



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI *ONONIS* L. TÜRLERİNİN
TAŞIDIĞI YARA İYİLEŞTİRİCİ VE ANTIENFLAMATUVAR
ETKİLİ BİLEŞİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

Burçin ERGENE ÖZ

**FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Gülçin SALTAN**

2015-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI *ONONIS* L. TÜRLERİNİN
TAŞIDIĞI YARA İYİLEŞTİRİCİ VE ANTIENFLAMATUVAR
ETKİLİ BİLEŞİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

Burçin ERGENE ÖZ

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. H. Gülçin SALTAN

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
Başkanlığı tarafından 13L3336002 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2015-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

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

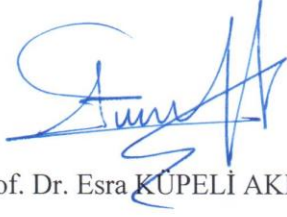
Tez Savunma Tarihi : 15/06/2015



Prof. Dr. Gülçin SALTAN

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL

Gazi Üniversitesi



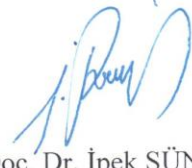
Prof. Dr. M. Levent ALTUN

Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Betül SEVER YILMAZ

Ankara Üniversitesi



Doç. Dr. İpek SÜNTAR

Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Enflamasyon	7
1.1.1. Enflamasyon Oluşumu	9
1.1.1.1. Vasküler Yanıt	10
1.1.1.2. Hücresel Yanıt	11
1.1.2. Antienflamatuvar Etkinin Değerlendirilmesi	15
1.2. Yara	15
1.2.1. Yara Tipleri	15
1.2.1.1. Akut Yaralar	15
1.2.1.2. Kronik Yaralar	15
1.2.2. Yara İyileşmesi	16
1.2.2.1. Enflamasyon Evresi	17
1.2.2.2. Proliferasyon Evresi	18
1.2.2.3. Olgunlaşma Evresi	19
1.2.3. Yara İyileşmesinin Değerlendirilmesi	19
1.2.3.1. <i>In Vitro</i> Çalışmalar	19
1.2.3.2. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	19
1.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Etki	20
1.4. <i>Ononis</i> L. Türlerinin Botanik Özellikleri	21
1.4.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri	21

1.4.2. Fabaceae Familyasının Genel Özellikleri	21
1.4.3. <i>Ononis</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri	22
1.4.4. Çalışılan Türlerin Tayin Anahtarı	22
1.5. <i>Ononis</i> L. Türleri Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar	23
1.5.1. Terpenik Bileşikler	23
1.5.1.1. Triterpenik Bileşikler	23
1.5.1.2. Steroller	25
1.5.2. Flavonoidler	26
1.5.3. Kumarinler	41
1.5.4. Uçucu Bileşikler	45
1.5.5. Diğer Bileşikler	48
1.6. <i>Ononis</i> Türleri Üzerinde Yapılan Aktivite Çalışmaları	60
1.6.1. Analjezik Aktivite	60
1.6.2. Antienflamatuvar Aktivite	60
1.6.3. Antikanser Aktivite	62
1.6.4. Antimikrobiyal Aktivite	64
1.6.5. Antioksidan Aktivite	67
1.6.6. Antiplatelet Aktivite	68
1.6.7. Hepatoprotektif Aktivite	69
1.6.8. İnsektisit Aktivite	69
1.6.9. Östrojenik Aktivite	69
1.6.10. Yara İyileştirici Aktivite	70
2. GEREÇ VE YÖNTEM	71
2.1. Gereç	71
2.1.1. Bitkisel Gereç	71
2.1.2. Deney Hayvanları	76
2.1.3. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar	76
2.2. Yöntem	76
2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	76
2.2.1.1. Ekstraksiyon	76
2.2.1.1.1. <i>n</i> -Hekzan Ekstrelerinin Hazırlanışı	77

2.2.1.1.2. Etil Asetat Ekstrelerinin Hazırlanışı	77
2.2.1.1.3. Metanol Ekstrelerinin Hazırlanışı	77
2.2.1.2. Kromatografik Yöntemler	78
2.2.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	78
2.2.1.2.2. Kolon Kromatografisi	79
2.2.1.2.2.1. Kolonun Hazırlanması	79
2.2.1.2.2.1.1. Silika Jel Kolonun Hazırlanması	79
2.2.1.2.2.1.2. Sefadeks Kolonun Hazırlanması	80
2.2.1.2.2.2. Ekstrenin Kolona Uygulanması	80
2.2.1.2.2.3. Ekstrenin Fraksiyonlandırılması	81
2.2.1.3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	82
2.2.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	84
2.2.1.4.1. Analitik Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	84
2.2.1.4.2. Semipreparatif Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	85
2.2.2. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini	88
2.2.2.1. NMR Spektrometrisi	88
2.2.2.2. Kütle Spektrometrisi (MS)	88
2.2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	89
2.2.3.1. Test Numunelerinin Hazırlanması	89
2.2.3.2. Referans Maddelerin Hazırlanması	89
2.2.3.3. Yara İyileştirici Aktivite Tayini	90
2.2.3.3.1. <i>In Vivo</i> Deneyle	90
2.2.3.3.1.1. Çizgisel İnsizyon Yara Modeli	90
2.2.3.3.1.2. Dairesel Eksizyon Yara Modeli	90
2.2.3.3.1.3. L (-) Hidroksiprolin Tayini	91
2.2.3.3.1.4. Histopatolojik İncelemeler	91
2.2.3.3.2. <i>In Vitro</i> Deneyle	92
2.2.3.3.2.1. Hialuronidaz Enzim İnhibisyonu Tayini	92
2.2.3.3.2.2. Kolajenaz Enzim İnhibisyonu Tayini	93
2.2.3.3.2.3. Elastaz Enzim İnhibisyonu Tayini	93
2.2.3.4. Antiinflamatuvar Aktivite Tayini	94
2.2.3.4.1. Asetik Asit-Nedenli Kapiller Permeabilite Artışının İnhibisyonu	

(Whittle Yöntemi)	94
2.2.3.4.2. TPA-Nedenli Kulak Ödemi	95
2.2.3.4.3. Karragenin-Nedenli Arka Ayak Ödemi	95
2.2.3.4.4. Freund's Complete Adjuvant-Nedenli Artrit Modeli	95
2.2.3.5. Antioksidan Aktivite Tayini	96
2.2.3.5.1. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	96
2.2.3.5.2. ABTS ⁺ Radikalini Süpürücü Aktivite Tayini	96
2.2.3.5.3. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi	97
2.2.3.5.4. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması	97
2.2.3.7. Deneyin Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi	98
3. BULGULAR	99
3.1. Fitokimyasal Çalışmalar	99
3.1.1. Ekstrelerin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular	99
3.1.2. Kromatografik Bulgular	99
3.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları	99
3.1.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Bulguları	106
3.1.3. Yapı Tayini Bulguları	119
3.1.3.1. OS-1 Bileşiğinin Yapı Tayini	119
3.1.3.2. OS-2 Bileşiğinin Yapı Tayini	129
3.1.3.3. OS-3 Bileşiğinin Yapı Tayini	140
3.1.3.4. OS-4 Bileşiğinin Yapı Tayini	152
3.1.3.5. OS-5 Bileşiğinin Yapı Tayini	163
3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular	174
3.2.1. Yara İyileştirici Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular	174
3.2.2. Antienflamatuvar Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular	183
3.2.3. Antioksidan Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular	191
3.2.4. İzole Edilen Bileşiklerin Enzim İnhibisyonu Deneilerine İlişkin Bulgular	192

4. TARTIŞMA	194
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	204
ÖZET	205
SUMMARY	206
KAYNAKLAR	207
ÖZGEÇMİŞ	220

ÖNSÖZ

Bitkiler tarihte olduğu gibi günümüzde de hastalıklara karşı koruyucu veya tedavi edici amaçlarla kullanılmaktadır. Bu bitkiler, ham halde (kaba toz şeklinde) veya infüzyon, dekoksion, ekstre, tentür gibi preparatlar halinde yaygın bir şekilde kullanılmakta, kimyasal içeriklerinden dolayı gıda takviyesi, bitkisel ilaç veya ilaçların içeriğine katılan etkili bileşikler olarak pazarda önemli yer tutmaktadır.

Doğal kaynaklardan köken alan yeni ilaçların geliştirilmesi, çoğu kez o türün geleneksel veya yerel tıbbi kullanımına ya da toksik etkilerine dayanır. Son yıllarda klinik çalışmalarla geliştirilen yeni ilaçlar, ilaç geliştirmede bu bilgi birikiminden faydalanmanın önemini vurgulamaktadır. Bu sebeple, ilaç geliştirilmesinde, etnobotanik çalışmaların incelenmesi ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi son derece önemlidir.

Halk arasında yaygın kullanımı olan bazı bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarla, bu bitkilerin etkileri ve geleneksel kullanımlarının doğruluğunun araştırılması ve bu tip çalışmalar sonucunda elde edilen bitki ekstraktlarının ve/veya etkili bileşiklerin, gerekli farmakolojik, toksikolojik ve klinik incelemelerin ardından tedavi alanında değerlendirilmesi mümkündür.

Tez konusu olarak seçtiğimiz *Ononis* L. türleri arasından, özellikle *Ononis spinosa* L.'nin kökleri, çeşitli farmakopelerde kayıtlı bir drog olup, halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılmasının yanısıra yara iyileştirici amaçla da kullanılmaktadır. Bu cinsin diğer bazı türlerinin de halk arasında çeşitli amaçlarla kullanımına rastlanmakla birlikte, konuyu fitokimyasal bakımdan bilimsel temellere oturtmayı amaçlayan, yeterli sayıda çalışma mevcut değildir. Bu çalışma sonucunda elde edilen ve bitkinin halk arasındaki kullanımını doğrulayan sonuçlar; halk arasında geleneksel olarak kullanılan bitkilerin araştırma konusu olarak seçilmesinin, Farmakognozi açısından önemini göstermektedir.

Bu çalışma sonucunda, bitkinin yara iyileştirici etkisinin kanıtlanması yeni geliştirilecek yara iyileştirici ilaçların hazırlanmasında veya mevcut ilaçların kullanımında hareket noktası olacaktır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince laboratuvarımızın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan, danışmanım olarak hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, bilgisini ve tecrübelerini benimle paylaşan Anabilim Dalı Başkanımız, çok değerli hocam Prof. Dr. Gülçin SALTAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Gerektiğinde benden yardımlarını esirgemeyen Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Antienflamatuvar, yara iyileştirici ve antioksidan aktivite çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz değerli hocalarım Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL ile Doç. Dr. İpek

SÜNTAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez konusu olarak seçilen bitkileri teşhis eden, çok yoğun programında bana vakit ayıran çok değerli hocalarım Prof. Dr. Hayri DUMAN ve Doç. Dr. Osman TUGAY'a teşekkürlerimi sunarım.

NMR analizlerimin gerçekleştirilmesi için Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarından faydalanmamı sağlayan başta Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı olmak üzere, Prof. Dr. Hakan GÖKER ile izolasyon ve yapı tayini çalışmalarım sırasında her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yoğun programında bana daima vakit ayıran değerli hocam ve arkadaşım Doç. Dr. Özlem BAHADIR ACIKARA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimimin başından beri gerek çalışma arkadaşım, gerek dostum olarak her zaman yanımda olan, ihtiyacım olduğunda yardımlarını benden esirgemeyen, desteklerini hep hissettiğim çok kıymetli arkadaşlarım Dr. Ecz. Ülkü Gökçen İÇÖZ ile Uzm. Ecz. Serkan ÖZBİLGİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem ve babama maddi manevi destekleri için çok teşekkür ederim. Sonsuz sabır ve anlayışıyla tez çalışmalarım sırasında bana her konuda destek olan eşim Burak ÖZ'e teşekkürü borç bilirim.

