

TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2.3 DİHİDRO-7H-CYCLOHEPTAN [1, 4]-DİOXİN'İN SIÇANLARDA
ANTİİNFLAMMATUAR AKTİVİTESİ

HAZIRLAYAN

Nesime ÖNER BULUT

TEZ YÖNETİCİSİ

Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

FARMAKOLOJİ A.B.D.

Yüksek Lisans Tezi

ERZURUM-2009

TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**2.3 DİHİDRO-7H-CYCLOHEPTAN [1, 4]-DİOXİN'İN SIÇANLARDA
ANTIİNFLAMMATUAR AKTİVİTESİ**

Nesime ÖNER BULUT

Tezin Enstitüye verildiği Tarih : 19.08.2009
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 26.08.2009
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Zekai HALICI
Jüri Üyesi : Yard. Doç. Dr. İsmail KARA
Jüri Üyesi : Yard. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU
Enstitü Müdürü : Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Tez Yöneticisi

Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM-2009

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
TABLULAR LİSTESİ	IV
ÖZET	V
SUMMARY	VI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tropolonlar	3
2.2. Akut İnflamasyon	5
2.2.1. İnflamasyonun Kimyasal Mediyatörleri	5
2.2.1.1. Vazoaktif Aminler	5
2.2.1.2. Plazma Proteazları	6
2.2.1.3. Araşidonik Asit Metabolitleri	8
2.2.1.4. Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF)	10
2.2.1.5. Sitokinler	10
2.2.1.6. Nitrik Oksit ve Oksijen Kaynaklı Serbest Radikaller	10
2.2.1.7. Lizozomal Unsurlar	11
2.3. Kronik İnflamasyon	11
3. MATERYAL VE METOD	12
3.1. Hayvanlar	12
3.2. Kimyasal Maddeler	12
3.3. Hyaluronidaz testi	14
3.4. Akut toksisite	15

4. BULGULAR	16
4.1. Karragenin inflamasyon testi	16
4.2. Hyaluronidaz testi	16
4.3. Akut toksisite	17
5. TARTIŞMA	20
6. KAYNAKLAR	24

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalında yürütülmüştür.

Araştırma konusunun seçilmesi, çalışmanın yürütülmesi ve tezin hazırlanmasında her türlü desteği veren değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU (Atatürk Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji A.B.D) ve Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN (Atatürk Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji A.B.D)'na, bu tez çalışmasının yapılabilmesi için bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Fatma GÖÇER (Atatürk Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji A.B.D Başkanı)'e ve ayrıca tezimin değerlendirilmesi aşamasında bizden yardımını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji A.B.D)'ya, Yard. Doç. Dr. İsmail KARA (Atatürk Üniv. Tıp Fak. Farmakoloji A.B.D)'ya, Yard. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU (Atatürk Üniv. Eczacılık Fak. Biyokimya A.B.D)'na en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım süresince benden manevi desteğini hiç esirgemeyen eşim Sancar BULUT'a, ben tez yazarken ağlayan biricik oğlum Ali Erham BULUT'a ve laboratuvar çalışmaları sırasında emeği geçen herkese teşekkür eder, eserin ilgililere yararlı olmasını dilerim.

Nesime ÖNER BULUT

Ağustos-2009

TABLÖLAR LİSTESİ	Sayfa No
Tablo 1: AD-1 ve indometazinin sıçanlarda karrageninle oluşturulan inflamasyonlu pençe ödemeine etkisi	15
Tablo 2: AD-1 ve indometazinin tavşanlarda Hyaluronidazla artırılan kapiler damar permeabiliteye etkileri	16

2.3 DİHİDRO-7H-CYCLOHEPTAN [1, 4]-DİOXİN'İN SIÇANLARDA ANTIİNFLAMMATUAR AKTİVİTESİ

ÖZET

Çalışmamızda 2.3 dihidro-7h-cycloheptan [1, 4]-dioxin'in (AD1 olarak kodlandırılan) antiinflammatuar aktivitesi sıçanlarda karragenin inflamasyon modelinde araştırıldı. Ayrıca, AD-1'in kapiller damar permeabiliteye etkileri hyaluronidaz testinde incelendi. AD-1 50,100 ve 200 mg/kg dozlarda karragenin inflamasyonunu sırası ile % 37 ($p<0.05$), % 71 ($p<0.02$) ve % 85 ($p<0.001$) olarak azaltmış, indometazin ise 25 mg/kg dozda karragenin inflamasyonunu % 67,9 (<0.02) oranında baskılamıştır. AD-1, 50 mg/kg dozda tavşanlarda hyaluronidazla artırılan kapiler damar permeabiliteyi 5. ve 30. dakikalarda kontrole göre anlamlı azaltmıştır. 25 mg/kg dozda kullanılan indometazin de hyaluronidazın kapiller permeabilite üzerindeki etkisini anlamlı olarak inhibe etmiştir. Çalışmamız, AD-1'in daha yüksek dozlarda (100 ve 200 mg/kg) karragenin inflamasyonunun baskılanması ve hyaluronidazla artırılan kapiller damar permeabilitenin azaltılmasında indometazinden daha etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, AD-1 toksisitesinin indometazinden daha düşük olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: tropolon, karragenin, inflamasyon, sıçan, tavşan

**ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF 2.3 DIHIDRO-7H-CYCLOHEPTAN
[1, 4]-DIOXIN IN RATS**

SUMMARY

In our study, anti-inflammatory activity of 2.3 dihydro-7h-cycloheptan [1, 4]-dioxin (coded as AD1) was investigated in rats using carrageenan inflammation model. In addition, the effects of AD1 on capillary permeability were analyzed by hyaluronidase test. 50, 100, 200 mg/kg doses of AD-1 reduced carrageenan inflammation by 37 percent ($p < 0.05$), 71 percent ($p < 0.02$) and 85 percent ($p < 0.001$) respectively. Where as 25 mg/kg dose of indomethacine inhibited carrageenan inflammation by 67.9 percent. AD-1 at 50 mg dose, significantly reduced hyaluronidase-induced capillary permeability at 5th and 30th minutes relative to controls in rabbits. Similarly, 25 mg/kg dose of indomethacine significantly inhibited the effect of hyaluronidase on capillary permeability. The present study demonstrated that, higher doses of AD-1 (100 and 200 mg/kg) were more effective in inhibiting carrageenan inflammation and in reducing hyaluronidase-induced capillary permeability than indomethacine. It was also observed that, toxicity of AD-1 was lower than that of indomethacine.

Key words: tropolone, carrageenan, inflammation, rat, rabbit

1. GİRİŞ

2.3 dihidro-7h-cycloheptan [1, 4]-dioxin (AD-1) tropolon türevi bir bileşiktir. Tropolonlar, yedi üyeli aromatik halka yapısına sahip bileşiklerdir.¹ Tropolonlar bitkilerden, bakterilerden ve sentezle elde edilmektedir.²⁻⁶ Bu bileşikler metaller (Fe, Cu, Zn vb.) ile şelasyon yapma özelliğine sahiptirler.^{7,8} İlginç halka yapıları ve şelatör özelliklerinden dolayı pek çok biyolojik aktiviteye sahiptirler.^{7,9}

Daha çok doğal olarak bitki ve bakterilerden elde edilen α -thujaplicin, hinokitiol (β -thujaplicin), γ -thujaplicin, β -dolabrin gibi tropolon türevlerinin biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır.^{3,7,10,11} Adı geçen bileşik deodorant ve gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak halen kullanılmaktadır.^{1,12} Günümüzde başlangıç molekülü tropon ve tropolon olan pek çok bileşiklerin biyolojik aktivite gösterdikleri bilinmektedir; bunlar antibakteriyel, antialerjik, antifungal ve antioksidan olarak sıralanabilir.^{7,13-15} β -thujaplicinin antiinflammatuar etkisinin olduğuda rapor edilmiştir.¹² Tropolondan elde edilen azulen türevlerinin lipid peroksidasyonunu engellediği gösterilmiştir.¹⁶ Tropolon türevlerinin metaloproteaz enzimini inhibe ettikleride bildirilmiştir.¹⁷ Metaloproteaz ve lipoksijenaz enzimlerinin inflammatuar olaylarda rolü gösterilmiştir.

