

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**Kayseri’de Halk Arasında Yara İyileştirici Olarak Kullanılan
Bazı Bitkilerin Kimyasal Yapıları ve Biyolojik Aktiviteleri
Açısından İncelenmesi**

Proje No: TCD-2015-5609

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd. Doç. Dr. Ayşe BALDEMİR

Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Botanik AB.Dalı

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Müberra KOŞAR (Başka Üniversite Mensubu)

Prof.Dr. Esra KÜPELİ AKKOL (Başka Üniversite Mensubu)

Doç. Dr. Mükerrerem Betül YERER AYCAN (Personel)

Doç. Dr. İpek PEŞİN SÜNTAR (Başka Üniversite Mensubu)

Yrd. Doç. Dr. Eren DEMİRPOLAT (Personel)

Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK (Personel)

Arş. Gör. Selen İLGÜN (Personel)

Arş. Gör. Mert İLHAN (Başka Üniversite Mensubu)

Aralık 2016KAYSERİ

TEŐEKKÖR

Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Araştırma Fonu (Proje No: TCD-2015-5609) tarafından mali olarak desteklenmiştir.

Yara iyileştirici etki alışmaları Gazi Üniversitesi Eczacılık Faköltesi Farmakognozi Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Gazi Üniversitesi Eczacılık Faköltesi Dekanlığı'na imkan sağladığı için teőekkör ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM.....	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1.Yara İyileştirici Etki Mekanizması.....	5
2.2. Türlerin Botanik Özellikleri.....	9
2.3. Bitkilerin Halk Arasındaki Kullanımları.....	11
2.4. Bitkilerin Kimyasal İçerikleri ve Biyolojik Aktiviteleri.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	17
3.1. Bitkilerin Ekstraksiyonu.....	17
3.2. Ekstrelerin Sıvı Kromatografisi (LC)-Kütle Spektrometresi (MS/MS) ile Kimyasal içerik Analizleri.....	17
3.3. <i>In vitro</i> deneyler.....	18
2.3.1. FR (ATCC® CRL-1213™) RAT FIBROBLAST Hücre Kültürü.....	18
3.3.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçülmesi.....	18
3.3.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Profillemeye Deneyi (Xcelligence).....	18
3.3.4. MTT (3(4,5-dimetil tiazolil-2)2,5-difenil tetrazolium bromit) Canlılık Testi.....	19
3.3.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Sitotoksite Deneyi (Xcelligence).....	19
3.3.6. Deneylerde kullanılan mikroorganizmaların standardizasyonu.....	20
3.3.7. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC).....	20
3.3.8. Antienflamatuvar aktivite tayini.....	20
3.3.9. ELISA protein ifadenmelerinin ölçümü.....	21
3.3.10. Hücre içi ve besi ortamına salınan nitrik oksit düzeylerinin ölçümü.....	21
3.4. <i>In vivo</i> deneyler.....	21
3.4.1. Bitkilerin yara iyileştirici ve anti-enflamatuvar aktivitelerinin belirlenmesi.....	21
3.4.2. Deney Hayvanları.....	21
3.4.3. Deneylerde kullanılacak test numunelerinin hazırlanma şekilleri.....	22

3.4.4. Referans Maddeler.....	22
3.4.5. Yara İyileştirici Aktivitenin Belirlenmesi.....	22
3.4.5.1. Çizgisel İnsizyon Yara Modeli.....	22
3.4.5.2. Dairesel Eksizyon Yara Modeli.....	23
3.4.5.3. Histopatolojik incelemeler.....	23
3.4.5.4. Kolajen Bağ Dokunun Saptanması.....	24
3.4.5.4.1. Hidroksiprolin Tayini.....	24
3.4.5.5. Antienflamatuvar Aktivitenin Belirlenmesi.....	24
3.4.5.5.1. Asetik Asit-Nedenli Kapiller Permeabilite Artışının İnhibisyonu (Whittle Yöntemi).....	24
3.4.5.5.2. Hyaluronidaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi.....	25
3.4.5.6. Kolajenaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi.....	25
3.4.5.7. Elastaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. Bitkilerin Ekstraksiyon.....	26
4.2. Sıvı kromatografisi Kütle Spektrometresi (SK-KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi.....	26
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları Bulguları.....	31
4.3.1. <i>Hücre Profilleme Deneyi</i>	31
4.3.2. <i>Sulphorhodamine B (SRB) Canlılık Deneyi</i>	31
4.3.3. <i>Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (GZHA) Deneyi</i>	33
4.3.4. Oksidatif Stres Parametreleri Bulguları.....	36
4.4. <i>In Vitro</i> Antimikrobiyal Aktivite Bulguları.....	37
4.5. <i>In Vitro</i> Antienflamatuvar Aktivite Bulguları.....	40
4.6. <i>In Vivo</i> Yara İyileştirici Etkinin Bulguları.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
6. KAYNAKLAR.....	53

ÖZET

Bu proje çalışması etnobotanik çalışmalarla özellikle Kayseri ve civarında yara iyileştirici amaçla kullanıldığı tespit edilen, *Heracleum platytaenium* Boiss. (HPM), *Potentilla recta* L. (PRec)ve *Potentilla reptans* L. (PRep) ile *Helianthemum canum* (L.) Baumg (HCM) türleri üzerinde yürütülmüştür. Bitkilerin toprak üstü kısımlarının %70'lik metanol ekstralarının *in vitro/in vitro* yara iyi edici etkileri, oksidatif stres parametrelerine etkileri ve etkiden sorumlu bileşikler incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *in vivo* yara iyileştirici etki tüm ekstralarda belli düzeylerde gözlenirken en yüksek ve anlamlı etkiyi PRep ekstresi göstermiştir. Ayrıca HCM ekstresi de ikinci derecede aktif ekstre olarak bulunmuştur. Sıvı kromatografisi Kütle Spektrometresi (SK-KS/KS) yöntemi kullanılarak tespit edilen ekstraların içermiş oldukları tanen türevi bileşikler ve flavonoit türevlerinin bu etkilerden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Yapılan *in vivo* çalışmaların sonuçları fibroblast hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlarla da uyum göstermektedir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında ekstraların *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeroginasa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 90028, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 3699 bakterilerine karşı Minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) hesaplanmıştır. Özellikle ekstralar *S. epidermidis* bakterisine karşı en düşük konsantrasyon olan 0,0625 mg/mL konsantrasyonda bile yüksek inhibisyon göstermişlerdir.

Sonuç olarak, yapılan *in vitro* ve *in vivo* antienflamatuar etki çalışmalarında ekstralardan gözlenen aktivite ile tanen türevi bileşiklerin ve flavonoit türevlerinin varlığı ilişkilendirilmiştir. Halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılan bu bitkilerin ekstraları ile yapılacak ileri düzey etki, güvenilirlik ve standardizasyon çalışmaları belki de enflamasyonu azaltmaya yönelik yardımcı bir tedavinin bulunmasına kapı açabilir.

Anahtar Kelimeler: *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta*, *Potentilla reptans*, *Helianthemum canum*, yara iyileştirici etki, anti-enflamatuar aktivite, antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite, SK-KS/KS

ABSTRACT

This project study was carried out with ethnobotanical studies, especially in Kayseri and in the vicinity of *Heracleum platytaenium* Boiss, (HPM), *Potentilla recta* L. (PRec) and *Potentilla reptans* L. (PRep) and *Helianthemum canum* (L.) Baumg (HCM) species, which was found to be used for wound healing purposes. *In vitro* / *in vitro* wound healing effects, their effects on oxidative stress parameters and their compounds responsible for their effects of 70% methanol extracts of aerial parts of plants were investigated. As a result of the studies performed, the wound healing effect *in vivo* was observed at certain levels in all extracts and showed the highest and significantly effective PREP extract. In addition, the HCM extract was also found as the active extract at the second time. It is believed that the tannin derivative compounds and flavonoid derivatives, which are contained in the extracts determined by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS), may be responsible for these effects. The results of *in vivo* studies are also consistent with results from fibroblast cell culture studies. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of all extracts were calculated for antimicrobial activity studies against *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 90028, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 3699. In particular, extracts showed high inhibition even at the 0.0625 mg / mL concentration, which is the lowest concentration against the *S. epidermidis*.

In conclusion, *in vitro* and *in vivo* antiinflammatory activity studies, the activity observed in extracts correlated with the presence of tannin derivative compounds and flavonoid derivatives. The high level of efficacy to be achieved with the extracts of these plants, which are used as a wound healing agent among the population, may lead to the availability of an adjunctive treatment for relieving inflammation, perhaps for reliability and standardization efforts.

Key Words: *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta*, *Potentilla reptans*, *Helianthemum canum*, wound healing effect, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, antibacterial activity, LC-MS/MS

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Bitkilerin çok eski çağlardan beri insanlar tarafından hastalıkları tedavi etmek ya da sağlıklarını korumak amacıyla kullanıldıkları bilinmektedir. Bitkilerin sahip oldukları sekonder metabolit olarak adlandırılan organik bileşenlerin tedavi edici özellikleri bu bitkilerin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasına olanak sağlamıştır. Genellikle farmakolojik olarak yüksek aktivite gösteren bu sekonder bileşikler bitkinin başlıca antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar, yara iyi edici olarak kullanılmasına sebep olmuştur. Türkiye, değişik iklim tiplerinin varlığı, coğrafik durumu, jeolojik yapısı, topoğrafik özellikleri, çeşitli toprak gruplarına sahip olması ve üç değişik fitocoğrafik (Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz bitki coğrafyası) bölgenin birleştiği yerde bulunması sebebiyle zengin bitki çeşitliliğine sahiptir. Tıbbi bitkilerin çoğunlukla bulunduğu büyük familyalar Türkiye’de geniş bir yayılım alanına sahiptir. Bu proje çalışmasında Rosaceae, Apiaceae ve Cistaceae gibi önemli tıbbi bitkileri içine alan familyalara ait bazı bitki türlerinin halk arasında kullanımlarına dayanarak kimyasal içerik analizleri ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır.

Daha önce yapılmış olan etnobotanik çalışmalarla özellikle Kayseri ve civarında yara iyileştirici amaçla kullanıldığı tespit edilen bu bitkiler; Apiaceae familyasından *Heracleum platytaenium* Boiss., Rosaceae familyasından *Potentilla recta* L. ve *Potentilla reptans* L. ile Cistaceae familyasının bir üyesi olan *Helianthemum canum* (L.) Baumg’dur. Yapılan literatür taramalarında bu bitki cinslerine ait diğer türler üzerinde çeşitli aktivite çalışmalarının yapıldığı ve bu çalışmalar sonucunda yüksek polifenolik madde içeriğine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışmada, bu bitkilerden hazırlanan %70’lik metanol ekstratlarının *in vivo* ve *in vitro* yara iyileştirici, anti-enflamatuvar etkileri ve oksidatif stres parametreleri enzimatik yöntemlerle ölçülmüş (SOD, GSHPX enzim aktiviteleri ve TBARS düzeyleri) ve kimyasal içerikleri Sıvı kromatografisi Kütle Spektrometresi (SK-KS/KS) yöntemi ile belirlenerek etnobotanik çalışmalar deneysel çalışmalarla desteklenmiştir.

In vitro deneylerde, ekstratların farklı dozları *Rattus norvegicus* deri fibroblast (CRL-113) hücre hattına uygulanarak MTT ve Xcelligence yöntemleri ile hücre canlılığı ve gelişme profilleri analizleri yapılmıştır. Ekstrelerin, immünojenlerle (Lipopolisakrit) uyarılmış fibroblast hücre hattında proinflatuar ve antiinflatuar sitokin düzeyleri üzerine etkisi, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve prostaglandin E2 (PGE 2) üzerindeki etkileri aydınlatılmıştır. Enflamasyonla oluşan hücre içi oksidatif stres SOD, GSHPX ve TBARS kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

Çalışma kapsamında ekstrelerin farklı deri patojenlerine (*Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Pseudomonas aeroginasa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 90028, and *Stapylococcus epidermidis* ATCC 3699) olan etkisi de Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) yöntemiyle belirlenerek antimikrobiyal etkinlik ölçülmüştür.

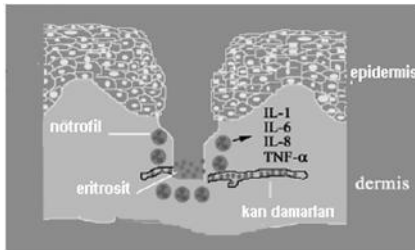
In vivo deneylerde, yara iyileştirici aktivitenin belirlenmesinde ratlar ve fareler üzerinde çizgisel insizyon ve dairesel eksziyon yara modelleri oluşturulmuş ve histopatolojik incelemeler yapılmıştır. Ayrıca kolajen bağ dokunun saptanması için hidroksiprolin tayini yapılmıştır. Antienflamatuvar etkinin saptanmasında Whittle yöntemi uygulanmış olup asetik asit nedenli permeabilite artışının inhibisyonun yanısıra, hyaluronidaz, kolajenaz, elastaz enzim inhibisyonları ölçülmüştür.

Sonuç olarak, önerilen projede bitkilerin yara iyileştirici etkisinde önemli rol oynayan mekanizmalar ve yanıtlar üzerinde ekstrelerin ve aktif bileşiklerin *in vitro* antienflamatuvar ve antioksidan aktiviteye sahip oldukları ayrıca *in vivo* yara iyi edici etkileri gösterilmiştir.

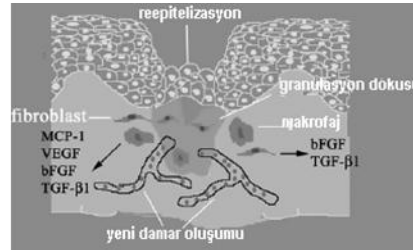
2. GENEL BİLGİLER

2.1.Yara İyileştirici Etki Mekanizması

Herhangi bir nedenle fiziksel veya kimyasal bir hasar oluşumuna bağlı olarak vücut bütünlüğünün bozulmasına yara adı verilir. Yara iyileşmesi vücudun bu yaralanmaya karşı gösterdiği savunma mekanizmasıdır (Eckert ve ark. 2004). İyileşme, doku hasarının başladığı andan itibaren gelişir. Kan ürünleri hasarlı bölgeye göç eder, plateletler kolajen ve ekstraselüler matriksin diğer elemanlarıyla bağlantıya geçerek esansiyel büyüme faktörleri ve sitokinleri salarlar. Kanamanın durmasından sonra nötrofiller yara bölgesine hücum ederek fagositozla yabancı maddeleri, bakterileri ve hasarlı dokuyu uzalaştırırlar. Bu enflamasyon prosesinde makrofajlar da fagositoza devam ederek platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve TGF- β salarlar. Yara bölgesi temizlendikten sonra fibroblastlar bölgeye göç ederek çoğalıp yeni ekstraselüler matriks oluştururlar (Diegelmann ve Evans, 2004). Proliferasyon fazında yeni oluşan granülasyon dokusunun yara alanını kaplamasıyla doku tamiri gerçekleştirmeye başlar. Granülasyon dokusunda hemen her zaman bulunan makrofajlara ek olarak uygun kemotaktik stimulus varlığında nötrofiller, eozinofiller, mast hücreleri ve lenfositler de görülür (Eckert ve ark. 2004). Damar oluşumu (anjiyogenez) (Şekil 1 ve 2) granülasyon dokusunun güçlenmesi için gerekli bir oluşumdur (Köşlü, 1996). Doku tamirinin son fazı yeni oluşum fazıdır; yaralanma öncesi doku bütünlüğü sağlayıncaya dek sürebilir (Cormack, 2001).



Şekil 1. Yara iyileşmesinin yangı süreci



Şekil 2. Yara iyileşmesinin proliferasyon süreci

(Kondo, 2007)

Yara olgusunda gelişen enflamasyona vücut bağışıklık sistemi ile yanıt verir. Deri ve derialtı dokusunu tutan bakteriyel infeksiyonlar, yara bölgesine mikroorganizmaların yerleşmesi, yayılması ve virülans faktörlerinin bağışıklık yanıtını yenmesiyle oluşmaktadır (Gündem ve Çıkman, 2012). Vücuda giren patojen mikroorganizmalar, doğal ve edinsel bağışıklık olan, immün sistemin iki sınıfı tarafından yok edilmektedir (Takeuchi ve Akira, 2001). Doğal immün

sistem temelde patojenleri tanıyan farklı hücre tiplerinin antimikrobiyal yanıtı oluşturmasıyla enfeksiyona karşı fiziksel ve kimyasal bariyer oluşturma esasına dayanır. Doğal immüitenin hücresel elemanları fagositik makrofajlar ve granüositler, antijen sunan dendritik hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler ve T lenfositlerdir (Mogensen, 2009). Edinsel bağışıklık ise T ve B lenfositlerden oluşup belirli bir antijene özgü olan bağışıklıktır (Iwasaki ve Medzhitov, 2010). Hücresel aracılı immünitede makrofajlar ve lenfositler rol oynamaktadır.

Makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri, nötrofiller, eozinofiller, doğal öldürücü hücreler (NK) ve doğal öldürücü T (NKT) hücrelerinin sorumluluğunda gerçekleşen doğal bağışıklık; bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı, doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip savunma sistemidir (İnci ve Bişkin, 2007). Doğal bağışıklık hücreleri patojen saldırısını yüzeydeki patojen kalıplarını tanıma reseptörleri (PRR) ile tanır. Bu reseptörler doğrudan veya dolaylı olarak mikrobiyal nükleik asit, lipoprotein ve karbonhidrat gibi patojen aracılıklı moleküler paternleri (PAMP) teşhis ederler (Newton ve Dixit, 2012).

Doğal bağışıklığın yapıtaşlarından biri de epitel tabakasıdır. Deri, sindirim ve solunum sistemleri, enfeksiyona karşı fiziksel ve kimyasal engeli oluşturan epitelyum tabakası ile örtülüdür. Epitel hücreleri yüzeylerinde glikozillenmiş glikoprotein yapısında musin içerirler ve patojen bağlanmasına ve saldırısına karşı koyarlar. Konağı mikrobiyal çevreden β -defensin ve lizozim gibi antimikrobiyal efektörler üreterek fiziksel olarak korurken bir takım sitokin ve kemokin salgılayarak da lokal enflamasyon yanıtına yardımcı olurlar (Kagnoff ve Eckmann, 1997).

Fibroblastlar ise ekstraselüler matriks bileşenlerini üreten primer epitelyum hücrelerdir (Tsai ve ark., 2014). Normal şartlar altında fibroblastlar doku bütünlüğünden ve ekstra selüler matriksin yapısal ve fonksiyonel proteinlerinden sorumludur. Hasarlı dokuda ise fibroblastlar yara bölgesine göç ederek çoğalıp daha fazla ekstra selüler matriks proteini üreterek yara iyileşmesine katkıda bulunur (Wang ve ark., 1995). Dermal fibroblastlar enflamasyon durumunda cevabı TLR reseptörleri (toll like reseptörler) aracılığıyla oluştururlar. TLR reseptörlerin ligandlarına ise lipopolisakkarit (LPS) örnek verilebilir. Dermal fibroblastlarda TLR4 reseptörleri Gram negatif bakteri komponenti olan LPS'yi tanıyan reseptörlerdir. Cilt enflamasyonunda TLR4 „ün LPS ile indüklenmesi sonucu NF- κ B ve MAPKs, sitokin ve PGE2 üretimine neden olur (Tsai ve ark., 2014). Hasarlı dokuda aktive olan fibroblastların ürettiği sitokinler İnterlökin 1, İnterlökin 6, İnterferon β ve İnterferon α gibi dokunun enflamasyon cevabını artıran sitokinlerdir (Wang ve ark., 1995). PGE2 siklooksijenaz (COX) tarafından araşidonik asitten sentezlenir. Bir çok dokuda

bulunan COX1 prostaglandinlerin fizyolojik görevlerini yerine getirmelerini sağlarken COX-2 tam tersine makrofoj gibi immün hücrelerinde bulunup enfeksiyon, hasar veya diğer stres durumlarında çok miktarda prostaglandin üretimine sebep olup ağrı reseptörlerini duyarlılaştırarak ve inflamasyonu indükleyerek cevap oluşturur (Kim ve ark., 2007).

Deri, sindirim ve solunum sistemleri, enfeksiyona karşı fiziksel ve kimyasal engel oluşturan doğal bağışıklığın yapı taşlarından biri olan epitelium tabakası ile örtülüdür. Epitel hücreleri yüzeylerinde glikozillenmiş glikoprotein yapısında musin içerirler ve patojen bağlanmasına ve saldırısına karşı koyarlar. Konağı mikrobiyal çevreden β -defensin ve lizozim gibi antimikrobiyal efektörler üreterek fiziksel olarak korurken bir takım sitokin ve kemokin salgılayarak da lokal enflamasyon yanıtına yardımcı olurlar (6). Fibroblastlar ise ekstraselüler matriks bileşenlerini üreten primer epitelium hücrelerdir (Tsai ve ark., 2014). Normal şartlar altında fibroblastlar doku bütünlüğünden ve ekstra selüler matriksin yapısal ve fonksiyonel proteinlerinden sorumludur. Hasarlı dokuda ise fibroblastlar yara bölgesine göç ederek çoğalıp daha fazla ekstra selüler matriks proteini üreterek yara iyileşmesine katkıda bulunur (Wang ve ark., 1995). Dermal fibroblastlar enflamasyon durumunda cevabı TLR reseptörleri (toll like reseptörler) aracılığıyla oluştururlar. TLR reseptörlerin ligandlarına ise lipopolisakkarit (LPS) örnek verilebilir. Dermal fibroblastlarda TLR4 reseptörleri Gram negatif bakteri komponenti olan LPS'yi tanıyan reseptörlerdir. Cilt enflamasyonunda TLR4 „ün LPS ile indüklenmesi sonucu NF- κ B ve MAPKs, sitokin ve PGE2 üretimine neden olur (Tsai ve ark., 2014). Hasarlı dokuda aktive olan fibroblastların ürettiği sitokinler İnterlökin 1, İnterlökin 6, İnterferon β ve İnterferon α gibi dokunun enflamasyon cevabını artıran sitokinlerdir (Wang ve ark., 1995). PGE2 siklooksijenaz (COX) tarafından araşidonik asitten sentezlenir. Bir çok dokuda bulunan COX1 prostaglandinlerin fizyolojik görevlerini yerine getirmelerini sağlarken COX-2 tam tersine makrofoj gibi immün hücrelerinde bulunup enfeksiyon, hasar veya diğer stres durumlarında çok miktarda prostaglandin üretimine sebep olup ağrı reseptörlerini duyarlılaştırarak ve inflamasyonu indükleyerek cevap oluşturur (Kim ve ark., 2007).