2211 Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında, doktora eğitimim sırasında bana maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
μl	Mikrolitre
ABTS	2,2-azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit
ADP	Adenozindifosfat
AEF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
BAYF	Biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama
CCl_4	Karbontetraklorür
CHCl_3	Kloroform
cm	Santimetre
CMC	Karboksimetilselüloz
COSY	Correlation spectroscopy
COX	Siklooksijenaz
DAD	Diode Array Dedector
dak	Dakika
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
Egr	Early growth response factor (erken büyüme yanıtı faktörü)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase (ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz)
EtOAc	Etil asetat
FCA	Freund's Complete Adjuvant
GC	Gaz kromatografisi
HCl	Hidroklorik asit
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation

HNE	İnsan nötrofil elastaz enzimi
HRESI	High resolution electron spray ionization
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration: <i>In vitro</i> testlerde % 50 inhibisyon oluşturan inhibitör konsantrasyon
IFN- γ	Gama interferon
IL-1	İnterlökin-1
İTK	İnce tabaka kromatografisi
LC	Liquid chromatography (sıvı kromatografisi)
MeOH	Metanol
M	Molar
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimol
MAAPVN	N-(metoksisukkinil)-Ala-Ala-Pro-Val 4-nitroanilid
MIC	Minimum inhibitory concentration (minimum inhibitör konsantrasyon)
MS	Mass spectrometry (kütle spektrometrisi)
MTT	3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NCI	National Cancer Institute (Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü)
NK	Natural Killer
NO	Nitrik oksit
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
°C	Santigrat derece
PAF	Platelet aktive edici faktör
PGs	Prostaglandinler
PGE	Prostaglandin E
PGI ₂	Prostasiklin

PPAR	Proliferator-activated receptor (proliferatör-aktive reseptör)
Rf	Retention factor (Retansiyon faktörü)
TGF- β	Transforming growth factor β (dönüştürücü büyüme faktörü- β)
TNF	Tumor necrosis factor (tümör nekroz faktörü)
TOCSY	Total correlation spectroscopy
TPA	12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat
UV	Ultraviyole
XTT	3'-[1-(fenilamino)-karbonil]-3,4-tetrazolyum]-bis(4-metoksi-6-nitro)benzensülfonik asit hidrat
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Enflamasyonun fazları	8
Şekil 1.2.	Akut enflamatuvar yanıt	9
Şekil 1.3.	Kronik enflamatuvar yanıt	9
Şekil 1.4.	<i>Ononis</i> L. türlerinde bulunan triterpenik bileşikler	24
Şekil 1.5.	<i>Ononis</i> L. türlerinde bulunan steroller	25
Şekil 1.6.	<i>Ononis</i> L. türlerinde bulunan flavonoidler	40
Şekil 1.7.	<i>Ononis</i> L. türlerinde bulunan kumarinler	44
Şekil 1.8.	<i>Ononis</i> L. türlerinde bulunan uçucu bileşikler	48
Şekil 1.9.	<i>Ononis</i> L. türlerinde bulunan diğer bileşikler	60
Şekil 2.1.	<i>Ononis spinosa</i> L. subsp. <i>leiosperma</i> (Boiss.) Sirj.	72
Şekil 2.2.	<i>Ononis variegata</i> L.	73
Şekil 2.3.	<i>Ononis viscosa</i> L. subsp. <i>brevifolia</i> (DC) Nym.	74
Şekil 2.4.	<i>Ononis natrix</i> L. subsp. <i>natrix</i> L.	75
Şekil 2.5.	<i>O. spinosa</i> subsp. <i>leiosperma</i> 'nın köklerinden hazırlanan etil asetat ekstresinin aktivite yönlendirmeli olarak fraksiyonlanma, saflaştırma ve izolasyon basamakları	87
Şekil 3.1.	<i>Ononis</i> türlerinin etil asetat:glasiyal asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) sisteminde UV 254 nm'deki İTK Kromatogramları	100
Şekil 3.2.	<i>Ononis</i> türlerinin etil asetat:glasiyal asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) sisteminde UV 366 nm'deki İTK Kromatogramları	101
Şekil 3.3.	<i>Ononis</i> türlerinin etil asetat:glasiyal asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) sisteminde anisaldehit-H ₂ SO ₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları	102
Şekil 3.4.	<i>Ononis</i> türlerinin toluen:kloroform:etanol (40:40:10) sisteminde UV 254 nm'deki İTK kromatogramları	103
Şekil 3.5.	<i>Ononis</i> türlerinin toluen:kloroform:Etanol (40:40:10) sisteminde UV 366 nm'deki İTK kromatogramları	103

Şekil 3.6.	<i>Ononis</i> türlerinin toluen:kloroform:etanol (40:40:10) sisteminde anisaldehit-H ₂ SO ₄ ile muamele sonrası İTK Kromatogramları	104
Şekil 3.7.	<i>Ononis</i> türlerinin <i>n</i> -hekzan: etil asetat (80:20) sisteminde UV 245 nm'deki İTK kromatogramları	104
Şekil 3.8.	<i>Ononis</i> türlerinin <i>n</i> -hekzan: etil asetat (80:20) sisteminde UV 366 nm'deki İTK kromatogramları	105
Şekil 3.9.	<i>Ononis</i> türlerinin <i>n</i> -hekzan: etil asetat (80:20) sisteminde anisaldehit-H ₂ SO ₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları	105
Şekil 3.10.	<i>O. spinosa</i> subsp. <i>leiosperma</i> 'nın etil asetat ekstresinin YPSK kromatogramı	106
Şekil 3.11.	E5 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	106
Şekil 3.12.	Fr. 15-16 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	107
Şekil 3.13.	Fr. 15-16 Prep. 2 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	107
Şekil 3.14.	Fr. 15-16 Prep. 2 RP-2 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	108
Şekil 3.15.	Fr. 15-16 Prep. 3 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	108
Şekil 3.16.	Fr. 15-16 Prep. 3 Seph. 11 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	109
Şekil 3.17.	Fr. 15-16 Prep. 3 Seph. 12 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	109
Şekil 3.18.	Fr. 15-16 Prep. 5 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	110
Şekil 3.19.	Fr. 15-16 Prep. 5 Seph. 30-31 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	110
Şekil 3.20.	Fr. 15-16 Prep. 5 Seph. 34-35 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	111
Şekil 3.21.	Fr. 17-18 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	111
Şekil 3.22.	Fr. 17-18 Seph. 31-32 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	112
Şekil 3.23.	Fr. 17-18 Seph. 33-35 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	112
Şekil 3.24.	Fr. 17-18 Seph. 36 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	113
Şekil 3.25.	Fr. 17-18 Seph. 37 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	113
Şekil 3.26.	Fr. 17-18 Seph. 38 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	114
Şekil 3.27.	Fr. 17-18 Seph. 41-44 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	114

Şekil 3.28.	Fr. 19-27 Seph. 33-35 fraksiyonunun YPSK kromatogramı	115
Şekil 3.29.	OS-1 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu	115
Şekil 3.30.	OS-2 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu	116
Şekil 3.31.	OS-3 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu	116
Şekil 3.32.	OS-4 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu	117
Şekil 3.33.	OS-5 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu	117
Şekil 3.34.	OS-1 bileşiğinin izolasyon şeması	119
Şekil 3.35.	OS-1 bileşiğinin LC-MS spektrumu	120
Şekil 3.36.	OS-1 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	121
Şekil 3.37.	OS-1 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	122
Şekil 3.38.	OS-1 bileşiğinin HSQC spektrumu	123
Şekil 3.39.	OS-1 bileşiğinin HMBC spektrumu	124
Şekil 3.40.	OS-1 bileşiğinin COSY spektrumu	125
Şekil 3.41.	OS-1 bileşiğinin TOCSY spektrumu	126
Şekil 3.42.	OS-1 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular	127
Şekil 3.43.	OS-2 bileşiğinin izolasyon şeması	129
Şekil 3.44.	OS-2 bileşiğinin LC-MS spektrumu	130
Şekil 3.45.	OS-2 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	131
Şekil 3.46.	OS-2 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	132
Şekil 3.47.	OS-2 bileşiğinin DEPT spektrumu	133
Şekil 3.48.	OS-2 bileşiğinin HSQC spektrumu	134
Şekil 3.49.	OS-2 bileşiğinin HMBC spektrumu	135
Şekil 3.50.	OS-2 bileşiğinin COSY spektrumu	136
Şekil 3.51.	OS-2 bileşiğinin TOCSY spektrumu	137
Şekil 3.52.	OS-2 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular	138
Şekil 3.53.	OS-3 bileşiğinin izolasyon şeması	140
Şekil 3.54.	OS-3 bileşiğinin LC-MS spektrumu	141
Şekil 3.55.	OS-3 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	142
Şekil 3.56.	OS-3 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	143
Şekil 3.57.	OS-3 bileşiğinin DEPT spektrumu	144
Şekil 3.58.	OS-3 bileşiğinin HSQC spektrumu	145
Şekil 3.59.	OS-3 bileşiğinin HMBC spektrumu	146

Şekil 3.60.	OS-3 bileşiğinin COSY spektrumu	147
Şekil 3.61.	OS-3 bileşiğinin TOCSY spektrumu	148
Şekil 3.62.	OS-3 bileşiğinin NOESY spektrumu	149
Şekil 3.63.	OS-3 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular	150
Şekil 3.64.	OS-4 bileşiğinin izolasyon şeması	152
Şekil 3.65.	OS-4 bileşiğinin LC-MS spektrumu	153
Şekil 3.66.	OS-4 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	154
Şekil 3.67.	OS-4 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	155
Şekil 3.68.	OS-4 bileşiğinin DEPT spektrumu	156
Şekil 3.69.	OS-4 bileşiğinin HSQC spektrumu	157
Şekil 3.70.	OS-4 bileşiğinin HMBC spektrumu	158
Şekil 3.71.	OS-4 bileşiğinin COSY spektrumu	159
Şekil 3.72.	OS-4 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular	160
Şekil 3.73.	OS-5 bileşiğinin izolasyon şeması	163
Şekil 3.74.	OS-5 bileşiğinin LC-MS spektrumu	164
Şekil 3.75.	OS-5 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	165
Şekil 3.76.	OS-5 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	166
Şekil 3.77.	OS-5 bileşiğinin DEPT spektrumu	167
Şekil 3.78.	OS-5 bileşiğinin HSQC spektrumu	168
Şekil 3.79.	OS-5 bileşiğinin HMBC spektrumu	169
Şekil 3.80.	OS-5 bileşiğinin COSY spektrumu	170
Şekil 3.81.	OS-5 bileşiğinin TOCSY spektrumu	171
Şekil 3.82.	OS-5 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular	172
Şekil 3.83.	Test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının hematoksilen-eozin ile boyanması ardından ışık mikroskobu altındaki görünümü	181

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Türkiye’de yetişen <i>Ononis</i> türleri ve halk arasındaki Kullanımları	2
Çizelge 1.2.	Akut ve kronik enflamasyon	7
Çizelge 2.1.	<i>Ononis</i> türlerinin toplandığı lokaliteler	71
Çizelge 2.2.	Ekstre ve fraksiyonlarının İTK analizi için kullanılan solvan sistemleri	79
Çizelge 2.3.	<i>O. spinosa</i> subsp. <i>leiosperma</i> ’nın etil asetat ekstesinin fraksiyonlanmasında kullanılan çözücü oranları	81
Çizelge 2.4.	YPSK analizinde kullanılan gradient çözücü sistemi	84
Çizelge 2.5.	Semipreparatif YPSK çalışmasında kullanılan gradient çözücü sistemi	85
Çizelge 3.1.	<i>Ononis</i> türlerinden hazırlanan ekstrelerin % verimleri	99
Çizelge 3.2.	İzole edilen bileşiklerin retansiyon zamanları	118
Çizelge 3.3.	OS-1 bileşiğinin ¹ H ve ¹³ C NMR bulguları	127
Çizelge 3.4.	OS-2 bileşiğinin ¹ H ve ¹³ C NMR bulguları	138
Çizelge 3.5.	OS-3 bileşiğinin ¹ H ve ¹³ C NMR bulguları	150
Çizelge 3.6.	OS-4 bileşiğinin ¹ H ve ¹³ C NMR bulguları	160
Çizelge 3.7.	OS-5 bileşiğinin ¹ H ve ¹³ C NMR bulguları	172
Çizelge 3.8.	<i>Ononis</i> türlerinden hazırlanan ekstrelerin çizgisel insizyon yara modelindeki etkileri	175
Çizelge 3.9.	<i>Ononis</i> türlerinden hazırlanan ekstrelerin dairesel eksizyon yara modelindeki etkileri	176
Çizelge 3.10.	<i>Ononis</i> türlerinden hazırlanan ekstrelerin hidroksprolin düzeyi üzerine etkileri	178
Çizelge 3.11.	EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının çizgisel insizyon yara modelindeki etkileri	179
Çizelge 3.12.	EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının dairesel eksizyon yara modelindeki etkileri	180

Çizelge 3.13.	EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının hidroksiprolin düzeyi üzerine etkileri	181
Çizelge 3.14.	Test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları	182
Çizelge 3.15.	<i>Ononis</i> türlerinden hazırlanan ekstrelerin asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışını inhibe edici etkisi	184
Çizelge 3.16.	<i>Ononis</i> türlerinden hazırlanan ekstrelerin farelerde karragenin-nedenli arka ayak ödemi üzerine etkileri	185
Çizelge 3.17.	<i>Ononis</i> türlerinden hazırlanan ekstrelerin farelerde TPA-nedenli kulak ödemi üzerine etkileri	186
Çizelge 3.18.	EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışını inhibe edici etkisi	188
Çizelge 3.19.	EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının farelerde karragenin-nedenli arka ayak ödemi üzerine etkileri	189
Çizelge 3.20.	EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının farelerde TPA-nedenli kulak ödemi üzerine etkileri	189
Çizelge 3.21.	<i>Ononis</i> türlerinden hazırlanan ekstre ve fraksiyonların FCA-nedenli artrit modelindeki etkileri	190
Çizelge 3.22.	<i>Ononis</i> türlerinden hazırlanan ekstrelerin ve EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının antioksidan etkileri	191
Çizelge 3.23.	İzole edilen bileşiklerin hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz inhibisyonu bulguları	193

1. GİRİŞ

Fabaceae familyasına ait olan *Ononis* L. cinsinin Avrupa'da tek veya çok yıllık olmak üzere 75'ten fazla türü bulunmakta ve Avrupa'da yaygın olmakla birlikte özellikle Akdeniz kıyılarında yetişmektedir. Ayrıca Atlantik adalarında, Batı Asya'da İran'a kadar olan kesimde ve Doğu Afrika'da da bulunmaktadır. *Ononis* cinsi, Türkiye'de 18 tür ile temsil edilmektedir. Çizelge 1'de listelenmiş olan türlerin yanında, Türkiye Florası'nda, *Ononis repens* L. şüpheli bir tür olarak kaydedilmiştir (Davis, 1970; Al-Khalil, 1995a; Reyes-Betancort ve Scholz, 2008).

