) Hesaplanabilir En Düşük Limitte (Tayin Alt Sınırı- TAS) (LOQ)	%BSS
Şikimik asit	210	467,778	2,670

Çizelge 3.14. Tayin Edilebilir En Düşük Limit (Teşhis Sınırı-TS) (LOD)

Standart	λ	Pik Alanı (Ortalama) Tayin Edilebilir En Düşük Limit (Teşhis Sınırı-TS) (LOD)	%BSS
Şikimik asit	210	180,825	3.086

4.TARTIŞMA

Yaşam kalitesini olumsuz etkileyen diyabetik ayak yaraları gibi güç kronik yaraların herhangi bir iz bırakmadan, düşük maliyet ile hızla iyileşmesini sağlamak üzere doğal kaynaklı veya sentetik maddelere ihtiyaç duyulmaktadır.

Türkiye’de pekçok bitkinin halk arasında yara iyileştirici amaçla yaygın olarak kullanıldığı yapılan etnobotanik çalışmalarda tespit edilmiştir. Anadolu halk kültüründe, *Alnus glutinosa* yapraklarının romatizma tedavisinde ve yara iyileştirici olarak kullanıldığı kayıtlıdır (Tuzlacı, 2006).

Alnus glutinosa yapraklarının halk arasındaki kullanımından yola çıkılarak çalışmamızda *A. glutinosa* subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis* ve *A. orientalis* var. *pubescens* yapraklarından hazırlanan metanollü ve sulu ekstraktların yara iyileştirici etkileri olup olmadığının belirlenmesi amacıyla *in vivo* yara iyileştirici aktivite yöntemlerinden çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon yara modelleri kullanılmıştır. Dairesel eksizyon yara modelinde, yara alanlarının küçülme oranları hesaplanarak test numunelerinin epitel oluşumu üzerindeki etkileri tespit edilmiştir. Çizgisel insizyon yara modeli, kolajen oluşumu ve sağlamlığı hakkında bilgi vermesi nedeniyle uygulanmıştır.

Çalışmalarımız yara iyileştirici aktivitesi yüksek bulunan *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* yaprakları metanollü ekstresi üzerinde “Biyolojik Aktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama (BAYF) ve İzolasyon Teknikleri” uygulanarak yürütülmüştür. Bu ekstreden BAYF çalışmaları kapsamında önce “Vakumlu Sıvı Kromatografisi (VLC)” yöntemi kullanılarak 5 ana fraksiyon elde edilmiş, aktif çıkan EtOAc: MeOH fraksiyonu silika jel kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlarına ayrılmıştır. Etkili fraksiyondaki major bileşiğin kimyasal yapısının aydınlatılması amacıyla ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve IR spektroskopisi yöntemlerinden yararlanılmıştır. Söz konusu yöntemlere ait spektrumlar Şekil 3.1.-3.3.’te verilmiştir.

İzole edilen bileşiğe ait IR spektrumu incelendiğinde 3400 cm^{-1} civarında fenolik OH bağları görülmektedir. 3200 cm^{-1} civarındaki OH gerilme pikleri de bunu doğrulamaktadır. 2880 cm^{-1} de yer alan pikler karboksilik asit fonksiyonunu göstermektedir. 1600 cm^{-1} civarındaki keskin pikler ise aromatik C=C bağına işaret etmekte olup $600-900\text{ cm}^{-1}$ pikleri yine aromatik zinciri göstermektedir (Şekil 3.3.).

Tüm spektrumlar göz önünde bulundurulduğunda, NMR spektrumuna ait pikler (Şekil 1-2) şikimik asit yapısını işaret etmekte olup IR spektrumundaki parmak izi bölgesi şikimik asit yapısını doğrulamıştır.

A. glutinosa subsp. *glutinosa* yapraklarından hazırlanan metanollü ekstrenin çizgisel insizyon yara modelinde % 42,79 oranında yara kuvvetini arttırdığı, dairesel eksizyon yara modelinde % 51,58 oranında kontraksiyon sağladığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.2., 3.3.). Elde edilen fraksiyonların ve şikimik asitin yara iyileştirici aktiviteleri aynı deney modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir. İnsizyon yara modelinde, EtOAc:MeOH fraksiyonunun % 36,27; Fr. 27-38'in % 28,29 ve şikimik asitin % 24,33 oranında yara gerilim kuvvetini arttırdığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.2.). Aynı fraksiyonların ve şikimik asitin eksizyon yara modelinde de paralel etki göstererek sırasıyla % 66,21, % 43,73, % 47,07 oranlarında kontraksiyon oluşturdıkları belirlenmiştir (Çizelge 3.3.).

Kolajen yaranın hızlı bir şekilde iyileşmesi için gerekli olan ekstraselüler matriks proteinlerinden biridir. Kolajeni oluşturan aminoasitlerden olan hidroksiprolinin yara alanındaki miktarı kolajen miktarının tespit edilmesi açısından değerlendirilmiştir. Metanollü ekstre, EtOAc:MeOH fraksiyonu, Fr. 27-38 ve şikimik asit ile hazırlanan merhemler ile tedavi edilen dokuların hidroksiprolin düzeyinin anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.4.).