Birçok çalışma polifenollerin yüksek miktarda tüketiminin kansere ve inflamatuvar hastalıklara karşı koruyucu olduğunu göstermiştir. Polifenollerin antiinflamatuvar etkileri antioksidan özellikleri ile ilişkilendirilmiştir çünkü inflamasyonun önemli işaretlerinden olan reaktif oksijen (ROS) ve nitrojen (RNS) türlerini süpürücü ve oluşumlarını engelleyici özellikleri vardır. Bununla birlikte polifenoller ayrıca MAPK, PI3-K/Akt ve NF- κ B gibi proinflamatuvar yollarının aktivasyonunu da inhibe etme yeteneğine sahiptirler (Benkhadir ve ark., 2012).

Daha modern bir yaşam biçimi ile birlikte gittikçe artan insan ömrü dikkate alındığında, yaralar

ve özellikle kronik yaralar yaşlı hastaları ciddi biçimde etkilemekte ve yaşam kalitesini azaltmaktadır. Mevcut tahminler dünyada yaklaşık 6 milyon kişinin büyük fizyolojik ve zihinsel travmanın neden olduğu kronik yaralardan muzdarip olduğunu göstermektedir. ABD’de kronik yaranın yıllık maliyeti 20-25 milyar dolar, akut, kronik ve diğerlerinin maliyeti ise 7-10 milyar dolar arasında değişmektedir. Yara iyileştirici ilaçlar üzerine yapılan araştırmalar modern biyomedikal bilimlerin hızla gelişen bir alanıdır (Majewska ve Gendaszewska-Darmach, 2011).

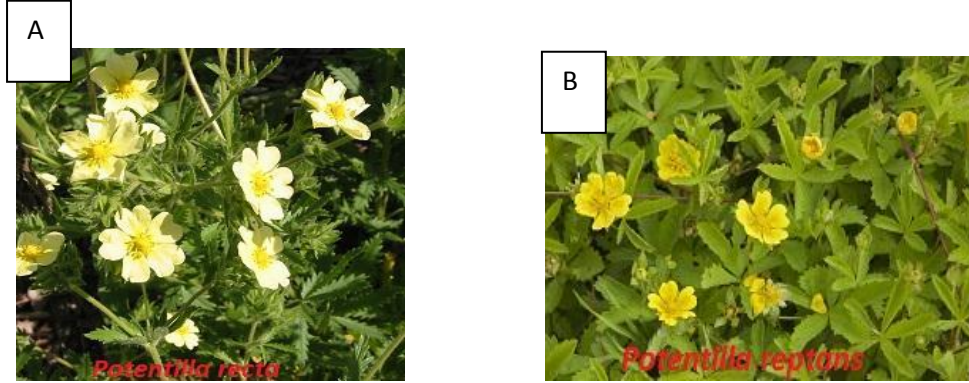
Yara bakımının tarihi, insanlık tarihi kadar eskidir (Robson ve ark., 2001). M.Ö. 2000 yıllarında Babil Kralı Hammurabi’nin kitabelerinde yara iyileşmesi ile ilgili ilaç reçetelerine rastlanmaktadır. Eski Mısır’da ele geçen papirüslerde hintyağının haricen yara ve yanık tedavisinde kullanıldığı, taze et sarmanın ve dışardan asilbent uygulamasının yararlı olduğu kayıtlıdır. Eski Yunanistan’da Eskulapyon tapınaklarında zehirsiz yılanların ve hastaların vücutlarındaki yaraları yalaması şeklinde uygulamalar yapıldığı görülmektedir. Hipokrat yaralarda antiseptik olarak katranı ilk uygulayan kişi olurken, Grekoromen devrin ünlü hekimi Galien yara iyileşmesi konusunda cerahati yararlı bir olgu şeklinde nitelendirilerek bir hataya düşmüştür. Eski çağlardan kalan yazıtlarda yara iyileşmesi için kullanılan drog ve maddelerden bazıları zamk, güherçile, civalı merhem, yumurta-gül suyu-tereyağından yapılan merhem, safran, susam, incibar kökü, sığırdili kuyruğu, mürver yağı, acı bakla, gürüz otu, sinirli ot, mürdesenk, anzarut ve kına olarak kayıtlıdır (Lawvere ve ark. 2006). Fenolik bileşikler, uçucu yağlar, seskiterpenler, yağ asitleri, steroller ve alkaloitler gibi farklı sekonder metabolitlerden oluşan bileşikler yara iyileştirici etkiden sorumludur. Özellikle birçok çalışmada fenolik asitler ve flavonoidlerin bu etkiden sorumlu oldukları rapor edilmiştir (Murthy ve ark., 2004; Tümen ve ark., 2013; Farzaei ve ark., 2014).

Bu çalışmada, bitki ve bitki ekstraktlarının fenolik içerikleri ve yara iyileştirici potansiyelleri gözönüne alınarak *Helianthemum canum* (Cistaceae), *Heracleum platytaenium* (Apiaceae), *Potentilla recta* (Rosaceae) ve *P. reptans* türlerinden elde edilen ekstraktların *in vitro*, *in vivo* yara iyileştirici ve antienflamatuvar etkileri ve oksidatif stres parametreleri SOD, GSHPX ve TBARS enzimatik yöntemlerle ölçülmüştür. Ayrıca YBSK ve SK-KS yöntemi ile kimyasal içerik analizleri yapılarak bu etkiye neden olan etken madde- aktivite ilişkileri aydınlatılmıştır.

2.2. Türlerin Botanik Özellikleri

Potentilla recta L. ve *P. reptans* L.

Potentilla cinsinin dahil olduğu Rosaceae familyası bitkiler aleminde 19. büyük familya olarak yer almaktadır. Yaklaşık olarak 100 cins ve 2830-3100 kadar türe sahiptir (Folta ve Gardiner, 2009). Bu cins ülkemizde 60 tür ile temsil edilmektedir (Güner, 2012). *Potentilla recta* bitkisi çok yıllık yükselici veya dik gövdeye sahiptir (Şekil 3A). Çiçekli gövde yaklaşık (2-) 20- 60 (60-90) cm'dir. Kısa ya da uzun yumuşak örtü tüylerinin yanı sıra kısa salgı tüylerine de sahiptir. Yapraklar digitattır. Yaprakçıklar genelde 5-7 tane olup oblong- obovat, linear lanseolat veya bazen kuneat- 10-50 (-70) x 5-25 mm uzunluğundadır. Çiçekler simöz durumundadır. Epikaliks segmentleri linear- lanseolattır ve sepaller kadar uzun veya hafif kısa olabilir. Sepaller triangular-ovate ve (3,5-) 5-8 mm uzunluğundadır. Petaller sarı obkordat ve 6-10 (-13) mm'dir; sepallerden daha uzundur. Meyve aken; pürüzlü ve kanatlıdır stilus tabanda konikal şekillidir. Çiçeklenme mevsimi 5-7. aylardır ve genellikle ıslak çayırılık alanlarda 2300 m civarlarında yayılış gösterir (Davis, 1972).

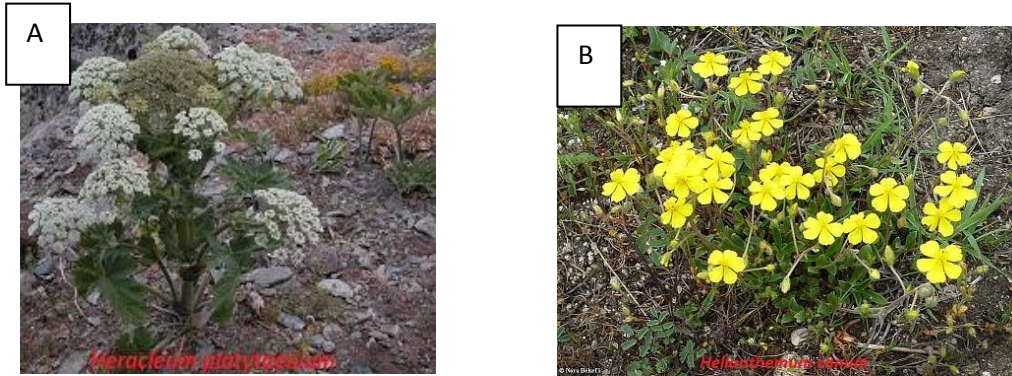


Şekil 3. A. *Potentilla recta* B. *Potentilla reptans*

P. reptans yatık stolonlu tüylü ya da tüysüz gövdesi ile çok yıllık bitkilerdir. Çiçekli gövdesi yaklaşık 80-100 cm uzunluğundadır (Şekil 3B). Yaprakları digitattır. Yaprakçıklar 5 adet olup obovat ya da oblong-obovat 5- 3,5 mm'dir. Yaprakçık kenarları krenat- dentat ya da serrate olup yüzeyleri yatık pilos tüylü ya da çıplaktır. Çiçekler koltuklarda tek ve 5 parçalıdır. Epikaliks segmentleri ve sepalleri çoğunlukla ovate-eliptik ve 13 mm" ye kadar büyüyebilir. Petaller sarı ve obovat 7-11 mm emergent ve genellikle sepallerden uzundur. Meyve tipi buruşuk aken ve stilus subterminaldır. Çiçeklenme zamanı 5-8. aylardır. Genellikle nemli, gölgelik akarsu ve göl kenarlarında yayılış gösterirler (Davis, 1972).

***Heracleum platytaenium* Boiss.**

Dünyada 120'den fazla tür ile temsil edilen *Heracleum* L. (tavşanotu) cinsi (Apiaceae), Türkiye'de 7'si endemik 17 tür ile temsil edilir (Davis 1972, Duman 2000, Firuzi 2010). *H. platytaenium* Öksin fitocoğrafik bölgede yayılış gösteren çok yıllık ve monokarpik bir bitki türüdür (Şekil 4A). Bitki 1-2 m uzunluğunda kaba görünümlü ve güçlü aromatiklidir. Gövde yaklaşık 2 cm genişliğinde; derin oluklu az çok yumuşak tüylü ya da villoz tüylüdür. Taban yaprakları ternant, trisekt, veya sadece pinnatilobat, lamina 25 cm'den daha da uzun yüzeyde çıplak ya da kısa sert tüylü alt yüzey ise gri renkli tomentos tüylüdür. Yaprak lobları geniş bir şekilde ovat ya da rotundat. Yukardaki kaulin yapraklar oldukça geniş, şişkin, trunkat ya da retus dentat dişlidir. Işınlar 25-80 cm, nadiren 3-18 cm az çok yumuşak tüylüdür. Brakteoller linear-lanseolat. Çiçekler beyaz, kısa ve ışınsal olarak yayılmıştır. Ovaryum kısa setalı; meyveler geniş obovat suborbikular 8-14x6-11 mm, sıklıkla emarginat, kısa yumuşak tüylü setulöz tüylü ya da çıplak; dorsal salgı kanalları tepeye doğru şişkinleşmiş 0,25-2 mm genişliğindedir. Çiçeklenme zamanı 5-7(-8). aylardır. Genellikle 1500 m yükseklikte ormanlık alanlarda akarsu kenarlarında kayalık bayırlarda yetişmektedir (Davis, 1972).



Şekil 4. A. *Heracleum platytaenium* B. *Helianthemum canum*

***Helianthemum canum* (L.) Baumg.**

Helianthemum cinsinin bazı türleri Amerika, Avrupa, Kuzey Afrika ve Türkiye'de yayılış gösteren peyzaj bitkisi olarak yetiştirilirler (Meckes ve ark. 1999). Türkiye'de *Helianthemum* cinsi 16 tür ile temsil edilmektedir (Güner, 2012, Rubio-Moraga, 2013). *Helianthemum canum* türü Cistaceae familyasına ait bir tür olup halk arasında "Dişotu, Kayagülü ve Güngülü" isimleriyle bilinmektedir (Güner, 2012) (Şekil 4B). Yarı çalimsı çok yıllık bitkilerdir. Yaprakları eliptik, stipulasız, grimsi beyaz renkli sık tüylü ya da değildir. İçteki sepaller 3-5 mmdir. Petaller sarı ve 4-7 mm'dir. Çiçeklenme mevsimi 5-8. aylardır.

800-1000 m yükseklikte dağ yamaçlarındaki çakıllarda ve steplerde yetişmektedir (Davis, 1972).

2.3. Bitkilerin Halk Arasındaki Kullanımları

Potentilla Cinsi

Ülkemizde “Beşparmak otu, incibar kökü, sarı kabusluk” gibi isimlerle bilinen *Potentilla* türleri halk arasında kabız, ateş düşürücü ve kuvvet verici olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999). Bu cinsin tedavi edici özellikleri eski çağlardan beri bilinmektedir. Topraküstü ve toprakaltı kısımlarının ekstreleri geleneksel tıpta iltihapların, yaraların, belli kanser tiplerinin, bakteri, mantar ve virüs enfeksiyonlarının, ishal, diyabet ve diğer bazı rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmıştır. Yunan hekim Dioscorides, iltihaplı yüz egzamasında ve ağız boşluğu ülserasyonlarında *P. erecta* toprakaltı kısımlarından hazırlanmış dekoksionunun kullanımını tavsiye etmiştir. Ortaçağlarda Avrupa hekim ve botanikçileri *Potentilla* türlerini botanik kitaplarında tarif ve tasvir etmişlerdir. Fuchs, NewKreüterbuch (1543)’da *P. alba*, *P. reptans*, *P. neumanniana* (toprakaltı parçaları ve yapraklar), *P. anserina* (bitki parçası) ve *P. erecta*’yı (toprakaltı parçaları ve bitkisel parçalar) içeren beş *Potentilla* türünden bahsetmiştir. Su, süt, bal ile hazırlanan ekstreler ve alkollü çözeltiler diş ağrısı, boğaz iltihapları, yara iyileşmesi, sarılık, ağız ülseri, dizanteri tedavisinde ve homeostatik olarak kullanılmıştır (Tomczyk ve Latte, 2009).

Heracleum Cinsi

Türkiye’de *Heracleum sphondylium* türünün kökleri halk arasında dizanteri ve diyareye karşı kullanılır (Baytop, 1999). Dünyada *Heracleum* türleri halk arasında, antipiretik, analjezik, diyaforetik, antiseptik, karminatif, hazmı kolaylaştırıcı, tatlandırıcı ajan, baharat, romatizmal hastalıklarda, lumbago, mide ağrısı, kırılma, ezilme gibi düşme sonucu oluşan yaralanmalarda, hipertansiyon, epilepside, artrit, felçlik, dizanteri ve diyarede etkili olarak kullanılır (Habibi ve ark. 2010). Fas’ta *H. sphondylium* türünün toprak üstü kısımlarının hipertansiyonda kullanıldığı belirtilmiştir (Eddouks ve ark 2002). *H. sphondylium* türünün toprak üstü kısımları ve meyveleri İtalya’da tentür şeklinde santral sinir sistemi yatıştırıcısı olarak kullanılırken, Bulgaristan’da *H. sphondylium* var. *sibiricum* türünün kök ve meyveleri soğuk suda maserasyon yapılarak hipotansif, spazmolitik, iştah açıcı, antidiyareik

ve gastrointestinal rahatsızlıklarda kullanılır (Leporatti ve ark., 2003). Kanada’da *H. maximum* türünün sonbaharda toplanan köklerinin dekoksasyonu çay olarak tüketilerek grip ve soğuk algınlığında koruyucu olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu türün çiçekleri ve saplarının çay olarak kullanımı tip 2 diyabette de kısa süreli etkin olduğu belirtilmiştir. Bu türün *Acorus calamus* türü ile çay olarak tüketilmesi suçiçeğini önlemede ve kolerada kullanılmaktadır (Webster ve ark. 2006). Kuzey Amerika ve Avrasya’da yetişen *H. maximum* ve *H. sphondylium* türlerinin taze yaprak ve çiçek sapları soyularak (cow-parsnip) yemiş olarak yerli halk tarafından yenmektedir. Aynı zamanda türlerin bu kısımları eskiden Doğu Avrupa’da “barshch” ve “borsh” olarak adlandırılan lacto- fermente çorbası yapmak içinde kullanılmıştır (Turner ve ark. 2011). Bosna Hersek’te *H. orsinii* ve *H. sphondylium* türlerinin genç sürgünleri ve kökleri halk arasında sebze olarak tüketilmektedir (Redzic, 2006). *Heracleum persicum* türü İran’ın birçok bölgesinde tatlandırıcı ajan ve baharat olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu cinsin yaprakları ve meyveleri halk arasında antiseptik, karminatif, sindirim ve analjezik olarak kullanılmaktadır (Firuzi ve ark., 2010). Ayrıca türün tohum ve gövdesi epilepsi tedavisinde kullanılmaktadır (Sayyah ve ark., 2005). Dioscorides’in *Materia Medica* adlı eserinde *H. spondylium* tohumları antiepileptik kür olarak kullanıldığından bahsedilmektedir (Eadie, 2004). Rönesans döneminde *H. spondylium* türü anti-malariyal olarak kullanılmıştır (Adams ve ark., 2011). Ayrıca yine aynı türün kök ve yapraklarının nadiren afrodizyak, sindirim, hafif ekspektoran, yatıştırıcı, larenjit ve bronşit tedavilerinde kullanılmaktadır (Ciesla ve ark., 2008). Bazı *Heracleum* türleri yiyecek, hayvan yemi, baharat, çeşni ve parfümeride kullanılmaktadır. Polonya’da *H. sphondylium* türünün yeşillik olarak, çorba yada pişirilip kızartılarak tüketimi söz konusudur (Luczag, 2010).

***Helianthemum* Cinsi**

Türkiye’de *Helianthemum nummularium* (L.) Miller (Altınotu) türünün kabız ve kan kesici etkili olduğu bilinmektedir (Baytop, 1999). Ayrıca *Helianthemum*’un farklı türleri İspanya ve Amerika’da geleneksel olarak antienflamatuvar, antiülserojenik, yara iyi edici, antiparaziter, antimikrobiyal, analjezik, sitotoksik ve vazodilatör etkili olarak kullanılmaktadır (Rubio-Moraga, 2013). *H. glomeratum*, Güney Meksika’da gastrointestinal rahatsızlıkları tedavi etmek için sık sık kullanılan tıbbi bir bitkidir. Yaprak ve köklerin dekoksyonları ishal, karın ve epigastrik ağrıların tedavisinde kullanımı tavsiye

edilmektedir (Meckes ve ark. 1999). Mayalar tarafından kanlı diyarenin tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Alsabri ve ark. 2013). Yapılan çalışmalarda bitkinin eski medeniyetlerde sıklıkla kullanımı olduğu görülmektedir. Yaprak ve köklerin dekoksasyonları ishal, karın ve epigastrik ağrılarda tavsiye edilir. *Chenopodium ambrosioides* ile birlikte kombine edildiğinde solucan enfeksiyonuna karşı tedavi edici etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Barbosa ve ark. 2007).

2.4. Bitkilerin Kimyasal İçerikleri ve Biyolojik Aktiviteleri

Potentilla Cinsi

Tanenler astrenjan etkileri nedeniyle *Potentilla* türleri ve bunların ekstrelerinin önemli bileşenleri olarak bilinir. Bu nedenle *Potentilla* türleri üzerinde özellikle 1960'larda başlayan ayrıntılı fitokimyasal çalışmalar öncelikle tanenler üzerine odaklanır. Son yıllarda yapılan çalışmalar triterpenoit bileşikler üzerine yoğunlaşmıştır. Eskiden Avrupa'da *P. erecta*, *P. anserina* ve *P. reptans* gibi türler araştırılıyordu, son yıllarda Asya ve Rusya gibi bölgelerde *P. chinensis*, *P. discolor*, *P. fruticosa*, *P. palustris* türleri de araştırılmaktadır. Fitokimyasal çalışmaların çoğu genellikle *Potentilla* türlerinin toprak üstü kısımları ile yapılmıştır. *P. erecta*, *Potentilla* türleri içinde en fazla sayıda bileşeni tanımlanandır (topraküstü ve toprakaltı kısımları toplam 68 bileşik), bunu *P. anserina* takip etmektedir (topraküstü ve toprakaltı kısımları toplam 37 bileşik). Bu bileşik gruplarının başlıcaları flavonoidler, kondanse tanenler, organik ve fenol karboksilik asitler, kumarinler ve sterollerdir (Tomczyk ve Latte, 2009). Türkiye'de yetişen bazı *Potentilla* türleri ile ilgili olarak, halen yapılmış kimyasal bir çalışma bulunmamaktadır. *P. erecta* polifenoller ile yapılan bir çalışmada 1 neolignan glikoziti ve 9 flavonoid olmak üzere 10 bileşen tespit edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Şöhretoğlu ve Kırmızıbekmez, 2011). *P. astracanica* toprak üstü kısımlarının fitokimyasal incelenmesi sonucu 2 izoflavonoid glikoziti, biri flavon-C glikozit olmak üzere 5 flavonoid glikoziti, 2 flavan izole edilmiştir. *Potentilla* cinsinde flavonoid ve C-glikozit flavon varlığı ilk kez rapor edilmiştir (Şöhretoğlu ve Sterner, 2011).

Potentilla türleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında antiülser (Gürbüz ve ark., 2005; Tomczyk ve Latte, 2009; Laloo ve ark. 2013), antidiyareyik (Tomczyk ve Latte,

2009), antineoplastik (Tomczyk ve Latte, 2009; Jin ve ark. 2011), antiviral ve antimikrobiyal (Fukuchi ve ark., 1989; Corthout ve ark., 1991; McCutcheon ve ark., 1995; Gautam ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2008; Webster ve ark., 2008; Tomczyk ve Latte, 2009), antihiperlipidemik (Syiem ve ark.2002; Tomczyk ve Latte, 2009; Zhang ve ark., 2010; Qiao ve ark., 2011; Song ve ark. 2012; Kumar ve ark. 2013), antienflamatuar (Tunón ve ark., 1995; Popov ve ark., 2005; Tomczyk ve Latte, 2009), hepatoprotektif (Tomczyk ve Latte, 2009), spazmolitik (Tomczyk ve Latte, 2009), antioksidan (Kirby ve ark., 1995; Miliauskas ve ark., 2004; Chen ve ark., 2005; Avci ve ark., 2006; Oszmian'ski ve ark., 2007; Tomczyk ve Latte, 2009; Qin ve ark., 2012; Zhao ve ark., 2013; Bazylko ve ark., 2013) ve kardiyovasküler (Li ve ark., 2012) etkili oldukları tespit edilmiştir.