Ononis türlerinin, dünyada laksatif, diüretik, antibakteriyel, analjezik, antienflamatuvar, antiviral, sitotoksik ve antifungal etkilerinden dolayı kullanıldığı görülmüştür (Al-Qudah ve ark., 2014). Ayrıca bu cinse ait bitkilerin, Kuzey Afrika'da sarılığa karşı, üriner sistem enflamasyonlarında, böbrek taşına karşı, romatizma ve cilt rahatsızlıklarında da kullanıldığı tespit edilmiştir (Abdel-Kader, 2001).

Türkiye'de yetişen *Ononis* türleri üzerinde yapılan çalışmaların daha çok Etnofarmakognozi alanında olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda, *Ononis* türlerinin çeşitli rahatsızlıklarda tedavi edici amaçla kullanımı olduğu tespit edilmiş, ancak bu kullanımların doğruluğunu bilimsel yönden ispatlamaya yönelik yeterli çalışma yapılmamıştır. Türkiye'de yetişen *Ononis* türleri ve bu türlerin halk arasındaki kullanımları Çizelge 1.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Türkiye’de yetişen *Ononis* türleri ve halk arasındaki kullanımları.

BİTKİ ADI	YETİŞME YERİ	HALK ARASINDAKİ KULLANIMI
<i>Ononis adenotricha</i> Boiss.	Ankara, Kütahya, Afyon, Kayseri, Adana, Muğla, Konya, İçel, Konya, Zonguldak, Denizli, Uşak, Antalya, Niğde, Antep, Mardin, Bursa, Diyarbakır, Urfa, Siirt, Maraş (Karamanoğlu, 1974; Davis, 1970)	-
<i>Ononis arvensis</i> L.	Bolu, Kastamonu, Trabzon, Gümüşhane, Erzincan, Erzurum, Zonguldak (Karamanoğlu, 1974; Davis, 1970)	Dahilen; idrar söktürücü terletici Haricen; mikrop öldürücü olarak ağız boğaz ve dişeti iltihaplanmalarında gargara olarak, yara iyileştirici amaçla egzama ve yaralarda (Asıngil, 2009)
<i>Ononis basiadnata</i> Hub.-Mor.	İçel, Konya, Karaman (Davis, 1970)	-
<i>Ononis biflora</i> Desf.	Adana, Urfa, İçel (Karamanoğlu, 1974; Davis, 1970)	-
<i>Ononis hirta</i> Desf.	İçel, Adana (Karamanoğlu, 1974; Davis, 1975)	-
<i>Ononis macrosperma</i> Hub.-Mor.	Antalya (Davis, 1970)	-
<i>Ononis mitissima</i> L.	İstanbul, İzmir, Antalya, İçel, Osmaniye (Davis, 1970)	-
<i>Ononis natrix</i> L.	İzmir, Aydın, Muğla, Hatay, Antalya, İçel, Urfa (Davis, 1970; Dogan ve ark., 2004)	-
<i>Ononis ornithopodioides</i> L.	Çanakkale, İstanbul, İzmir, Muğla (Davis, 1970)	-
<i>Ononis phyllocephala</i> Boiss.	Hatay (Davis, 1970)	-
<i>Ononis pubescens</i> L.	Çanakkale, İstanbul, Bursa, İzmir, Muğla, Antalya, İçel, Adana, Adıyaman, Aydın, Maraş (Karamanoğlu, 1974; Davis, 1970; Dogan ve ark., 2004)	-
<i>Ononis pusilla</i> L.	Çanakkale, İstanbul, Bursa, Ankara, Amasya, İzmir, Uşak, Afyon, Adana, Muğla, Antalya, İçel, Hatay, Bilecik, Denizli, Konya, Antep, Siirt (Karamanoğlu, 1974; Davis, 1970; Ocak ve Tokur, 2000; Kaya ve ark., 2008)	-
<i>Ononis reclinata</i> L.	Çanakkale, İstanbul, Bursa, İzmir, Denizli, Muğla, Antalya, İçel, Maraş, Mardin, Urfa (Davis, 1970)	-
<i>Ononis serrata</i> Forssk.	Antalya, İçel (Davis, 1970)	-
<i>Ononis sessilifolia</i> Bornm.	Niğde (Davis, 1970)	-
<i>Ononis spinosa</i> L.	Çanakkale, İzmir, Kütahya, Konya, Denizli, İçel, İstanbul,	Dahilen; enflamatuvar üriner sistem rahatsızlıkları ve böbrek

	Kocaeli, Kastamonu, Amasya, Gümüşhane, Erzurum, İzmir, Ankara, Maraş, Elazığ, Muş, Van, Denizli, Antalya, Adana, Antep, Urfa, Mardin, Hakkari, Siirt, Hatay, Muğla, Kırklareli, Edirne, Manisa, Nevşehir, Kırıkkale (Karamanoğlu, 1974; Davis, 1970; Dogan ve ark., 2004; Ecevit Genç ve Özhatay, 2006; Aktaş Aytepe, 2007; Kültür, 2007; Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010)	taşlarına karşı, idrar arttırıcı olarak, mide rahatsızlıklarında, gutta, bademcik iltihabında Haricen; egzama ve diğer deri hastalıklarında yara ve yanık tedavisinde, mikrop öldürücü olarak (Baytop, 1999; Karaman ve Kocabaş, 2001; Altanlar ve ark., 2006; Ecevit Genç ve Özhatay, 2006; Sever Yılmaz ve ark., 2006; Asımgil, 2009; Ugulu ve ark., 2009)
<i>Ononis variegata</i> L.	Antalya, İçel, Adana (Davis, 1970)	-
<i>Ononis viscosa</i> L.	Çanakkale, İstanbul, Kocaeli, Sinop, İzmir, Denizli, Adana, Hatay, Siirt, Bursa; İçel, Urfa (Karamanoğlu, 1974; Davis, 1970)	-

Türkiye’de halk arasında tedavi amaçlı en yaygın kullanılan ve genellikle “kayışkıran” adıyla bilinen *Ononis spinosa* L. yetiştiği bölgeye bağlı olarak “kayık çiçeği, yandak, yantak” gibi isimlerle de anılmaktadır (Baytop, 1999) *O. spinosa*’nın Türkiye’de *Ononis spinosa* subsp. *antiquorum* (L.) Briq. ve *Ononis spinosa* subsp. *leiosperma* (Boiss.) Sirj. olmak üzere 2 alt türü bulunmaktadır (Davis, 1970). Bitkinin kurutulmuş kökleri Avrupa Farmakopesi 7.0’de “Ononidis radix” adıyla kayıtlıdır. Orta Anadolu’da yaygın olarak bulunan bu bitki, halk arasında iltihap giderici amaçla üriner sistem rahatsızlıklarında ve böbrek taşlarında dahilen; yara iyileştirici etkisinden dolayı ise egzama ve diğer deri hastalıklarında haricen kullanılmaktadır (Altanlar ve ark., 2006; Sever Yılmaz ve ark., 2006). Etnofarmakognozik çalışmalar sonucunda *O. spinosa* subsp. *leiosperma*’nın toprak üstü kısımlarının hayvan yemi (Kargıoğlu ve ark., 2010), köklerin dekoksasyon şeklinde haricen antiseptik ve yara iyileştirici etkileri nedeniyle egzama ve benzeri cilt rahatsızlıklarında (Baytop, 1999; Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010), dahilen idrar arttırıcı, taş düşürücü olarak (Baytop, 1999), mide rahatsızlıklarında (Karaman ve Kocabaş, 2001), bademcik iltihabında, romatizmal şikayetlerde ve gutta (Ugulu ve ark., 2009) kullanıldığına dair bilgiler edinilmiştir. İstanbul-Çatalca çevresinde “kaplıca, kimya otu, kuşkonmaz, yağlıca” isimleriyle de tanınan bu alt türün köklerinden hazırlanan ekstre ve dekoksiyonun, yöre halkı tarafından yanıkların tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir (Ecevit Genç ve Özhatay, 2006). Kırklareli çevresinde yapılan bir çalışmada, bitkinin köklerinden hazırlanan dekoksiyonun diüretik ve böbrek taşı düşürücü amaçla kullanıldığı tespit

edilmiştir (Kültür, 2007). Yurtdışında yapılan etnofarmakognozi çalışmalarında da bu türün halk arasında tedavi amaçlı kullanımı olduğu görülmüştür. Kayıtlara göre bu türün depuratif ve diüretik etkileri nedeniyle kullanımı mevcuttur. Ayrıca gut, romatizmal rahatsızlıklar ve üriner sistem hastalıklarında kullanımı da tespit edilmiştir (Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010). Avrupa’da bu türün diüretik etkisi ile ve böbrek taşı oluşumunun tekrar etmesini önlemek için hayvanların yemlerine katılabildiğine dair kayıtlar da mevcuttur (Runjaic-Antic ve ark., 2010). Sırbistan’ın orta kesiminde bitkinin toprak üstü kısımlarının çay şeklinde sakinleştirici, sindirime yardımcı, gastrointestinal şikayetlerde (Jaric ve ark., 2007); Ürdün’de dahilen böbrek rahatsızlıklarında, haricen cilt hastalıklarında (Al-Qur’an, 2008), toprak üstü kısımlardan hazırlanan infüzyonunun diş ağrılarında ve plak oluşumunu önleyici olarak (Al-Khalil, 1995b); Karadağ’da bitki köklerinden hazırlanan infüzyonun üriner sistem enfeksiyonlarında, böbrek ve mesane taşları, gut ve romatizmal şikayetlerde (Menkovic ve ark., 2011); İspanya’nın kuzeydoğu kesiminde bitkiden hazırlanan infüzyonun antidiyareik olarak, köklerinin ise antihelmintik olarak (Agelet ve Valles, 2003); İtalya’da, bitkinin köklerinden hazırlanan dekoksasyonun antienflamatuvar etkisi nedeniyle üriner sistem rahatsızlıklarında diüretik olarak, akneye karşı ve ağız yıkama suyu olarak (Leporatti ve Ivancheva, 2003); Cezayir’de böbrek rahatsızlıklarında (Gonzalez-Tejero ve ark.,2008); Bulgaristan’da ise yine köklerin diüretik, antienflamatuvar ve östrojenik etkileri nedeniyle (Daruhazi ve ark., 2008) kullanıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca Bulgaristan’da HNS8 adlı bitkisel preparat içine, antitüssif, laksatif, diüretik ve taş düşürücü etkilerin sağlanması amacıyla ilave edilmiştir (Georgieva ve ark., 2008).

Aynı zamanda Komisyon E (Blumenthal, 1998) ve ESCOP (2003) monograflarında da *Ononidis radix*’in irrigasyon tedavisinde, böbrek taşlarında, enflamatuvar ve bakteriyel üriner sistem enfeksiyonlarında diüretik olarak kullanımı kayıtlıdır. Bununla birlikte ESCOP monograflarında, köklerden etanol ile hazırlanan ekstrelerin antienflamatuvar etkisinin bulunduğu belirtilmiştir. Preklinik çalışmalar sonucunda etanol ekstresinin 14 gün süreyle, etanollü ekstrenin günlük 2 g/kg dozda oral veya intraperitoneal uygulaması sonucunda, herhangi bir toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

PDR Bitki Monograflarında (2004), bu türün kökleri ile çiçekli dallarının, idrar yollarındaki enflamatuvar rahatsızlıklarda, böbrek taşlarına, gut ve romatizmal rahatsızlıklara karşı kullanımının yaygın olduğu belirtilmiştir. Bu kayıtlarda, bitkinin kullanımı konusunda herhangi bir yan etki bildirilmemekle birlikte; uyarı olarak, kalp veya böbrek yetmezliği sebebiyle meydana gelen ödem durumunda kullanılmaması gerektiği vurgulanmıştır.