Günümüzde antiinflammatuar aktivitenin araştırılması ve değerlendirilmesi için sıçanlarda, karragenin inflamasyon modeli (pençe ödemi) kullanılmaktadır.¹⁸ Karrageninin oluşturduğu inflamasyonlu bölgede vasküler dilatasyon ve kapiller permeabilitede artış görülür.¹⁹ Vasküler permeabilitenin artışında hyaluronidaz enziminin rolü bilinmektedir.²⁰ Hyaluronidaz aktivitesinin artması, inflamasyon şiddetine paralellik gösterdiği saptanmıştır.²¹ Bir çok ülkede inflammatuar hastalık tedavisinde kullanmak amacıyla antiinflammatuar ilaçlar üzerinde çalışılmaktadır.

Çünkü yan etkileri daha az olan ve daha güçlü antiinflammatuar etki gösteren ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızın amacı, 2.3 dihidro-7h-cycloheptan [1, 4]-dioxin (AD-1 olarak kodlandırılan) tropolon türevi bir bileşiğin inflamasyonun akut fazına etkilerini karragenin inflamasyon modelinde, kapiller damar permeabiliteye etkilerini ise hyaluronidaz testinde incelemektir. Bu çalışmamızda ayrıca antiinflammatuar etkinliğin, hyaluronidaz enzim inhibisyonuna paralellik gösterip göstermediğini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tropolonlar

Kimyaca tropolonlar, yedi üyeli aromatik halka yapısına sahip bileşiklerdir.¹ Bitkiler ve bakteriler tropolonların ana kaynağı olarak bilinmektedir. Ayrıca tropolonlar sentezle de elde edilmektedir.²⁻⁶ Tropolonlar metallerle bileşik yapma özelliklerinede sahiptirler.^{7,8} Tropolonlar bir çok biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir.^{7,9}

Bitki ve bakterilerden elde edilen α -thujaplicin, hinokitiol (β -thujaplicin), γ -thujaplicin, β -dolabrinler biyolojik aktiviteleri en fazla araştırılan tropolon türevleri bileşiklerdir.^{3,7,10,11} Bu bileşikler endüstri ve gıda sanayiinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.^{1,12} Yukarda adı geçen tropolon türevlerinin antibakteriyel, antialerjik, antifungal ve antioksidan etkilerinin olduğu deneysel olarak ortaya konulmuştur.^{7,13-15} Bazı tropolon türevlerinin (azulen) lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir.¹⁶ Ayrıca tropolon türevlerinin inflamasyon olayında rolü bilinen metaloproteaz enzimini inhibe ettikleri de rapor edilmiştir.¹⁷

Tropolon derivatlarının asidik hydroxyl ve proton alıcı grubu taşıması metallerle şelasyona izin vermekte, bu durumda aktiviteye katkı sağlamaktadır.²² Tropolon derivatlarının asidik hydroxyl ve proton alıcı grubu taşıması metallerle şelasyona izin vermekte, bu durum biyolojik aktiviteye katkı sağlamaktadır.²² Bis tropolon türevleri ribonükleotit redüktaz gibi DNA biyosentezini katalize eden enzimler için gerekli metallerle şelat formu oluşturmaktadır.²³ Hinokitiol benzeri maddelerden, bitkisel kaynaklı olan β - dolabrin ve γ -thujaplicin güçlü bir bitki büyüme inhibitörüdür ve bu etkileri bitkilerin klorofil içeriğini azaltmalarıyla ilgilidir.²⁴ Hinokitiol invitro olarak Stafilokok aureusaya karşı antibakteriyel etki oluşturmaktadır.²⁵ Hinokitiol microphthalmia-associated transcription factor (MITF) tirozinaz aktivasyonunu

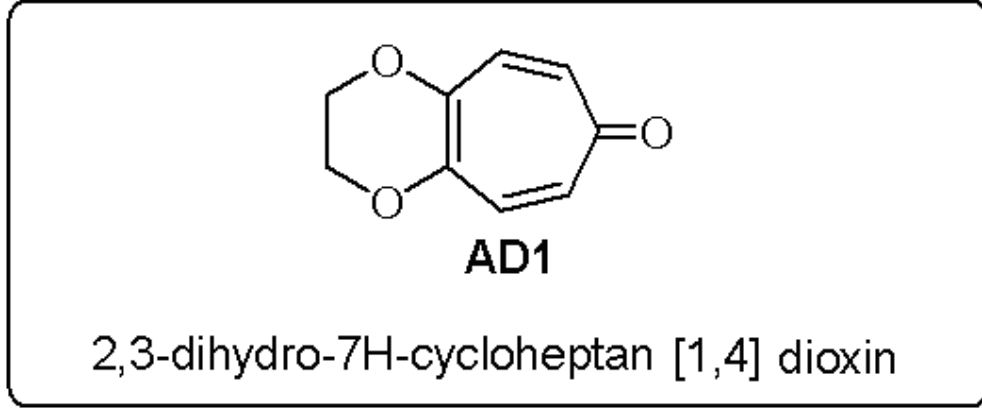
azaltmakta ve melanin sentezini engellemekte, hipopigmentasyona sebep olmaktadır.²⁶ Hinokitiol ve tropolon türevleri farelerde dalak T lenfositlerinin blastogenesis ve memeli hücrelerinin büyümesi üzerine sitotoksik etkilidir.²⁷ Tropolon catecol- O-methyltransferase (COMT)'ı inhibe etmekte, Katekolamin (noradrenalin ve dopamin) düzeyini artırmaktadır. Katekolaminler ile cinsiyet hormonları arasında da ilişki olduğu belirtilmektedir.²⁸ Bir bakteri kültüründen izole edilen 3,7-dihydroxytropolone melanomda invitro olarak sitotoksik etkili bulunmuştur.²⁹

Bitkisel kökenli, doğal olarak ortaya çıkan, şelasyon yapabilen (özellikle demir iyonu ile) antibakteriyel, antifungal ve hatta 1996 dan beri Japonya'da gıda koruyucu olarak kullanılan β -thujaplicin 7 üyeli halka yapısına sahip aromatik bir tropolon bileşigir ve farelerde (ICR) teratojenik etki oluşturmaktadır. Teratojenik etkisi doza bağlı olarak artmakta yada azalmaktadır.³⁰ Tropolon türevleri, ratlardan izole edilen hepatositlerde sitotoksik etkilidir ve bu türevlerden sentezle hazırlanan α -thujaplicin, antibakteriyel, bitki gelişimini inhibe eder, ve sitotoksik etkilidir.³¹

Bitkisel ekstraktan elde edilen hinokitiol (β -thujaplicin) ki o tropolone benzeri bir maddedir ve Ultra viyole-B ile indüklenmiş apoptosis (fare eritrositlerinde)'de antioksidan özelliğinden dolayı güçlü bir inhibisyon mekanizması oluşturmaktadır.³²