***Heracleum* Cinsi**

Farklı *Heracleum* türleri üzerinde yapılan kimyasal çalışmalar sonucunda türlerin furanokumarinler bakımından zengin olduğu ortaya konulmuştur. Bu türler arasında *H. candidans* ticari olarak antilökodermal özelliğe sahip olan bronzlaştırıcı losyon formülasyonlarında kullanılan ksantotoksin'in önemli bir kaynağıdır (Guleria ve ark., 2011). Kumarinler, furanokumarinler, antrakınon, stilbent, furanokumarin dimerleri ve flavonoidleri içeren sekonder metabolitler bu cinsin türlerinden izole edilmiş ve tanımlanmıştır. *Heracleum* cinsine ait bitkiler uçucu yağların mükemmel bir kaynağıdır. *H. persicum*, *H. candolleianum*, *H. dissectum*, *H. sphondylium* subsp. *ternatum*, *H. crenatifolium* ve *H. platytaenium* türlerinin uçucu yağ kompozisyonlarının monoterpenler, hidrokarbonlar, oksijenli monoterpenler ve seskiterpenlerden oluştuğu tespit edilmiştir (Kuljanabhagavad ve ark., 2011). *H. persicum*, *H. pastinacifolium*, *H. rechingeri* ve *H. transcaucasicum* türlerinin topraküstü kısımlarından elde edilmiş olan uçucu yağın GC ve GC-MS ile analizleri yapılmıştır. Miristisin, (E)-anetol, hekzil butanoat, elemisin ana bileşikler olarak tespit edilmiştir (Firuza, 2010). *H. thomsonii* türünün uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi ve hidrodistilasyon (limonen, (Z)- β -osimen, terpinolen, neril asetat, nerol, p-simen-8-ol) ve SC- CO₂ ekstresinin (terpinolen, germakren D, neril asetat, nerol, geranil asetat, α -bisabolol ve 1- nonadekanol) GC-MS ile bileşimleri araştırılmış her iki örnekte ana bileşenler olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca ekstrelerde bazı mantarlar (*Candida albicans*, *Aspergillus parasiticus*, *A. sydowii*, *T. rubrum*), Gram pozitif (*Bacillus subtilis*) ve Gram negatif (*Pseudomonas aureginosa*) bakterilerine karşı orta

dereceden yükseğe doğru değişen bir aktivite tespit edilmiştir (Guleria ve ark., 2011). *H. siamicum* türü uçucu yağlarının GC ve GC-MS ile analizleri yapılmış, *n*-oktil asetat (% 65.30) ve o-simen (%10.35) ana bileşikler olarak tespit edilmiştir (Kuljanabhagavad ve ark., 2011). *H. antasiaticum* türünün meyve ve yapraklarının uçucu yağ bileşimleri GC ile araştırılmış olup, etilkaprilat, oktilasetat ve terpinolen ana bileşikler olmak üzere toplam 16 bileşik tespit edilmiştir (Ibadullaeva, 2000). Birkaç *Heracleum* türünün yapraklarından elde edilen uçucu yağın bileşimi araştırılmış, α -pinen, β -pinen, limonen gibi bileşikler tespit edilmiştir (Tkachenko, 2010). Diğer bir çalışmada ise çeşitli *Heracleum* türlerinin köklerinde esterler, terpenler ve seskiterpenlerin uçucu yağ kompozisyonunu oluşturduğu tespit edilmiştir (Tkachenko, 2009).

Heracleum türleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında antimikrobiyal (Buruk ve ark., 2006; Benli ve ark., 2007; Kuljanabhagavad ve ark., 2011), analjezik ve antienflamatuvar (Hajhashemi ve ark., 2009); antikonvulsan (Sayyah ve ark., 2005; Tosun ve ark., 2008), antiviral (Tkachenko ve ark., 2006), antioksidan (Çoruh ve ark., 2007), apoptotik (Bogucka-Kocka ve ark., 2008; Kielbus ve ark., 2013), antikandida (İşcan ve ark., 2004; Naeini ve ark., 2009) aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

***Helianthemum* Cinsi**

Türkiye’de *H. nummularium* (Altınotu) türünün kabız ve kan kesici olduğu bilinmektedir (Baytop, 1999). *H. glomeratum*, Güney Meksika’da gastrointestinal rahatsızlıkları tedavi etmek için sık sık kullanılan tıbbi bir bitkidir. Yaprak ve köklerin dekoksasyonları ishal, karın ve epigastrik ağrıların tedavisinde kullanımı tavsiye edilmektedir (Meckes ve ark., 1999). Ayrıca *Helianthemum*’un farklı türleri İspanya ve Amerika’da geleneksel olarak antienflamatuvar, antiülserojenik, yara iyi edici, antiparaziter, antimikrobiyal, analjezik, sitotoksik ve vazodilatör etkili olarak kullanılmaktadır (Rubio-Moraga, 2013). *H. glomeratum* türünden anti-giardiya etkili bileşikler izole edilmiştir. Bu bileşikler arasında ise kemferol, tiliroset ve epikateşin bulunmaktadır. Bu bileşiklerin başta epikateşin olmak üzere önemli derecede anti-giardiya ve anti-protozoal aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Barbosa ve ark., 2007). Yine bu tür üzerinde yapılan diğer bir çalışmada flavon-3-ol, epigallokateşin ve epigallokateşingallat bileşikler izole edilmiş ve anti-amoebik ve anti-giardiya etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Alsabri ve ark., 2013). *Helianthemum* kökleri ile yapılan başka bir fitokimyasal çalışmada ise anti-giardiya ve

antiamoebik etkili bileşiklerden flavon-3-ol ve epigallokateşin tespit edilmiştir (Calzada ve Alanis, 2007). 11 farklı *Helianthemum* türünden elde edilen su ve % 80'lik metanol ekstreleri standart yöntemler kullanılarak fitokimyasal bileşim açısından analiz edilmiştir. Ayrıca, gallik asit, elajik asit, tanen ve flavonol tespiti için YBSK analizi yapılmıştır. Antioksidan aktivite ABTS⁺• ve DPPH• yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir.

Helianthemum yaprak ekstreleri arasındaki toplam polifenolik içerik ve antioksidan özellikler açısından önemli bir fark olduğu görülmüştür. Polifenolik profil her tür için spesifiktir (Meckes ve ark., 1999). *H. lippii*'nin metanol ekstrelerinin antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar ve antiülser etkileri değerlendirmiştir. Antimikrobiyal çalışmada; gram (+) bakterilerden *S. aureus*'a, gram (-) bakterilerden *E. coli* 'ye ve mantar olarak *C. albicans* 'a karşı etkisi ortaya konulmuştur. Ekstreler üzerindeki fitokimyasal tarama sonucu içeriğinde flavonoidler, tanenler, saponinler, basit fenolik bileşikler olduğu tespit edilmiş ve ayrıca güçlü bir antioksidan aktivite göstermiştir (Alsabri ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada *H. glomeratum* 'un toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstrelerine uygulanan fraksiyonlama işlemi ile antiprotozoal etkili 5 flavon glikoziti elde edilmiştir. Bunlar; tilirosit, kamferol, astragallin, kersitrin ve isokersitrin''dir. Antiprotozoal testlerin sonucuna göre tilirosit en güçlü antiamoebik ve anti-giardial etkiyi gösteren bileşik olmuştur. İzokersitrin, *E. histolytica* 'ya karşı seçicilik göstermiştir. Kersitrin''de *Giardia lamblia* 'ya karşı etki göstermiştir. Bütün izole bileşikler pozitif kontrol olarak kullanılan iki antiprotozoal ilaca; metronidazole ve emetine göre düşük aktivite göstermiştir. Özetle, *H. glomeratum* 'un toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstrelerinin antibakteriyal, antifungal ve antiprotozoal etkili oldukları tespit edilmiştir. Toprak üstü kısımlarından elde edilen flavonoidlerin (kamferol, kersetin ve tilirosit) antiamoebik aktivitelerinin yanısıra tuzlu su karidesine karşı ölümcül etkileri vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Bitkilerin Ekstraksiyonu

Çalışma kapsamında bitkilerin toprak üstü kısımlarından daha önceki çalışmalarımız için hazırlanmış %70'lik metanol ekstraktları kullanıldı. Bitkisel materyallerin kurutulmuş toprak üstü kısımları kaba toz edildikten sonra çalkalamalı su banyosunda %70'lik metanolle 3 gün boyunca oda sıcaklığında ekstre edilip rotavaporda yoğunlaştırıldı.

Tüm ekstraktlar liyofilize edilip analiz anına kadar -18°C de saklandı.

3.2. Ekstrelerin Sıvı Kromatografisi (LC)-Kütle Spektrometresi (MS/MS) ile Kimyasal İçerik Analizleri

Ekstrelerin kimyasal bileşimleri LC/MS/MS analizleri ile aydınlatılmıştır.

LC/MS/MS çalışma şartları:

Cihaz	: Shimadzu Prominence LC-20A ve Üçlü Kuadropol Hibrid Lineer İyon Trap Kütle Spektrometre Sistemi
Dedektör	: Shimadzu LC/MS-8040 LC/MS/MS sistemi
İyonlaşma modu	: Elektro Sprey İyonizasyon (ESI), negatif iyonlaşma
Hareketli faz	:A (%1 asetik asit su içerisinde) B (%1 asetik asit metanol içinde)
Akış hızı	: 0.2 mL/dak

3.3. *In vitro* deneyler

2.3.1. FR (ATCC® CRL-1213™) RAT FIBROBLAST Hücre Kültürü

Rattus norvegicus" un deri fibroblast hücresidir. Yapışan tipte özelliğe sahiptir ve 18 günlük Sprague- Dawley türündeki sıçandan elde edilerek ticari olarak satılmaktadır. Eagle"s Minimum Essential Medium" a (EMEM/ATCC-30-2003), fetal bovine serumun (FBS/Biochrom S 0415) son konsantrasyonu %10 ve penisilin streptomisininki (Sigma P4333) %1 olacak şekilde eklenerek elde edilen komple besiyerinde çoğaltılabilmektedir.

Satın alınan hücre 37 °C'de çözöldükten sonra önceden hazırlanmış komple besiyerinde 1:10 oranında dilüe edilmiş ve dondurma çözeltisinden santrifüj yardımıyla kurtarıldıktan sonra hücre sayısına göre 25 cm² (5ml besiyerinde) veya 75 cm² (10ml besiyerinde) yüzey alanına sahip flasklara ekilmiştir. Flaskta %70 doluluk oranına ulaşıldığında %0.25' lik tripsin EDTA (Sigma-T4049) ile kaldırılıp besiyeri ile deaktivasyondan sonra hücreler santrifüjle elde edilmiştir. Bu hücreler yapılacak olan canlılık ve diğer deneyler için hücre sayımı yapılarak kullanılmış veya stok oluşturmak için %5 dimetil sülfoksit (DMSO/Applichem A3672) içeren komple besiyerinde dondurularak -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçölmesi

Hazırlanan hücre kültürlerinde Glutasyon Peroksidaz (GSHPx) aktivitesi, Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi ve TBARS düzeyleri gibi en çok bilinen oksidatif stres parametreleri ticari kitler aracılığı ile kit prosedürüne göre spektrofotometrik olarak ölçölmek suretiyle değeriendirilmiştir.

3.3.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Profilleme Deneyi (Xcelligence)

Hücrelerin 4. veya 5. pasajında öncelikle gerçek zamanlı hücre analizi (GZHA) kullanılarak büyüme profili deneyi yapılmıştır. Hücrelerin istenilen sayıda çoğaltılmasından sonra, sayılmaları için tripan mavisi metodu ile çalışan Innovatis Cedex Xs cihazı kullanılmıştır. Elde edilen hücre sayısı/ml verilerine dayanarak hücreler 8 tekrarlı olarak 50,000 hücre, 25,000 hücre, 12,500 hücre, 6250 hücre, 3125 hücre, 1622 hücre

sayılarında e-plakanın her bir kuyucuğuna 100 µL hacminde ekim yapılmıştır. Ekim için plakanın solundan sağına doğru 100 µL hacmindeki mikro pipetle hücrelere seri dilüsyon uygulanmış ve kuyular arasında aktarım yapılırken, pipetajla homojen bir karışım elde edilmesi sağlanmıştır. Besiyerinden kaynaklanan hücre endeksi değişiminin kontrolü için hücre içermeyen besiyeri kuyusu kontrol olarak kullanılmıştır. GZHA yazılımı aracılığıyla her 15 dk' da bir hücre endeksi ölçülmüş ve 50 saat boyunca devam edecek şekilde cihaz kurulmuştur. Hücre büyüme profilleri elde edildikten sonra deney sonlandırılmıştır. Büyüme profili deneyinden elde edilen verilere dayanarak MTT deneyinde kullanılacak hücre sayısı, besiyeri miktarı ve deney süresinin uzunluğu standardize edilmiştir (Pana ve ark. 2013; Moe ve ark. 2013).

3.3.4. MTT (3(4,5-dimetil tiazolil-2)2,5-difenil tetrazolium bromit) Canlılık Testi

Hücre canlılığı MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromit) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu testi kullanılarak incelenmiştir. İlk olarak 5×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda hücre alınıp steril 96 well plate içine yerleştirilmiştir. Denenecek ekstre ve maddelerin ilgili dozları uygulanıp 24- 48 saat inkübasyon ardından her bir kuyucuğa 10 µL medium içinde hazırlanmış MTT (5 mg/mL) eklenip 37 °C, CO₂'li etüvde 4 saat inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon sonrası 96'lık plateler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra MTT içeren süpernatant vakum ile uzaklaştırılmıştır. Ardından kuyucuklara MTT'nin hücre sel metabolizması sonucu oluşan kristal formazon tuzunu çözmek için 100 µL DMSO eklenmiştir. Optik yoğunluk 550 nm' de multifonksiyonel mikrop laka okuyucuda okunmuştur. IC₅₀ değeri, kontrol olarak DMSO uygulanan hücrelerle kıyaslanarak, kontrol grubundaki hücre sayısının %50 azaldığı madde konsantrasyonu hesaplanarak belirlenmiştir (Price ve ark. 1990).

3.3.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Sitotoksiste Deneyi (Xcelligence)

MTT deneylerinde IC₅₀ değeri hesaplanmasında kullanılan konsantrasyonlar göz önünde bulundurularak GZHA sitotoksiste deneyi yapılmıştır. Profilleme deneyinden elde edilen hücre sayısı verilerine dayanarak hücreler e-plate" ye ekilmiştir ve hücreler henüz proliferasyon-konfluens açısından platoya ulaşmadan ekstreler uygulanmıştır. Ekstrelerin akut etkilerinin gözlenebilmesi için cihaz her 15 sn'de bir 2 saat boyunca ve bu 2 saat sonrasında ise 15 dk'da bir okuma yapacak şekilde kurulmuştur. Ekstreler için akut, 24 ve 48 saat IC₅₀ değeri hesaplatılmıştır.

3.3.6. Deneylerde kullanılan mikroorganizmaların standardizasyonu

Deneylerde kullanılan mikroorganizmaların standardizasyonu, National Center for Infectious Diseases (NCID) ve Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, ABD'nin yayınlamış olduğu, “Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera” adlı kitapta (NCID/CDC/WHO/AFRO 1999), anlatılan metod izlenerek yapılmıştır. Minimum İnhibisyon yöntemi kullanmadan önce, bakteri örnekleri 0.5 McFarland standardı ile karşılaştırılarak standardize edilmiştir. Bakteri kültürleri öncelikle izole koloniler elde etmek amacıyla agar ortamına ekilerek, 37 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra 4-5 tane iyi izole olmuş koloni, öze yardımıyla %0.9'luk serum fizyolojik içine alınmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonu, süspansiyonun bulanıklığı türbidometrede 0,5 McFarland standardına ayarlanmıştır.

3.3.7. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)

Çalışmada kullanılacak olan test mikroorganizmaları (*Staphylococcus aureus* ATCC29213,

Staphylococcus epidermidis ATCC 3699, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC 90028) 5 ml’lik Nutrient sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir. 96 kuyucuklu plakta farklı konsantrasyonlarda bitki ekstraktı içeren 0.2 ml nutrient sıvı besiyeri üzerine % 5 oranında bakteri ekilip, 24 saat 37°’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bulanıklığın bittiği konsantrasyon bakteri canlılığının bittiği nokta olarak kabul edilerek MİK olarak belirlenmiştir. Tüm analizler iki paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3.8. Antienflamatuvar aktivite tayini

Çalışmalarımızda kullanacağımız LPS ve ekstrelerin dozları ve LPS nin inkübasyon süresi ön çalışma ile belirlenmiştir. Ön çalışmalarımızda inflamasyonun etkin biçimde tetiklenmesi için gerekli LPS dozu ve LPS inkübasyon süresi xCELLigence cihazı ile belirlenmiştir.

3.3.9. ELISA protein ifadenmelerinin ölçümü

LPS ile indüklenen hücrelerde sitokinler İnterlökin 1, İnterlökin 6, İnterferon β , İnterferon α ve siklooksijenaz-2 ve ürünü olan prostaglandin E2 (PGE2) düzeyleri ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Hücreler proteaz inhibitör koktail içeren fosfat tamponu içersinde lizis edildikten sonra elde edilen protein örneklerde ve hücre besi ortamında salınan sitokin ve prostaglandin E2 (PGE2) antikorla kaplanmış eliza plaklarına uygulanmıştır.

3.3.10. Hücre içi ve besi ortamına salınan nitrik oksit düzeylerinin ölçümü

Hücrelerde olusan ve besi ortamına salınan nitrik oksit, spektrofotometrik olarak olusan Nitrit-nitrat miktarının saptanmasıyla degerlendirilmiştir. Homojenatlar ve besi yeri örnekleri her bir kuyucukta 100 μ l olacak sekilde ayarlanmıştır ve bu ortamlar, 100 μ l of Griess reaktifi ile (0.1 mol/l HCl ve 0.1% N-(1- naftil) etilendiamin dihidroklorid içinde 1% sülfonilamid) oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonunda olusan renk, 540 nm de mikropalak okuyucuda saptanacak ve sodyum nitrit standardına göre hesaplama yapılmıştır.

3.4. *In vivo* deneyler

3.4.1. Bitkilerin yara iyileştirici ve anti-enflamatuvar aktivitelерinin belirlenmesi

Yara iyileştirici aktivitenin değerlendirilmesi için *in vivo* yara modelleri ve akut anti-enflamatuvar etkinin tayinine yönelik deney modeli kullanılmış; aktif bileşenler üzerinde ise *in vitro* enzim inhibisyonuna dayanan çalışmalar yapılmıştır (Süntar, 2011).

3.4.2. Deney Hayvanları

160-180 g ağırlığında erkek Sprague Dawley sıçanlar ve 25-30 g ağırlığında erkek Swiss Albino fareler (her grupta altı hayvan olmak üzere) kullanılmıştır.

3.4.3. Deneylerde kullanılacak test numunelerinin hazırlanma şekilleri

Test numuneleri %1 oranında ekstre/fraksiyon içerecek şekilde Madecassol® pomat (Bayer)'in bazı olan glikol sterarat:1,2 propilen glikol: sıvı parafin (3:6:1) kullanılarak hazırlanmıştır.

Anti-enflamatuvar etkinin değerlendirilebilmesi için, test numuneleri %0.5'lik sodyum karboksimetil selüloz (CMC) çözeltisi içerisinde hazırlanacak, deney hayvanlarına özel mide gavajı vasıtasıyla oral yolla uygulanmıştır. Kontrol grubu hayvanlarına ise sadece %0.5'lik CMC verilmiştir.

3.4.4. Referans Maddeler

Yara iyileştirici etkinin tayininde sonuçların karşılaştırılması amacıyla, standart yara iyileştirici madde olarak Madecassol® pomat kullanılmıştır. Anti-enflamatuvar aktivite deneyinde referans madde olarak %0.5'lik CMC içinde hazırlanmış 10 mg/kg indometasin; Hyaluronidaz enzim inhibisyonu deneyinde 100 µg/ml konsantrasyonda tannik asit; Kolajenaz ve elastaz enzim inhibisyonu deneylerinde 100 µg/ml konsantrasyonda epigallokateşin gallat referans madde olarak kullanılmıştır.

3.4.5. Yara İyileştirici Aktivitenin Belirlenmesi

3.4.5.1. 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 değerlendirilmiştir (Suguna ve ark., 2002; Lodhi ve ark., 2006). Sıçanlara intraperitoneal yolla 0.05 cc Ksilazin (%2 Alfazine®) ve 0.15 cc Ketamin (%10 Ketazol®) enjeksiyonu ile genel anestezi yapılmış, sırt kısımlarının orta hattından 2 cm uzaklıkta bistüri ile iki adet 5 cm'lik çizgisel insizyon yarası oluşturulmuştur. Cerrahi ipek iplikle eşit aralıklarla 3 adet dikiş atılacak, 9 gün boyunca günde bir defa 500'er mg ekstre/fraksiyon içeren merhem formülasyonları haricen yaralara uygulanacaktır. 9. gün sonunda dikişler alınacak, 10. gün hayvanlar anestezi ile sakrifiye edilerek, yara alanları çıkarılmıştır. Yaralardan biri histopatolojik incelemeler için ayrılacak, diğer

yararının tensiometre ile gerilim kuvveti ölçülmüştür (Süntar ve ark., 2011) (Şekil 5).



Şekil 5. Çizgisel İnsizyon Yara Modeli

3.4.5.2. Dairesel Eksizyon Yara Modeli

Farelere intraperitoneal yolla 0.02 cc Ksilazin (%2 Alfazine®) ve 0.08 cc Ketamin (%10 Ketazol®) ile genel anestezi yapılacak, biopsi punch ile 5 mm çapında daireSEL eksizyon yarası oluşturulmuştur. 12 gün boyunca 500'er mg ekstre/fraksiyon içeren merhem formülasyonları haricen yaralara uygulanacak, yara alanlarının her gün dijital fotoğraf makinesi ile resimleri çekilecektir. AutoCAD programı kullanılarak yara alanlarındaki küçülme hesaplanmıştır (Sadaf ve ark., 2006; Küpeli ve ark., 2011) (Şekil 6).



Şekil 6. Dairesel Eksizyon Yara Modeli

3.4.5.3. Histopatolojik İncelemeler

%10'luk tamponlu formaldehitte saklanan örneklerden 5 µm kalınlığındaki kesitler alınacak hematoxilen-eozin (HE) ve Van Gieson (VG) boyaları ile boyanacaktır. Işık mikroskobu (Olympus CX41 bağlı Kameram® Dijital Image Analiz Sistemi) altında incelenen dokularda epidermal ve dermal re- modelleme hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olmak üzere derecelendirilmiştir (Peşin Süntar ve ark., 2010; Süntar ve ark., 2010).