Orta Asya ve Rusya'da, *O. spinosa*, *Ononis arvensis* L., *Ononis hircina* Jacq. ve *Ononis antiquorum* L.'un köklerinin ciltteki tahriş, kaşıntı, yara ve dermatit durumlarında kullanıldığı bilinmektedir (Mamedov ve ark., 2005). *O. arvensis*'in köklerinden maserasyon yöntemi ile hazırlanan ekstre, Bulgaristan'da halk arasında diüretik olarak kullanılmaktadır (Leporatti ve Ivancheva, 2003).

Avrupa'da halk arasında kullanımı olan *Ononis natrix* L.'in, Türkiye'de 3 alt türü vardır ve bu tür Akdeniz Bölgesi'nde yayılış göstermektedir (Davis, 1970). Yapılan çalışmalarda *O. natrix* ekstrelerinin diüretik etkisi sebebiyle üriner sistem rahatsızlıklarında, antiromatizmal, antibakteriyel ve tansiyon düşürücü olarak kullanımının olduğu tespit edilmiştir (Al-Khalil, 1995a, b; Saeed, 2003; Al-Bakri ve Afifi, 2007). Ayrıca Tunus ve Fas'ta, bitkinin halk arasında diş çürüklerinde, sarılık tedavisinde ve aynı zamanda tedavi amacının dışında köklerinin çobanlar tarafından temizlikte çamaşırları köpürtmek amacıyla kullanıldığına dair kayıtlar mevcuttur (Khallouki ve ark., 2002; Sassi ve ark., 2007). Ürdün'de yapılan bir etnobotanik çalışmada, bitkiden hazırlanan dekoksasyonun diüretik, antiseptik ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak, dahilen diyabette, ateşli hastalıklarda ve barsak spazmlarında kullanıldığı tespit edilmiştir (Hudaib ve ark., 2008; Al-Qudah ve ark., 2014). Bu bitkinin çiçekleri ve köklerinden hazırlanan infüzyon, Fas'ta da geleneksel olarak üriner sistem rahatsızlıklarında tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Elamrani ve Benaissa, 2010). Bu türden izole edilen ksantomikrolün ince barsak üzerinde antispazmodik etkisiye sahip olduğu; *Aspergillus parasiticus*, *Candida tropicalis*, *Fusarium solani*'ye karşı antimikrobiyal etki gösterdiği; himenoksinin ise insan hücre kültürü üzerinde sitotoksik etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir (Al-Khalil, 1995a).

Ürdün’de yapılan etnobotanik çalışmalara göre, *Ononis sicula* (Guss.) Hub.-Mor.’nın toprak üstü kısımlarının halk arasında haricen ciltteki lezyonlara karşı; *Ononis hirta* Desf.’nin toprak üstü kısımlarının ise yine ciltteki lezyonların yanısıra uçuklara karşı ağız veya cildin yıkanması suretiyle kullanıldığı bilinmektedir (Talib ve Mahasneh, 2010a).

Ononis türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda ise, bu cinse ait türlerin; şeker, tanen, saponin, lektinler, flavonoit yapısında bileşikler (trifolirhizin, ononin, formononetin, genistein, genistin, biokanin, daidzin, glisit, glisitein, sissotrin), fenolik asitler (gallik, protokateşik, p-hidroksibenzoik, vanilik, kafeik, siringik, p-kumarik, ferulik, sinapik asit), uçucu yağ (major bileşen olarak anetol, karvon, mentol), steroller (β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol, stigmastan-3,5-dien sterol), terpenik bileşikler (β -amirin, α -onoserin), antranilik asit türevleri, rezorsinol türevleri, aromatik laktonlar ve kumarin türevi bileşikleri taşıdığı tespit edilmiştir (Al-Khalil, 1995a; Baytop, 1999; Klejdus ve ark., 2007, 2008; Daruhazi ve ark., 2008; Benedec ve ark., 2012).

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde kökleri haricen yara iyileştirici amaçla kullanılan ve pek çok monografta tıbbi bitki olarak yer alan *O. spinosa* ve aynı cinse ait, üzerinde yeterli sayıda bilimsel çalışma bulunmayan, *Ononis viscosa* L., *Ononis variegata* L. ve *O. natrix* türlerinden farklı polaritedeki ekstraların hazırlanması, bu ekstraların fitokimyasal analizlerinin yapılması, biyolojik olarak aktif bileşik/bileşiklerin izolasyonu ve tüm çalışma süresince hazırlanan ekstre, fraksiyon ve izole edilen bileşiklerin yara iyileştirici, antienflamatuvar ve antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesidir. Çalışmada biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yöntemi kullanılarak biyolojik aktivitesi yüksek olan fraksiyonlardan etkili bileşik/lerin izolasyonunun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma ile *O. spinosa*’nın halk arasında kullanımı, kimyasal içeriği belirlenerek bilimsel temellere oturtulacak, çalışılan diğer türlerin de söz konusu aktiviteleri gösterip göstermediği tespit edilecektir. Böylece, bu konu üzerinde yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak, bitkinin halk arasındaki kullanımının dayandığı temel, bilimsel kanıtlara dayalı olarak değerlendirilmiş olacaktır.

1.1. Enflamasyon

Kalıtsal bağıışıklık iki savunma mekanizmasını kapsar. Bunlar; vücudun doğal bariyerleri (fiziksel, mekanik ve biyokimyasal) ve enflamasyondur. Vücuda zarar veren bir etkinin, ilk basamak olan bariyerleri geçmesi durumunda, daha fazla hasarın önlenmesi, hasarlı dokunun enfeksiyondan korunması ve iyileşme sürecinin başlaması amacıyla enflamatuvar yanıt gelişir. Özetle enflamasyon; bakteri, travma, kimyasal maddeye maruz kalma, iskemi veya sıcaklık gibi etkenler sebebiyle doku hasarı oluşması durumunda; doku hasarına karşı gelişen, hasarlı dokudan salınan bazı maddelerin sebep olduğu non-spesifik immünolojik bir yanıttır. Özellikle sitokinler tarafından yönlendirilen bu immünolojik ve fizyolojik olaylar dizisinde, diğer savunma mekanizmalarından farklı olarak, immünolojik yanıt oluşturan dokunun kendisinin de zarar görmesi muhtemeldir (Rote ve Huether, 2010; Hall, 2011; Ashley ve ark., 2012).

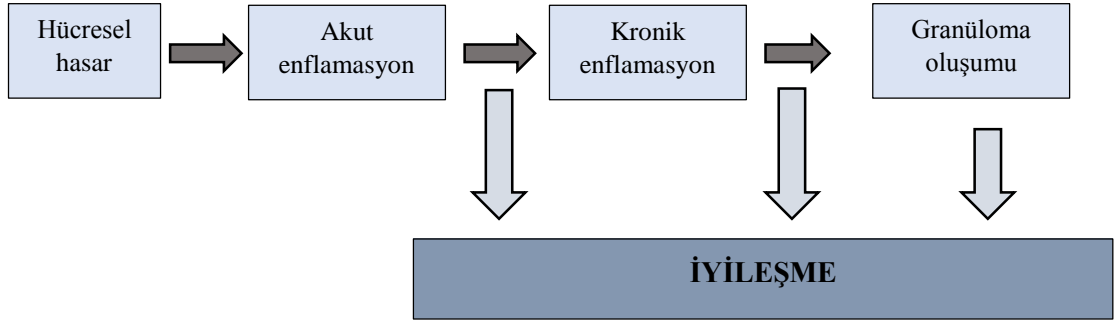
Enflamasyonu, akut ve kronik enflamasyon olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür. Akut enflamasyon kısa sürerken, kronik enflamasyonda süreç yıllar alabilmektedir. Akut ve kronik enflamasyonun sebepleri, bu süreçte etkili olan hücreler ve mediyatörler Çizelge 1.2’de belirtilmiştir (Beg ve ark., 2011).

Çizelge 1.2. Akut ve kronik enflamasyon (Beg ve ark., 2011)

Enflamasyon Tipi	Nedeni	Major Olarak Etkin Hücreler	Süresi
Akut enflamasyon	Patojenler, hasarlı dokular	Monositler, makrofajlar, nötrofiller	Birkaç gün
Kronik enflamasyon	Yokedilemeyen patojenler, sürekli olarak yabancı maddelere maruz kalma, otoimmün reaksiyonlar	Mononükleer hücreler (monositler, makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri), fibroblastlar	Aylar/yıllar

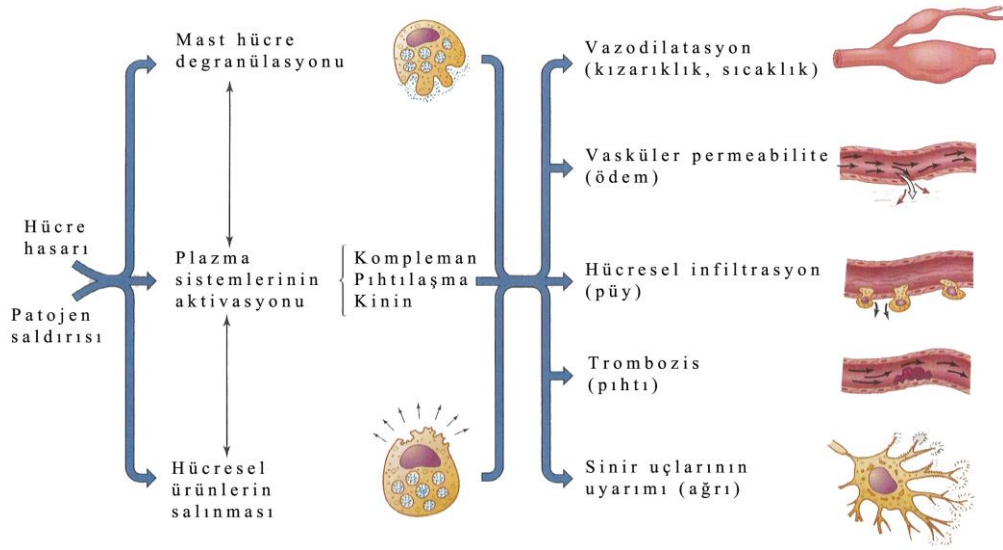
Akut enflamasyon, doku hasarı veya mikrobiyal kontaminasyonun hemen ardından

başlar ve genellikle 8-10 gün sürer. Bu süre sonunda iyileşme süreci başlayabilir veya durum kronik enflamasyona dönüşebilir. Kronik enflamasyon sonunda iyileşme görülebilmekle birlikte, süreç granüloma oluşumu ile de ilerleyebilir. Enflamasyonun ilerleyişi, bu şekilde farklı fazlardan geçerek son aşama olan iyileşme ve hasar gören dokunun yeniden yapılanması ile son bulur. Bu durum Şekil 1.1’de özetlenmiştir (Rote ve Huether, 2010).

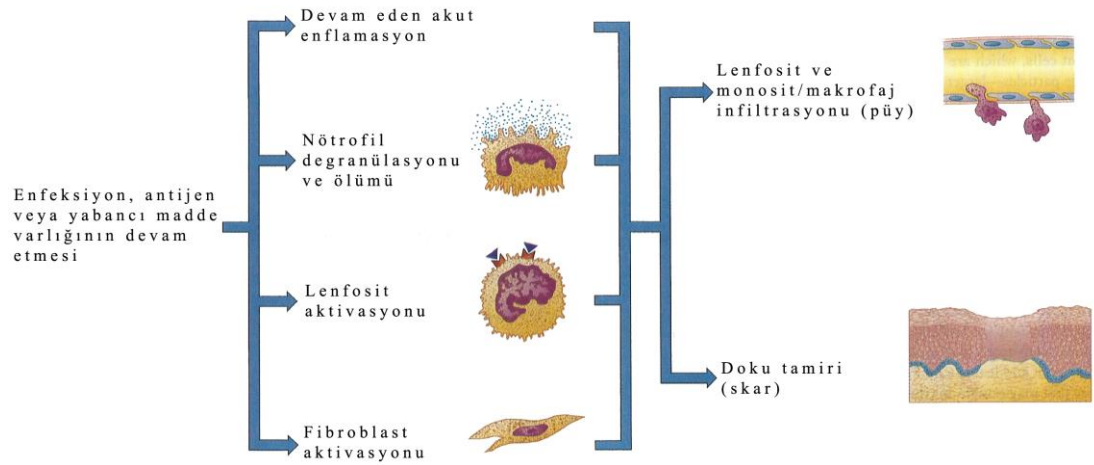


Şekil 1.1. Enflamasyonun fazları (Rote ve Huether, 2010)

Kronik enflamasyon, başarısız bir akut enflamasyon safhasının sonucu olabileceği gibi, öncesinde belirgin bir akut yanıt görülmeyen farklı bir süreç halinde de ilerleyebilir. Kronik enflamatuvar yanıt, yoğun lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu ile karakterizedir. Akut enflamasyon evresinde nötrofil ve makrofajların patojen mikroorganizmaların tümünü yok edememesi; makrofajların enfeksiyonu veya doku hasarını sınırlandıramaması halinde, enfekte olan bölgenin izole edilmesi amacıyla granüloma oluşumu gerçekleşir. Granüloma oluşumunda makrofajlar değişime uğrayarak, fagositoz yeteneğine sahip olmayan ancak, artıkları içine alabilecek büyük epitelooid hücrelerini oluştururlar. Bazı makrofajlar da birleşerek büyük partikülleri fagosite edebilen çok çekirdekli iri hücreler meydana getirirler. Bu iki tip makrofaj hücre grubu, bir lenfosit duvarıyla çevrili olan granülomanın merkezini oluşturur. Akut ve kronik enflamatuvar yanıtın gelişimi Şekil 1.2 ve Şekil 1.3’te gösterilmiştir (Rote ve Huether, 2010).