β -thujaplicin tropon ve tropolondan daha sitotoksiktir.³³ Sentetik olarak hazırlanmış β -thujaplicin analoglarının diğer ticari ürünler (azaconazole, tebucanazole ve copper oxine) gibi bitki mantarları üzerine antifungal etkili belirtilmektedir.³⁴ β -thujaplicin antiinflammatuar etkisinin olduğu da rapor edilmiştir.¹² Bitkilerden elde edilen β -thujaplicin ve β -dolabrin Staphylacoccus epidermidis üzerine antibakteriyel, γ -thujaplicin ise antifungal etkilidir. Her 3 maddede metaloproteaz inhibitörü'dür. β -

thujaplicin özellikle karboksipeptidaz A'yı inhibe etmektedir ve β -thujaplicin'in asetatlı bileşiği ise antimikrobial ve metaloproteaz inhibe edici etki oluşturmamaktadır.¹⁷



2.2. Akut İnflamasyon

Akut inflamasyon kısa sürelidir, birkaç dakika ile birkaç gün sürer. Vasküler olayların temel rol oynadığı akut inflamasyon, zedeleyici etkene karşı dokuda ilk oluşan cevaptır. Vasküler alandaki hemodinamik değişikliklerle, polimorfonükleer lökositlerin hareketleri birlikte olaylar dizisini oluşturur. Akut inflamasyon eksudasyon (vasküler) ve lökosit akümülyasyonu (hücreyel) ile karakterizedir.³⁵

2.2.1. İnflamasyonun Kimyasal Mediyatörleri

2.2.1.1. Vazoaktif Aminler

Histamin: Histamin Özellikle mast hücrelerinden daha az oranda da bazofiller ve trombositlerden salınır. Histamin fizik zedelenme, immün reaksiyonlar, kompleman parçacıkları (C3a,C5a) ve sitokinler gibi uyarılarla salınır. Arteriol dilatasyonu ve venüllerde permeabilite artışına yol açar.^{36,37}

Serotonin: Serotonin ya da diğeri adıyla 5-HT (5-Hidroksitriptamin) esansiyel bir aminoasit olan triptofandan sentezlenir.³⁸ İntestinal mukozada bulunan enterokromaffin hücrelerde lokalize olmuştur. Serotonin burada düz kasları uyararak gastrointestinal motiliteyi artırır. Kandaki tüm serotonin trombositlerde depolanır. Trombosit agregasyonu ile sahnımı uyarılır. Serotoninin lokal enjeksiyonu o bölgede inflamasyona yol açar.^{38,39}

2.2.1.2. Plazma Proteazları

Kompleman Sistemi: Kompleman sistemi ayrışma ürünleri ile birlikte 20 protein komponentinden oluşur.C1'den C9'a kadar sıralanan komponentler normalde plazmada inaktif halde bulunurlar. Aktivasyonları klasik ve alternatif olmak üzere iki yol üzerinden gerçekleşir. C3'ün ayrışması en kritik aşama olup, her iki yol da bu noktadan sonra ortak aktivasyon şekli izler. Antijen-antikor kompleksleri klasik yolu, mikrobial yüzeyler ve polisakkaridler ise alternatif yolu aktive ederler. Bu komponentler içinde bazıları diğeriğine göre daha sık olarak inflamasyon süreci içinde yer alır ve iyi tanınırlar. Bunlardan, C3a ve C5a (anaflatoksinler olarak da bilinirler) histamin aracılığı ile vasküler permeabilityi artırır, vazodilatasyona neden olurlar. C5a, aynı zamanda nötrofil ve diğeri hücreler için oldukça kuvvetli kemotaktik ajan olup, lökositlerin endotele adezyonunda görev alır. C3b ve C3bi ise opsonin olarak bilinir ve fagositozu kolaylaştırır.³⁸

Pıhtılaşma Sistemi: Hageman faktörünün aktivasyonu sonrası ortaya çıkan bir dizi plazma proteininden oluşur. Ayrışma sürecinin sonunda fibrinojenden fibrin oluşur, bu sırada fibrinopeptidler de ortaya çıkar. Fibrinopeptidler vasküler permeabilityi artırır ve lökositler için kemotaktiktirler. Fibronolitik sistemin

çalışması sonrasında plazmin aracılığı ile oluşan fibrin yıkım ürünleri de permeabiliteyi artırıcı etkiye sahiptir.⁴⁰

Kinin Sistemi: Hageman faktörünün aktivasyonu ile tetiklenen bir sistemdir. Kinin sisteminin en iyi bilenen mediyatörü bradikinin'dir. Bu mediyatör vasküler permeabiliteyi artırır, düz kas kontraksiyonu yapar, kan damarlarını dilate eder ve inflamasyonda ağrı duyusundan sorumludur.⁴¹ Ayrıca deriye enjekte edildiğinde ağrı oluşturur. Bradikininin etkisi kısa sürelidir. Çünkü plazma ve dokularda bulunan kininazlarla hızlı bir şekilde parçalanır. Bradikininler, P maddesi ve prostanoidler ağrı yolaklarını uyararak inflamasyonun dolor'unu oluştururlar.^{41,42} Kininler etkilerini B1 ve B2 olarak adlandırılan iki tip reseptörle oluştururlar.^{41,42} B1 reseptörleri doku hasarı ve inflamasyon gibi patolojik durumlarda indüklenirken, normal dokularda bulunmaz.¹⁴ B2 reseptörleri afferent sinir uçlarında ve SSS'de bulunur, ağrı reseptörlerinin duyarlılığını artırır.⁴³

P Maddesi: P maddesi santral sinir sistemi (SSS)'de yaygın olarak bulunur. P maddesinin periferden gelen ve nosiseptif uyarıları SSS'ne taşıyan primer duyuşal nöronlarda, omuriliğin arka boynuzunda ve duyuşal trigeminus çekirdeğindeki akson uçlarında glutamat ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir. P maddesi SSS' de ağrının birinci nörondan ikinci nörona taşınmasında rol oynar. Yapılan birçok deneysel çalışma P maddesinin inflamatuvar cevaba katkısı olduğunu desteklemektedir.⁴⁴ Levvis'in üçlü cevabında vazodilatasyon yapması ve ayrıca karrageninle oluşturulan inflamasyon modelinde (sıçan pençesinde yapılan ölçümlerde 15. dakika ve sonrasında) P maddesinin artması bu kanıtı desteklemektedir.⁴⁵

2.2.1.3. Araşidonik Asit Metabolitleri

Araşidonik asit (AA) hücre membranındaki fosfolipidlerde önemli bir miktarda bulunur. Sellüler fosfolipaz aktivasyonu ile membran fosfolipitlerinden ortaya çıkar.⁴⁶ Hücre sel fosfolipazlar mekanik, kimyasal, fiziksel uyarı veya C5a gibi iltihabi mediyatörlerle aktive edilirler.