3.4.5.4. Kolajen Bağ Dokunun Saptanması

3.4.5.4.1. Hidroksiprolin Tayini

Hidroksiprolin standartının ölçümü için 5 mg hidroksiprolin 50 ml 0.001 N HCl'de çözülerek hazırlanan stok çözeltisinden bir seri dilüsyon çözeltileri (0.5 µg/ml; 1 µg/ml; 1.5 µg/ml; 2 µg/ml ve 2.5 µg/ml) hazırlanmıştır. Diğer taraftan ölçümü yapılacak dokular tartılarak üzerine 5 ml 6 N HCl ilave edilmiştir.

130°C'de 3 saat hidroliz edilen dokular üzerine indikatör olarak birkaç damla %0.02'lik metil kırmızısı eklenecek, çözeltinin rengi sarıya dönene kadar pH 6-7 arasında olana kadar 2.5 N NaOH eklenmiştir.

Hem standart hem de test çözeltileri üzerine Kloramin T eklenecek, 20 dk oda ısısında bekletildikten sonra perklorik asit ilave edilmiştir. 1 ml taze hazırlanmış 0.2 g/ml *p*-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi eklenmiş, tabakalanma kayboluncaya kadar çalkalanacaktır. 60°C su banyosunda 20 dk bekletilmiş ve soğutulduktan sonra çözeltilerin absorbansı 557 nm'de ölçülmüştür (Woessener, 1961; Değim ve ark., 2002).

3.4.5.5. Antienflamatuvar Aktivitenin Belirlenmesi

3.4.5.5.1. Asetik Asit-Nedenli Kapiller Permeabilite Artışının İnhibisyonu (Whittle Yöntemi)

Farelere test numuneleri ve referans olarak kullanılan indometazin uygulandıktan 30 dakika sonra her farenin marjinal kuyruk venasına %4'lük Evans Blue çözeltisinden 0.1 ml enjekte edilecek, 10 dakika sonra %0.5'lik asetik asit çözeltisinden 0.4 ml intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Hayvanlar 20 dakika sonra servikal dislokasyonla öldürülerek, Periton içeriği distile su ile yıkanarak içinde 0.1 N NaOH bulunan 10 ml'lik balon jojelere aktarılmış ve distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Boyanın absorbansı 590 nm'de Beckman Due Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için 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 hazırlanarak 590 nm'de absorbansları ölçülmüştür (Küpeli, 2000).

3.4.5.5.2. Hyaluronidaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi

50 µl sıgır hyaluronidazı (7900 ünite/ml) 0.1 M asetat tamponunda çözülecek (pH 3.6), bu çözelti iki farklı konsantrasyonda %5 DMSO içinde çözünmüş 50 µl test numunesi çözeltisi ile katıştırılmıştır. 37°C'de 20 dakika inkübasyonun ardından karışıma 50 µl kalsiyum klorür (12.5 mM) ilave edilerek 37°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmış, 250 µl sodyum hyaluronat (1.2 mg/ml) eklenecek ve 37°C'de 40 dakika inkübe edilmiştir. Karışım 50 µl 0.4 M NaOH ve 100 µl 0.2 M sodyum borat ilavesinden sonra kaynayan su banyosunda bekletilmiştir. Soğuduktan sonra 1.5 ml *p*-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra absorbansı 585 nm'de ölçülmüştür (Lee ve Choi, 1999; Shasrabudhe ve Deodhar, 2010).

3.4.5.6. Kolajenaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi

Clostridium histolyticum kolajenaz enzimi (ChC) 0.8 ünite/ml olacak şekilde 50 mM tris tamponu (10 mM CaCl₂ ve 400 mM NaCl ile) içinde çözülecek, substrat N-[3-(2-furil) akrilolil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) aynı tampon içinde 2 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. 25 µL tampon, 25 µL test numunesi ve 25 µL enzim her kuyucuya eklenmiş ve 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 50 µL substrat eklendikten sonra absorbans 340 nm'de ölçülmüştür (Barrantes ve Guinea, 2003).

3.4.5.7. Elastaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi

Test numuneleri ve insan nötrofil elastaz enzimi (HNE) (17 mU/ml) 0.1M tris-HCl tamponu (pH 7.5) ile 25°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmış, karışıma HNE'nin substratı N-(metoksisüksinil)-ala-ala-pro-val-4-nitroanilit (MAAPVN) (500 lM) eklenerek 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra karışıma 1 mg/ml soya tripsin inhibitörü eklenerek *p*-Nitroanilin oluşumuna bağlı olarak 405 nm'de absorpsiyon ölçülmüştür (Melzig ve ark., 2001).

4. BULGULAR

4.1. Bitkilerin Ekstraksiyonu

Çalışmalarda kullanılan bitkilerin toprak üstü kısımlarından %70 metanol ile masere edilerek ekstreler hazırlanandı ve çözücüleri vakum altında düşük sıcaklıkta uzaklaştırıldıktan sonra -18 °C de analiz anına kadar saklandı. Tüm analizlerde aynı ekstreler kullanıldı. Ekstre verimleri Tablo 1’de verilmiştir.

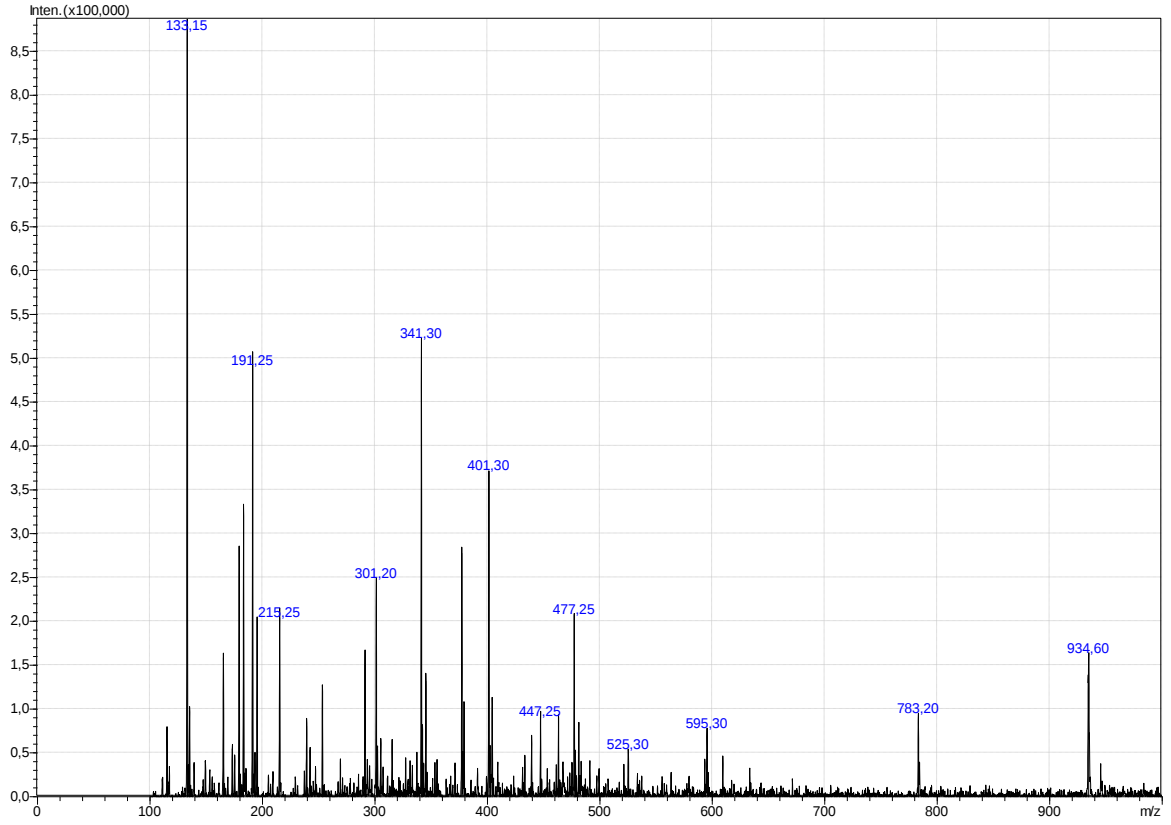
Tablo 1. Kullanılan bitkilerin ekstre verimleri

Bitki	Kod	Verim [%]
<i>Potentilla recta</i>	PRec	20.50
<i>Potentilla reptans</i>	PRep	25.08
<i>Helianthemum canum</i>	HCM	17.74
<i>Heracleum platytaenium</i>	HPM	21.60

*Ortalama $\pm$ SD; Pe70 : %70’lik metanol ekstresi

4.2. Sıvı kromatografisi Kütle Spektrometresi (SK-KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

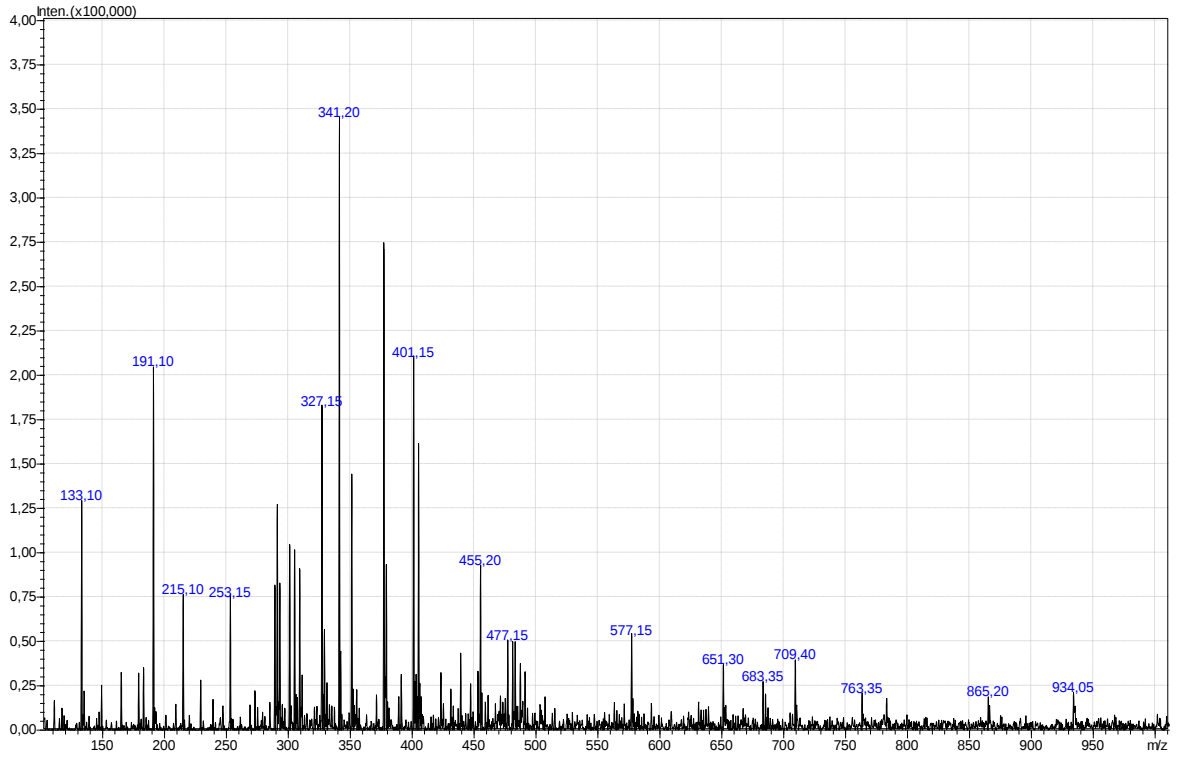
Tüm çalışılan ekstreler sıvı kromatografisi sistemi ile ayrıldıktan sonra, Kütle Spektrometre dedektörü kullanılarak moleküler iyon pikleri ve temel pikler üzerinden değerlendirilmeleri yapıldı. Ekstrelerin toplam iyon spektrumları [E(-) Q3 scan modu] Şekil 7-10’da, ekstrede tanımlanan bileşikler ise Tablo 2-5’de verilmiştir.



Şekil 7. *P. recta* (PRec) ekstresinin toplam iyon spektrumu [E(-) Q3 scan modu]

Tablo 2. *P. recta* (PRec) ekstresinde SK-KS/KS ile tanımlanan maddeler

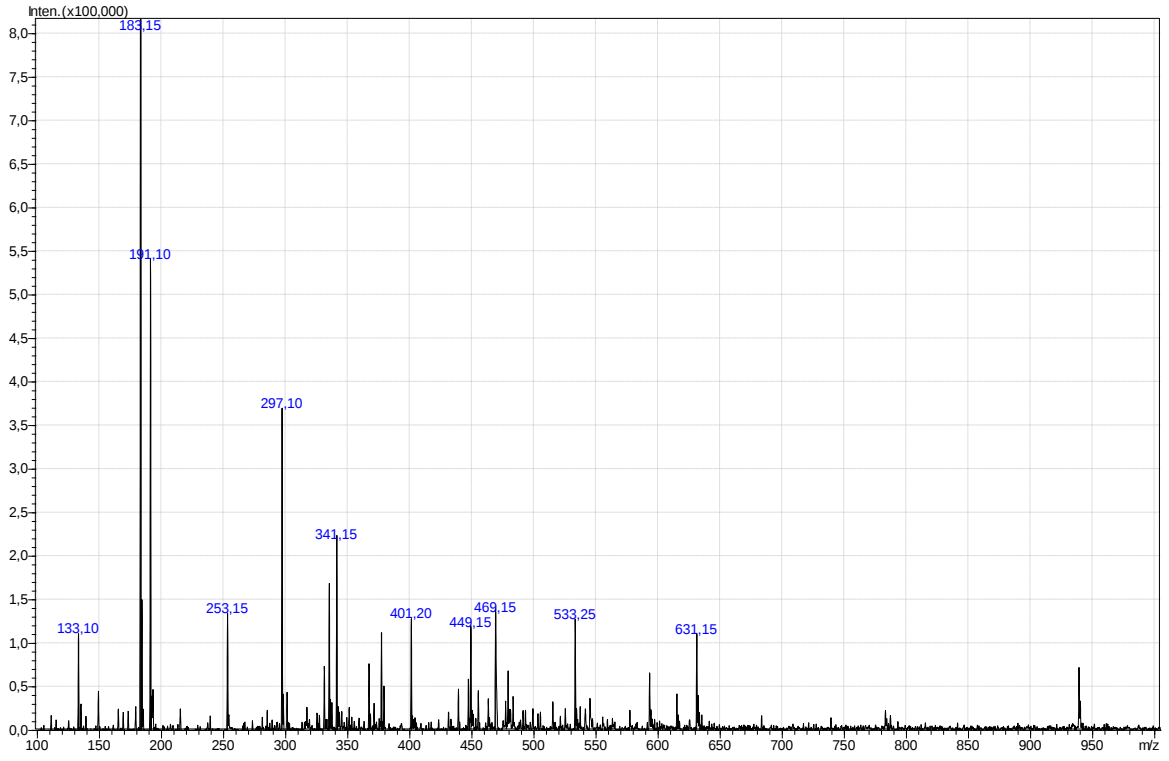
MA	[M-H] m/z	Madde
192	191, 85	Kinik asit
302	301, 199, 145	Elajik asit
342	341, 179, 119	Kafeik asit türevi
448	447, 284, 255	Kemferol-3-glikozit
478	477, 301, 135	Kersetin glukronit
596	595, 301	Kersetin türevi
784	783, 301, 275	Bis-HHDP glukoz
935	934, 633, 301	Potentilin



Şekil 8. *P. reptans* (PRep) ekstresinin toplam iyon spektrumu [E(-) Q3 scan modu]

Tablo 3. *P. reptans* (PRep) ekstresinde SK-KS/KS ile tanımlanan maddeler

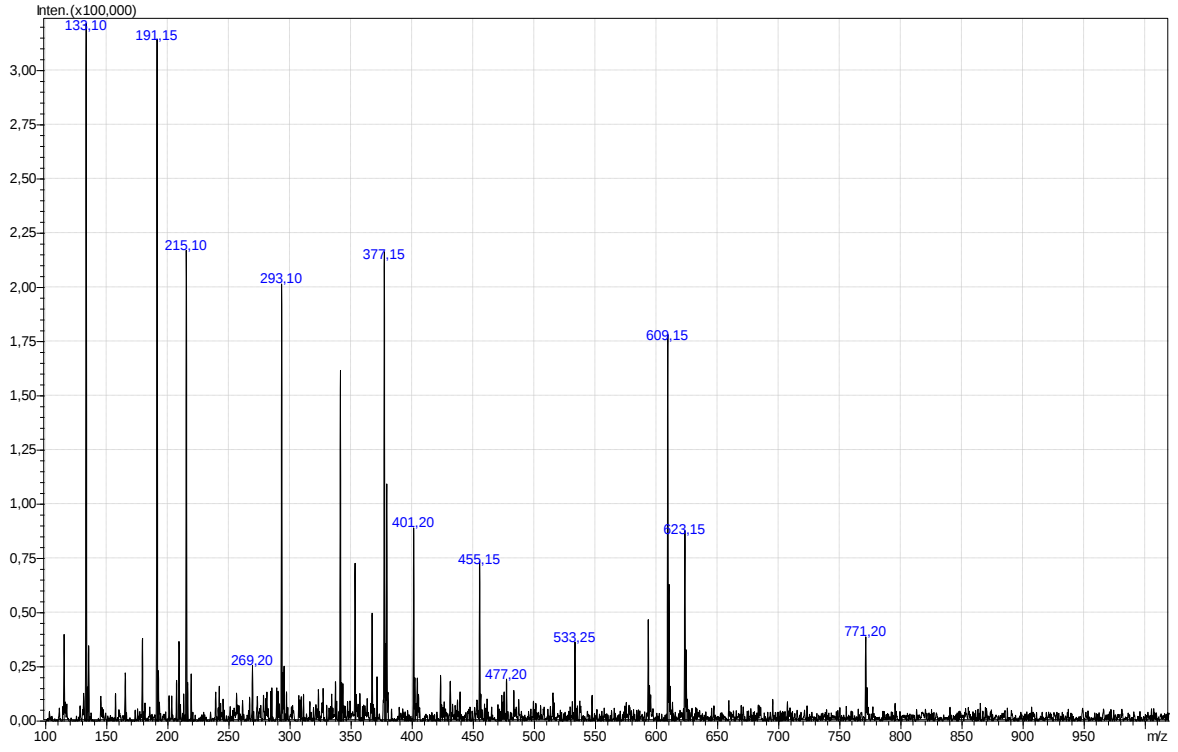
MA	[M-H] m/z	Madde
192	191, 85	Kinik asit
302	301, 199, 145	Elajik asit
342	341, 179, 119	Kafeik asit türevi
478	477, 301, 135	Kersetin glukronit
784	783, 301, 275	Bis-HHDP glukoz
935	934, 633, 301	Potentilin



Şekil 9 *H. canum* (HCM) ekstresinin toplam iyon spektrumu [E(-) Q3 scan modu]

Tablo 4. *H. canum* (HCM) ekstresinde SK-KS/KS ile tanımlanan maddeler

MA	[M-H] m/z	Madde
184	183, 124, 78	Metil gallate
192	191, 85	Kinik asit
297	296, 183, 124	Metil gallat türevi
335	334, 183, 124	Metil gallat türevi
449	448, 317, 179	Mirsetin türevi
469	468, 448, 169	Galloil türevi
631	630, 317, 179	Mirsetin türevi
939	938, 769, 429	Penta galloil glukoz



Şekil 10. *H. plathytataenium* (HPM) ekstresinin toplam iyon spektrumu [E(-) Q3 scan modu]

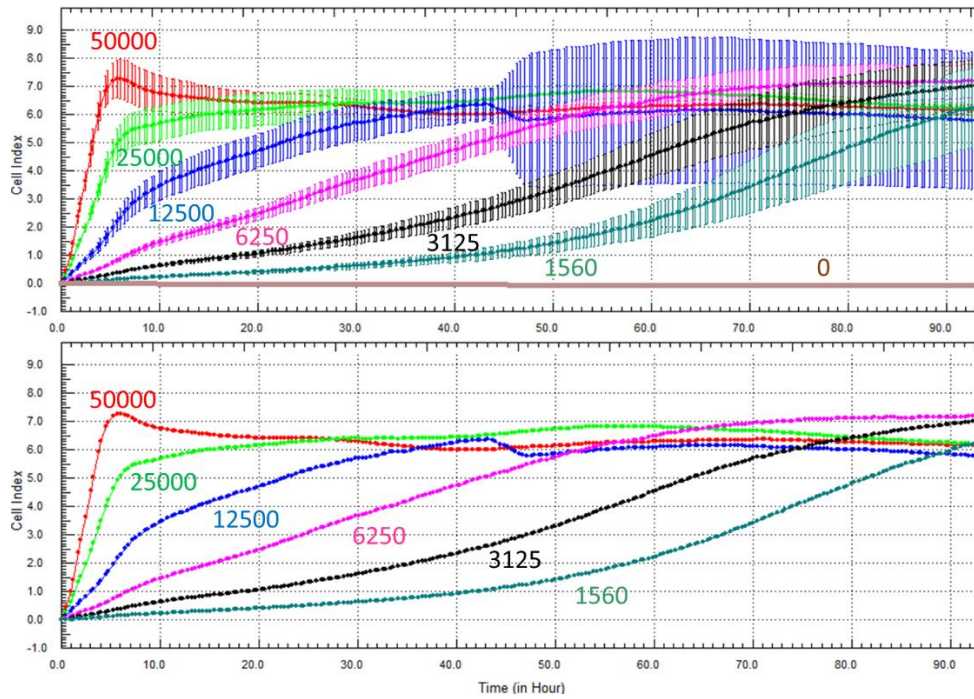
Tablo 5. *H. plathytataenium* (HPM) ekstresinde SK-KS/KS ile tanımlanan maddeler

MA	[M-H] m/z	Madde
192	191, 85	Kinik asit
216	215	Xanthotoxin
378	377, 341, 179	Kafeik asit türevi
402	401, 341, 179, 119	Kafeik asit türevi
610	609, 300, 271	Rutin
772		Bilinmeyen

4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları Bulguları

4.3.1. Hücre Profilleme Deneyi

90 saate kadar varan ölçümler sonucunda 96 kuyucuklu plakalar için 200 μL ' lik bir besiyeri ortamındaki 1560, 3125 ve 6250 hücrenin herhangi bir plato çizmediği ve dolayısıyla plaka yüzey alanı ile ortamdaki besiyeri miktarı göz önüne alındığında 96 kuyucuklu bir plakada fibroblast hücresi ile yürütülecek herhangi bir deneyde bu hücre sayılarının uygun olduğu; bir kuyuda 12500 ve daha fazla sayıda hücre bulunması halinde ise 30. saatten sonra plato olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla kuyu başına 12500 ve daha fazla hücrenin deneylerde kullanılması uygun değildir. Bu sonuçlara dayanarak SRB ve GZHA canlılık deneyleri için kuyu başına ortalama 5000 adet hücrenin uygun olduğu görülmüştür. Bu deney verilerine göre 96' lık plaka dışındaki diğer plakalara ekim yapılmak istenirse bağıl yüzey alanına göre uygun hücre sayısı belirlenebilir (Şekil 11).