Şekil 1.2. Akut enflamatuvar yanıt (Rote ve Huether, 2010)



Şekil 1.3. Kronik enflamatuvar yanıt (Rote ve Huether, 2010)

1.1.1. Enflamasyon Oluşumu

Herhangi bir etki sebebiyle doku zarar gördüğünde, vücutta, hasarı sınırlandırmak, enfeksiyona karşı korunmak ve hasar alan bölgenin onarılmasını başlatmak amacıyla, etkili lokal ve sistemik yanıtlar oluşur (Rote ve Huether, 2010). Enflamasyon oluşumundaki olaylar vasküler ve hüresel düzeyde değerlendirilebilir. Arteriollerdeki kısa süreli vazodilatasyon ısı ve kızarıklık oluşumuna neden olur. Vazodilatasyon ve

bunun sonucu olarak kan akımının artması damar çeperlerinin geçirgenliğinin artmasına neden olur. Damarlardan sızan proteince zengin sıvı sebebiyle ödem oluşur. Doku hasarının ardından bölgeye lökositlerin göçüyle de hücresel düzeyde yanıt oluşur (Kuralay ve Çavdar, 2006). Enflamatuvar yanıtta görevli olan hücreler, mast hücreleri, granülositler (nötrofil, eozinofil, bazofil), monositler/makrofajlar, NK (natural killer) hücreleri, plateletler ve endotelyal hücrelerdir. Enflamatuvar yanıtta savunma, vasküler ve hücresel yanıt yanında, sitokinler ve plazma proteinlerinin aktivasyonu ile gerçekleşir (Rote ve Huether, 2010).

Akut enflamatuvar yanıtta meydana gelen vasküler değişiklikler sebebiyle ortaya çıkan lokal tepkiler (kızarıklık, sıcaklık, şişme, ağrı) yanında, ateş, dolaşımda geçici lökosit artışı ve plazma proteinlerinin kandaki düzeyinin artışı gibi sistemik tepkiler de söz konusudur (Rote ve Huether, 2010).

1.1.1.1.Vasküler Yanıt

Enflamasyon oluşumu, kolaylıkla gözlenebilen bazı belirtiler oluşturur. Enflamasyonun temel işaretleri de denebilen bu belirtiler; kızarıklık, sıcaklık, şişme ve ağrıdır. Bu lokal etkilerin yanında, dokuda fonksiyon kaybı da söz konusu olabilir. Dokunun hasar alması durumunda, bölgede 3 temel değişiklik meydana gelir:

1. Vazodilatasyon
2. Damar geçirgenliğinde artış ve damar dışına sıvı çıkışı
3. Damar içinden hasarlı dokuya lökosit göçü

Hasar alan doku bölgesinde ilk olarak kısa süreli vazokonstrüksiyonu ve gerekirse pıhtılaşmayı takiben, damarlar genişler, bölgedeki kan akış hızı ve bölgenin kanlanması artar. Bu durum bölgede sıcaklık artışı ve kızarıklığa sebep olur. Artan kan akımı ve geçirgenliğin artması sonucunda, doku içine sıvı geçişi ve dolayısıyla ödem meydana gelir. Vasküler değişiklikler, lökositler, plazma proteinleri ve bazı biyokimyasal mediyatörlerin hasarlı dokuya gitmesini sağlar. Dokulara ulaşan hücreler ve kimyasalların amaçları kısaca şu şekildedir:

1. Bölgeye plazma akışı ile mikroorganizma veya ölü hücrelerden kaynaklanabilecek toksinlerin seyreltilmesi, bakterilerin yok edilmesine yardımcı olan protein sistemlerinin bölgeye göçü ve aktivasyonlarının sağlanması ve hücre kalıntıları ve enfeksiyon ajanlarının fagositozu ile kontaminasyon sebebiyle ilerleyebilecek hasarı önlemek,
2. Plazma protein sistemleri, plazma enzimleri ve hücreler aracılığıyla enflamatuvar yanıtı kontrol edip sınırlandırarak, sağlıklı dokuya enflamasyonun yayılmasını önlemek,
3. Makrofajlar ve lenfositler aracılığıyla, kazanılmış bağışıklık sistemi elemanlarıyla etkileşim sağlayıp, kontaminasyona sebep olan patojen/patojenlere karşı daha spesifik bir yanıt oluşturmak,
4. Mikrobiyal ürünler, hücre kalıntıları ve enflamasyon kaynaklı diğer artıkları bölgeden uzaklaştırmak ve iyileşme sürecini başlatmak (Rote ve Huether, 2010).

1.1.1.2.Hücresel Yanıt

Enflamatuvar yanıtın hücresel bileşenleri temel olarak granülosit ve monosit hücreleridir. Genellikle dolaşımda olmakla birlikte, bazıları dokularda da bulunurlar. Dolaşımdaki hücreler; nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, trombositler (plateletler), makrofajların prekürsörü olan monositler ve lenfositlerdir. Dokularda bulunan hücreler; mast hücreleri ve monosit/makrofaj türevi hücrelerdir. Lenfatik sistem kökenli hücreler ve NK hücrelerine ise hem kanda hem de dokularda rastlanabilir. Bu hücrelerin tümü, çeşitli biyokimyasal maddeler salgılar ve bu tip maddelere yanıt verir (Rote ve Huether, 2010).

Hasarlı dokudan, hücrelerden (lökositler, mast hücreleri vb.) veya plazmadan köken alan mediyatörler enflamatuvar doku yanıtının oluşturulmasını sağlarlar. Kökeni plazma olan mediyatörler aktive olmak için bazı proteolitik değişikliklere gereksinim duyarken, hücre kaynaklı mediyatörler normalde intrasellüler granüllerde bulunur ve ihtiyaç olduğunda salınır veya uyarı olması durumunda yeniden sentezlenir. Aktive edilmiş veya hücreden salınmış mediyatörler genellikle kimyasal değişim geçirir ya da

enzimler tarafından inaktive edilir. Mediyatörlerin hemen hemen hepsi hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanır ve bu şekilde aktivite gösterir. Hedef hücreyi etkileyen mediyatör kendisine benzeyen, aynısı olan ya da karşıt etki gösteren ikincil bir mediyatör salımını uyarabilir. Bu mediyatörler şu şekilde sınıflandırılabilir:

1. Vazoaktif aminler
2. Plazma proteazları
3. Araşidonik asit metabolitleri
4. Lökosit ürünleri
5. Platelet aktive edici faktör (PAF)
6. Sitokinler
7. Büyüme faktörleri
8. Diğer mediyatörler

(Kuralay ve Çavdar, 2006)

Enflamatuvar yanıtta aktivite gösteren 3 temel plazma protein sistemi vardır. Bunlar; kompleman sistemi, pıhtılaşma sistemi ve kinin sistemidir. Bu sistemler, dolaşımda inaktif formda dolaşan, yaralanma veya enfeksiyon durumunda aktive olan proteinler içerir (Rote ve Huether, 2010).

Anaflatoksinler, mast hücrelerinin degranülasyonu ile vazodilatasyon ve damar geçirgenliğini arttıran histamin salımını uyarır. Kompleman sistemin bazı ürünleri anaflatoksik etkilidir. Bu sistemde, aynı zamanda, lökositlerin enflamasyon bölgesine göçünü sağlayan kemotaktik ajanlar da bulunur. Anaflatoksik etki, erken evrede, enflamasyon bölgesindeki mast hücrelerinin degranülasyonunun gerçekleşmesi, damar geçirgenliğinin artması ve vazodilatasyonun sağlanması için önemlidir. Kemotaktik etki ise, bölgeye lökosit göçünün sağlanması için daha uzun dönem gereklidir. Kompleman sistemde ayrıca, parçalanması gereken mikroorganizmalara bağlanan ve opsonin adı verilen moleküller de mevcuttur. Özetle, kompleman sistemin 4 temel görevi vardır. Bunlar; mast hücrelerinin degranülasyonunu sağlayan anaflatoksik aktivite, bölgeye lökosit göçü (kemotaksis), opsonizasyon ve hücre parçalanmasıdır (Rote ve Huether, 2010).

Pıhtılaşma sisteminde görevli proteinler, enflamasyon bölgesinde bir fibrin ağı oluşturur. Bu yapı, enfeksiyonun çevre dokulara yayılmasını önler, mikroorganizmaları ve yabancı maddeleri enflamasyon bölgesinden uzak tutar, kanamanın durmasını sağlayan bir pıhtı oluşturur ve tamir ve iyileşme süreci için başlangıç oluşturur. Bu sistemde görevli olan fibrinopeptitler, nötrofiller için kemotaktik ajanlardır, aynı zamanda kinin sistemi tarafından üretilen bradikininin etkisini arttırarak damar geçirgenliğini arttırırlar (Rote ve Huether, 2010).

Kinin sisteminde salınan birincil kinin olan bradikinin; vazodilatasyona ve düz kasların kasılmasına sebep olur, prostoglandinlerle birlikte sinir uçlarının uyarılmasını sağlayarak ağrı oluşturur, damar geçirgenliğini arttırır ve lökosit göçünü uyarır (Rote ve Huether, 2010).

Plazma protein sistemleri, birbiriyle etkileşim içindedir ve uyarılmaları sonucunda yüksek etkinlikte maddelerin salımı gerçekleşir ve enflamatuvar yanıt aktive olur. Enflamasyon, canlılar için kritik öneme sahiptir ve bu sebeple enflamasyon sürecinin etkin biçimde uyarımının sağlanması şarttır. Ancak bu süreçte üretilen biyokimyasal mediyatörler çok etkili ve vücudun kendi dokuları için de zararlı olabilecek niteliktedir, dolayısıyla enflamasyonun hasar gören bölge ile sınırlı kalması çok önemlidir. Bu sebeplerle, enflamatuvar yanıt oluşumunda büyük rolü olan plazma protein sistemlerinin regülasyonu büyük öneme sahiptir (Rote ve Huether, 2010).

Uyarı durumunda, mast hücrelerinden histamin, kemotaktik faktörler ve sitokinler (TNF- α , IL-4 gibi) salınır ve bu maddelerin etkileri çok hızlı görülür. Vazoaktif aminler grubunda yer alan histamin, salımı halinde ilk etapta ana damarlarda hızlı vazokonstrüksiyona, enflamasyon bölgesindeki kılcallarda ise vazodilatasyona sebep olur, böylelikle bölgedeki kan akımının artmasını sağlar. Histamin ayrıca kapiller permeabilite artışına eden olur. Lökotrienler, prostoglandinler ve platelet aktive edici faktör, mast hücrelerinin aktivasyonu süresince salınan diğer mediyatörlerdendir. Araşidonik asit metabolitlerinden olan lökotrienler, düz kas kasılmasına, damar geçirgenliğinde artışa ve eozinofil ve nötrofil göçüne sebep olur. Lökotrienler histamin benzeri etki göstermekle birlikte, farklı olarak etkilerini daha yavaş ve uzun süreli

ortaya çıkardıkları için enflamasyonun ilerleyen evrelerinde önem taşır. Mast hücrelerinde sentezlenen ve yine araşidonik asit metaboliti olan prostoglandinler ise damar geçirgenliğini artırma ve nötrofil göçünü uyarmanın yanısıra ağrı oluşumuna sebep olur. Vasküler permeabiliteyi arttıran, lökosit göçünü ve platelet aktivasyonunu sağlayan platelet aktive edici faktörün temel kaynağı mast hücreleri olmakla birlikte, enflamasyon süresince nötrofiller, makrofajlar, endotel hücreleri ve trombositler de bu mediyatörü salgılayabilir (Rote ve Huether, 2010).