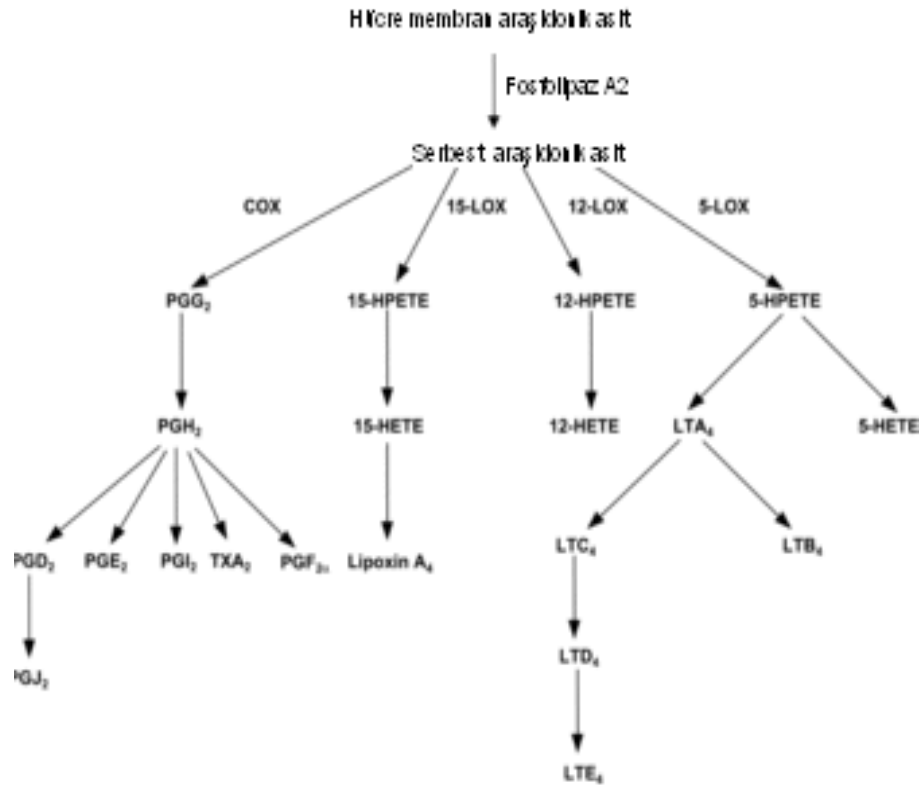
AA metabolizması iki majör yoldan biri şeklinde ilerler. Farklı yollardan siklooksijenaz ürünleri ve lipoksijenaz ürünleri oluşur.⁴⁷

Siklooksijenaz Ürünleri: Burada prostaglandin E2 (PGE2), prostaglandin D2 (PGD2), prostaglandin F2 α (PGF2 α), PG1 ve tromboksan (TXA2) bulunur. Araşidonik asit COX enzimi ile siklik endoperoksitlere (PGG2, PGH2) dönüşür.⁴⁸ PGE, PGF ve PGD'lere primer PG'ler adı verilir.⁴⁸ Primer PG'ler inflamasyonda anahtar mediyatör olarak rol oynarlar. Son yapılan çalışmalarda COX'un iki formu (COX-1 e COX-2) olduğu gösterilmiştir.⁴⁹ COX-1 ile COX-2 arasındaki en önemli fark COX-1' in esas olarak yapısal, COX-2' nin ise indüklenebilir olmasıdır.⁵⁰ COX-1 ayrıca damar endotelinde, trombositlerde, böbrek glomerül ve tubülüs hücrelerinde ve vezikula seminaliste fazla miktarda bulunur. COX-2'nin başta endotoksinler, interlökin- α , interlökin-6 ve tümör nekroz faktör_a olmak üzere inflamasyona neden olan değişik faktörlerle (bazı büyüme faktörleri, trombosit aktive edici faktör, endotelin, koryonik gonadotropin, serotonin ve ayrıca mekanik bir uyarı olan sürtünme stresi) indüklenir. Bu nedenle COX-2 aktivitesinin artması, inflamasyon gibi patolojik olaylardan sorumlu olan PG sentezini artırmaktadır.⁵¹ COX enzimi ürünleri olan PG'lerin değişik etkileri bulunmaktadır. PGE1'in intradermal injeksiyonu eritem ve hiperaljezi oluşturur. Karragenin, histamin, bradikinin ile oluşan ödematöz cevabı potansiyelize eder. PGE2 ise hiperaljezi oluşturur. Çok düşük dozlarda bile olsa karragenin, histamin, bradikinin

ile oluşan ödematöz cevabı potansiyelize eder. Düşük dozlarda diğer inflamasyon mediyatörlerinin etkilerini artırırken, yüksek dozlarda direkt inflamatuvar etki oluşturur. PGG₂'nin etkileri PGE₂'ye benzemektedir.⁵¹

Lipooksijenaz Ürünleri: 5-lipooksijenaz (5-LO) nötrofillerde baskın olarak bulunan ve AA'den lökotrienlerin oluşumunu sağlayan bir enzimdir. LO enziminin ürünleri lökotrienlerdir (LT). LT'lerden LTB₄ kemotaksisde görev alır. LTC₄, LTD₄, LTE₄ ise vazokonstriksiyon, bronkospazm ve permeabilite artışına yol açarlar. Bu mediyatörlerin rol aldığı en klasik hastalık örneği bronşiyel astımdır.^{52,53}

Özet olarak; ağrı ve ateş mekanizması da dahil olmak üzere eikozanoidler akut inflamasyonun her aşamasında yer alırlar.



2.2.1.4. Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF)

Trombosit aktive eden faktör (PAF), fosfolipid kökenli bir mediyatördür. Mast hücresi ve bazofil başta olmak üzere birçok hücreden salınır. Vasküler permeabiliteyi artırır, lökosit agregasyonu adezyonu ve kemotaksisini sağlar. Trombositleri aktive eder, eikozanoidler başta olmak üzere diğer bazı mediyatörlerin sentezini de uyandır.^{54,55}

2.2.1.5. Sitokinler

Sitokinler, aktive olmuş lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere birçok hücreden sentezlenir ve diğer hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan polipeptid yapıdaki maddelerdir. Hücrel immün cevap üzerine etkilerinin yanısıra inflamatuvar yanıtın oluşumunda da ilave önemli rolleri vardır.⁴⁰ İnflamasyonun oluşmasında rol alan en önemli sitokinler; interlökin-1 (IL-1), interlökin-8 (IL-8), tümör nekrozis faktör (TNF α ve β), interferon (IFN γ) ve kemokinlerdir.⁴⁰

2.2.1.6. Nitrik Oksit ve Oksijen Kaynaklı Serbest Radikaller

Nitrik oksit (NO) son dönemlerin yeni popüler mediyatörüdür. Solübl, serbest radikal gaz olan nitrik oksit, endotel kökenli gevşetici faktör (EDRF) benzeri etki gösterir. Sadece endotelden değil, makrofajlardan ve beyindeki spesifik nöronlardan da salınır. L-arginin, moleküler oksijen ve NADPH'dan nitrik oksit sentez enzimi (NOS) ile sentezlenir. İki tip NOS vardır. Endotel hücreleri ve nöronlarda sitoplazmik kalsiyumun artışı ile NOS hızlı bir şekilde sentezlenir. Makrofaj NOS'ı ise hücrenin aktive olması ile sentezlenebilir. NO damar duvarındaki düz kasları gevşetme yanı sıra, trombositlerde agregasyona ve adezyona neden olur. Ek olarak makrofajlarda sentez edilen formu, serbest radikal olarak davranır ve bazı mikroorganizmalar ve tümör

hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterir. Septik şokta kontrolsüz NO salınımı periferde vazodilatasyon ve ağır şok tablosuna yol açar.⁵⁶⁻⁵⁸

2.2.1.7. Lizozomal Unsurlar

Nötrofil ve monositler lizozomal granüller içerirler. Nötrofillerde üç tip granül izlenir. Spesifik granüller laktoferrin, lizozim, defensin, alkalen fosfataz ve kollejenaz gibi enzimler içerir. Primer granüller myeloperoksidaz, lizozim, defensin, asit hidrolazlar ve nötral proteazlar içerir. Tersiyer granüllerde ise; asit hidrolazlar ve jelatinazlar bulunur. Bu enzimlerin birçoğu matriks proteinlerini parçalayarak, destrüktif doku hasarına neden olurlar.⁵⁹

2.3. Kronik İnflamasyon

Kronik inflamasyon aktif iltihap ve iyileşme süreçlerinin birlikte görüldüğü uzun süreli bir inflamasyon olarak kabul edilir.⁶⁰

Kronik inflamasyon akut inflamasyonu izleyebilir. Bu geçiş zedeleyici etkenlerin ısrarla devam etmesi veya iyileşme süreçlerinde bozukluklar nedeniyle ortaya çıkar. Zedelenmenin bazı türlerinde ise zedeleyici etkene karşı yanıt başlangıçtan itibaren kronik inflamasyondur. Kronik inflamasyonu ortaya çıkaran zedeleyici etkenler akut inflamasyon yapanlardan daha az toksik olmalarına rağmen, iyileştirme süreçlerinde bir yetersizlik olması daha uzun süren bir zedelenmeye neden olabilir. Fibrozis birçok kronik inflamatuvar hastalığın ortak özelliğidir ve organ disfonksiyonunun önemli nedenlerinden biridir. Kronik inflamasyon; inatçı enfeksiyonlar, potansiyel toksik ajanlara uzun süre maruz kalma ve otoimmün hastalıklar sırasında oluşabilir.^{61,62}

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hayvanlar

Çalışmamızda kullanılan hayvanlar (sıçan ve tavşanlar) Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Deney için ağırlıkları 220-230 gram arasında değişen toplam 60 adet albino Wistar türü erkek sıçan ve 18 adet albino tavşan (3,5-4 kg) kullanıldı. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde laboratuarda normal oda sıcaklığında (22 C°) barındırıldı ve beslendi.