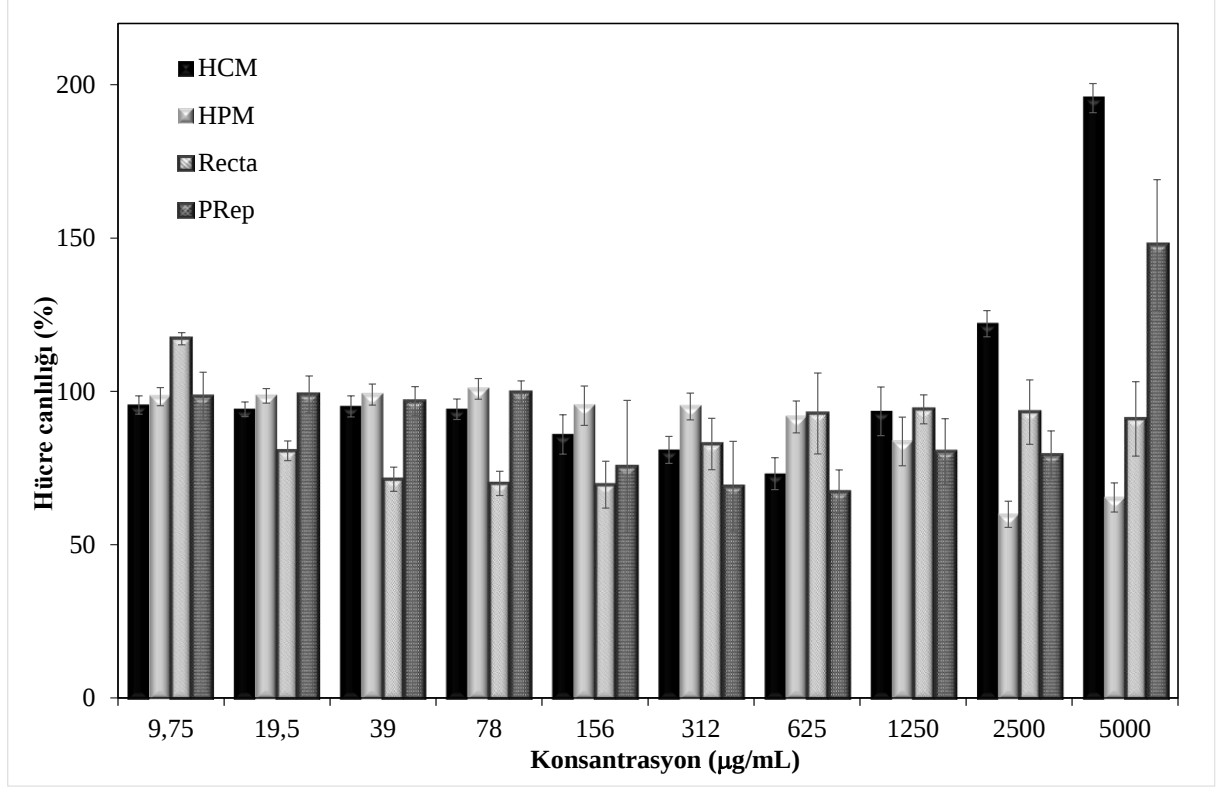


Şekil 11. FR hücre büyüme profili

4.3.2. Sulphorhodamine B (SRB) Canlılık Deneyi

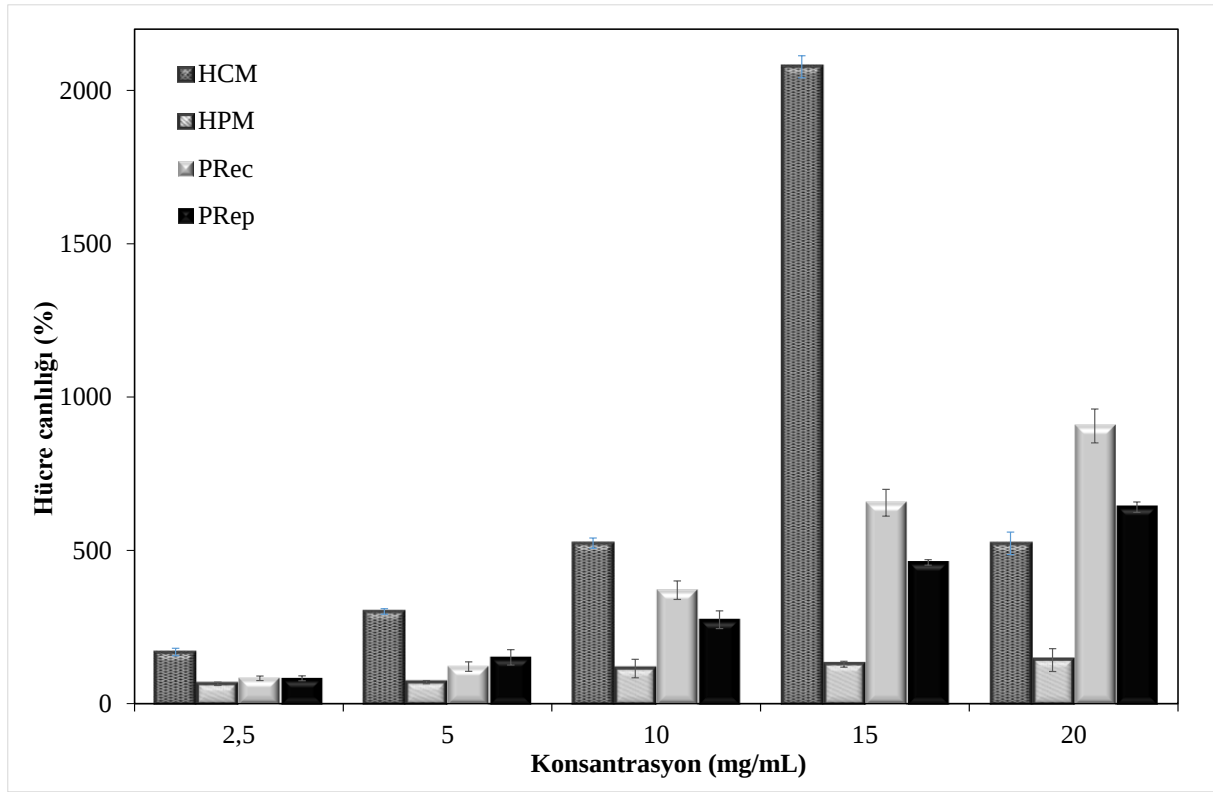
Şekil 12' de görüldüğü gibi HCM ekstresi için düşük konsantrasyonlarda fibroblast hücresi canlılığında herhangi bir azalma meydana gelmezken; yüksek konsantrasyonlarda SRB deneyi için canlılıkta artış söz konusudur. HPM ekstresinde ise 1250 $\mu\text{g/ml}$ ' ye kadar canlılıkta düşüş gözlenmemiştir, daha yüksek dozlarda ise canlılık azalmıştır. PRec ekstresi için 625

$\mu\text{g/ml}$ ' den daha yüksek konsantrasyonlarda canlılıkta anlamlı bir düşüş vardır. PRep ekstresinde ise 312 ve 625 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında canlılık azalmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Tüm ekstreler genel tarama SRB canlılık deneyi

Yapılan ilk deneyin sonuçlarına göre ekstrelerin tamamı için 156 $\mu\text{g/ml}$ ' ye kadar canlılıkta anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir; dolayısıyla bu konsantrasyonlara kadar yara iyileştirici etki mekanizmalarının araştırılması anlamlı iken; daha yüksek konsantrasyonlarda canlılığın azalabileceği düşünülmüştür. Bunu açıklığa kavuşturmak için yüksek konsantrasyonlarda deneyler tekrarlanmıştır (Şekil 13).



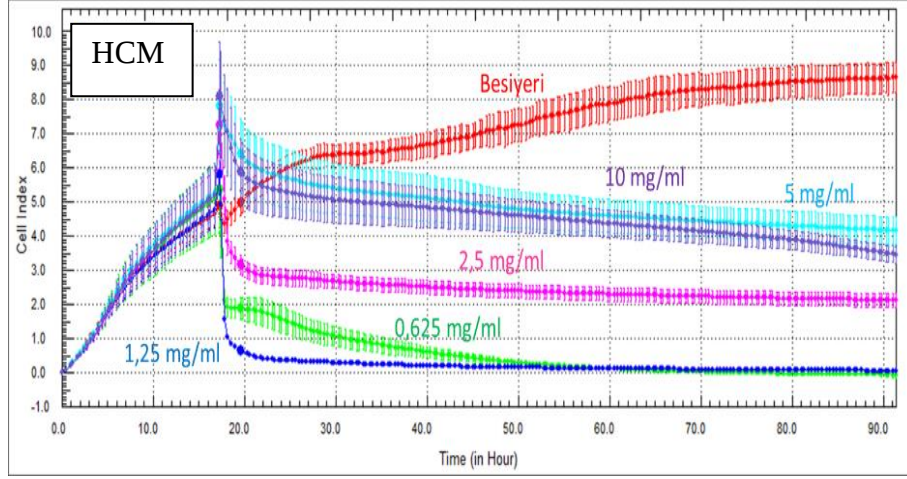
Şekil 13. Tüm ekstreler yüksek konsantrasyonlar için SRB canlılık deneyi

Yüksek konsantrasyonlar için yapılan deneyde tüm ekstreler için canlılıkta bir artış gözlenmiştir; ancak bu artışın ekstrelerin yüksek konsantrasyonlarında plaka tabanında çökmesine bağlı olarak absorpsiyon ölçümlerinin etkilenmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. SRB deneylerinde ekstreler belirgin düzeyde canlılıkta düşüş yapmadıklarından bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.

4.3.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (GZHA) Deneyi

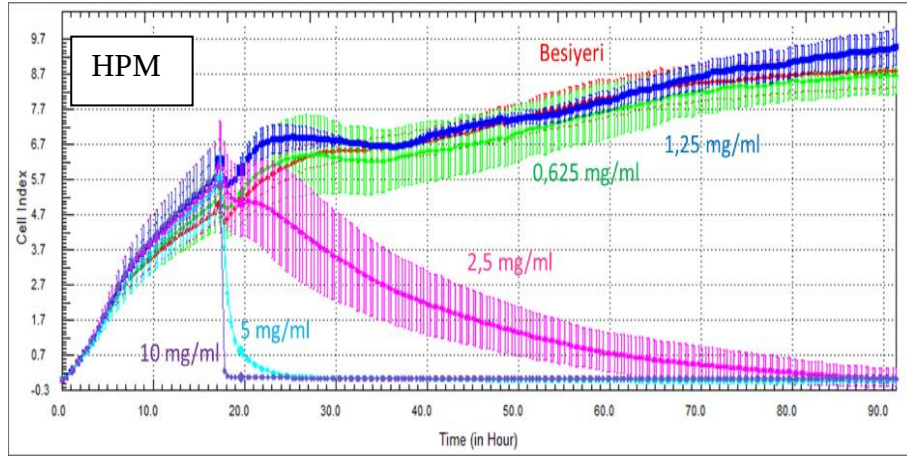
SRB deneylerindeki yüksek konsantrasyonda canlılığı artırıcı etkinin doğrulanması için absorpsiyon mekanizmasından farklı olarak plaka yüzeyine yapışan hücrelerin elektriksel alanda oluşturmuş olduğu dirence bağlı ölçüm yapan gerçek zamanlı hücre analizi deneyi yapılmıştır (Şekil 14-17).

Şekil 14’ de görüldüğü gibi HCM için, SRB’ ye zıt olarak yüksek konsantrasyonlarda ekstrenin sitotoksik olduğu görülmüştür ve bu sonuçlara göre 24 sa IC_{50} değeri 2.7 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



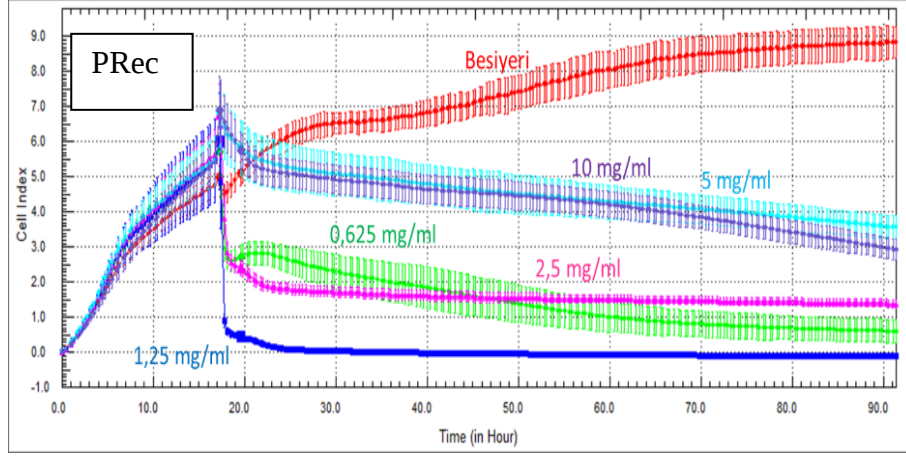
Şekil 14. HCM gerçek zamanlı hücre analizi deneyi

Şekil 15’ de görüldüğü üzere HPM’ nin, 2.5 mg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücreye toksik etki gösterdiği görülmüş ve verilere göre 24 sa IC₅₀ değeri 1.7 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



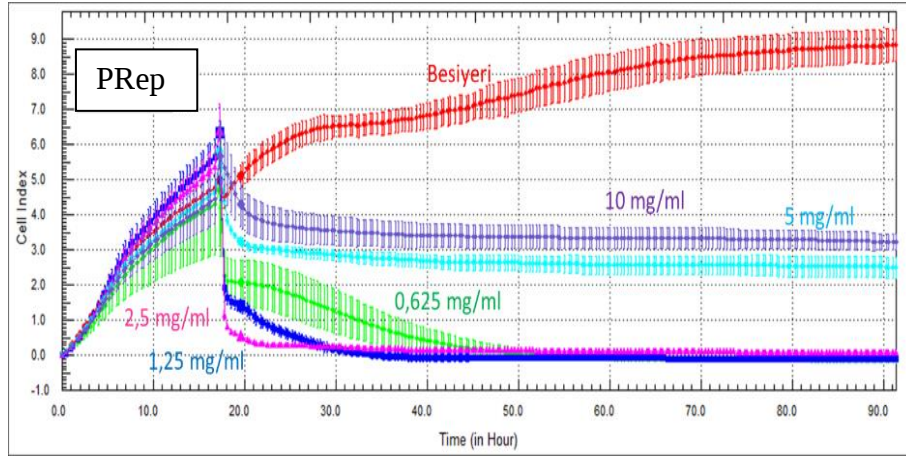
Şekil 15. HPM gerçek zamanlı hücre analizi deneyi

Şekil 17’ de görüldüğü üzere *P. recta*’ nın, yüksek konsantrasyonlarda canlılığı azaltıcı etkisi gözlenmiş ve 24 sa IC₅₀ değeri 8.3 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 16. Recta gerçek zamanlı hücre analizi deneyi

Şekil 16' de görüldüğü üzere *P. reptans*, yüksek konsantrasyonlarda canlılığı azaltmış ve 24 sa IC_{50} değeri 17.5 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

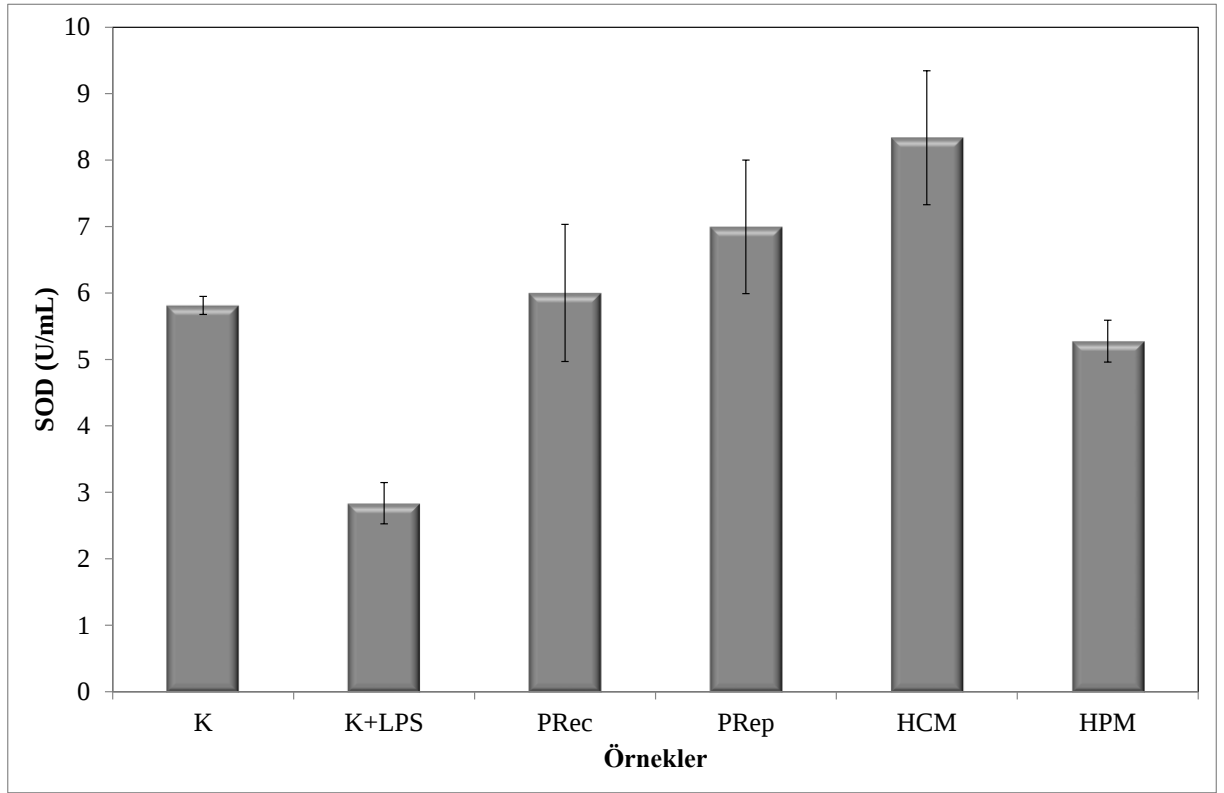


Şekil 17. Repta gerçek zamanlı hücre analizi deneyi

Sonuç olarak SRB deneyleriyle genel doz taraması yapılırken; GZHA deneyiyle toksik konsantrasyonlar için bir IC_{50} değeri bulunmuştur.

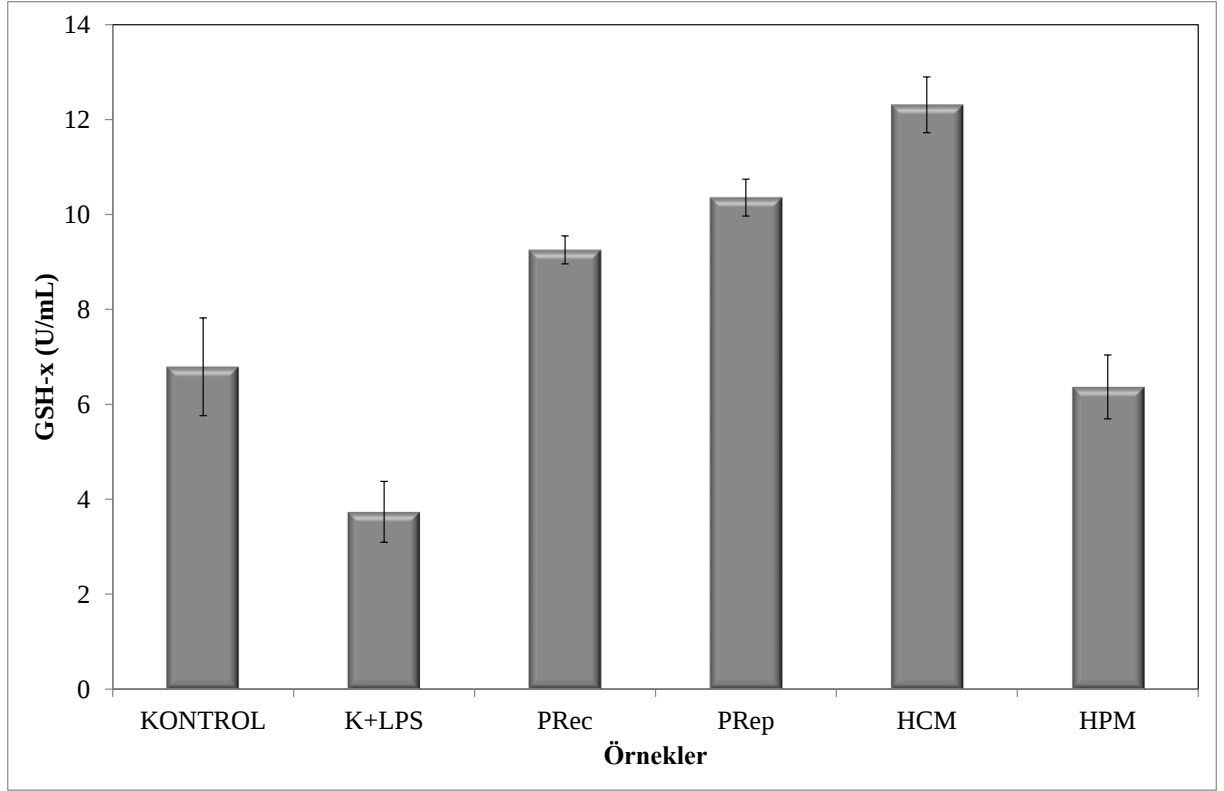
GZHA deney sonuçlarına göre ekstraler için bir IC_{50} değeri hesaplatılmıştır. Fibroblast tipindeki bu hücrelerde yürütülecek olan etki mekanizmalarıyla ilgili deneylerin sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, tüm ekstraler için 156 $\mu\text{g/ml}$ ' den daha düşük konsantrasyonlarda yapılmasının uygun olacağına karar verilmiştir; çünkü bu konsantrasyonlarda hiçbir ekstrenin canlılığı azaltmadığı saptanmıştır.