Nötrofiller, enflamasyon bölgesine ilk gelen fagositik hücrelerdir. Çeşitli enflamatuvar mediyatörler aracılığıyla uyarılarak fagositoz ile bölgeyi temizler. Makrofajlar ve lenfositler bölgeye ulaştıktan sonra sayıları azalır. Monosit/makrofajlar da fagositik hücrelerdir ancak bunlar, enflamatuvar yanıtın daha ileri evresinde, nötrofiller tarafından salınan kemotaktik faktör ile uyarıldıktan sonra ve nötrofillerden daha uzun süre etkinlik gösterirler. Monositler kemik iliğinde üretilir ve enflamasyon bölgesine göçün ardından makrofajlara dönüşür. Bu hücreler aynı zamanda dokulardaki makrofajların prekürsörüdür. Makrofajlar, hücresel enflamatuvar yanıtta dokuya geçen primer hücrelerdir ve bölgeyi temizlemek ve ürettikleri sitokinler aracılığıyla enflamasyonun ilerlemesini durdurup iyileşme sürecinin başlamasını sağlamakla görevlidirler. IFN- γ gibi sitokinler ayrıca, makrofajların bakterisidal aktivitesini de artırır. Makrofajlar aynı zamanda, IFN- γ , IL-1 β , anjiyogenik faktör, fibroblast aktive edici faktör ve büyüme faktörü gibi maddeler üreterek hasarlı dokunun tamirinde rol oynar (Rote ve Huether, 2010). Makrofajlar tarafından üretilen pek çok büyüme faktörü pleiotropiktir ve hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve ekstrasellüler matriks oluşumunda rol oynarlar (Li ve ark., 2007). Enflamatuvar yanıtın sonucunda, bölgenin yabancı maddeler/patojenlerden temizlenmesi durumunda, antienflamatuvar aktivite için sinyalizasyon başlar ve enflamasyonun çözülme sürecine girilir. Bu süreçte özellikle, lipoksinler, protektinler, resolvinler gibi lipit yapısındaki mediyatörler rol oynar. Araşidonik asit türevidir olan lipoksin, nötrofil göçünü durdurur, ölü hücrelerin ve doku kalıntılarının makrofajlar tarafından temizlenmesi için enflamasyon bölgesine daha fazla monositin gelişini uyarır (Barton, 2008).

1.1.2. Antienflamatuvar Etkinin Değerlendirilmesi

Antienflamatuvar etkinin değerlendirilmesi temel olarak, deney hayvanlarına enflamasyon oluşturucu bir ajan verilmek suretiyle enflamasyonun oluşturulması, ardından test edilecek numunenin bu enflamasyonu azaltıp azaltmadığına bakılması suretiyle yapılır. Numune enflamasyonu geriletiyorsa etkisi, aktivitesi bilinen antienflamatuvar bir ajanla kıyaslanarak tespit edilir (Özbek ve Öztürk, 2003).

1.2. Yara

Vücut ağırlığımızın yaklaşık %16'sını kaplayan derinin en önemli görevi, dış çevreye karşı bariyer oluşturarak vücudu korumaktır. Yara; cerrahi girişimler veya travmalar sebebiyle, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulmasıdır (Özler ve ark., 2007).

1.2.1. Yara Tipleri

1.2.1.1. Akut Yaralar

Geçici bir etken sebebiyle oluşan bu tip yaralar, genellikle kısa sürede iyileşen yaralardır. Açık yaralar ve kapalı yaralar olarak iki grupta incelenebilir (Süntar, 2011). Açık yaralarda deri altı dokular atmosferle temas halindedir. Bu temas kısa sürede kesilmezse enfeksiyon, doku kuruluğu, eritrosit, lökosit, immün madde ve benzeri proteinlerin kaybı gibi faktörler iyileşme sürecini olumsuz yönde etkiler (Gökalp Özkorkmaz ve Özay 2009).

1.2.1.2. Kronik Yaralar

Sürekli bir etken sebebiyle meydana gelen, iyileşmeyen veya iyileşmesi üç aydan fazla

süren yaralar bu gruptadır. Bazı sistemik ve lokal faktörler yara iyileşmesini engellemektedir. Akut yaralarda görülen anabolik-katabolik reaksiyon dengesi kronik yaralarda katabolizma yönüne kaymıştır. Akut yaralarda enflamasyon gelişiminin temel amacı hasarlı doku parçalarını ve bakteriyel kontaminasyonu ortadan kaldırarak bölgeyi iyileşme sürecine hazırlamak ve fibroblast aktivasyonunu sağlamak iken; kronik yaralarda enflamasyon gelişimi daha fazla enflamasyonun oluşmasını ve yaranın kronikleşmesini tetiklemektedir (Menke ve ark., 2007; Süntar, 2011).

1.2.2. Yara İyileşmesi

Doku bütünlüğündeki bozulma, yara bölgesinde morfolojik ve fonksiyonel özelliklerin geri kazanılması amacıyla, bir dizi fizyolojik olayı kapsayan tamir sürecini başlatır. Yara iyileşmesi sürecinde, temelde doku hasarının en aza indirgenmesi, yeterli doku kanlanması ve oksijenlenmesinin, dokunun düzgün beslenmesi ve nemlenmesinin sağlanması hedeflenmektedir (Özler ve ark., 2007; Gökalp Özkorkmaz ve Özay, 2009). Yara iyileşmesinin istenen sonucu, dokunun tamamıyla yenilenip (rejenerasyon) eski haline dönmesidir. Bu sonuç, özellikle erişkinlerde, her zaman mümkün olmasa da, yara küçük ve temiz ise rejenerasyon tam olarak gerçekleşebilir. Hasar alan dokunun neredeyse orijinal yapısına döndüğü ve herhangi bir fonksiyon eksikliğinin söz konusu olmadığı bu duruma rezolüsyon adı verilir. Eğer dokudaki hasar fazlaysa, hasarlı doku rejenere olamıyorsa, enfeksiyon sonucunda abse ve granüloma oluştuysa veya bozulmuş dokudaki fibrin varlığı devam ediyorsa, rezolüsyon mümkün olmaz ve tamir süreci başlar. Dokunun tamiri için, temelde kolajen yapısında olan, hasarlı dokuda gerilim kuvvetini sağlayan, ancak yara almamış haliyle aynı fizyolojik fonksiyonları taşımayan skar dokusu gelişir (Rote ve Huether, 2010).

Yara iyileşmesi süreci, kesin sınırlarla ayrılamayan üç evreden oluşur. Bunlar; enflamasyon (0-3 gün), proliferasyon (3-12. günler) ve olgunlaşma/remodelizasyon (3-6 ay) evreleridir (Özler ve ark., 2007; Gökalp Özkorkmaz ve Özay, 2009).

1.2.2.1. Enflamasyon Evresi

Travmaya karşı oluşan fiziksel yanıt enflamasyonla başlar. İlk etapta kanamanın durdurulması, hemostazın sağlanması amacıyla vazokonstriksiyon meydana gelir. Kanamanın durdurulmasının ardından plazma ve dokulardan salınan enflamatuvar mediatörler aracılığıyla lokal vazodilatasyon ve damar geçirgenliğinde artış görülür. Yaralanmayı takip eden süreçte trombositlerin kolajenle teması ile pıhtılaşma mekanizmaları aktive olur. Trombosit adhezyonu, agregasyonu ve pıhtılaşma faktörlerinin salınmasıyla pıhtı meydana gelir. Pıhtı oluşumu, kanamanın, bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi ve yaranın kapanması bakımından önemli bir basamaktır. Bu pıhtı aynı zamanda bölgeye göç eden hücreler için bir iskelet görevi görür. Trombositler, hemostazın sağlanması için temel görevleri olan pıhtılaşmayı sağlamanın yanısıra, büyüme faktörü ve vazoaaktif maddeler salgılayarak fibroblast ve diğer mezankimal hücrelerin aktivasyonunu sağlar (Li ve ark., 2007; Özler ve ark., 2007). TNF- α , IL-1, IL-6 gibi mediyatörlerin salınmasıyla, lökositler yaralanma bölgesine gelir. Bakterisidal ve fagositik özellikleri olan bu hücrelerin temel görevi; yaradaki yabancı maddeleri, aktivitelerini yitirmiş doku hücrelerini, hasarlı matriks bileşenlerini fagosite etmektir. Bu şekilde, yara bölgesinde bakteriyel kontaminasyonu ve enfeksiyon oluşumunu önleyen nötrofiller immünolojik bir rol oynarlar. Normal yaralarda yara iyileşmesinde yüksek katkı sağlayan nötrofiller, kronik yaralarda yara bölgesinde kalma sürelerinin ve salgıladıkları maddelerin artması sebebiyle iyileşmenin gecikmesine neden olurlar. Yara bölgesine nötrofillerden sonra gelen lenfositlerin, yüksek kontaminasyonun olduğu yaralarda iltihap derecesini belirleyen bir rolü vardır. Enflamasyonun az olduğu yaralarda minimal işleve sahiptirler. Bölgeye monositlerin gelmesiyle nötrofil miktarı azalır. Aktive olan monositler, makrofajlara dönüşerek, patolojik mikroorganizmaları, doku artıklarını ve işlevini bitirmiş olan nötrofilleri fagosite ederler. Yara iyileşmesinde önemli rolü olan diğer bir grup da mast hücreleridir. Bu hücreler, enzim, histamin ve diğer aktif aminleri sentezleyerek enflamasyon bulgularını ortaya çıkarırlar. Yara bölgesinde makrofajların etkinliği, proliferatif evreye geçildiğinin göstergesi olarak düşünülebilir (Özler ve ark., 2007; Süntar, 2011; Altınyay, 2014).

1.2.2.2. Proliferasyon Evresi

Proliferasyon evresi, yeni oluşan granülasyon dokusunun yara alanını kapladığı ve doku tamirinin başladığı evredir. Bu aşamada fibroblastların önemli rolü vardır. Bu hücreler normal dermiste sayıca az ve dinlenme durumunda bulunur, ancak yara dokusunda çok sayıda ve aktif haldelerdir. Makrofajların salgıladıkları sitokinler aracılığıyla, fibroblast migrasyonu, proliferasyonu ve kolajen sentez-yıkım kontrolü sağlanır. Fibroblastlar, yara iyileşmesinde kritik olan kolajen ve glikozaminoglikan sentezini yaparlar. Hyaluronik asit, kondroitin-4-sülfat, dermatan sülfat ve heparan sülfat olmak üzere dört ana çeşidi bulunan glikozaminoglikanlar, kolajenin depolanması bakımından önemli yapılardır. Kolajen sentezinin arttığı bu evrede, paralel olarak yara gerilme kuvveti de artar. Kolajen fibriller kovalent bağlarla birbirine bağlanarak kolajen liflerini oluşturur. Mevcut fibrin pıhtısı, kolajen lifleri ve doku hücreleri için bir iskelet görevi görür ancak iyileşmenin devamında bu pıhtı çözülür ve yerine rezolüsyon durumunda normal doku, tamir durumunda ise skar dokusu geçer. Kolajen yapımı, granülasyon dokusunun güçlenmesi için gerekli olan damar oluşumu (anjyogenez) ve dokunun yeniden şekillenmesi için önemli bir basamaktır (Özler ve ark., 2007; Rote ve Huether, 2010; Süntar, 2011). Makrofajlardan salınan sitokinler, bölgede düşük oksijen miktarı, laktik asit ve biyolojik aminler anjyogenez başlangıcını uyarır. Yaralanma durumunda, endotel hücreleri anjyogenik basamakları başlatır ve çevredeki damarlardan kaynak alarak hasarlı bölgedeki yeni damarlar gelişir. Yeni oluşan damarlar, bölgeyi besler ve oksijen taşır, bu şekilde granülasyon dokusunun oluşumuna katkı sağlar. Bu süreçte endotel hücreleri, sitokinler gibi aktif maddeler de üretir (Li ve ark., 2007).

Yara iyileşmesinin klinik değerlendirilmesinde, epitelizasyonun tamamlanmasına bakılır. Yeni oluşan epitelin kaynağı, bazal tabakadaki keratinositlerdir. Fibroblastlardan salınan sitokinler tarafından yönlendirilen epitelizasyon, yara oluşumunu takiben başlar. Sitokinler keratinositlerin yara bölgesine migrasyonunu ve proliferasyonunu uyarır. Uyarılan keratinositlerden IL-6 ve NO salınarak diğer keratinositlerin migrasyon ve proliferasyonu sağlanır. Keratinositlerin proliferasyonu ile, epidermis ve dermisi bağlayacak olan membran şekillenir. NO miktarı, keratinosit

yoğunluğu ile orantılı olarak artar ve NO miktarının belli bir düzeye gelmesi sonucunda keratinosit proliferasyonu durur ve epiderminin tabakalarının oluşmasını sağlayan hücre farklılaşması başlar (Li ve ark., 2007; Özler ve ark., 2007).

1.2.2.3. Olgunlaşma Evresi

Kolajen yapımı ve yıkımının dengeye ulaşmasıyla yara iyileşmesinde son evreye girilir. Kolajen miktarı sabit kalırken kolajen lifleri, çevresel faktörlere bağlı olarak yeniden şekillendirilir. Bu aşamada enflamasyonda rol oynayan hücreler azalmaya başlar ve yara gerilme kuvveti devamlı artar. Gerilme kuvveti, yaralanmadan 6-12 gün sonra belirgin hale gelir (Özler ve ark., 2007; Süntar, 2011). Bu evrede amaç, dokunun yapısal bütünlüğü ve fonksiyonel yetkinliğinin yeniden sağlanmasıdır (Li ve ark., 2007).