3.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan 2.3 dihidro-7h-cycloheptan [1, 4]-dioxin (AD-1) Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Arif DAŞTAN ve Prof. Dr. Metin BALCI tarafından sentezlenmiştir. Ayrıca indometazin, Karragenin, tripan mavisi SİGMA'dan, hyaluronidaz ise Kiyevskoye predpriyetiye po proizvodstuu bakteriynih preparatov (Kiev UKRAINA)'den temin edildi.

AD-1 in sıçanlarda karrageninle oluşturulan inflamasyonlu pence ödemeine etkisi

Deneyimizin bu serisinde AD-1'in antiinflamatuvar etkisi sıçanlarda karrageninle oluşturulan inflamasyonlu pence ödeminde araştırıldı⁶³ (Şekil 1). Deney öncesi 5 gruba ayrılan sıçanların ilk 3 grubuna sırası ile AD-1 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda ağızdan sonda ile uygulandı. AD-1'in antiinflammatuar etki gücünü karşılaştırmak için

sıçanların bir başka grubuna (4. grup) indometazin 25 mg/kg dozda aynı yöntemle ağızdan verildi. Kontrol grubuna ise çözücü olarak aynı hacimde distile su verildi.



Şekil 1: Karrageninle oluşturulan inflamasyonlu sıçan pençesi

İlaçlar verildikten 1 saat sonra bütün sıçanların ayak pençesine 0.1 ml % 1'lik karragenin enjekte edildi. Karragenin enjekte edilmeden önce hayvanların ayak hacimleri diz eklemine kadar pletismometrede (Şekil 2) ölçüldü. Karrageninin oluşturduğu inflamasyonlu pençe hacim artışı her saat başı 5 kez ölçüldü. AD-1 ve indometazinin antiinflamatuvar etkileri kontrol grubundan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak tespit edildi.



Şekil 2: Pletismometre

3.3. Hyaluronidaz testi

Deneyin bu serisinde AD-1 ve indometazinin hyaluronidazla artırılan kapiller damar permeabilitesine etkisi araştırıldı.⁶⁴ Deney için ağırlıkları 3.5-4 kg olan 18 adet albino tavşan kullanıldı. Deney öncesi tavşanlar gruplara bölünerek bilateral batin bölgeleri traşlandı. Tavşanların bir grubuna AD-1 50 mg/kg diğer bir gruba indometazin 10 mg/kg dozlarında ağızdan sonda ile verildi. Kontrol grubuna ise aynı hacimde distile su verildi. Daha sonra 128 ünite hyaluronidaz 1 ml izotonik NaCl içinde çözüldü ve bu solusyonun 0.5 ml'si içine 0.8 ml tripan mavisi (% 075'lik) çözeltisi eklendi. Son karışımın 0.1 ml'si ilaçlar verildikten bir saat sonra traşlanmış bölgeye subkutan olarak enjekte edildi. Enjeksiyonun 5. ve 30. dakikalarında beliren mavi alan mm^2 cinsinden

ölçüldü. Beliren mavi alanın küçük olması hyaluronidaz enzimi aktivitesi ve kapiller damar permeabilitesinin azaldığını göstermektedir.

3.4. Akut toksisite

AD-1'in akut toksisitesi 250, 500 ve 1000 mg/kg dozlarda araştırıldı. AD-1 uygulanan sıçanlar 24 saat kontrol altında tutuldu. AD-1 in akut toksisitesi indometazinle karşılaştırıldı. Bu amaçla indometazin hayvanlara 25 ve 50 mg/kg dozlarda uygulandı. Akut toksisite bu süre içerisinde ölen sıçan sayısına göre değerlendirildi.⁶⁵

4. BULGULAR

4.1. *Karragenin inflamasyon testi*

Tablo 1'den görüldüğü gibi AD-1 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda karragenin oluşturduğu inflamasyonlu pençe ödemi dördüncü saatte kontrol grubuna göre sırası ile % 37 ($p<0.05$), % 71 ($p<0.02$) ve % 85 ($p<0.001$) olarak azaltmıştır. Bu oran indometazin için % 67,9 (<0.02) olmuştur. Kontrol grubunda inflamasyonlu ayak hacmi normale göre 0,56 ml artış gösterirken, belirtilen dozlarda AD-1 ve indometazin alan sıçan gruplarında bu artış sırası ile 0.23, 0.07, 0.09, 0.17 ve 0.56 ml olarak ölçülmüştür.

4.2. *Hyaluronidaz testi*

Tablo 2'den görüldüğü gibi 50 mg/kg dozda AD-1 alan tavşanlarda tripan mavisinin cilt altında yayılma alanı 5. ve 30. dakikalarda 220.1 ($p<0.05$) ve 251 ($p<0.01$) mm² olurken bu alan indometazin (25 mg/kg) ve kontrol grubunda 239,3 ($p<0.05$), 270.5 ($p<0.01$) ve 277, 485,8 mm² olarak belirlendi.



Şekil 3: Tripan mavisini ile hyaluronidazın birlikte verilmesi ile oluşan kapiller permeabilite artışı

4.3. Akut toksisite

Sıçanlara 250, 500 mg/kg dozlarda ağızdan uygulanan AD-1 hiçbir dozda ölüm oluşturmadı. Fakat 1000 mg/kg dozda ölüm oluşturdu. İndometazini 25 mg/kg dozda alan sıçanlarda ölüm görülmedi. Fakat 50 mg/kg dozda indometazin alan sıçanların tümü öldü.

Elde edilen sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Sonuçların değerlendirilmesi için tek yönlü varyans analizinde Tukey HSD testi kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo 1. AD-1 ve İndometazin sığınlarda Karrageninle oluşturulan inflamasyonlu pençe ödeme etkisi

İlaçlar	Hayvan sayısı	Doz mg/kg	Sığınların ayak hacmi ml'de		Antiinflamatuvar etki % de	P
			İnflamasyondan önce	Karragenin inflamasyondan 4 saat sonra		
AD-1	6	50	0,86	1,09	37	<0,05
AD-1	6	100	0,96	1,03	71	<0,02
AD-1	6	200	0,91	1,00	85	<0,001
İndometazin	6	25	0,89	1,06	67,9	<0,02
Kontrol	6	–	0,84	1,40	–	–

Tablo 2. AD-1 ve İndometazinin tavşanlarda Hyaluronidazla artırılan kapiller damar permeabiliteye etkileri

İlaçlar	Hayvan sayısı	Doz mg/kg	Hyaluronidazın dağılım alanı mm ² de			
			5. dakikada	P	30. dakikada	P
AD-1	6	50	220,1 ± 17	<0,05	251 ± 19	<0,01
İndometazin	6	10	239,3 ± 21	<0,05	270,5 ± 26	<0,01
Kontrol	6	–	277,0 ± 33	–	485,8 ± 43	–

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, AD-1'in antiinflammatuar etkisi sıçanlarda karrageninle oluşturulan inflamasyonlu pençe ödeminde araştırıldı. Ayrıca tavşanlarda hyaluronidazla artırılan kapiler damar permeabiliteye etkisi incelendi (Şekil 3). Deney sonuçlarımız AD-1'in kullanılan tüm dozlarda karragenin inflamasyonunu anlamlı azalttığını göstermiştir. Bu sonuçlardan AD-1'in antiinflammatuar etkisinin doz artışına paralellik gösterdiği anlaşılmıştır. AD-1'in kullanılan tüm dozları arasındaki antiinflammatuar etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. AD-1'in 100 ve 200 mg/kg dozlarının karragenin inflamasyonunun 4. saatinde indometazinden daha etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar AD-1'in 100 ve 200 mg/kg dozları karragenin inflamasyonunun hem erken hem de geç fazlarını inhibe ettiğini göstermektedir.