4.3.4. Oksidatif Stres Parametreleri Bulguları



Şekil 18. Ekstrelerin SOD üzerine etkisi.

LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda uygulanmayan kuyucuğa göre SOD seviyesinde azalma olmuştur. 78 µg/mL dozda ekstrenin uygulandığı kuyucuklarda LPS uygulanan kontrole göre SOD seviyesinde artış görülmüştür. Ekstrelerin SOD üzerine etkileri HCM > PRep > PRec > HPM şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 18).



Şekil 19. Ekstrelerin GSH-Px üzerine etkisi.

LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda uygulanmayan kuyucuğa göre GSH-Px seviyesinde azalma olmuştur. 78 µg/mL dozda ekstrenin uygulandığı kuyucuklarda LPS uygulanan kontrole göre GSH-Px seviyesinde artış görülmüştür. Ekstrelerin GSH-Px üzerine etkileri HCM > PRep > PRec > HPM şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 19).

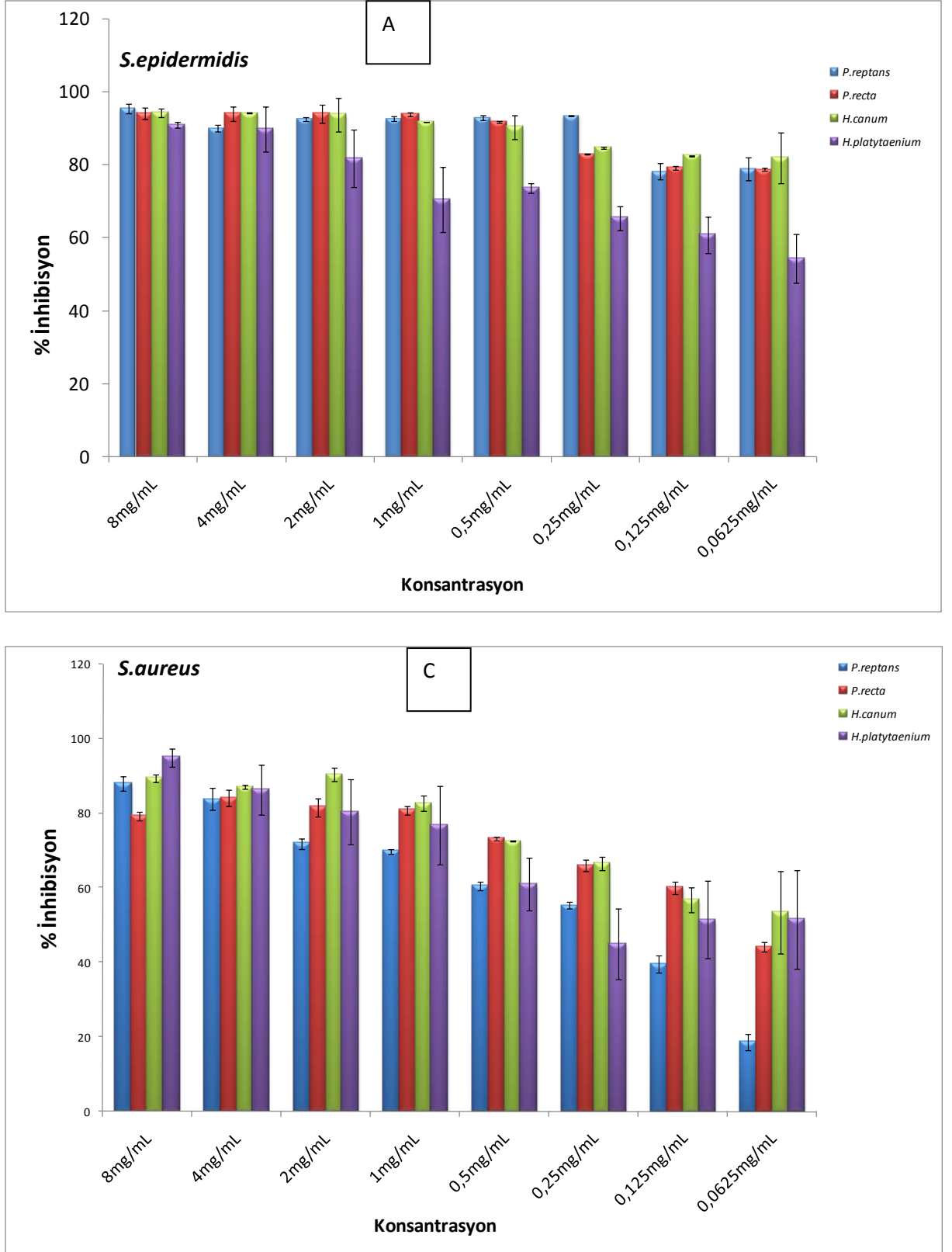
4.4. In Vitro Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Ekstreler *Staphylococcus epidermidis* bakterisine karşı en düşük konsantrasyon olan 0,0625 mg/mL konsantrasyonda bile yüksek inhibisyon göstermişlerdir. Ekstreler arasında en düşük aktiviteyi HPM göstermiştir.

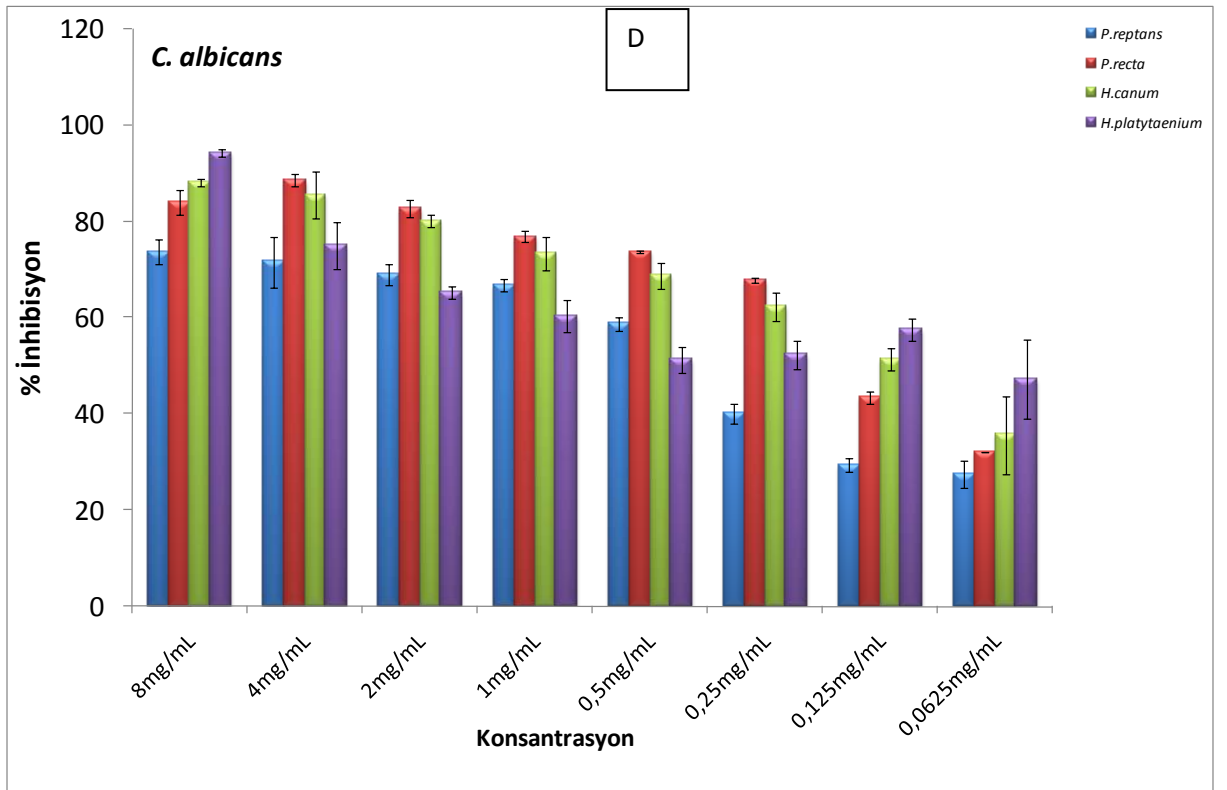
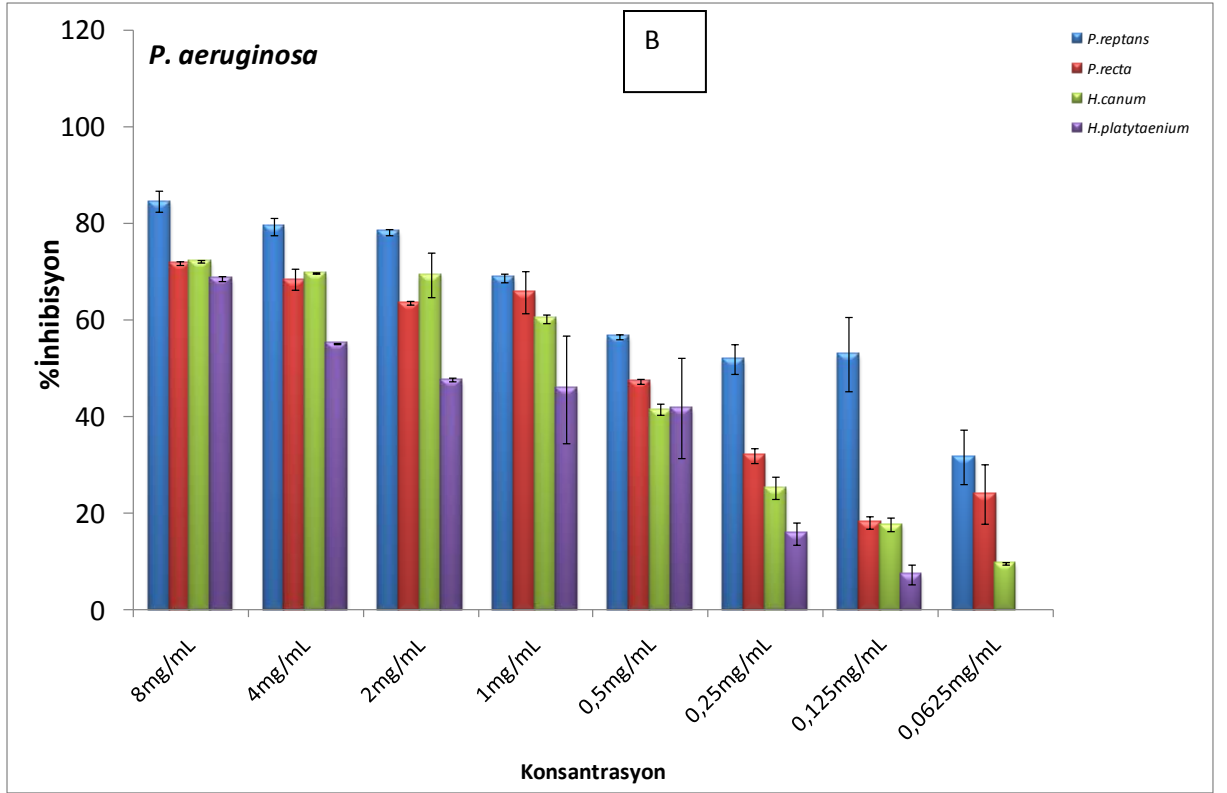
Staphylococcus aureus'a karşı en aktif ekstre HCM ekstresi iken en düşük aktiviteyi 0,19 mg/mL IC50 değeriyle PRep ekstresi göstermiştir.

Pseudomonas aeruginosa'ya karşı IC50 değerleri PRep için 0,308 mg/mL, PRec için 0,553 mg/mL, HCM için 0,882 mg/mL, HPM için 2,63 mg/mL bulunurken en aktif ekstre PRep'tir.

Candida albicans' a karşı IC50 değerleri PRep için 0,35 mg/mL, PRec için 0,134 mg/mL, HCM için 0,107 mg/mL, HPM için 0,29 mg/mL bulunurken en aktif ekstre HCM' dir. Sonuçlar aşağıda grafiklerle gösterilmiştir (Şekil 20 A-D).

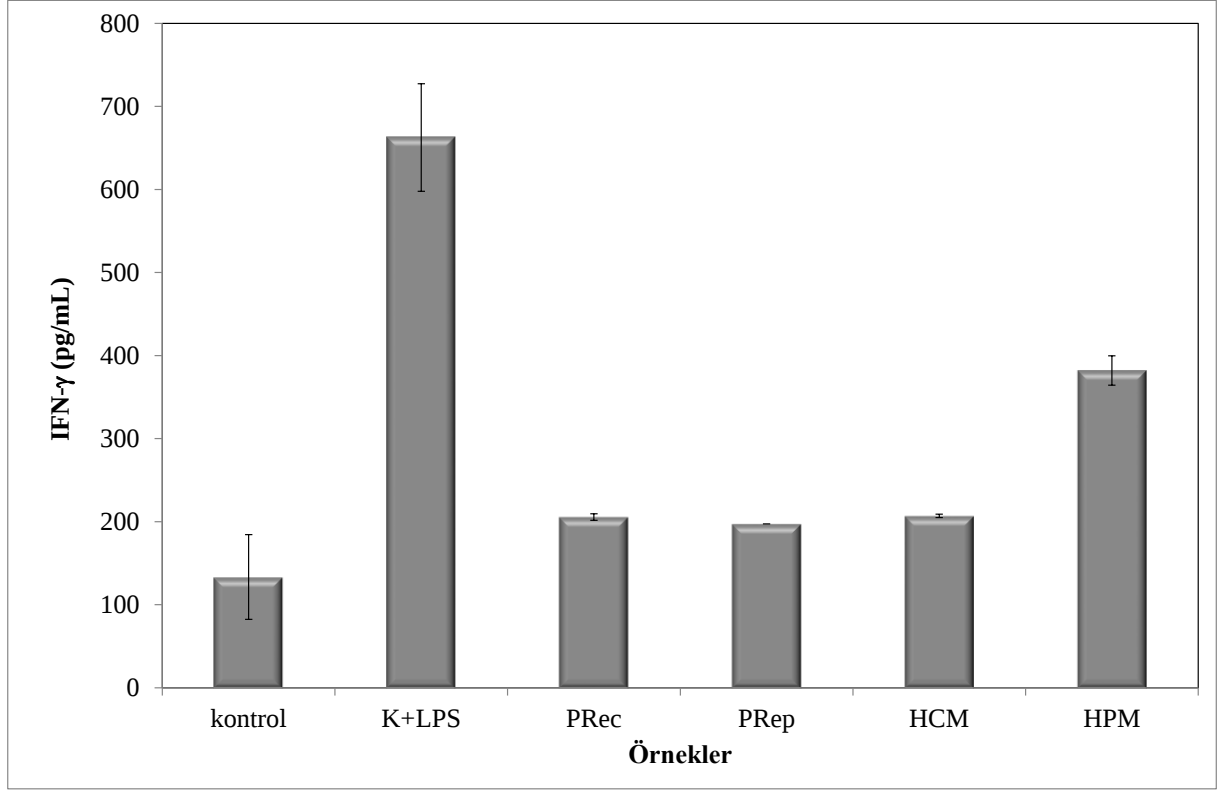


Şekil 20 A, B. Ekstrelerin *S. epidermidis* ve *S. aureus* patojenlerne karşı MİK değerleri



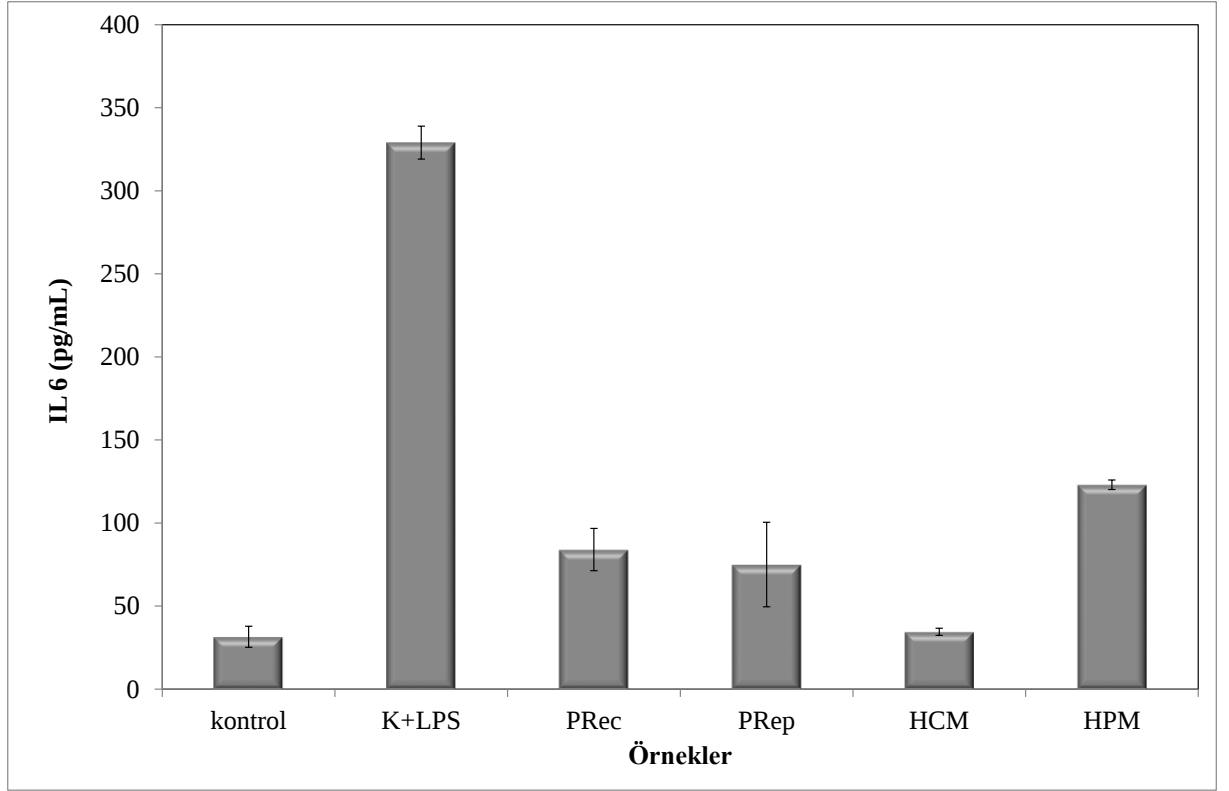
Şekil 20 devamı C, D. Ekstrelerin *P. aeruginosa* ve *C. albicans* patojenlerine karşı MIK değerleri

4.5. *In Vitro* Antienflamatuar Aktivite Bulguları



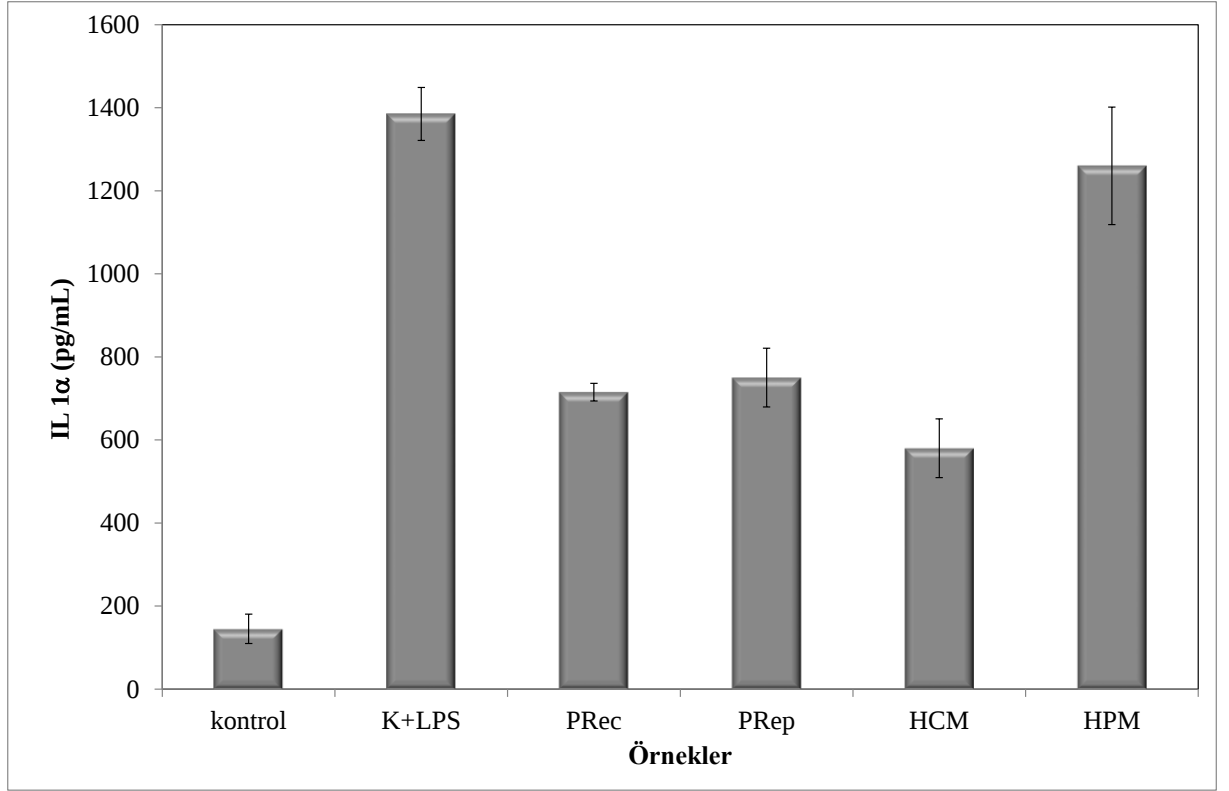
Şekil 21. Ekstrelerin IFN- γ miktarına olan etkisi.

LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda uygulanmayan kuyucuğa göre IFN- γ seviyesinde artış olmuştur. 78 $\mu\text{g/mL}$ dozda ekstrenin uygulandığı kuyucuklarda LPS uygulanan kontrole göre IFN- γ seviyesinde azalma görülmüştür. Ekstrelerin IFN- γ üzerine etkileri $\text{PRep} \geq \text{PRec} \geq \text{HCM} > \text{HPM}$ şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 21).



Şekil 22. Ekstrelerin IL-6 miktarına olan etkisi.

LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda uygulanmayan kuyucuğa göre IL-6 seviyesinde artış olmuştur. 78 µg/mL dozda ekstrenin uygulandığı kuyucuklarda LPS uygulanan kontrole göre IL-6 seviyesinde azalma görülmüştür. Ekstrelerin IL-6 üzerine etkileri HCM > PRep > PRec > HPM şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 22).