Histopatolojik incelemelerde, inflamasyon, proliferasyon ve remodelleme fazları göz önünde bulundurulduğunda iyileşmenin düzgün seyrettiği gruplar, *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* yaprakları metanollü ekstresi (MB), EtOAc:MeOH, Fr. 27-38 ve şikimik asit ile hazırlanan merhemler ile tedavi edilen gruplar olarak belirlenmiştir

(Çizelge 3.5., Şekil 3.4.-3.7.). Bu gruplarda kendini gösteren iyileşme ile birlikte reparatif görünüm tespit edilmiştir. Baz merhem ve negatif kontrol gruplarında yara iyileşmesi bakımından zayıf bir durum gözlenirken bu gruplar dışında kalan diğer gruplardaki iyileşmenin düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Grupların tümü dikkate alındığında inflamasyon ve proliferasyon evresinin baskın olduğu, bununla beraber bazı hayvanlarda, grubun tamamını yansıtmayacak şekilde, yoğun kolajen birikimleri ve neovaskülarizasyon göze çarparken yara bölgelerinin hem mononükleer hem de polimorfonükleer hücreler bakımından hipersellüler bir görünüm sergilediği saptanmıştır.

Ekstre ve fraksiyonların antienflamatuvar etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla asetik asit-nedenli kapiller permeabilitenin inhibisyonuna dayanan Whittle Yöntemi; karragen-nedenli arka ayak ödemi ve TPA-nedenli kulak ödemi deneyleri uygulanmıştır. Sonuçlar, Whittle Yöntemi'nde *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarının metanollü ekstresinin % 30,22; EtOAc: MeOH fraksiyonunun % 32,46; Fr. 27-38'in % 38,24 ve şikimik asitin % 27,19 oranlarında anlamlı derecede inhibisyon etkisi göstererek antienflamatuvar etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Karragen-nedenli arka ayak ödemi testinde elde edilen sonuçlar, Whittle Yöntemi kullanılarak elde edilen bulgular ile paralellik göstermiştir. Ancak TPA-nedenli kulak ödemi testinde hiçbir ekstre ve fraksiyonun anlamlı derecede aktivite göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 3.6.-3.8.). TPA gecikmeli bir başlangıç ve uzun süren bir cevap oluşturur. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, TPA-nedenli enflamasyonun lipoksijenaz tarafından sentezlenen lökotrienler (LT) ile bağlantısının olduğu düşünülmektedir. TPA fare derisinde, güçlü bir şekilde LTC₄, LTD₄ ve LTE₄ miktarının artmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda ekstre ve fraksiyonların TPA-nedenli kulak ödemi testinde inaktif olduğu ve dolayısı ile antienflamatuvar etkinin lökotrien sentezinin inhibisyonu ile ilgili olmadığı düşünülmüştür (Deliorman Orhan ve ark., 2007).

Antioksidan etkili bileşikler lipit peroksidasyonunu inhibe etmek suretiyle hücre hasarını önleyerek yara iyileşmesine katkı sağlamaktadır (Getie ve ark, 2002; Shetty ve ark., 2008). Bu amaçla çalışmamızda antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi

amacıyla DPPH ve ABTS+. üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini, indirgenme gücünün belirlenmesi ve spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasına dayanan yöntemler kullanılmıştır. Bu deneylere ait bulgular Çizelge 3.9.'da gösterilmiş olup, *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarının metanollü ekstresinin, EtOAc:MeOH fraksiyonu, Fr.27-38 ve şikimik asitin antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Hiyoluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri yara iyileşmesinde önemli olan hiyoluronik asit, kolajen ve elastinin enzimatik yıkımına neden olmaktadır. Yara iyileşmesi sürecinde bu enzimlerin minimal seviyede tutulması oldukça önemlidir. Yara iyileştirici aktivite mekanizmasını aydınlatmak amacıyla etkili fraksiyondan izole edilen şikimik asitin *in vitro* hiyoluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzim inhibitör etkileri değerlendirilmiştir. Şikimik asitin 100 µg/ml dozda % 38,24 oranında hiyoluronidaz enzim inhibisyonu gösterdiği, ancak kolajenaz ve elastaz enzimleri üzerinde anlamlı derecede inhibisyon oluşturmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.10.).

Alnus türleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında bu türlerin antioksidan, sitotoksik, hepatoprotektif ve antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Sati ve ark., 2011; Ludwiczuk ve ark., 2011; Tung ve ark., 2010). Özellikle *A. japonica* yaprak ve kabuklarından hazırlanan ekstrenin iNOS ve COX-2 inhibisyonu yaptığı, *A. hirsuta* yaprak ekstresi ve *A. firma*'nın kabuklarından elde edilen metanollü ekstrenin ise NO üretimini anlamlı şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Choi ve ark., 2011; Sati ve ark., 2011). Başka bir çalışmada, *A. glutinosa* kozalaklarından elde edilen elajitanenlerin hepatoprotektif, antienflamatuvar ve antioksidan etki gösterdiği rapor edilmiştir (Sati ve ark., 2011). Çalışmamızda elde edilen biyolojik aktivite sonuçları bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Alnus türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda bu türlerin flavonoidler, stilben türevleri, hidroksi sinamik asit-spermidin amidleri, tanenler, steroidler, triterpenik asitler, saponinler, sekodamaran tip triterpenler, diaril heptanoidler, ve ksanton türevi bileşikler içerdiği tespit edilmiştir (Peres ve ark., 2000; Guz ve ark., 2002). *A. glutinosa* kabuklarından diarilheptanoit yapısına sahip oregonin,