Bilindiği gibi karragenin inflamasyonu iki fazdan oluşur: Bunlar erken ve geç faz olarak adlandırılır.⁶⁶ Erken fazın histamin, serotonin ve bradikinin salınımına bağlı olduğu, geç fazın ise PG oluşumuna bağlı olarak geliştiği gösterilmiştir.⁶⁷ Karrageninin oluşturduğu inflamasyonda adı geçen bu mediyatörler dışında, NO (nitrik oksid) sentezinin artması, hidrojen peroksid (H₂O₂), süperoksid (O⁻²), hidroksil radikaller ve PNL aktivasyonu yer almaktadır.⁶⁷⁻⁶⁹ PNL inflamasyonun şiddetlenmesinde rol oynar.⁷⁰ Deneysel çalışmalar PNL lerin aktivasyonunuda kalsiyum iyonlarının önemli rol aldığını göstermiştir.⁷¹ Kalsiyum iyonları hücrelerde 5-Lo az enzimini aktive ederek lipoksigenaz ürünlerinin sentezine yol açar. Ayrıca sitosolik fosfalipaz A2 yi aktive ederek eikozanoid sentezini artırır.⁷² Karrageninle oluşturulan inflamasyon modeli COX'a bağımlı bir reaksiyondur ve COX inhibisyonunun tanımlanması için kullanılan bir yöntemdir; bir çalışmada karragenine bağlı ödemde lipoksigenaz enzimlerinde rolünü göstermişlerdir.⁷³

AD-1'in 100 ve 200 mg/kg dozlarda karragenin inflamasyonunu hem erken hemde geç fazlarında baskılaması histamin, serotonin, bradikinin ve PG oluşumunun inhibisyonunundan kaynaklandığını düşündürebilir. Ayrıca 50 mg/kg dozda erken fazda etkili olamaması, bu dozda erken fazda salgılanan inflamasyon mediyetörlerini inhibe edememesinden ileri gelmiş olabilir. Bu deney sonuçlarımız AD-1'inde antiinflammatuar etkisinin İndometazin ve diğer NSAİİ ler gibi inflamasyon mediyetörleri üzerinden oluşturduğunu göstermektedir. İndometazini 25 mg/kg dozda kullanmamızın nedeni bu dozda karragenin inflamasyonunu daha düşük dozlara göre güçlü baskılamasıdır.^{63,-65} İndometazinde diğer nonsteroid antiinflammatuar ilaçlar gibi histamin, bradikinin, serotonin PG sentezini inhibe ederek antiinflammatuar etki oluşturduğu bilinmektedir.⁷⁴ Literatürlerde AD-1'in antiinflammatuar etki mekanizmasına yönelik çalışmalara rastlanmadı. Fakat tropolon türevlerinin inflamasyon olayında rolü bilinen Lipoksigenazı in-vitro olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir.⁷⁵

Deneyimizin ikinci serisinde AD-1 ve indometazinin tavşanlarda hyaluronidazla artırılan kapiller damar permeabiliteye etkisi araştırıldı. 50 mg/kg dozda kullanılan AD-1 hyaluronidazla artırılan kapiller damar permeabiliteyi indometazin kadar anlamlı azaltmıştır. İndometazinin bu dozu (10 mg/kg) bundan önceki çalışmalarda da artmış kapiler permeabiliteyi anlamlı olarak azaltmıştır.^{64,76,77} Hem AD-1, hem de indometazin hyaluronidaz dağılım alanını 5. ve 30. dakikalarda kontrole göre anlamlı olarak küçültmüştür. İnflamasyonlu bölgede vasküler dilatasyon ve permeabilite de artış görülür. Vasküler permeabilite artışında hyaluronidaz enziminin rolü bilinmektedir.⁷⁸ İnflamasyon esnasında hyaluronidaz aktivitesi yükselir ve inflamasyon azalması ile hyaluronidaz aktivitesinin azalması paralellik gösterir.²¹ Elde edilen sonuçlarımız

antiinflammatuar etkinlik ile hyaluronidaz enzim inhibisyonu arasındaki ilişkinin olduğunu ortaya koymuştur. AD-1 ve indometazinin antiinflammatuar etki oluşturan dozlarda, hyaluronidaz aktivitesinde anlamlı inhibe etmesi, AD-1'in de antiinflammatuar etki mekanizmasında hyaluronidaz enzim inhibisyonunun rolünü göstermektedir.

Antiinflammatuar aktiviteye sahip ilaç ve maddelerin tavşanlarda hyaluronidazla artırılan kapiler damar permeabilityyi azalttıkları gösterilmiştir.⁷⁹ Bu çalışma sonuçları bizim sonuçlarımızla uyum içerisindedir.

Literatürlerde tropolon türevlerinin kapiler damar permeabilityye etkilerine ait bilgilere rastlanmadı. Fakat hidroksitropolonların inositol monofosfat, ALP ve β -monoksijenaz gibi enzimleri yarışmalı yada yarışmasız bir şekilde inhibe ettikleri gösterilmiştir.⁸⁰ Araşidonik asit, monoksijenaz enzimleri ile de metabolize olunur: Bu metabolitler hidroksicikozatetraenoik asit (HETE), epoksicikozatrienoik asit (EETA) ve 19,20-hidroksiaraşidonatlarıdır. Araşidonik asidin epoksi grubu içeren metabolitleri (11,12-EETA) damarları güçlü genişletir.³⁸ Tropolonların monoksijenazı inhibe etmeleri araşidonik asitten güçlü vazodilatasyon yapan epoksi metabolitlerinin üretiminin azalmasına yol açabilir. Bu son olay artmış damar geçirgenliğinin azalmasında katkı sağlamış olabilir.

Sonuç olarak AD-1'in indometazine göre daha güçlü antiinflammatuar etkili ve düşük toksisiteli bir ajan olduğu söylenebilir. AD-1'in antiinflammatuar etki mekanizmasının indometazine benzer olduğu tahmin edilebilir. Fakat AD-1'in antiinflammatuar etki mekanizmasına açıklık getirilebilmesi için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- 1- Ogata A, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Ogawa H, Yasuda K, Aoki N. Teratogenicity of thujaplicin in ICR mice. *Food and Chem Toxicol* 1999; 37: 1097-1104.
- 2- Morita Y, Matsumura E, Tsujibo H, Yasuda M, Okabe T, Sakagami Y, Ishida N, Inamori Y. Biological activity of 4-acetyltropolone, the minor component of *Thujopsis dolabrata* SIEB. et ZUCC. *Hondai MAKINO*. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 981-985.
- 3- Arima Y, Nakai Y, Hayakawa R, Nishino T. Antibacterial effect of β -thujaplicin on staphylococci isolated from atopic dermatitis: relationship between changes in the number of viable bacterial cells and clinical improvement in an eczematous lesion of atopic dermatitis. *J Antimicrob Chemoth* 2003; 51: 113–122.
- 4- Kitamura S, Iida T, Shirahata K, Kase H. Studies on lipoxygenase inhibitors I. MY3-469 (3-methoxytropolone), a potent and selective inhibitor of 12-lipoxygenase, produced by *Streptovercillium hadanonense* KY11449. *J Antibiot* 1986; 39: 589-593.
- 5- Korth H, Brüsewithz G, Pulverer G. Isolation of antibacterial active tropolone from a *Pseudomonas cepacia* strain. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hgy (A)* 1982; 252: 83-86.
- 6- Budihas SR, Gorshkova I, Gaidamakov S, Wamiru A, Bona MK, Parniak MA, Crouch RJ, McMahon JB, Beutler JA, Le Grice SFJ. Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity by hydroxylated tropolones. *Nucleic Acids Res* 2005; 33 (4): 1249–1256.