Şekil 23. Ekstrelerin IL-1α miktarına olan etkisi.

LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda uygulanmayan kuyucuğa göre IL-1α seviyesinde artış olmuştur. 78 µg/mL dozda ekstrenin uygulandığı kuyucuklarda LPS uygulanan kontrole göre IL-1α seviyesinde azalma görülmüştür. Ekstrelerin IL-1α üzerine etkileri HCM > PRec > PRep > HPM şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 23).

4.6. In Vivo Yara İyileştirici Etkinin Bulguları

Çalışmanın sonuçlarına göre, *P. reptans* ekstresinin çizgisel insizyon yara modelinde anlamlı derecede etki gösterdiği tespit edilmiştir (%32.1) (Tablo 6).

Tablo 6. *Helianthemum canum*, *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta* ve *Potentilla reptans* ekstrelerinin çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkileri

Materyal	Yara gerilme kuvveti $\pm$ O.S.H. (%Yara gerilme kuvveti)
Baz merhem	10.25 $\pm$ 1.09 (5.5)
Negatif kontrol	9.72 $\pm$ 1.17 -
<i>Helianthemum canum</i>	13.10 $\pm$ 0.52 (27.8)
<i>Heracleum platytaenium</i>	11.62 $\pm$ 1.48 (13.4)
<i>Potentilla recta</i>	11.95 $\pm$ 1.35 (16.6)
<i>Potentilla reptans</i>	13.54 $\pm$ 0.81 (32.1)*
Madecassol®	15.68 $\pm$ 0.44 (52.9)***

* : 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.

Aynı bitki ekstresinin dairesel eksizyon yara modelinde, %52.65 oranında kontraksiyon artışı oluşturduğu tespit edilmiştir. Aynı deney modelinde, *H. canum* ekstresinin de anlamlı derecede etkili olduğu gözlenmiştir (%35.09) (Tablo 2). Dokulardaki hidroksiprolin miktarları değerlendirildiğinde, *P. reptans* ekstresinin uygulandığı dokularda anlamlı derecede bir artışın olduğu belirlenmiştir (24.30 μ g/mg) (Tablo 7).

Tablo 7. *Helianthemum canum*, *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta* ve *Potentilla reptans* ekstrelerinin dairesel eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri

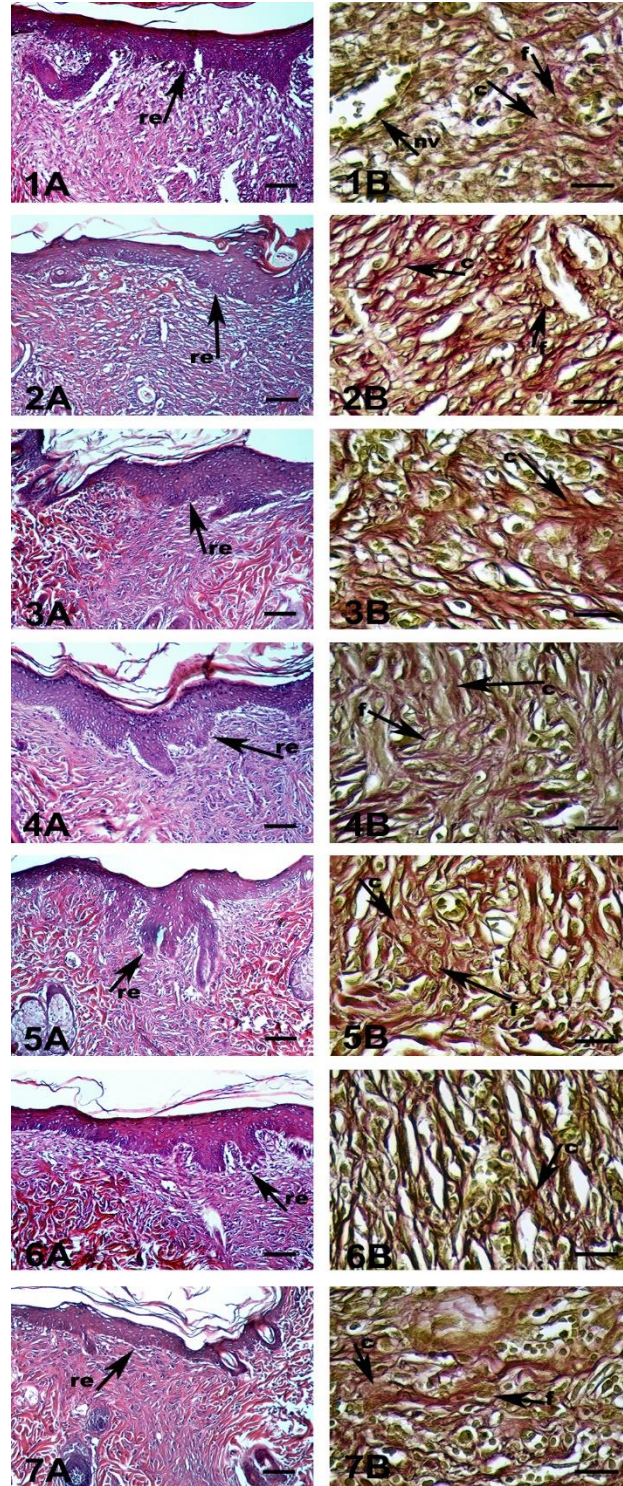
Materyal	Yara alanı (mm ²) ± O.S.H. (%Kontraksiyon)						
	0. gün	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün	10. gün	12. gün
Baz merhem	19.35±2.11	19.05±2.13 (1.85)	16.42±2.01 (0.85)	14.06±1.91 (2.09)	8.89±1.74 (11.89)	5.48±1.46 (8.97)	3.02±0.62 (4.43)
Negatif kontrol	19.64±2.10	19.41±2.04	16.56±2.21	14.36±1.96	10.09±1.86	6.02±1.57	3.16±0.77
<i>Helianthemum canum</i>	19.49±2.07	18.75±1.99 (1.57)	15.76±1.72 (4.02)	12.66±1.81 (9.96)	7.49±1.68 (15.75)	3.98±0.86 (27.37)	1.96±0.47 (35.09)*
<i>Heracleum platytaenium</i>	19.26±1.93	18.86±1.96 (0.99)	16.04±1.90 (2.31)	13.30±1.45 (5.41)	8.13±1.59 (8.55)	4.99±0.75 (8.94)	2.41±0.40 (20.19)
<i>Potentilla recta</i>	19.40±1.92	18.70±2.16 (1.84)	16.03±1.93 (2.38)	13.06±1.78 (7.11)	7.99±1.52 (10.12)	4.22±0.91 (22.99)	2.26±0.52 (25.17)
<i>Potentilla reptans</i>	19.82±2.08	18.61±2.40 (2.31)	15.13±1.91 (7.86)	12.13±1.62 (13.73)	6.91±1.47 (22.27)	3.83±0.63 (30.11)*	1.43±0.39 (52.65)**
Madecassol®	19.53±2.01	17.29±2.03 (9.24)	14.08±1.49 (14.25)	10.34±1.17 (26.46)	4.48±0.21 (49.61)**	1.91±0.20 (65.15)***	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; Ekstre ve referans merhem grupları baz merhem grubuyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

Tablo 8. *Helianthemum canum*, *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta* ve *Potentilla reptans* ekstreleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları

Gruplar	Yara İyileşme Süreci						İyileşme fazları				
	S	U	RE	FP	CD	MNC	PMN	NV	EF	PF	RF
Baz merhem	++	+	+ / ++	++ / +++	++	++	+ / ++	++	+ / ++	++	+ / ++
Negatif kontrol	++	+ / ++	+	++ / +++	++ / +++	++	++	++ / +++	++	++ / +++	+
<i>Helianthemum canum</i>	+	- / +	+ / ++	++	+ / ++	+ / ++	+	+ / ++	+ / ++	++	++
<i>Heracleum platytaenium</i>	+ / ++	+	+ / ++	++	+ / ++	+ / ++	+ / ++	- / +	+ / ++	++	+ / ++
<i>Potentilla recta</i>	+ / ++	- / +	+ / ++	++	+ / ++	+ / ++	- / +	+ / ++	+	++	+ / ++
<i>Potentilla reptans</i>	+	- / +	++	++	+ / ++	+	+	+ / ++	+	+ / ++	++
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, PM: Polimorfonükleer hücreler, NV: Neovaskülerizasyon, EF: Enflamasyon fazı, PF: Proliferasyon fazı, RF: Re-modeling fazı



Şekil 24. *Helianthemum canum*, *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta* ve *Potentilla reptans* ekstreleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları

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

1) Baz merhem; 2) Negatif kontrol; 3) *Helianthemum canum*; 4) *Heracleum platytaenium*; 5) *Potentilla recta*; 6) *Potentilla reptans*; 7) Referans grup

Ekstrelerin anti-enflamatuvar etkinliği asetik-asit nedenli kapiller permeabilite artışının inhibisyonu ölçülerek değerlendirilmiş ve *P. reptans* ekstresinin 100 mg/kg dozda %25.85 oranında istatistiksel olarak anlamlı etkisi belirlenmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. *Helianthemum canum*, *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta* ve *Potentilla reptans* ekstreleri ile tedavi edilen dokulardaki dokulardaki hidroksiprolin ölçüm sonuçları

Materyal	Hidroksiprolin (µg/mg) ± O.S.H.
Baz merhem	11.64 ± 2.28
Negatif kontrol	10.42 ± 2.16
<i>Helianthemum canum</i>	20.13 ± 1.86
<i>Heracleum platytaenium</i>	12.07 ± 2.49
<i>Potentilla recta</i>	14.42 ± 2.37
<i>Potentilla reptans</i>	24.30 ± 1.07*
Madecassol®	48.71 ± 0.56***

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

Enzim inhibisyon etkileri incelendiğinde (Tablo 10 ve 11) *P. reptans*'ın zayıf fakat anlamlı anti-kolajenaz etki gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 10. *Helianthemum canum*, *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta* ve *Potentilla reptans* ekstralarının Whittle yöntemi üzerindeki etkileri

Materyal	Doz (mg/kg)	Evans blue konsantrasyonu (µg/ml) ± O.S.H.	İnhibisyon (%)
Kontrol	-	12.38 ± 1.14	-
<i>Helianthemum canum</i>	100	9.92 ± 1.18	19.87
<i>Heracleum platytaenium</i>	100	10.21 ± 1.30	17.53
<i>Potentilla recta</i>	100	10.48 ± 1.27	15.35
<i>Potentilla reptans</i>	100	9.18 ± 0.91	25.85*
İndometasin	10	5.79 ± 0.32	53.23***

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

Tablo 11. *Helianthemum canum*, *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta* ve *Potentilla reptans* ekstralarının hyaluronidaz enzim inhibisyonu üzerindeki etkileri

Materyal	Konsantrasyon (µg/ml)	İnhibisyon (%) ± O.S.H.
<i>Helianthemum canum</i>	100	21.60 ± 1.35
<i>Heracleum platytaenium</i>	100	19.72 ± 1.22
<i>Potentilla recta</i>	100	18.77 ± 1.41
<i>Potentilla reptans</i>	100	23.42 ± 1.10
Tannik asit	100	86.75 ± 0.59***

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

Tablo 12. *Helianthemum canum*, *Heracleum platytaenium*, *Potentilla recta* ve *Potentilla reptans* ekstralarının kolajenaz ve elastaz enzim inhibisyonu üzerindeki etkileri

Materyal	Concentration (µg/ml)	Kolajenaz inhibisyonu (%) ± O.S.H.	Elastaz inhibisyonu (%) ± O.S.H.
<i>Helianthemum canum</i>	100	17.03 ± 2.06	8.85 ± 1.96
<i>Heracleum platytaenium</i>	100	15.07 ± 1.90	12.44 ± 1.58
<i>Potentilla recta</i>	100	14.48 ± 1.75	9.42 ± 1.76
<i>Potentilla reptans</i>	100	28.32 ± 0.98*	11.26 ± 1.69
Epigallokateşin gallat	100	40.16 ± 0.74**	74.02 ± 0.95***

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

58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86

Histopatolojik analizlerde, gruplar arası farklılıkların fazla olmamasına rağmen, referans grup ve *P. reptans* ekstresinin uygulandığı grupta daha düzgün iyileşme tespit edilmiştir (Şekil 24).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu proje kapsamında Kayseri bölgesinde yara iyileştirici olarak kullanılan *P. recta* (PRec), *P. reptans* (PRep), *H. canum* (HCM) ve *H. platytaenium* (HPM) bitkilerinin *in vitro/in vitro* yara iyi edici etkileri, oksidatif stres parametrelerine etkileri ve etkiden sorumlu bileşikleri incelenmiştir. Bu amaçla bitkilerin %70'lik metanol ekstraktları hazırlanmış ve tüm deneylerde bu ekstraktlar kullanılmıştır. Hazırlanan ekstraktların verimleri PRec > HPM > PRec > HCM şeklinde sıralanmaktadır.

Ekstraktların kimyasal bileşimleri SK-KS/KS analizi ile belirlenmiştir. Bu analizler sonucunda ekstraktlarda fenolik bileşiklerin varlığı tespit edilmiş ve kütle spektrumlarına bağlı olarak tanımlanmaları yapılmıştır. Ekstraktlarda daha çok gallik asit türevleri ve flavonoidler belirlenmiştir.

Fibroblast hücre kültüründe yapılan toksisite çalışmalarında ekstraktların tamamı için 156 µg/ml' ye kadar canlılıkta anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir; dolayısıyla bu konsantrasyonlara kadar yara iyileştirici etki mekanizmalarının araştırılması anlamlı iken; daha yüksek konsantrasyonlarda canlılığın azalabileceği düşünülmüştür.

GZHA deney sonuçlarına göre ekstraktlar için bir IC₅₀ değeri hesaplatılmıştır. Fibroblast tipindeki bu hücrelerde yürütülecek olan etki mekanizmalarıyla ilgili deneylerin sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, tüm ekstraktlar için 156 µg/ml' den daha düşük konsantrasyonlarda yapılmasının uygun olacağına karar verilmiştir; çünkü bu konsantrasyonlarda hiçbir ekstraktın canlılığı azaltmadığı saptanmıştır.

Fibroblast hücrelerinde oksidatif stres parametrelerinden SOD ve GSH-Px düzeyleri incelenmiş ve ekstraktların bu enzimleri nasıl etkiledikleri belirlenmiştir. Öncelikle fibroblast hücreleri LPS ile indüklenmiştir. Bu indüklenmiş hücelere 78 µg/mL dozda ekstrakt uygulanmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda her iki enzim üzerinde de en aktif ekstraktın HCM olduğu tespit edilmiştir. Bu ekstraktın bileşiminde is gallik asit ve metil gallat türevlerinin bulunması aktivitenin tanen türevi bu bileşiklerden ileri geldiğini düşündürmektedir.

Ekstraktların antienflamatuar aktiviteleri LPS ile indüklenmiş fibroblast hücreleri tarafından salınan anti-enflamatuar sitokinlerin düzeyleri incelenerek belirlenmiştir. Antienflamatuar cevapta önemli olan IFN-γ, IL-6 ve IL-1α düzeyleri LPS ile indüklenmiş fibroblast hücrelerinde belirlenmiştir. Ekstraktların IFN-γ üzerine etkileri PRep ≥ PRec ≥ HCM

118 > HPM şeklinde; IL-6 üzerine etkileri HCM > PRep > PRec > HPM şeklinde; IL-1 α üzerine
119 etkileri HCM > PRec > PRep > HPM şeklinde sıralanmaktadır. Sonuçlardan da görüldüğü gibi
120 incelenen tüm sitokinler üzerinde en az aktiviteyi HPM ekstresi göstermiştir.

121 Ekstrelerin yara iyileştirici etkileri *in vivo* olarak fareler üzerinde incelenmiştir.
122 Sonuçlar ayrıca histopatolojik olarak da incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda tüm
123 ekstrelerde belli düzeylerde aktivite gözlenirken en yüksek ve anlamlı etkiyi PRep ekstresi
124 göstermiştir. Ayrıca HCM ekstresi de ikinci derecede aktif ekstre olarak bulunmuştur.
125 Ekstrelerin içermiş oldukları tanen türevi bileşikler ve flavonoit türevlerinin bu etkilerden
126 sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Yapılan *in vivo* çalışmaların sonuçları fibroblast hücre
127 kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlarla da uyum göstermektedir.

128 Sonuç olarak, yapılan *in vitro* ve *in vivo* antienflamatuar etki çalışmalarında
129 ekstrelerden gözlenen aktivite ile tanen türevi bileşiklerin ve flavonoit türevlerinin varlığı
130 ilişkilendirilmiştir.

131 Ekstreler halk arasında yara iyi edici olarak kullanılmaktadır. Ekstreler ile yapılacak
132 ileri düzey etki, güvenilirlik ve standardizasyon çalışmaları belki de enflamasyonu azaltmaya
133 yönelik yardımcı bir tedavinin bulunmasına kapı açabilir. Bu nedenle rasyonel fitoterapi
134 ışığında geleneksel tıbbi onaylamak için klinik çalışmalar yapılması gereklidir. Bugün bile
135 bitkiler dünya nüfusunun neredeyse tek ilaç kaynağıdır. Bu yüzden gerekli ileri çalışmaların
136 yapılması, yeni bitkisel ilaçların üretilmesi açısından önem taşımaktadır.

137

138

139

140

141

142

143

144

145

6. KAYNAKLAR

- Adams, M., Ather, W., Kessler, M., Kluge, M., Hamburger, M.: Malaria in the Renaissance: Remedies from European Herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 133;278-288, 2011.
- Akman, Y., Ketenoglu O., ve ark. Angiospermae (Kapalı Tohumlular), sayfa no.281, Palme Yayıncılık, Ankara, 2007.
- Alsabri, S., Rmeli, N., Zetrini, A., et al.: Phytochemical, anti-oxidant, anti-microbial, anti-inflammatory and anti-ulcer properties of *Helianthemum lippii*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2278-4136, 2013.
- Avci, G., Kupeli, E., Eryavuz, A., Yesilada, E., Kucukkurt, I. Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 418–423, (2006).
- Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R.: *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Etnopharmacology*, 109;552-554, 2007.
- Barrantes, E., Guinea, M.: Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Sci.*, 72;843-50, 2003.
- Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, (ilaveli ikinci baskı.), sayfa no. 373, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1999.
- Bazylko, A., Piwowarski, P.J., Filipek, A., Bonarewicz, J., Tomczyk, M.: *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Potentilla recta* and its main ellagitannin, agrimoniin. *Journal of Ethnopharmacology*, In pres., 2013.
- Benkhadir, K.J., Refai, A., Riahi, I., Fattouch, S., Karoui, H., Essafi, M.: Quince (*Cydonia oblonga* Miller) peel polyphenols modulate LPS-induced inflammation in human THP-1-derived macrophages through NF- κ B, p38MAPK and Akt inhibition, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418:180–185, 2012.
- Benli, M., Güney, K., Bingöl Ü., Geven F., Yiğit N.: Antimicrobial activity of some endemic species from Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 6(15):1774-1778, 2007.

- 175 Bogucka-Kocka, A., Smolarz, HD., Kocki, J.: Apoptotic activities of ethanolic extracts
176 from some Apiaceae on human leukaemiz cell lines. *Fitoterapia*, 79:487-497,
177 2008.
- 178 Buruk, K., Sokmen, A., Aydın, F., Ertürk, M. Antimicrobial activity of some endemic
179 plants growing in the Eastern Black Sea Region, Turkey. *Fitoterapia*, 77:388-391,
180 2006.
- 181 Calzada, F., Alanis, A. Additional Antiprotozoal Flavonol Glycosides of the Aerial Parts of
182 *Helianthemum glomeratum*. *Phytother. Res.*, 21;78-80, 2007.
- 183 Chen, K., Plumb, GW., Bennett, RN., Bao, Y. Antioxidant activites of extracts from five
184 anti- viral medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 96;201–205, 2005.
- 185 Ciesla, L., Bogucka,-Kocka, A., Hajnos, M., Petruczynik, A., Waksmundzka-Hajnos, M.:
186 Two- dimensional thin-layer chromatography with adsorbent gradient as a method
187 of chromatographic fingerprinting of furanocoumarins for distinguishing
188 selected varieties and forms of *Heracleum* spp. *Journal of Cromatography A*,
189 1207;160-168, 2008.
- 190 Cormack, D.H. Cormack Essential Histology, 2. Baskı, page no: 281-99, 2001.
- 191 Corthout, J., Pieters, LA., Claeys, M., Vanden Berghe, DA., Vlietinck, AJ.:
192 Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, 30;1129–1130,
193 1991.
- 194 Çoruh, N. Sağdıçoğlu Celep, A.G., Özgökçe, F.: Antoxidant properties of *Prangos*
195 *ferulacea* (L.) Lindl., *Chaerophyllum macropodum* Boiss. and *Herculeum*
196 *persicum* Desf. from Apiaceae family as food Eastern Anatolia and their inhibitory
197 effects on glutathione-S-transferase. *Food Chemistry*, 100;1237-1242, 2007.
- 198 Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 4, Edinburgh University
199 Press, Edinburgh, Page no: 41-65, 1972.
- 200 Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* Vol. 1, Edinburgh University
201 Press, Edinburgh, Page no: 506-515, 1972.
- 202 Davis, P.H., Mill, RR., Tan, K. *Heracleum* L. In PH. Davis, RR., Mill, Tan, K. (Eds.).
203 *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol. 10, Edinburgh University Press,

- 204 Edinburgh Page no: 153-154, 1972.
- 205 Davis, PH. *Heracleum* L. In Davis, P.H. (Ed.). Flora of Turkey and The East Aegean
206 Islands. Vol. 4, Edinburgh University Press, Edinburgh, Page no: 488-500,
207 1972.
- 208 Değim, Z., Çelebi, N., Sayan, H., Babül, A., Erdoğan, D., Take, G.: An investigation on
209 skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. *Amino Acids*,
210 22;187-98, 2002.
- 211 Diegelmann, RF., Evans, MC.: Wound Healing: An Overview Of Acute: Fibrotic And
212 Delayed Healing Frontiers in Bioscience, 9;283-289, 2004.
- 213 Dinarello, C.A.: Proinflammatory Cytokines. *Chest*, 118(2);503-508, 2000.
- 214 Duman, H.: *Heracleum* L. In Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, KHC. (Eds.).
215 Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Vol. 11, Edinburgh University Press,
216 Edinburgh, Page no: 144, 1972.
- 217 Eadie, MJ.: The epileptic Materia Medica of Pediacus Dioscorides. *Journal of Clinical*
218 *Neuroscience*, 11(7);697-701, 2004.
- 219 Eckert, G.P., Keller, J.H., Jourdan, C., Karas, M., Volmer, D.A., Schubert-Zsilavecz, M.
220 et al.: Hyperforin modifies neuronal membrane properties *in vivo*. *Neurosci Lett*,
221 367;139-43, 2004.
- 222 Eckert, R.L., Broome, A.M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D., Lee, K.: S100 proteins
223 in the epidermis. *J Invest Dermatol*, 123;23–33, 2004.
- 224 Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, HJ.: Ethnopharmacological survey
225 of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and
226 cardiac diseases in the South-east region of Morocco (Tafialet). *Journal of*
227 *Ethnopharmacology*, 82;97-103, 2002.
- 228 Ertoy, D.: Yara İyileşmesinin Histopatolojisi. Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi. Ankara,
229 TDD Yayınları, 1996.
- 230 Farzaei, M.H., Abbasabadi, Z., Shams-Ardekani, M.R., Abdollahi, M., Rahimi, R. A.:
231 Comprehensive Review of Plants and Their Active Constituents With Wound
232 Healing Activity in Traditional Iranian Medicine, *Wounds*, 26(7);197-206, 2014.