tohumlarından yine diarilheptanoit türevi bileşikler olan hirsutanolol ile flavon türevi bir bileşik olan genkwanin izole edilmiştir (Guz ve ark., 2002; O'Rourke ve ark., 2005). Yapılan literatür taramalarında *A. glutinosa* bitkisinden şikimik asitin izole edildiğini rapor eden herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup, bu çalışma, *A. glutinosa* bitkisinden hareketle şikimik asitin izole edildiği ilk çalışmadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli bitkilerden izole edilen şikimik asitin COX-1 ve COX-2 enzimleri üzerinde minör inhibitör etki gösterdiği, IFN- γ ve lipopolisakkarit ile stimüle edilmiş RAW 264.7 hücreleri üzerinde nitrik oksit ve PGE₂ üretimini inhibe ettiği, antipiretik, antienflamatuvar ve analjezik etki gösteren çeşitli polaritelerdeki *Schinus polygamus* ekstrelerinde yapılan izolasyon çalışmalarında izole edilen bileşikler arasında şikimik asitin de yer aldığı rapor edilmiştir (Orhan ve ark., 2012; Erazo ve ark., 2006). Bir başka çalışmada şikimik asitin antioksidan etkisine bağlı olarak sıçanlarda asetik asit ile indüklenen kolit üzerinde koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (Xing ve ark., 2012).

Bu çalışmada *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarından elde edilen metanollü ekstrenin diğer *Alnus* taksonlarına göre daha güçlü antioksidan, antienflamatuvar ve yara iyi edici etkisi olduğu belirlenmiş ve bu etkiden sorumlu majör bileşiğin şikimik asit olduğu tespit edilmiştir. Şikimik asitle ilgili daha önce yapılan çalışmalar ile bu çalışma sonucu elde edilen veriler birbirini destekler niteliktedir.

A. glutinosa subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *pubescens* ve *A. orientalis* var. *orientalis* yapraklarında bulunan şikimik asitin kantitatif olarak tayin edilmesi amacı ile HPLC yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonucu şikimik asit içeriği bu üç taksonun yapraklarında sırasıyla % 0,6491, % 0,4309 ve % 0,2452 olarak saptanmıştır. Yapılan literatür araştırmasında *A. japonica* yapraklarından şikimik asit türevi olan 5-*O*-galloil(-)-şikimik asit bileşiğinin izole edildiği (Lee ve ark., 1992) rapor edilmiş olmasına rağmen *Alnus* türlerinden şikimik asit izole edildiğine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biyolojik aktivite çalışma sonuçları ile taksonların içerdikleri şikimik asit miktarlarına bakıldığında en yüksek etki en fazla şikimik asit

içeren taksonda (*A. glutinosa* subsp. *glutinosa*) görülmüştür. Bu sonuç etkiden sorumlu olan majör bileşimin şikimik asit olduğunu doğrulamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Betulaceae familyasında yer alan *Alnus* Miller cinsi dünyada yaklaşık olarak 35 tür ile temsil edilmekte olup kuzey yarımkürenin sıcak bölgelerinde dağılım göstermektedir (Ludwiczuk ve ark., 2011). Ülkemizde ise *Alnus* cinsi iki tür ve altı takson ile temsil edilmektedir (Davis, 1982; Davis, 2000).

Alnus türleri, Türkiye’de ve dünyada önemli etkileri nedeni ile kullanılıyor olmasına ve bazı türler üzerinde kimyasal içerik ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmış olmasına rağmen, Türkiye’de yetişen *A. glutinosa* alt türleri ve *A. orientalis* üzerinde yapılmış herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasına rastlanmamıştır. Bu araştırma ülkemizde yetişen bazı *Alnus* taksonları üzerinde yapılmış bu konudaki ilk ve tek kapsamlı çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Son yıllarda başta bitkiler olmak üzere doğal kaynaklardan elde edilen ürünlerle tedaviye karşı giderek artan bir ilgi oluşmuştur. Bu ilgi sonucu doğal kaynaklardan elde edilen ürünleri gelişigüzel kullanan kişilerde çok ciddi yan etkiler olduğu rapor edilmektedir. Bu nedenle halk ilacı olarak kullanılan bitkilerin bilimsel platformda incelenmesi hem geleneksel kullanımın bilimsel verilerle desteklenmesi hem de tedaviye sunulabilecek etkili, kaliteli ve güvenli yeni bileşikler geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir.

Bu çalışma kapsamında, halk ilacı olarak kullanılan *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* bitkisinin yapraklarının metanollü ekstresi üzerinde gerçekleştirilen yara iyileştirici, antienflamatuvar ve antioksidan etki çalışmaları sonucunda elde edilen veriler bitkinin geleneksel kullanımını desteklemektedir. Yine literatür araştırmalarında söz konusu bitki üzerinde yara iyileştirici ve antienflamatuvar etki açısından, bitkiden etkili bileşiğe kadar giden böyle bir çalışmaya rastlanılmamış olması çalışmamızın orijinallliğini göstermektedir.

Bu çalışmayı takiben *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarından hareketle standardize ekstre hazırlanmasına yönelik çalışmalar yapılmasının tedaviye sunulabilecek yeni ürünler geliştirilmesi açısından önemli olduğu ve böyle bir ekstrenin hazırlanarak piyasaya verilebilmesi durumunda ekonomiye katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Türkiye’de Yetişen Bazı *Alnus* Miller Taksonları Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

Betulaceae familyasında yer alan *Alnus* Miller cinsi dünyada yaklaşık olarak 35 tür ile temsil edilmekte olup kuzey yarımkürenin sıcak bölgelerinde dağılım göstermektedir. Türkiye’de ise *Alnus* cinsine ait altı takson doğal olarak yetişmektedir.