1.2.3. Yara İyileşmesinin Değerlendirilmesi

1.2.3.1. *In Vitro* Çalışmalar

Genellikle fibroblast, keratinosit ve endotel hücreleri kullanılarak yapılan hücre kültürü temelli bu çalışmalarda, iyileşme sürecinde önemli olan hyaluronik asit, kolajen ve elastini parçalayan enzimlere karşı inhibitör etki değerlendirilir (Süntar, 2011).

1.2.3.2. *In Vivo* Çalışmalar

Yara iyileştirici etkinin değerlendirilmesi amacıyla, fare, sıçan gibi küçük memeli hayvanlarda mekanik veya termal travma ile yara oluşturulur. Belli zaman aralıklarıyla fotoğraflanan yara alanları ölçülerek yara kontraksiyonu hesaplanır. Yara alanının küçülmesi yara iyileşmesinin göstergesidir. İnsizyon tipi yara oluşturulmuş

modellerde yara kenarları cerrahi dikişle birleştirilir. Dikişlerin alınmasından sonra yara alanları çıkarılarak tensiometre ile yara gerilme kuvveti ölçülür. Yara gerilme kuvvetinin yüksek olması yara sağlamlığı ve kolajen oluşumunun değerlendirilmesini sağlar. Bu şekilde test edilen numunenin yara gerilme kuvvetine etkisi tespit edilir. Yara bölgeleri çıkarılıp formaldehit çözeltisi içinde saklanarak histopatolojik inceleme ile iyileşme sürecinin değerlendirilmesi de mümkündür (Süntar, 2011).

1.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Etki

Aerobik organizmaların elektron taşıma sistemlerinde, aktif fagositoz gibi metabolik yollarda sürekli olarak reaktif oksijen türleri ortaya çıkmaktadır. Bu reaktif türlerin başlıcaları; süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikal (HO^{\cdot}), peroksil radikal (ROO^{\cdot}), alkoksil radikal (RO^{\cdot}), hipoklorik asit ($OHCl^{\cdot}$), ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) olarak sayılabilir. Fagositoz sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türleri, fagositlerdeki proteazlar ve antimikrobiyal peptitlere ek olarak antimikrobiyal bir sistem oluşturur. Reaktif oksijen radikalleri DNA, protein ve lipitler gibi makromoleküllerde oksidatif hasara neden olur. Metabolizma sırasında oluşan bu reaktif türler, normalde spesifik enzim sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz), ürik asit ve tokoferol gibi, protein yapısında olmayan bazı bileşikler tarafından engellenmektedir. Az miktarda, kolay okside olabilen maddelerin oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen bileşiklere antioksidan adı verilir (Barton, 2008; Albayrak ve ark., 2010).

Vücutta antioksidan aktivite gösteren doğal yapılar her zaman yeterli olmayabilir. Oksidatif stres; reaktif oksijen türlerinin oluşumunun, bu reaktif bileşenleri detoksifiye eden sistem etkinliğini aşması olarak tanımlanabilir. Oksidatif stres sonucunda oluşan serbest radikaller, hücre hasarına ve dolayısıyla kanser, kardiyovasküler sistem hastalıkları, metabolik rahatsızlıklar ve nörolojik problemler gibi pek çok rahatsızlığa sebep olabilirler (Erdoğan-Orhan ve ark., 2010).

Kronik yaralarda yapılan biyokimyasal ölçümlerde, oksidatif stres artışının dikkat çekici düzeyde olduğu görülmektedir (Özler ve ark., 2009). Yara iyileşmesinin enflamasyon evresinde, aktif nötrofillerin bakterileri fagositozu sırasında oluşan serbest radikaller doku hücrelerine de hasar verir (Özler ve ark., 2007).

1.4. *Ononis* L. Türlerinin Botanik Özellikleri

1.4.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri

Alem	: Plantae	
Bölüm	: Spermatophyta	
Alt Bölüm	: Angiospermae	
Sınıf	: Dicotyledonae	
Alt Sınıf	: Dialypetalae	
Takım	: Rosales	
Familiya	: Fabaceae	
Alt Familiya	: Papilionaceae	
Cins	: <i>Ononis</i> L.	(Davis, 1970)

1.4.2. Fabaceae Familyasının Genel Özellikleri

Odunsu veya otsu, yapraklar alternan, genellikle stipulalı, bipennat, pennat, digitat, trifoliat veya basit. Çiçekler aktinomorf veya zigomorf, hipogin, bazen perigin, genellikle hermafrodit. Çiçek durumu rasemoz, başak, şemsiyemsi veya tek çiçekli. Sepaller (4-) 5, tek sepal her zaman önde. Petaller (1-) 5, tomurcukta valvat veya imbrikat, serbest veya nadiren kısmen birleşik. Stamenler 4 ya da daha fazla sayıda, genellikle 10'lu, hepsi bir tüp içinde birleşik (monodelf), üst stamen serbest (diadelf) veya hepsi serbest. Karpel 1, üst durumlu, plasantasyon parietal, meyve legümen ventral, dorsal ya da açılmayan, bazen 1 tohumlu lomentumlara ayrılmış. (Davis, 1970; Baldemir, 2010).

Fabaceae familyası; Caesalpinioideae (Syn: Caesalpinaceae), Mimosoideae (Syn: Mimosaceae) ve Papilionoideae (Syn: Papilionaceae) olmak üzere 3 alt familyayı kapsamaktadır (Davis, 1970).

1.4.3. *Ononis* L. Cinsinin Özellikleri

Tek veya çok yıllık otsu veya alçak, kısa çalı formunda bitkiler. Gövde, salgı tüylü veya örtü tüyüne sahip, nadiren tüysüz. Yapraklar 1-3 foliolat veya 1-foliolat, nadiren imparipennat. Yaprakçıklar genellikle dişli, stipulalar yapraksı ve yaprak sapıyla birlikte gelişmiş. Çiçekler, gövdeye bitişik, ayrı 2-3 tane, sapsız veya uzun saplı genellikle yapraksı salkımlı. Kaliks kampanulat, veya nadiren tübüler (5 dar, eşit bölmeli). Petaller sarı-beyaz veya pembe-mor. Ön petal sivri. Stamenler monodelf. Stigma küçük ve terminal. Legümen meyve lineer-oblong, şişkin veya silindirik ve birkaç tane veya çok sayıda böbrek şeklinde/orbikular tohumlu, kendiliğinden açılan, kaliks tarafından sarılı veya 3 katı kadar büyüklükte (Davis, 1970).

1.4.4. Çalışılan Türlerin Tayin Anahtarı

1. Petaller saman rengi-sarı, genellikle kırmızı çizgili veya kırmızılı
2. Tek yıllık
3. Korollada veksillum tüylü 14. *variegata*
3. Korollada veksillum tüysüz
4. Pedunkul dikensiz; çiçekler sık salkım oluşturmamış; kaliks dişli, lineer lanseolattan subulata; tohumlar pürüzlü
5. Korolla kaliksten uzun veya kısa; legümenler oblongdan lineer oblonga, şişkin, boğumlu değil
6. Korolla 5-10 mm, petaller sarı; pedunkul 1 çiçekli
7. Pedunkul 10-25 mm, 5-20 mm dikenli 10. *viscosa*
2. Çok yıllık
8. Pedunkul 5-20 mm
9. Gövde 15-100 cm; korolla 8-20 mm; pedunkul dikenleri (2-)5-15 mm; legümen lineer 4. *natrix*
9. Gövde 3-30 cm; korolla 6-12 mm; pedunkul dikensiz veya dikenler en fazla 2 mm; legümen oblong
10. Korolla 6-9 mm; yapraklar belirgin saplı

11. Yapraklar genellikle trifoliat, üst yapraklar çoğunlukla tek yaprakçıklı, alt yapraklar bazen imparipennat; kaliks lobları lineer-subulat ve üç damarlı

1. Petaller pembe-mor veya beyaz

12. Çok yıllık, çoğunlukla dikenli

18. Çiçekler 6-10 (-15) mm, genellikle tek, gevşek salkım şeklinde; kaliks loblarında genellikle sapsız veya kısa saplı salgı tüyleri, arasında seyrek olarak daha uzun örtü tüyleri, bazen tüysüz; tohumlar pürüzlü veya pürüzsüz 13. *spinosa*

Çalışılan türlerden *O. spinosa*'nın Türkiye'de yetişen iki alt türü bulunmaktadır. Bunlar; *O. spinosa* subsp. *antiquorum*'un tohumları çıkıntılı iken, *O. spinosa* subsp. *leiosperma*'nın tohumlarının yüzeyi pürüzsüzdür (Davis, 1970).

1.5. *Ononis* L. Türleri Üzerinde Yapılan Kimyasal Çalışmalar

1.5.1. Terpenik Bileşikler

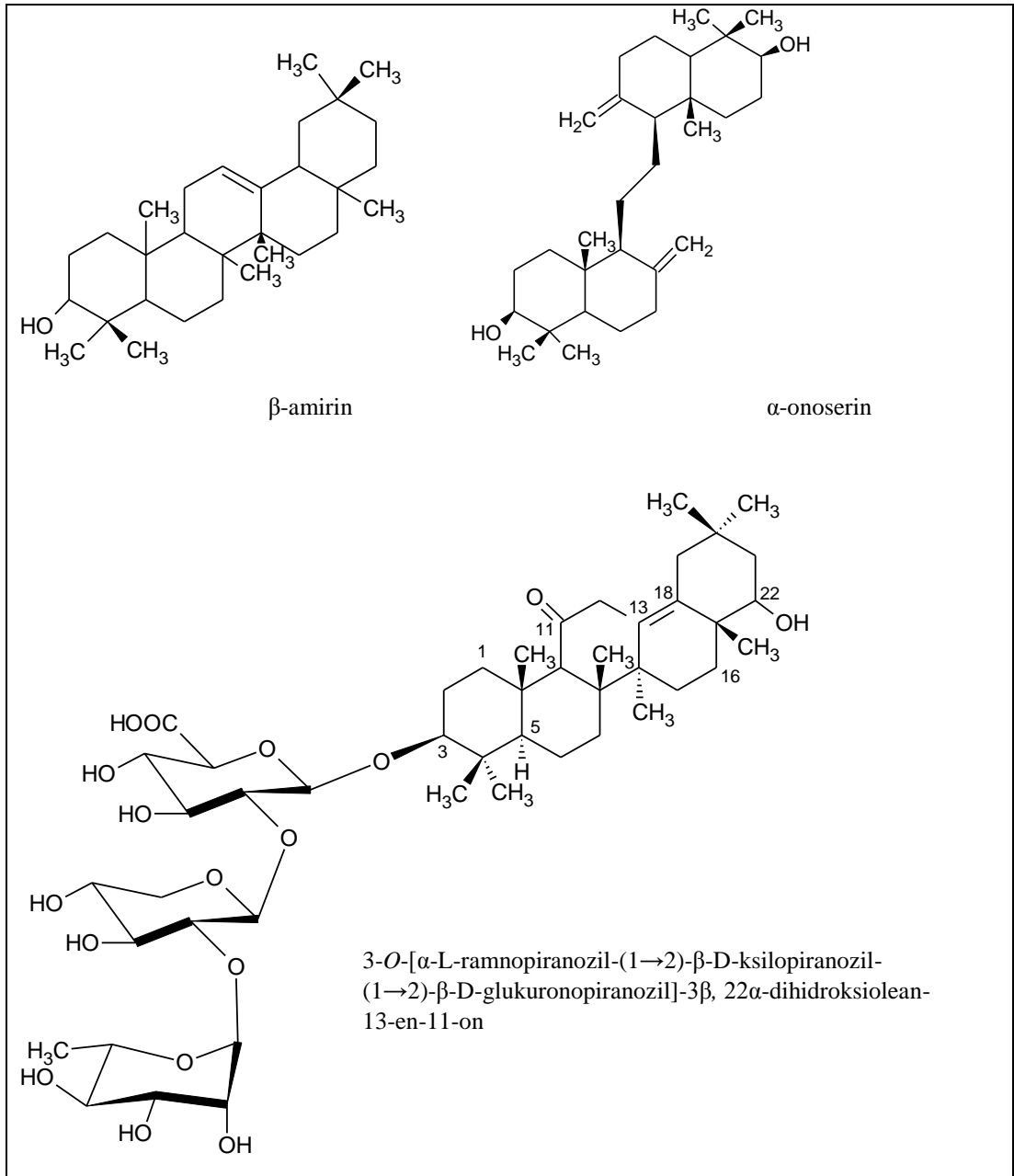
1.5.1.1. Triterpenik Bileşikler

On iki *Ononis* türünden hazırlanan ekstraların sabunlaşmayan kısımları ile yapılan GC analizinde, bu türlerin on tanesinin (*O. cristata* Miller, *O. pubescens* L., *O. viscosa*, *O. minutissima* L., *O. arvensis*, *O. spinosa*, *O. repens*, *O. subspicata* Lag., *O. mitissima* L., *O. alopecuroides* L.) α -onoserin taşıdığı saptanmıştır (Rowan ve Dean, 1972).