- 7- Miyamoto D, Kusagaya Y, Endo N, Sometani A, Takeo S, Suzuki T, Arima Y, Nakajima K, Suzuki Y. Thujaplicin–copper chelates inhibit replication of human influenza viruses. *Antivir Res* 1998; 39: 89–100.
- 8- Doulias BT, Nouis L, Zhu BZ, Frei B, Galaris D. Protection by tropolones against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis in cultured Jurkat cells. *Free Radical Res.* 2004; 39: 125-135.
- 9- Diouf PN, Delbarre N, Perrin D, Ge´rardin P, Rapin C, Jacquot JP, Gelhaye E. Influence of tropolone on poria placenta wood degradation. *Appl Environ Microb* 2002; 4377–4382.
- 10- Choi Y, Bae E, Kim D, Park S, Kwon S, Na J, Park K. Differential regulation of melanosomal proteins after hinokitiol treatment. *J Dermatol Sci* 2006; 43: 181-188.
- 11- Morita Y, Matsumura E, Okabe T, Fukui T, Ohe T, Ishida N, Inamori Y. Biological activity of b-dolabrin, g-thujaplicin, and 4-acetyltropolone, hinokitiol-related compounds. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(10): 1666-1669.
- 12- Nakano Y, Wada H, Tani M, Sasai K, Baba E. Effects of β -thujaplicin on anti-malassezia pachydermatis remedy for canine otitis externa. *J Vet Med Sci* 2005; 67(12): 1243–1247.
- 13- Morita Y, Matsumura E, Okabe T, Fukui T, Mitsunobu S, Sugiura M, Ohe T, Tsujibo H, Ishida N, Inamori Y. Biological activity of α -thujaplicin, the isomer of hinokitiol. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 899–902.
- 14- Bagli JF, Bogri T, Palameta B, Martel R, Robinson W, Pugsley T, Lippmann W. Troponoids. 3. synthesis and antiallergy activity of N-troponyloxamic acid esters. *J Med Chem* 1979; 22: 1186-1193.

- 15-** Lee CP, Hegarty MP, Christie GS. Antithyroid and antiperoxidase activity of tropolone and 3-hydroxy-4-pyrone. *Chem Biol Interact* 1979; 27: 17-26.
- 16-** Rekka E, Chrysselis M, Siskou I, Kourounakis A. Synthesis of new azulene derivatives and study of their effect on lipid peroxidation and lipoxygenase activity. *Chem Pharm Bull* 2002; 50(7): 904-907.
- 17-** Inamori Y, Shinohara S, Tsujibo H, Okabe T, Morita Y, Sakagami Y, Kumeda Y, Ishida N. Antimicrobial activity and metalloprotease inhibition of hinokitiol- related compounds, the constituents of *Thujopsis dolabrata* S. and Z. Hondai MAK. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 990-993.
- 18-** Demirezer LO, Kuruüzüm- Uz A, Guvenalp Z, Süleyman H. Bioguided fractionation of *Polygonum alpinum* and isolation and structure elucidation of Active compounds. *Pharm Biol* 2006; 44(6): 462-466.
- 19-** Nacife VP, Soeiro Mde N, Gomes RN, D'Avila H, Castro-Faria Neto HC, Meirelles Mde N. Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide in vivo. *Cell Struct Funct* 2004; 29(2): 27-34.
- 20-** Houck JC, Chang CM. Permeability factor contaminating hyaluronidase preparations. *Inflammation* 1979; 3(4): 447-451.
- 21-** Procida C, Montovani V, Bianchini P. Aktivata antihyaluronidasica dialcuniderivati pirazolici. *Biol Soc Ital Biol Sper* 1971; 47(6): 159-163.
- 22-** Yamato M, Hashigaki K, Yasumoto Y, Sakai J, Luduena RF, Banerjee A, Tsukagoshi S, Tashiro T, Tsuruo T. Synthesis and antitumor activity of tropolone derivatives. 6. Structure-activity relationships of antitumor-active tropolone and 8-hydroxyquinoline derivatives. *J Med Chem* 1987a; 30(10): 1897-1900.

- 23-** Yamato M, Hashigaki K, Sakai J, Kawasaki Y, Tsukagoshi S, Tashiro T. Synthesis and antitumor activity of tropolone derivatives 4. *J Med Chem* 1987b; 30(1): 117-120.
- 24-** Sakagami Y, Inamori Y, Isoyama N, Tsujibo H, Okabe T, Morita Y, Ishida N. Phytogrowth-Inhibitory activities of beta-dolabrin and gamma-thujaplicin, hinokitiol-related compounds and constituents of *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. var *hondai* Makino. *Biol Pharm Bull* 2000; 23(5): 645-648.
- 25-** Matsunaga T, Hasegawa M, Ryuno K, Ohmayu S, Kawamitsu S, Murasaki Y, Sasamoto K, Nishitani K, Saruta K, Iikura Y. On the antibacterial effect of hinokitiol against *Staphylococcus aureus* showing double zone phenomenon. *Kansenshogaku Zasshi* 1995; 69(1): 21-27. (Japanese)
- 26-** Kim DS, Park SH, Kwon SB, Li K, Youn SW, Park KC. Epigallocatechin-3-gallate and hinokitiol reduce melanin synthesis via decreased MITF production. *Arch Pharm Res* 2004; 27(3): 334-339.
- 27-** Inamori Y, Tsujibo H, Ohishi H, Ishii F, Mizugaki M, Aso H, Ishida N. Cytotoxic effect of hinokitiol and tropolone on the growth of mammalian cells and on blastogenesis of mouse splenic T cells. *Biol Pharm Bull* 1993; 16(5): 521-523.
- 28-** Reznikov AG, Nosenko ND, Tarasenko LV. Augmentation of the sterilizing effect of neonatal androgenization with tropolone, a catechol-O-methyltransferase inhibitor, in female rats. *Neuroendoc* 1990; 52(5): 455-459.
- 29-** Sugawara K, Ohbayashi M, Shimizu K, Hatori M, Kamei H, Konishi M, Oki T, Kawaguchi H. BMY-28438 (3,7-dihydroxytropolone), a new antitumor antibiotic active against B16 melanoma. I. Production, isolation, structure and biological activity. *J Antibiot* 1988; 41(7): 862-868.