Alnus türleri dünyada halk arasında antiperspirant olarak, kronik herpes, ekzema ve kaşıntılı deri hastalıkları gibi çeşitli cilt rahatsızlıklarında, diş apselerinde, tırnak enflamasyonu, romatizma ve hemoroid tedavisinde, yara iyileştirici ve ateş düşürücü olarak, rahim kanserinde ve çeşitli tümörlere karşı olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır. Türkiye’de ise halk arasında *A. glutinosa* yaprakları ezildikten sonra haricen kesik ve yara tedavisinde, yapraklardan hazırlanan infüzyon ise günde 3 öğün birer bardak içilerek romatizma tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Türkiye’de yetişen *A. glutinosa* subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis* ve *A. orientalis* var. *pubescens* bitkisinin yapraklarından hazırlanan sulu ve metanollü ekstratlar üzerinde yara iyileştirici, antienflamatuvar ve antioksidan etki çalışmaları yapılmış, daha yüksek etki gösteren *A. glutinosa* subsp. *glutinosa* yapraklarının metanollü ekstresi, biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama (BAYF) tekniği ile fraksiyonlanmıştır. Çalışma sonucunda izole edilen ve yapısı NMR ve IR spektroskopisi yöntemleri kullanılarak tayin edilen şikimik asitin etkiden sorumlu majör bileşik olduğu tespit edilmiştir.

Aynı bitkilerin metanollü ekstratları üzerinde yapılan kromatografik çalışmalarda yaprakların içerdiği şikimik asit miktarı kantitatif olarak tayin edilmiştir.

Bu alışma ülkemizde yetişen bazı *Alnus* taksonlarının yara iyi edici, antienflamatuvar ve antioksidan zelliklerinin araştırıldığı ilk ve tek alışmadır.

Anahtar Szckler: *Alnus* , antienflamatuvar, antioksidan, Betulaceae, izolasyon, yara iyileştirici

SUMMARY

Pharmacognostical Investigations on Some *Alnus* Miller Taxons Growing in Turkey

The genus *Alnus* Miller, belongs to Betulaceae family, consists of about 35 species and is distributed in temperate regions of the northern hemisphere. There are six taxones of *Alnus* species growing wild in Turkey.

Alnus species have been used as anti-perspirant and for the treatment of rheumatism, hemorrhoids, uterus cancer, dental abscesses, and various skin diseases such as chronic herpes, eczema, prurigo and nail inflammation and for wound healing in folk medicine. In Turkey, the leaves of *Alnus glutinosa* have been used as a folk remedy to treat wounds and cuts, and one glass of the infusion of leaves is drunk three times per day to treat rheumatism.

In this study, the aqueous and methanolic extracts of *A. glutinosa* subsp. *glutinosa*, *A. orientalis* var. *orientalis* and *A. orientalis* var. *pubescens* leaves were evaluated for their wound healing, anti-inflammatory and antioxidant activities. Methanolic extract of the leaves of *A. glutinosa* subsp. *glutinosa*, the most potent extract, was fractionated by bioassay-guided fractionation technique. The structure of the isolated compound was determined as shikimic acid by using NMR and IR analysis. Shikimic acid was found to be the major compound responsible from the activity.

Quantitative analysis of shikimic acid found in the leaf methanolic extracts of the same plants were performed by using HPLC method.

This is the first and unique study that investigates wound healing, anti-inflammatory and antioxidant effects of some *Alnus* taxons growing in Turkey.

Keywords: *Alnus*, Antiinflammatory, Antioxidant, Betulaceae, Isolation, Wound Healing

KAYNAKLAR

- AGUILAR M. I., ROVELO R., VERJAN J. G., ILLESCAS O., BAEZA A.E., DE LA FUENTE M., AVILA I., NAVARRETE A. (2011). Anti-inflammatory activities, triterpenoids, and diarylheptanoids of *Alnus acuminata* ssp. *arguta*, *Pharmaceutical Biology*, **49(10)**: 1052-1057
- ALAN Ş. (2010). Türkiye Corylaceae ve Betulaceae Familyaları Polenlerinin Biyokimyasal ve Morfolojik Özellikleri, (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
- ALBAYRAK S., SAĞDIÇ O., AKSOY A. (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **26(4)**: 401-409
- AOKI T., OHTA S., SUGA T. (1990). Triterpenoids, Diarylheptanoids and Their Glycosides In The Flowers of *Alnus* Species, *Phytochemistry*, **29(11)**: 3611-3614
- ASAKAWA Y. (1971). Chemical constituents of *Alnus sieboldiana* (BETULACEAE) II. The Isolation and Structure of Flavonoids and Stilbenes, *Bulletin of The Chemical Society of Japan*, **44**: 2761-2766
- BARRANTES E, GUINEA M. (2003). Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel, *Life Sciences*, **72**: 843-50
- BARTON G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system, *The Journal of Clinical Investigation*, **118(2)**: 413-420
- BEG S., SWAIN S., HASAN H., BARKAT M. A., HUSSAIN M. S. (2011). Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives, *Pharmacognosy Review*, **5(10)**: 120-137
- BENZIE I. F. F., STRAIN J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, **239**: 70-76
- BURNS J. L., MANCOLL J. S., PHILLIPS L. G. (2003). Impairments to wound healing, *Clinics In Plastic Surgery*, **30**: 47-56
- BÜYÜKTUNCEL, E. (2013). Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Başlıca Spektrofotometrik Yöntemler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, **17**: 93-103
- CHANDA S., DAVE R. (2009). *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview, *African Journal of Microbiology Research*, **3(13)**: 981-996
- CHOI S. E., PARK K. H., JEONG M. S., KIM H. H., LEE D. I., JOO S. S., LEE C. S., BANG H., CHOI Y. W., LEE M., SEO S. J., LEE M. W. (2010). Effect of *Alnus japonica* extract on a model of atopic dermatitis in NC/Nga mice., *Journal of Ethnopharmacology*, **136(3)**: 406-13