- 233 Firuzi, A., Asadollahi, M., Gholami, M., Javidnia, K.: Composition and Biological
234 Activities of Essential Oils from four *Heracleum* Species. Food Chemistry, 122;117-
235 122, 2010.
- 236 Folta M.K., Gardiner E.S.: Genetics and Genomics of Rosaceae, Vol. 6, Springer Science
237 and Business Media, New York, Page number: 3-5, 2009.
- 238 Fuentes, A.L., Millis, L., Sigola, L.B.: Laminarin, a soluble beta-glucan, inhibits
239 macrophage phagocytosis of zymosan but has no effect on lipopolysaccharide
240 mediated augmentation of phagocytosis. International Immunopharmacology, 11;1939-
241 1945, 2011.
- 242 Fukuchi, K., Sakagami, H., Okuda, T., Hatano, T., Tanuma, S., Kitajima, K., Inoue, Y.,
243 Inoue, S., Ichikawa, S., Nonoyama, M., et al.: Inhibition of herpes simplex virus
244 infection by tannins and related compounds. Antiviral Research, 11;285–298,
245 1989.
- 246 Gautam, R., Saklani, A., Jachak, S.M.: Indian medicinal plants as a source of
247 antimycobacterial agents. Journal of Ethnopharmacology, 110;200–234, 2007.
- 248 Guleria, S., Saini, R., Jaitak, V., Kaul, V.K., Lal, B., Rahi, P., Gulati, A., Singh, B.:
249 Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Heracleum thomsonii*
250 (Clarke) from the cold desert of the western Himalayas. Natural Product
251 Research, 25(13);1250-1260, 2011.
- 252 Gündem, NS., Çıkman, A.: Yara kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve
253 antibiyotik duyarlılıkları, Ankem Derg, 26(4);165-170 (2012).
- 254 Güner, A. A.: Checklist of the Flora of Turkey (Vascular Plants), Nezahat Gokyigit
255 Botanic Garden Publications, Flora series I, 2012.
- 256 Gürbüz, İ, Özkan, AM., Yeşilada, E., Kutsal, O.: Anti-ulcerogenic activity of some plants
257 used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). Journal of
258 Ethnopharmacology, 101;313- 318, 2005.
- 259 Habibi, Z., Eshaghi, R., Mohammadi, E., Yousefi, M.: Chemical Composition and
260 Antibacterial Activity of Essential Oil of *Heracleum rechingeri* Manden from
261 Iran. Natural Product Research, 24(11);1013-1017, 2010.

262 Hajhashemi, V., Sajjadi, ES., Heshmati, M.: Anti-inflammatory and Analgesic
 263 Properties of *Heracleum pericum* Essential Oil and Hydroalcoholic Extract in
 264 Animal Models. Journal of Ethnopharmacology, 124;475-480, 2009.

265 Hu, T., Wei, X., Zhang, X., Cheng, F., Shuai, X., Zhang, L., Le Kang, L.: Protective effect
 266 of *Potentilla anserina* polysaccharide (PAP) on hydrogen peroxide induced apoptosis
 267 in murine splenic lymphocytes. Carbohydrate Polymers, 79;356-361, 2010.

268 Ibadullaeva, SD.: Essential oil of *Heracleum antasiaticum*. Chemistry of Natural
 269 Compounds, 36(2);218, 2000.

270 Iwasaki, A., Medzhitov, R.: Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune
 271 System, *Science*, 327;291-295, 2010.

272 İnci, A., Bişkin, Z.: Like Reseptörler ve Protozoon Enfeksiyonlarındaki Roller, Erciyes
 273 Üniv Vet Fak Derg 4(2);121-128, 2007.

274 İşcan, G., Özek, T., Özek, G, Duran, A., Başer, KHC.: Essential oil of three species of
 275 *Heracleum* Anticandial activity. Chemistry of Natural Compounds, 40(6):544-547,
 276 2004.

277 Jin, M., Iwamoto, T., Yamada, K., Satsu, H., Totsuka, M., Shimizu, M.: Effects of
 278 chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor mediated IL-6
 279 secretion by macrophage-like J774.1 cells, Biosci Biotechnol Biochem, 75(7); 1-7,
 280 2011.

281 Jin, Q., Nan, J., Li-Hua Lian, L.: Antitumor Activity of Leaves from *Potentilla*
 282 *discolor* on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG-2. Chinese Journal of
 283 Natural Medicines, 9;61-64, 2011.

284 Kagnoff, MF., Eckmann, L.: Epithelial cells as sensors for microbial infection. J Clin
 285 Invest, 100(6);1997.

286 Kim, JB., Han, AR., Park, EY., Kim, JY., Cho, W., Lee, J., Seo, EK., Lee, KT.: Inhibition
 287 of LPS-Induced iNOS, COX- 2 and Cytokines Expression by Poncirin through
 288 the NF-k B Inactivation in RAW 264.7 Macrophage Cells. Biol. Pharm. Bull,
 289 30(12);2345-2351, 2007.

290 Kim, JB., Han, AR., Park, EY., Kim, JY., Cho, W., Lee, J., Seo, E.K., Lee, K.T.:

291 Inhibition of LPS-Induced iNOS, COX-2 and Cytokines Expression by Poncirin
 292 through the NF- κ B Inactivation in RAW 264.7 Macrophage Cells. *Biol. Pharm.*
 293 *Bull*, 30(12);2345-2351, 2007.

294 Kielbus, M., Skalicka-Wozniak, K., Jeleniewicz, W., Dmoszynska-Graniczka, M.,
 295 Marston, A., Polberg, K., Gawda, P., Klatka, J., Stepulak, A.: 7-substituted
 296 coumarins inhibit proliferation and migration of laryngeal cancer cells *in vitro*.
 297 *Anticancer Res.*, 33(10);4347-56, 2013.

298 Kirby, AJ., Schmidt, RJ.: The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of
 299 placebo herbs-I. *Journal of Ethnopharmacology*, 56;103–108, 1997.

300 Kolodziej, H., Burmeister, A., Trun, W., Radtke OA., Kiderlen, AF., Iito, H., Hatano,
 301 T., Yoshidac, T., Yeap, L.: Tannins and related compounds induce nitric oxide
 302 synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major* - infected
 303 macrophage-like RAW 264.7 cells, *Food, Bioorganic & Medicinal Chemistry*,
 304 13, 6470-6476 (2005).

305 Kolodziej, H., Kiderlen, A.F.: *In vitro* evaluation of antibacterial and
 306 immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides*
 307 and the related herbal drug preparation EPss 7630, *Phytomedicine*,14;18–
 308 26, 2007.

309 Köşlü, A.: Yara İyileşmesinde Tarihsel Gelişmeler Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi.
 310 Ankara, TDD Yayınları, 1996.

311 Kuljanabthagavad, T., Sriubolmas, N., Ruangrunsi, N.: Chemical Composition,
 312 Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oil From *Heracleum*
 313 *siamicum* Craib. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 45(3);178-182, 2011.

314 Kumar, D., Ghosh, R., Pal, BC. α -Glucosidase inhibitory terpenoids from *Potentilla*
 315 *fulgens* and their quantitative estimation by validadd HPLC method. *Journal*
 316 *of Functional Foods*, 5(3);1135-1141, 2013.

317 Küpeli Akkol, E., Süntar, I., Keleş, H., Yeşilada, E.: The potential role of female flowers
 318 inflorescence of *Typha domingensis* Pers. in wound management. *J Ethnopharmacol.*,
 319 133;1027-32, 2011.

320 Küpeli E.: *Berberis crataegina* DC. Bitkisinin Romatizma Tedavisindeki Etkisi Üzerinde
321 Çalışmalar. Yüksek Lisans. Ankara, Gazi Üniversitesi, 2000.

322 Laloo, D., Prasad, SK., Krishnamurthy, S., Hemalatha, S.: Gastroprotective activity of
323 ethanolic root extract of *Potentilla fulgens* Wall. Ex Hook. Journal of
324 Ethnopharmacology, 146;505-514, 2013.

325 Lawvere, S., Mahoney, M.C., Cummings, K.M., Kepner, J.L., Hyland, A., Lawrence,
326 D.D., et al.: A Phase II study of St. John's Wort for smoking cessation. Comp. Ther.
327 Med., 14;175-84, 2006.

328 Lee, Y.G., Byeona, S.E., Kima, J.Y., Lee, J.Y., Rheeb, M.H., Hong, S., Wu, J.C., Lee,
329 H.S., Kima, MJ., Choa, D.H., Choa, J.Y.: Immunomodulatory effect of *Hibiscus*
330 *cannabinus* extract on macrophage functions, *Journal of Ethnopharmacology*, 113,
331 6271, (2007).

332 Lee, K.K., Choi, J.D.: The effects of *Areca catechu* L. extracts on anti ageing. Int J
333 Cosmetic Sci, 21;285-94, 1999.

334 Lodhi, S., Pawar, R.S., Jain, A.P. Singhai AK.: Wound healing potential of *Tephrosia*
335 *purpurea* (Linn.) Pers. in rats. J Ethnopharmacol., 108;204-10, 2006.

336 Leporatti, ML., Ivancheva, S.: Preliminary comparative analysis of medicinal plants used
337 in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. Journal of
338 Ethnopharmacology, 87;123-142, 2003.

339 Li, L., Wang, L., Wang, Y., Cui, Y., Li, J., Zhang, L., Zhang, Y.: Effect of n-butanol
340 Extract from *Potentilla anserina* on Hypoxia-induced Calcium Overload and
341 SERCA2 Expression of Rat Cardiomyocytes. Chinese Herbal Medicines, 4;142- 149,
342 2012.

343 Luczaj, L.: Changes in the utilization of wild green vegetables in Poland since the 19 th
344 century: A comparison of four ethnobotanical surveys. Journal of
345 Ethnopharmacology, 128;395-404, 2010.

346 Majewska, I., Gendaszewska-Darmach, E.: Proangiogenic activity of plant extracts in
347 accelerating wound healing-a new face of old phytomedicines. Acta Biochimica
348 Polonica, 58 (4);449-460, 2011.

349 McCutcheon, A.R., Roberts, T.E., Gibbons, E., Ellis, S.M., Babiuk, L.A., Hancock,
 350 R.E.W., Towers, G.H.N.: Antiviral screening of British Columbian medicinal plants.
 351 Journal of Ethnopharmacology, 49;101-110, 1995.

352 Meckes, M., Calzada, F., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R.: Antiprotozoal Properties
 353 of *Helianthemum glomeratum*. Phytother. Res., 13;102-105, 1999.

354 Melzig, MF., Löser, B., Ciesielski, S. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic
 355 compounds from plants. Pharmazie, 56;967-70, 2001.

356 Miliauskas, G., Venskutonis, PR., Van Beek, TA.: Screening of radical scavenging
 357 activity of some medicinal and aromatic plant extract. Food Chemistry, 85;231-
 358 237, 2004.

359 Moe, B., Gabos, Si., Fang, Li, X.: Real-time cell-microelectronic sensing of nanoparticle-
 360 induced cytotoxic effects. Analytica Chimica Acta, 789;83- 90, 2013.

361 Mogensen, T.H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune
 362 Defenses, Clinical Microbiology Reviews, 22(2);240–273, 2009.

363 Murthy, K.N., Reddy, V.K., Veigas, J.M., Murthy, U.D.: Study on wound healing activity
 364 of *Punica granatum* peel. J Med Food, 7(2);256-9, 2004.

365 Naeini, A., Khosravi, AR., Chitsaz, M., Shokri, H., Kamlnejad, M.: Anti-*Candida*
 366 *albicans* activity of some Iranian plants used in traditional medicine. Journal of
 367 Medical Mycology, 19;168-172, 2009.

368 Newton, K., Dixit, V.M.; Signaling in Innate Immunity and Inflammation. Cold Spring
 369 Harb Perspect Biol, 4(3), 2012.

370 Oszmian' ski, J., Wojdyło, A., Lamer-Zarawska, E., S'wia' der, K.: Antioxidant tannins
 371 from Rosaceae plant roots. Food Chemistry, 100;579–583, 2007.

372 Pana, T., Khare, S., Ackah, F., Huang, B., Zhang, W., Gabos, S., Jin, C., Stampfl,
 373 M.: *In vitro* cytotoxicity assessment based on KC50 with real-time cell analyzer
 374 (RTCA) assay. Computational Biology and Chemistry, 47;113-120, 2013.

375 Peşin Süntar, İ., Küpeli Akkol, E., Yilmazer, D., Baykal, T., Alper, M., Kırmızıbekmez,
 376 H., Yesilada, E.: Investigations on the *in vivo* wound healing potential of
 377 *Hypericum perforatum* L. J Ethnopharmacol., 127;468–77, 2010.

378 Popov, S.V., Popova, G.Y., Ovodova, R.G., Ovodov, Y.S. Antiinflammatory activity of
 379 the pectic polysaccharide from *Comarum palustre*. Fitoterapia, 76;281-287, 2005.

380 Price, P., McMillan, T. J.: Use of the Tetrazolium Assay in Measuring the Response of
 381 Human Tumor Cells to Ionizing Radiation, Cancer Research, 50;1392-1396, 1990.

382 Qiao,W., Zhao,C., Qin, N., Zhai,HY., Hong Quan Duan,HQ.: Identification of trans-
 383 tiliroside as active principle with anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and
 384 antioxidant effects from *Potentilla chinensis*. Journal of
 385 Ethnopharmacology,135;515-521, 2011.

386 Qin, X., Li,L., Lv, Q.,Yu, B., Yang, S., He, T., Zhang, Y.: Neuroprotection of n-
 387 Butanol Extract from Roots of *Potentilla anserina* on Hypoxic Injury in
 388 Primary Hippocampal Neurons. Chinese Herbal Medicines, 4;195-200, 2012.

389 Redzic, SJ. Wild Edible Plants and Their Traditional use in the Human Nutrition in
 390 Bosnia-Herzegovina. Ecology of Food and Nutrition, 45;189–232, 2006.

391 Robson MC., Steed DL., Franz MG.: Wound healing: biologic features and approaches to
 392 maximize healing trajectories. Curr Probl Surg, 38;72–140, 2001.

393 Rubio-Moraga, A., Argandona, J., Mota, B., et al.: Screening for polyphenols, antioxidant
 394 and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa
 395 (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. Journal of
 396 Ethnopharmacology, 148;287-296, 2013.

397 Sadaf, F., Saleem, R., Ahmed, M., Ahmad, SI., Navaid-ul, Z.: Healing potential of
 398 cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in guinea pigs.
 399 J Ethnopharmacol., 107;161-3, 2006.

400 Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., Takahashi, T.,
 401 Imaizumi, H., Asai, Y., Kuroki, Y.: Direct Binding of Toll-Like Receptor 2 to
 402 Zymosan, and Zymosan-Induced NF-kB Activation and TNF- α Secretion Are
 403 Down-Regulated by Lung Collectin Surfactant Protein A1. J Immunol, 171;417-
 404 425, 2003.

405 Sayyah, M., Moaied, S., Kamalinejad, M.: Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum*
 406 seed. Journal of Ethnopharmacology, 98;209-211, 2005.

- 407 Shasrabudhe, A., Deodhar, M.: Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of *Garcinia*
408 *indica*. Int J Bot 6(3);299-303, 2010.
- 409 Song, C., Huang, L., Rong, L., Zhou, Z., Peng, X., Yu, S., Fang, N.: Anti-hyperglycemic
410 effect of *Potentilla discolor* decoction on obese-diabetic (Ob-db) mice and its
411 chemical composition, Fitoterapia, 8;1474-1483, 2012.
- 412 Suguna, L., Singh, S., Sivakumar, P., Sampath, P., Chandrakasan, G.: Influence of
413 *Terminalia chebula* on dermal wound healing in rats. Phytother Res., 16;227-3,
414 2002.
- 415 Süntar I.: Türkiye'de Halk Arasında Yara İyileştirici Amaçla Kullanılan Bazı
416 Bitkilerin Aktiviteleri Üzerinde Araştırmalar. Doktora tezi, Ankara, Gazi
417 Üniversitesi, 2011.
- 418 Süntar, I., Baldemir, A., Coşkun, M., Keleş, H., Küpeli Akkol, E.: Wound healing
419 acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. J
420 Ethnopharmacol., 135;63-70, 2011.
- 421 Süntar, İ., Tatlı, İ.İ. Küpeli Akkol, E., Keleş, H., Kahraman, C., Akdemir, Z.: An
422 ethnopharmacological study on *Verbascum* species: From conventional wound
423 healing use to scientific verification. J Ethnopharmacol., 132;408-13, 2010.
- 424 Syiem, D., Syngai, C., Khup, PZ. Khongwir, B.S., Kharbuli, B., Kayang, H.:
425 Hypoglycemic effects of *Potentilla fulgens* L. in normal and alloxan-induced diabetic
426 mice. Journal of Ethnopharmacology, 83;55-61, 2002.
- 427 Şöhretoğlu, D., Kırmızıbekmez, H.: Polyphenols from *Potentilla recta*. Biochemical
428 Systematics and Ecology, 39;132-134, 2011.
- 429 Şöhretoğlu, Ş., Sterner, O.: Isoflavonoids, flavonoids and flavans from *Potentilla*
430 *astracantha*, Biochemical Systematics and Ecology, 39;666-68, 2011.
- 431 Takeuchi, O., Akira, S.: Toll-like receptors; their physiological role and signal
432 transduction system, International Immunopharmacology, 1(4);625-635, 2001.
- 433 Tkachenko, G., K.: Antiviral Activity of the Essential Oils of Some *Heracleum* L.
434 Species. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 12(3), 2006.
- 435 Tkachenko, GK.: Essential oils from leaves of several *Heracleum* Species growing in

436 Leningrad oblast. Chemistry of Natural Compounds, 46(2);319-321, 2010.

437 Tkachenko, GK.: Essential oils from roots of certain *Heracleum* Species. Chemistry of
 438 Natural Compounds, 46(4);578-581, 2009.

439 Tomczyk, M., Latte, KP.: *Potentilla*-A review of its phytochemical and pharmacological
 440 profile. Journal of Ethnopharmacology, 122;184-204, 2009.

441 Tosun, F., Kızılay, ÇA., Erol, K., Kılıç, FS., Kürçüoğlu, M., Başer, KHC.:
 442 Anticonvulsant Activity of furabocoumarins and the essential oil obtained from the
 443 fruits of *Heracleum crenatifolium*. Food Chemistry, 107;990-993, 2008.

444 Tsai, M-H., Lin, Z-C, Liang, C-J, Yen, F-L, Chiang, Y-C., , Lee, C-W.: Eupafolin inhibits
 445 PGE2 production and COX2 expression in LPS-stimulated human dermal fibroblasts
 446 by blocking JNK/AP-1 and Nox2/p47^{phox} pathway, Toxicology and Applied
 447 Pharmacology, 279;240–251, 2014.

448 Tumen, I., Süntar, I., Eller, FJ., Keleş, H., Küpeli Akkol, E.: Topical wound-healing
 449 effects and phytochemical composition of heartwood essential oils of *Juniperus*
 450 *virginiana* L., *Juniperus occidentalis* Hook., and *Juniperus ashei* J. Bucholz.
 451 Journal of Medicinal Food, 16(1);48-55, 2013.

452 Tunón, H., Olavsdotter, C., Bohlin, L.: Evaluation of anti-inflammatory activity of some
 453 Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-
 454 induced exocytosis. Journal of Ethnopharmacology, 48;61-76, 1995.

455 Turner, N.J., Luczaj, L.J., Migliorini, P., Pieroni, A., Dreon, A.L., Sacchetti, L.E., Paoletti,
 456 M.G.: Edible and Tended Wild Plants, Traditional Ecological Knowledge and
 457 Agroecology. Critical Reviews in Plant Sciences, 3;198-225, 2011.

458 Van Reeth, K.; Cytokines in the pathogenesis of influenza, Veterinary Microbiology,
 459 74;109-116, 2000.

460 Wang, R., Ghahary, A., Shen, YJ., Scott, PG., Tredget, EE.: Human dermal fibroblasts
 461 produce nitric oxide and Express both constitutive inducible nitric oxide synthase
 462 isoforms, The Journal Of Investigate Dermatology, 419-427, 1995.

463 Webster, D., Taschereau, P., Belland, R.J., Sand, C., Rennie, R.P. Antifungal activity of
 464 medicinal plant extract; preliminary screening studies. Journal of Ethnopharmacology,

115;140-146, 2008.

Webster, D., Taschereau, P., Lee, TDG., Jurgens, T.: Immunostimulant properties of *Heracleum maximum* Bartr. Journal of Ethnopharmacology, 106;360-363, 2006.

Woessner, J.F.: The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch Biochem Biophys, 93;440-7, 1961.

Zhang, L., Yang, J., Chen, X., Zan, K., Wen, X., Chen, H., Wang, Q., Lai, M.: Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. Journal of Ethnopharmacology, 132;518-524, 2010.

Zhao, B., Zhang, J., Yao, J., Song, S., Yin, Z., Gao, Q.: Selenylation modification can enhance antioxidant activity of *Potentilla anserina* L. polysaccharide. International Journal of Biological Macromolecules, 58;320-328, 2013.

Zhao, YL., Cai, GM., Hong, X., Shan, LM., Xiao, XH.: Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserina* L. Phytomedicine, 15;253-258, 2008.