- 30-**Ogata A, Ando H, Kubo Y, Nagasawa H, Ogawa H, Yasuda K, Aoki N. Teratogenicity of thujaplicin in ICR mice. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 1097-1104.
- 31-**Morita Y, Matsumura E, Tsujibo H, Yasuda M, Sakagami Y, Okabe T, Ishida N, Inamori Y. Biological activity of α -thujaplicin, the minor component of *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. var. *hondai* Makino. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 607–611.
- 32-**Baba T, Nakano H, Tamai K, Sawamura D, Hanada K, Hashimoto I, Arima Y. Inhibitory effect of β -thujaplicin on ultraviolet β -induced apoptosis in mouse keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 24-28.
- 33-**Nakagawa Y, Tayama K. Mechanism of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity induced by tropolones in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interac* 1998; 45-60.
- 34-**Baya M, Soulonganga P, Gelhaye E, Gérardin P. Fungicidal activity of beta-thujaplicin analogues. *Pest Manag Sci* 2001; 57(9): 833-838.
- 35-**Maslinska D, Gajewski M. Some aspects of the inflammatory process. *Folia Neuropathol* 1998; 36: 199-204.
- 36-**Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Prostaglandins, aspirin-like drugs and edema of inflammation. *Nature* 1973; 246: 217-218.
- 37-**Kayaalp SO, Tuncer M. Histamin ve Antihistaminikler İn: Kayaalp SO, editör. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 11. Baskı, Ankara, Hacettepe-Taş 2005; 1239-1255.
- 38-**Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Hacettepe-Taş Ltd Sti Ankara 1998.

- 39- Maleki K, Nayebi AM, Garjani A. Effects of central and peripheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw oedema. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1723-1730.
- 40- Guyton AC, Hail JE. Text book of medical physiology. Çeviri: Arslan A. Tıbbi fizyoloji. 9. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti 1996.
- 41- Sharma JN, Buchanan WW. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp Toxicol Patbol* 1994; 46: 421-433.
- 42- Hail İM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther* 1992; 56: 131-190.
- 43- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1227-1231.
- 44- Bileviciute I, Lundeberg T, Ekblom A, Theodorsson E. Bilateral changes of substance-p-like, neurokinin-a-like, calcitonin gene-related peptide-like and neuropeptide-y-like immunoreactivity in rat knee-joint synovial-fluid during acute monoarthritis. *Neuro Sci Lett* 1993; 153: 37-40.
- 45- Ogonowski AA, May SW, Moore AB, Barrett LT, O'Bryant CL, Pollock SH. Antiinflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 846-853.
- 46- Garcia-Pastor P, Randazzo A, Gomez-Paloma L, Alcaraz MJ, Paya M. Effects of petrosaspongiolide M, a novel phospholipase A2 inhibitor, on acute and chronic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 166-172.
- 47- Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 247-258.

- 48-** Griswold DE, Adams JL. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev* 1996; 16: 181-206.
- 49-** Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26: 2-10.
- 50-** Fung HB, Kirschenbaum HL. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors for the treatment of arthritis. *Clinical Therapeutics* 1999; 21: 1131-1157.
- 51-** Steinmeyer J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res* 2000; 2: 379-385.
- 52-** Malmsten CL. Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes in inflammation. *Am J Med* 1986; 80: 11-17.
- 53-** Bhattacharjee P, Hammond B, Salmon JA, Stepney R, Eakins KE. Chemotactic response to some arachidonic acid lipoxygenase products in the rabbit eye. *Eur J Pharmacol* 1981; 73: 21-28.
- 54-** Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2000; 80: 1669-1699.
- 55-** Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *J Biochem* 2002; 131: 773-779.
- 56-** Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995; 82: 1598-1610.
- 57-** Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology. and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
- 58-** Kuyumcu A, Duzgun AP, Ozmen MM, Besler HT. The role of nitric oxide in trauma and infection. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2004; 10: 149-159.

- 59-** Takeuchi A, Kobayashi K, Yukiyaama Y, Chihara T, Matsuta K, Hashimoto A. Role of protease-protease-inhibitor complexes in inflammation. *Int J Tissue React* 1984; 6: 1-8.
- 60-** Melli M, Kayaalp SO. Non-steroidal antiinflatuar ilaçlar. İn: Kayaalp SO. Edit. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 11. Baskı, Hacettepe-Taş Ankara 2005; 837-870.
- 61-** Co DO, Hogan LH, Ji-Kim S, Sandor M. T celi contributions to the different phases of granuloma formation. *Immunol Lett* 2004; 92: 135-142.
- 62-** Mielke ME, Peters C, Hahn H. Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol Rev* 1997; 158: 79-93.
- 63-** Suleyman H, Demircan B, Karagoz Y, Oztasan N, Suleyman B. Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. *Pol J Pharmacol* 2004; 56(6): 775-780.
- 64-** Suleyman H, Gul HI, Gul M, Alkan M, Gocer F. Anti-inflammatory activity of bis (3-aryl-3-oxo-propyl)methylamine hydrochloride in rat. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(1): 63-67.
- 65-** Suleyman H, Demirezer LO, Kuruuzum A, Banoglu ZN, Gocer F, Ozbakir G, Gepdiremen A. Antiinflammatory effect of the aqueous extract from *Rumex patientia* L. roots. *J Ethnopharmacol* 1999; 65(2): 141-148.
- 66-** Chaudhuri AKN, Karmakar S, Rey D, Pal S, Pal M, Sen T. Anti-inflammatory activity of Indian black tea (sikim variety). *Pharmacol Res* 2005; 51: 169–175.
- 67-** Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P: Antiinflammatory effect of *Semecarpus anacardium* L. nut extract in acute and chronic inflammatory conditions. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 2028–2031.

- 68-**Marzocco S, Di Paola R, Serraino I, Sorrentino R, Meli R, Mattaceraso G, Cuzzocrea S et al: Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 484: 341–350.
- 69-**Neto AG, Costa JMLC, Belati CC, Vinholis AHC, Possebom LS, Da Silva Filho AA, Cunha WR et al.: Analgesic and antiinflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. *J Ethnopharmacol* 2005; 96: 87–91.
- 70-**Higgins AJ. The biology pathophysiology and control of eicosanoids in inflammation. *J Vet Pharmacol Ther*1985; 8: 1–8.
- 71-**Elferink JG, Boonen GJ, Koster BM. The role of calcium in neutrophil migration: the effect of calcium and calcium-antagonists in electroporated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182: 864–869.
- 72-**Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1997; 272: 16709–16712.
- 73-**Gamache DA, Povlishock JT, Ellis EF. Carragenan induced brain inflammation. *J Neurosurg* 1986; 65: 679–685.
- 74-**Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep* 2007; 59(3): 247-58. (Review)
- 75-**Suzuki H, Ueda T, Juránek I, Yamamoto S, Katoh T, Node M, Suzuki T. Hinokitiol, a selective inhibitor of the platelet-type isozyme of arachidonate 12-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275(3): 885-889.
- 76-**Suleyman H, Demirezer LO, Kuruuzum A, Buyukokuroglu ME, Gocer F, Banoglu ZN, Gepdiremen A. Effect of the aqueous extract of *Rumex patientia* on xylol and hyaluronidase induced capillary permeability compared to indomethacin. *Pharmazie* 2001; 56(1): 92-93.

- 77- Suleyman H, Gul HI, Asoglu M. Anti-inflammatory activity of 3-benzoyl-1-methyl-4-phenyl-4-piperidinol hydrochloride. *Pharmacol Res* 2003; 47(6): 471-475.
- 78- Houck JC, Chang CM. Permeability factor contaminating hyaluronidase preparations. *Inflammation* 1979; 3, 447-451.
- 79- Halici Z, Suleyman H, Cadirci E. Effects of calcium channel blockers on hyaluronidase-induced capillary vascular permeability. *Arch Pharm Res* 2008; 31 (7): 891-899.
- 80- Piettre SR, André C, Chanal MC, Ducep JB, Lesur B, Piriou F, Raboisson P, Rondeau JM, Schelcher C, Zimmermann P, Ganzhorn AJ. Monoaryl and bisaryldihydroxytropolones as potent inhibitors of inositol monophosphatase. *J Med Chem* 1997; 40 (26): 4208-4221.