- CHOI J. G., LEE M. W., CHOI S. E., KIM M. H., KANG O. H., LEE Y. S., CHAE H. S., OBIANG-OBOUNOU B., OH Y. C., KIM M. R., SHIN D. W., LEE J. H., KWON D.Y. (2012). Antibacterial activity of bark of *Alnus pendula* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **16**: 853-859
- DAVIS, P. H. (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.7, Edinburg: Edinburg University Press, s.: 691-693
- DAVIS, P. H. (2000). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.11, Edinburg: Edinburg University Press, s.: 216
- DEĞİM Z., ÇELEBİ N., SAYAN H., BABÜL A., ERDOĞAN D., TAKE G. (2002). An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation, *Amino Acids*, **22**: 187-98
- EDWARDS J. V., HOWLEY P., COHEN I. K. (2004). *In vitro* inhibition of human neutrophil elastase by oleic acid albumin formulations from derivatized cotton wound dressings, *International Journal of Pharmaceutics*, **284**: 1-12
- EDWIN S., EDWIN JARALD E. E., DEB L., JAIN A., KINGER H., DUTT K. R., AMAL RAJ A. (2008). Wound Healing and Antioxidant Activity of *Achyranthes aspera*, *Pharmaceutical Biology*, **46(12)**: 824-828
- FLANAGAN M. (2000). The physiology of wound healing, *Journal of Wound Care*, **9(6)**: 299-300
- GETIE M., GEBRE MARIAM T., REITZ R., NEUBERT R. H. (2002). Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonea viscosa* (Sapindaceae), *Pharmazie*, **57**: 320–322.
- GOMES A., FERNANDES E., LIMA J. F. C., MIRA L., CORVO M. L. (2008). Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids, *Current Medicinal Chemistry*, **15(16)**: 1586-1605
- GUYTON D.C., HALL J. E. (1996). Tıbbi Fizyoloji, 9. Edisyon, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.
- GUZ N. R., LORENZ P., METRAUX J-P. (2002). Oregonin from the bark of European *Alnus* species, *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**: 471-474
- HA R., AZMATHULLA M., BAIDYA M., ASAD M. (2010). Wound healing activity of human urine in rats, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **1(3)**: 750-758
- HAMMOND G. B., FERNANDEZ I. D., VILLEGAS L. F., VAISBERG A. J. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas, Department of Ancash, Peru, *Journal of Ethnopharmacology*, **61**: 17-30
- HANAWA F., TOWERS G. H. N. (2003). Flavones from *Alnus rubra* Bong. seed coat, *Bulletin of FFPRI*, **2(2)**: 85-91

- HEMALATHA S., LALITHA P., ARULPRIYA P. (2010). Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothos aurea* (Linden ex Andre), *Der Pharma Chemica*, **2(6)**: 84-89
- HU W., WANG M. H. (2011). Antioxidative activity and anti-inflammatory effects of diarylheptanoids isolated from *Alnus hirsuta*, *Journal of Wood Science*, **57(4)**: 323-330
- IVANOV S.A., NOMURA K., MALFANOV I. L., PTITSYN L. R. (2012). Glutinoin, a novel antioxidative ellagitannin from *Alnus glutinosa* cones with glutinoic acid dilactone moiety, *Natural Product Research*, **26(19)**: 1806-1816
- JIN W., CAI X. F., NA M., LEE J. J., BAE K. (2007). Triterpenoids and diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit HIF-1 in AGS cells, *Archives of Pharmacal Research*, **30(4)**: 412-418
- JOHNSTONE CC, FARLEY A., HENDRY C. (2005). The physiological basics of wound healing, *Nursing Standard*, **19(43)**: 59-65
- JO H., CHOI S. J., JUNG S. H. (2013). Protective effects of a compound isolated from *Alnus japonica* on oxidative stress-induced death in transformed retinal ganglion cells, *Food and Chemical Toxicology*, **56**: 425-435
- JOO S. S., KIM S. G., CHOI S. E., KIM Y. B., PARK H. Y., SEO S. J., CHOI Y. W., LEE M. W., LEE DO I. (2009). Suppression of T cell activation by hirsutenone, isolated from the bark of *Alnus japonica*, and its therapeutic advantages for atopic dermatitis, *European Journal of Pharmacology*, **614(1-3)**: 98-105
- KARASU A., BAKIR B. (2008). Yara ve Yara İyileşmesi, *Veteriner Cerrahi Dergisi*, **14(1)**: 36-43
- KONDO T., ISHIDA Y. (2010). Molecular pathology of wound healing, *Forensic Science International*, **203**: 93-98
- KUNWAR A., PRIYADARSINI K.I. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health, *Journal of Medical&Allied Sciences*, **1(2)**: 53-60
- KUO C., LEE C., LAI Y., LEE S. (2008). Determination of oregonin in *Alnus* plants and biological samples by capillary electrophoresis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **47**: 195-200
- KÜPELİ AKKOL E., SÜNTAR İ., KELES H., YEŞİLADA E. (2011). The potential role of female flowers inflorescence of *Typha domingensis* Pers. in wound management, *Journal of Ethnopharmacology*, **133**: 1027-1032
- KÜPELİ E. (2000). *Berberis crataegina* DC. Bitkisinin Romatizma Tedavisindeki Etkisi Üzerinde Çalışmalar, (Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı
- LAI Y-C., CHEN C-K., LIN W-W., LEE S-S. (2012). A comprehensive investigation of anti-inflammatory diarylheptanoids from the leaves of *Alnus formosana*, *Phytochemistry*, **73(1)**: 84-94

- LEE M-W., TANAKA T., NONAKA G-I. (1992). Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica*, *Phytochemistry*, **31(8)**: 2835-2839
- LEE M-W., PARK M-S., JEONG D-W., KIM K-H., KIM H-H., TOH S-H. (2000). Diarylheptanoids from the leaves of *Alnus hirsuta* Turcz, *Archives of Pharmacol Research*, **23(1)**: 50-53
- LEE S-L., HUANG W-J, LIN W. W., LEE S-S., CHEN C-H. (2005 a). Preparation and anti-inflammatory activities of diarylheptanoid and diarylheptylamine analogs, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, **13**: 6175-6181
- LEE W. S., KIM J-R., IM K-R., CHO K-H., SOK D-E., JEONG T-S. (2005 b). Antioxidant Effects of Diarylheptanoid Derivatives from *Alnus japonica* on Human LDL Oxidation, *Planta Medica*, **71(4)**: 295-299
- LEE M., LEE K. M., KIM Y. C., SUNG S. H. (2011). Antifibrotic constituents of *Alnus firma* on hepatic stellate cells, *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **21**: 2906-2910
- LI J., CHEN J., KIRSNER R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing, *Clinics in Dermatology*, **25**: 9-18
- LIM S. S., LEE M. Y., AHN H. R., CHOI S. J., LEE J. Y., JUNG S. H. (2011). Preparative isolation and purification of antioxidative diarylheptanoid derivatives from *Alnus japonica* by high-speed counter-current chromatography, *Journal of Separation Science*, **34(23)**: 3344-3352
- LODHI S., PAWAR R. S., JAIN A. P., SINGHAI A. K. (2006). Wound healing potential of *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **108**: 204-10
- LOI M. C., POLI F., SACCHETTI G., SELENU M. B., BALLERO M. (2004). Ethnopharmacology of Ogliastro (Villagrande Strisaili, Sardinia, Italy), *Fitoterapia*, **75**: 277-295
- LUDWICZUK A., SAHA A., KUZUHARA T., ASAKAWA Y. (2011). Bioactivity guided isolation of anticancer constituents from leaves of *Alnus sieboldiana* (Betulaceae), *Phytomedicine*, **18(6)**: 491-498
- LV H., SHE G. (2012). Naturally Occuring Diarylheptanoids- A Supplementary Version, *Records of Natural Products*, **6(4)**: 321-333
- MELZIG M.F., LOSER B., CIESIELSKI S. (2001). Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants, *Pharmazie*, **56**: 967-70
- MENKE N.B., WARD K.R., WITTEN T.M., BONCHEV D.G., DIEGELMANN R.F. (2007). Impaired wound healing, *Clinics in Dermatology*, **25**: 19-25
- MIDDLETON P., STEWART F., AL-QAHTANI S., EGAN P., O'ROURKE C., ABDULRAHMAN A., BYRES M., MIDDLETON M., KUMARASAMY Y., SHOEB M., NAHAR L., DELAZAR A., SARKER S. D. (2005). Antioxidant, Antibacterial Activities and General Toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2**: 81-86

- MITTAL A., SARDANA S., PANDEY A. (2013). Herbal Boon For Wounds, *International Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5(2)**: 1-12
- MUSHKINA O. V., GURINA N. S., KONOPLEVA M. M., BYLKA W., MATLAWSKA I. (2013). Activity and total phenolic content of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* leaves, *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, **12(3)**: 3-11
- NEVES J.M., MATOS C., MOUTINHO C., QUEIROZ G., GOMES L.R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Tras-os-Montes (northern of Portugal), *Journal of Ethnopharmacology*, **124**: 270-283
- ÖZBEK H., ÖZTÜRK A. (2003). Antienflamatuvar Etkinliğin Ölçülmesinde Kullanılan Yöntemler, *Van Tıp Dergisi*, **10(1)**: 23-28
- ÖZKORKMAZ G. E., ÖZAY Y. (2009). Yara İyileşmesi ve Yara İyileşmesinde Kullanılan Bazı Bitkiler, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **2(2)**: 63-67
- PANDA V., SONKAMBLE M., PATIL S. (2011). Wound healing activity of *Ipomoea batatas* tubers (sweet potato), *Functional Foods in Health and Disease*, **10**: 403-415
- PARK D., KIM H. J., JUNG S. Y., YOOK C. S., JIN C., LEE Y. S. (2010). A new diarylheptanoid glycoside from the stem bark of *Alnus hirsuta* and protective effects of diarylheptanoid derivatives in human HepG2 cells, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, **58(2)**: 238-41
- PARK J. Y., JEONG H. J., KIM J. H., PARK S. J., KIM D., PARK K. H., LEE W.S., RYU Y. B. (2012). Diarylheptanoids from *Alnus japonica* inhibit papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **35(11)**: 2036-2042
- PATEL M., MURUGANANTHAN, GOWDA S. K. (2012). *In Vivo* Animal Models in Preclinical Evaluation of Anti-Inflammatory Activity- A Review, *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, **1(2)**: 1-5
- PATTANAYAK S.P., MITRA MAZUMDER P., SUNITA P. (2012). Total Phenolic Content and in vitro antioxidant activities of *Dendrophthoe falcata* (L.f.) Ettingsh, *Research Journal of Medicinal Plant*, **6(2)**: 136-148
- PEEV C. I., VLASE L., ANTAL D. S., DEHELEAN C. A., SZABADAI Z. (2007). Determination of Some polyphenolic Compounds In Buds of *Alnus* and *Corylus* Species by HPLC, *Chemistry of Natural Compounds*, **43(3)**: 259-262
- PETERS P., COOPER C., MAIORANA K., GRAEME M. L. (1977). The effect of topically applied agents on ultraviolet erythema in guinea pigs, *Agents and Actions*, **7(5-6)**: 545-553
- PHAN M. G., TRUONG T. T. C., PHAN T. S., MATSUNAMI K., OTSUKA H. (2010). Mangiferonic acid, 22-hydroxyhopan-3-one, and physcion as specific chemical markers for *Alnus nepalensis*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **38**: 1065-1068.
- RASHED K., SUCUPIRA A. C. C., NETO J. M. M., FEITOSA C. M. (2013). Evaluation of Acetylcholinesterase inhibition by *Alnus rugosa* L. stems methanol extract and phytochemical content, *International Journal of Biomedical And Advance Research*, **4(9)**: 606-609.

- RASİK A. M., RAGHUBIR R., GUPTA A., SHUKLA A., DUBEY M. P., SRIVASTATA S., JAIN H. K., KULSHRESTHA D. K. (1999). Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs, *Journal of Ethnopharmacology*, **68**: 261-6
- ROZE L., BIKOVENS O., TELYSHEVA G. (2011). Determination and Separation of Diarylheptanoids from Alder Growing In Latvia, *Environment. Technology. Resources. Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference*. **(1)**: 329-332
- SA R. C., ANDRADE L. N., SOUSA D. P. (2013). A review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes, *Molecules*, **18**: 1227-1254
- SADAF F., SALEEM R., AHMED M., AHMAD S. I., NAVAIID-UL Z. (2006). Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in guinea pigs, *Journal of Ethnopharmacology*, **107**: 161-3
- SAHASRABUDHE A., DEODHAR M. (2010). Anti-hyaluronidase, Anti-elastase Activity of *Garcinia indica*, *International Journal of Botany*, **6(3)**: 299-303
- SATI S.C., SATI N., SATI O. P. (2011). Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*, *Pharmacognosy Review*, **5(10)**: 174-183
- SHETTY S., UDUPA S., UDUPA L. (2008). Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of *Ocimum sanctum* Linn in rats, *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, **5**: 95–101
- SHRIMANKER M., PATEL N., MODI H., DAVE R. (2013). A Review: Screening Models for Wound Healing Activity in Animals, *American Journal of Pharmatech Research*, **3(3)**: 237-251
- SINGHAL M., PAUL A., SINGH P. H., DUBEY S.K., GAUR K. (2011). Evaluation of Reducing Power Assay of Chalcone Semicarbazones, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **3(3)**: 639-645
- STEVIC T., SAVIKIN K., ZDUNIC G., STANOJKOVIC T., JURANIC Z., JANKOVIC T., MENKOVIC N. (2010). Antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activity of *Alnus incana* (L.) ssp. *incana* Moench and *A. viridis* (Chaix) DC ssp. *viridis* extracts, *Journal of Medicinal Food*, **13(3)**: 700-704
- SUGUNA L., SINGH S., SIVAKUMAR P., SAMPATH P., CHANDRAKASAN G. (2002). Influence of *Terminalia chebula* on dermal wound healing in rats, *Phytotherapy Research*, **16**: 227-31
- SÜNTAR I., BALDEMİR A., COSKUN M., KELES H., AKKOL E. K. (2011 a). Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey, *Journal of Ethnopharmacology*, **135(1)**: 63-70
- SÜNTAR İ. (2011 b). Türkiye’de Halk Arasında Yara İyileştirici Amaçla Kullanılan Bazı Bitkilerin Aktiviteleri Üzerinde Araştırmalar, (Doktora Tezi), Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognosi Anabilim Dalı
- TANKER N., KOYUNCU M., COŞKUN M. (2004). *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, s.: 177-178

- TORI M., HASHIMOTO A., HIROSE K., ASAKAWA Y. (1995). Diarylheptanoids, flavonoids, stilbenoids, seiquiterpenoids and a phenanthrene from *Alnus maximowiczii*, *Phytochemistry*, **40(4)**: 1263-1264
- TUNG N. H., KWON H. J., KIM J. H., RA J. C., DING Y., KIM J. A., KIM Y. H. (2010 a). Anti-influenza diarylheptanoids from the bark of *Alnus japonica*, *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **20**: 1000-1003
- TUNG N. H., RA J. C., SOHN D. H., KIM Y. H. (2010 b). A new diarylheptanoid from the bark of *Alnus japonica*, *Journal of Asian Natural Products Research*, **12(10)**: 921-924
- TUZLACI, E. (2006). *Şifa Niyetine Türkiye'nin Halk İlaçları*, Alfa Basım Yayın ve Dağıtım Ltd. Şti., İstanbul, s.: 29
- VERMA D. K., BHARAT M., NAYAK D., SHANBHAG T., SHANBHAG V., RAJPUT R. S. (2012). *Areca catechu*: Effect of topical ethanolic extract on burn wound healing in albino rats, *International Journal of Pharmacology and Clinical Sciences*, **1(3)**: 74-78
- WINTER C. A., RISLEY E. A., SILBER R. H. (1968). Antiinflammatory Activity of Indomethacin and Plasma Corticosterone in Rats, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **162**: 196-201
- WOESSNER J.F. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **93**: 440-7
- YADAV D., SINGH S. C., VERMA R. K., SAXENA K., VERMA R., MURTHY P. K., GUPTA M. M. (2013 a). Antifilarial diarylheptanoids from *Alnus nepalensis* leaves growing in high altitude areas of Uttarakhand, India, *Phytomedicine*, **20**: 124-132
- YADAV D., KUSHWAHA V., SAXENA K., VERMA R., MURTHY P. K., GUPTA M. M. (2013 b). Diarylheptanoid compounds from *Alnus nepalensis* express in vitro and in vivo antifilarial activity, *Acta Tropica*, **128(3)**: 509-517
- YEŞİLADA, E., KÜPELİ, E.(2007). *Clematis vitalba* L. Aerial Parts Exhibit Potent Anti-inflammatory, Antinociceptive and Antipyretic Effects, *Journal of Ethnopharmacology*, **110**: 504-515
- YOSHIKAWA T., NAITO Y. (2002). What is Oxidative Stress?, *Japan Medical Association Journal*, **45(7)**: 271-276
- YU Y-B., MIYASHIRO H., NAKAMURA N., HATTORI M., PARK J. C. (2007). Effects of Triterpenoids and Flavonoids Isolated from *Alnus firma* on HIV-1 Viral Enzymes, *Archives of Pharmacal Research*, **30(7)**: 820-826

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Çiğdem
Soyadı : ALTINYAY
Doğum yeri ve tarihi : Ankara-13.06.1978
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Evli
İletişim Adresi : Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
Telefonu : 0 532 4324975

II- Eğitimi

2004-2006 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı
(Yüksek Lisans)
2000-1996 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
1996-1989 TED Ankara Koleji (Ortaokul ve Lise)
1989-1987 Büyük Kolej (İlkokul 3, 4 ve 5.sınıf)
1987-1985 Sarar İlkokulu (İlkokul 1 ve 2. sınıf)

Yabancı Dili : İngilizce

III- Ünvanları

2006-Bilim Uzmanı
2000-Eczacı

IV- Mesleki Deneyimleri

2014-2012	Eczacı Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
2012-2007	Eczacı Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü
2007-2004	Araştırma Görevlisi (A.Ü. Eczacılık Fak. Farmakognozi ABD)
2004-2002	Sorumlu Eczacı (Başkent Üniversitesi Zübeyde Hanım Uygulama ve Araştırma Merkezi-İzmir)
2002-2001	Eczacı (Başkent Üniversitesi Hastanesi-Ankara)

V-Yayınları

1. Altınyay, Ç., Altun, M. L.: “ HPLC Analysis of Oleuropein in *Olea europaea* L.” *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi (Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University)*, 35 (1), 1-11 (2006).
2. Sever Yılmaz, B., Saltan Çitoğlu, G., Altun, M. L., Özbek, H. , Bayram, İ., Cengiz, N. , Altınyay, Ç.: “ Hepatoprotective and Hypoglycemic Activity of *Viburnum lantana* L.”, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 151-165 (2006).
3. Altınyay, Ç., Güvenç, A., Altun, M. L. : “ Antioxidant Activities of Oleuropein and the Aqueous Extracts of *Olea europaea* L. Varieties Growing in Turkey”, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 23-30 (2011).

VI- Bilimsel Etkinlikleri

POSTERLER

1. **Altınyay, Ç.**, Altun, M. L.: “HPLC Method For The Analysis of Oleuropein in *Olea europaea* L.”, 8 th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-8), Ankara-Turkey, June 13-16, 2006.
2. Güvenç, A., **Altınyay, Ç.**, Altun, M. L.: “Antioxidant Activity of *Olea europaea* L.” 8 th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-8), Ankara-Turkey, June 13-16, 2006.
3. Altun, M.L., Özbek, H., Sever Yılmaz, B., Saltan Çitoğlu G., Bayram İ., Cengiz, N., **Altınyay, Ç.:** “Hepatoprotective and Hypoglycemic Activity of *Viburnum opulus* L.” 8 th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-8), Ankara-Turkey, June 13-16, 2006.
4. Altun, M.L., Saltan Çitoğlu G., Sever Yılmaz, B., Özbek, H., Bayram İ., Cengiz, N., **Altınyay, Ç.:** “ Antinociceptive, Anti-inflammatory and Hepatoprotective Activities of *Viburnum opulus* L. Growing in Turkey” The XII International Congress Phytopharm 2008, St- Petersburg- Russia, July 2-4, 2008.
5. Sever Yılmaz, B., Altun, M.L., Saltan Çitoğlu G., Özbek, H., Bayram İ., Cengiz, N., **Altınyay, Ç.:** “ Antinociceptive, Anti-inflammatory and Hepatoprotective Activities of *Viburnum lantana* L. Growing in Turkey” The XII International Congress Phytopharm 2008, St- Petersburg- Russia, July 2-4, 2008.
6. Özbek, H., Sever Yılmaz, B., Saltan Çitoğlu G., Altun, M.L., Bayram İ., Cengiz, N., **Altınyay, Ç.:** “ *Viburnum lantana* L. Bitkisinin Hipoglisemik ve Hepatoprotektif Aktiviteleri”, XVI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT-2006), Erzurum, 28-30 Haziran, 2006