Barton ve Overton'un yaptığı bir çalışmada (1955), *O. spinosa* köklerinin kloroform ile ekstraksiyonu sonrasında α -onoserin kristallendirilerek elde edilmiştir. α -onoserin ayrıca, bitkinin kurutulmuş köklerinden petrol eteri kullanılarak yapılan Soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstreden de izole edilmiş, MS ve NMR teknikleri yardımıyla yapı tayini yapılmıştır (Pauli, 2000).

Başka bir çalışmada, *O. spinosa*'nın kök ekstresinin sabunlaşmayan kısmının GC-MS analizi sonucunda, yapısında β -amirin ve α -onoserin varlığı tespit edilmiştir (Daruhazi ve ark., 2008).

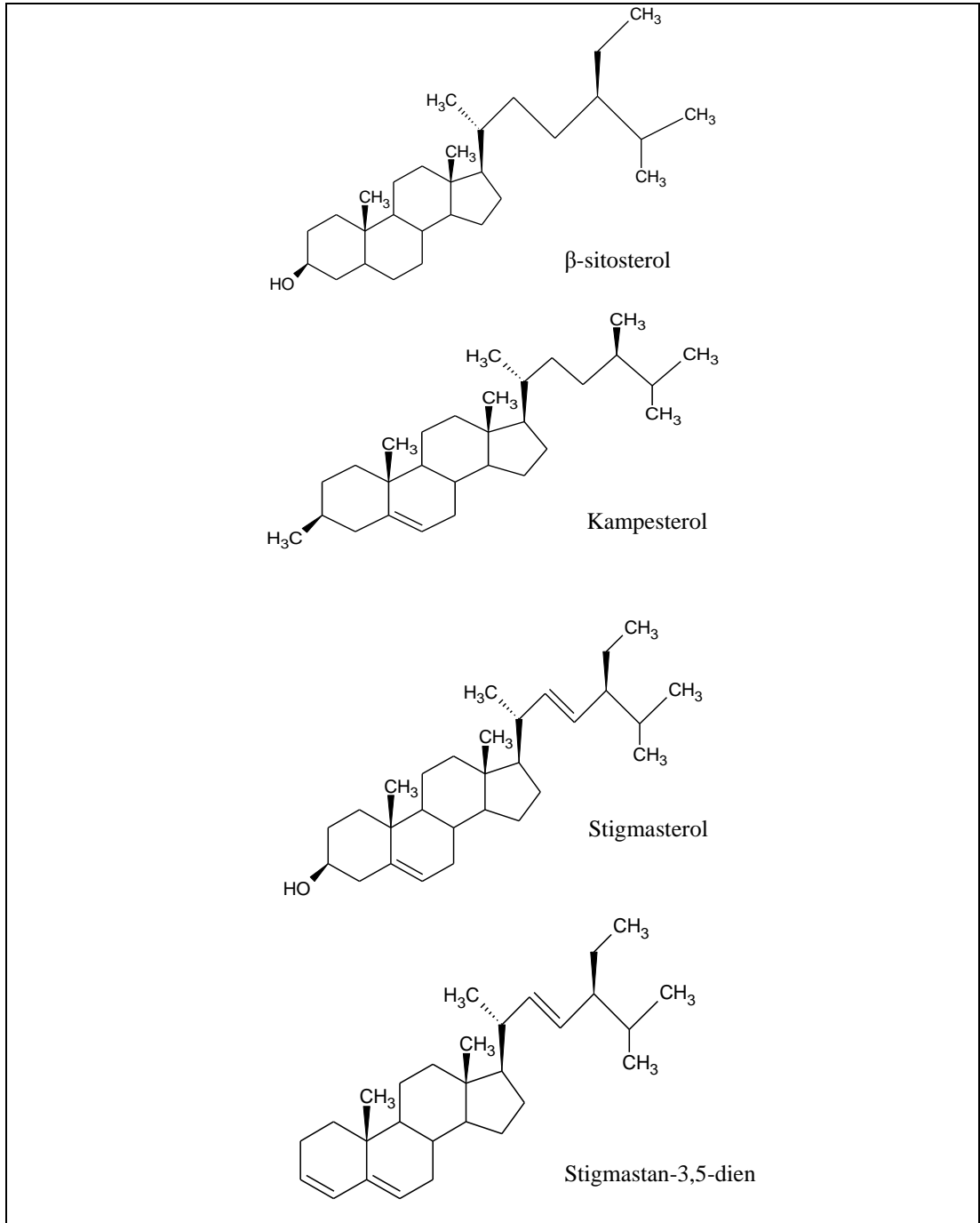
O. spinosa köklerinin butanol ekstresinden triterpenik bir saponozit olan 3-*O*-[α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukuronopiranozil]-3 β , 22 α -dihidroksiolean-13-en-11-on bileşiği izole edilmiştir (Shaker ve ark., 2004).



Şekil 1.4. *Ononis* L. türlerinde bulunan triterpenik bileşikler

1.5.1.2. Steroller

O. spinosa köklerinden hazırlanan ekstrenin GC-MS analizi, sabunlaşmayan kısmının β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol ve stigmastan-3,5-dien içeriğini ortaya koymuştur (Daruhazi ve ark., 2008).



Şekil 1.5. *Ononis* L. türlerinde bulunan steroller

1.5.2. Flavonoitler

Metanol:su (90:10) karışımı ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonu sonucunda *O. spinosa*'dan hazırlanan ekstrenin yüksek çözünürlüklü YPSK analizi sonucunda bitkinin izoflavon içeriği tespit edilmiştir. UV-VIS DAD ve ESI-MS dedektörler aracılığıyla yapılan bu analiz sonucunda, ekstrenin psödobaptigenin glukozit, ononin (7 β -(glukoziloksi)formononetin) ve formononetin taşıdığı saptanmıştır (Klejdus ve ark. 2007).

Yapılan ultra performanslı sıvı kromatografisi sonucunda ise asit hidrolizine uğramış *O. spinosa* ekstresinde genistein ve biokanin A tespit edilmiştir (Klejdus ve ark., 2008).

Başka bir çalışmada; *O. spinosa* köklerinden sulu metanol ile hazırlanan ekstrenin YPSK analizi ile asit hidrolizi öncesinde ve sonrasında izoflavon içeriği araştırılmış ve hidrolizden önce ekstrede daidzin, genistin, ononin ve formononetine rastlanırken, asit hidrolizi sonrasında ekstrede ononin, daidzein ve formononetin tespit edilmiştir (Benedec ve ark. 2012).

Fujise ve arkadaşlarının (1965) yaptığı bir çalışmada *O. spinosa*'dan trifolirhizinin tetraasetatı izole edilmiş ve bu bileşikten de redüksiyon ve alkali hidrolizi yoluyla trifolirhizin elde edilmiştir.

Dannhardt ve arkadaşları (1992) tarafından yapılan bir çalışmada, *O. spinosa*'nın köklerinin metanol ekstresinin lipoksijenaz üzerindeki inhibitör etkisi incelenmiş, aktif bileşen olarak medikarpin izole edilmiştir. Başka bir çalışmada, *O. spinosa*'dan medikarpin yanında, homopterokarpin de izole edilmiştir (Jimenez-Gonzales ve ark., 2008).

O. spinosa subsp. *leiosperma* (Boiss.) Sirj.'nin köklerinden hazırlanan metanol ekstresinden izoflavon türevi olan ononin ve bir pterokarpan türevi olan 7-demetoksi-

7-D-(glukoziloksi)- homopterokarpın bileşikleri izole edilmiştir (Kırmızıgül ve ark., 1997).

O. arvensis'in köklerinden izoflavanon yapısındaki onogenin izole edilmiş ve maddenin yapı tayininde UV, IR, NMR ve MS gibi spektroskopik yöntemlerden yararlanılmıştır (Kovalev ve ark., 1975).

O. natrix subsp. *hispanica* (L.F.) Cout.'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan hekzan ekstresinden flavon yapısındaki nevadensin elde edilmiştir (Barrero ve ark., 1990).

O. natrix bitkisi ile yapılan bir çalışmada, ipterokarpın türevi bir bileşik olan homopterokarpın izole edilmiştir (San Feliciano ve ark., 1983).

Barrero ve ark. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, *O. natrix* subsp. *ramosissima* (desf.) Briq.'dan, 2',4'-dihidroksikalkon, 2'-hidroksi-4'-metoksikalkon, 4,2',4'-trihidroksikalkon, 4,2'-dihidroksi-4'-metoksikalkon; 2',4',6'-trihidroksi dihidrokalkon, 2',6'-dihidroksi-4'-metoksidihidrokalkon, 2',4'-dihidroksi-6'-metoksidihidrokalkon, 4,2',6'-trihidroksi-4'-metoksidihidrokalkon, 2',6'-dihidroksi-4'-metoksidihidrokalkon, 2',6'-dihidroksi-4,4'-dimetoksidihidrokalkon; 7-hidroksiflavanon, 5,7-dihidroksiflavanon; pterokarpın türevi bileşikler olan medikarpın, homopterokarpın, trifolirhizin izole edilmiştir.

O. natrix'in toprak üstü kısımlarından kloroform ile hazırlanan ekstreden, flavon türevi bileşikler olan gardenin B, ksantomikrol, himenoksin ve bir pterokarpın türevi olan medikarpın- β -D-glukoz elde edilmiştir (Al-Khalil, 1995a).

O. speciosa Lag.'nın çiçeklerinden hazırlanan ekstreden ononin ve 6''-O-asetilononin izole edilmiştir (Barrero ve ark., 1989a).

O. viscosa subsp. *brevifolia* (DC) Nym.'nin toprak üstü kısımlarının kloroform ekstresinde pterokarpan türevi bileşikler izole edilmiş ve yapıları variabilin ve anhidrovariabilin olarak tayin edilmiştir (Barrero ve ark., 1994a). Aynı alt tür ile yapılan başka bir çalışmada ise kloroformlu ekstreden pterokarpin, homopteroarpin, medikarpin, maakiain, 11b-hidroksi-11b,1-dihidromedikarpin ve 11b-hidroksi-11b,1-dihidromaakiain bileşikleri saflaştırılmıştır (Barrero ve ark., 1998).

Ononis cinsinin 31 taksonu ile yapılan bir çalışmada, *O. natrix*, *O. spinosa*, *O. viscosa*, *O. hispida* Desf., *O. serrata* Forrsk., *O. variegata* ve *O. subspicata* türlerinin de içinde bulunduğu örneklerin yapraklarında medikarpin varlığı tespit edilmiştir. Bu örneklerin çoğunun maakiain de taşıdığı görülmüştür (Ingham, 1982).

O. serrata'nın etanol ekstresinden elde edilen kloroform ve etil asetat fraksiyonlarından, 5,6,4'-trihidroksi-7,3'-dimetoksiflavon, sorbifolin, apigenin, luteolin, astragalin, izokersitrin ve 6-hidroksikemferol-3-glukozit izole edilmiştir. Bileşiklerin yapısı, fiziksel özelliklerine bakılarak, spektroskopik verilerden faydalanılarak ve referans örneklerle kıyaslanarak tayin edilmiştir (Amer, 2001b).

O. serrata'nın butanolde çözünen fraksiyonu ile yapılan bir çalışmada, medikarpin-3-*O*-glukozit ve rotindin izole edilmiştir (Abdel-Kader, 2004).

Cezayir'de endemik olarak yetişen bir tür olan *O. angustissima* Lam.'nin metanol:su karışımıyla hazırlanan ekstresinin fraksiyonlanması ardından kloroformlu fraksiyondan alnetin, 6,7-di-*O*-metilbaikalein, negletein, krizin izole edilmiştir (Bouheroum ve ark., 2009). Bu çalışmanın devamında, metanol:su karışımı ile hazırlanmış ekstrenin etil asetat fraksiyonundan izole edilen beş bileşikten üçü spektroskopik yöntemler kullanılarak, 2',4'-dihidroksikalkon, 2'-hidroksikalkon ve 6-hidroksi-4'-metoksiauron olarak teşhis edilmiştir (Mezrag ve ark., 2013).

O. angustissima'nın toprak üstü kısımlarından kloroform ile hazırlanan ekstreden flavonoit türevi 4 bileşik izole edilmiş ve bileşiklerin yapıları HRESI-MS, UV, NMR

gibi spektroskopik teknikler kullanılarak ve literatür verileri ile kıyaslanarak aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin 2',3',4'-trihidroksikalkon, 6-hidroksiauron, 2',4'-dihidroksikalkon ve tetrokrizin olduğu tespit edilmiştir (Benabderahmane ve ark., 2014).

Amer ve arkadaşlarının (1989) yaptığı bir çalışmada, *O. vaginalis* Vahl. Symb. türünden 7 tane flavonoit türevi bileşik izole edilmiş ve bu bileşiklerin yapıları apigenin, krizin, astragalin, trifolin, luteolin-3',4'-dimetil eter, sirsimaritin ve eupatilin olarak aydınlatılmıştır.

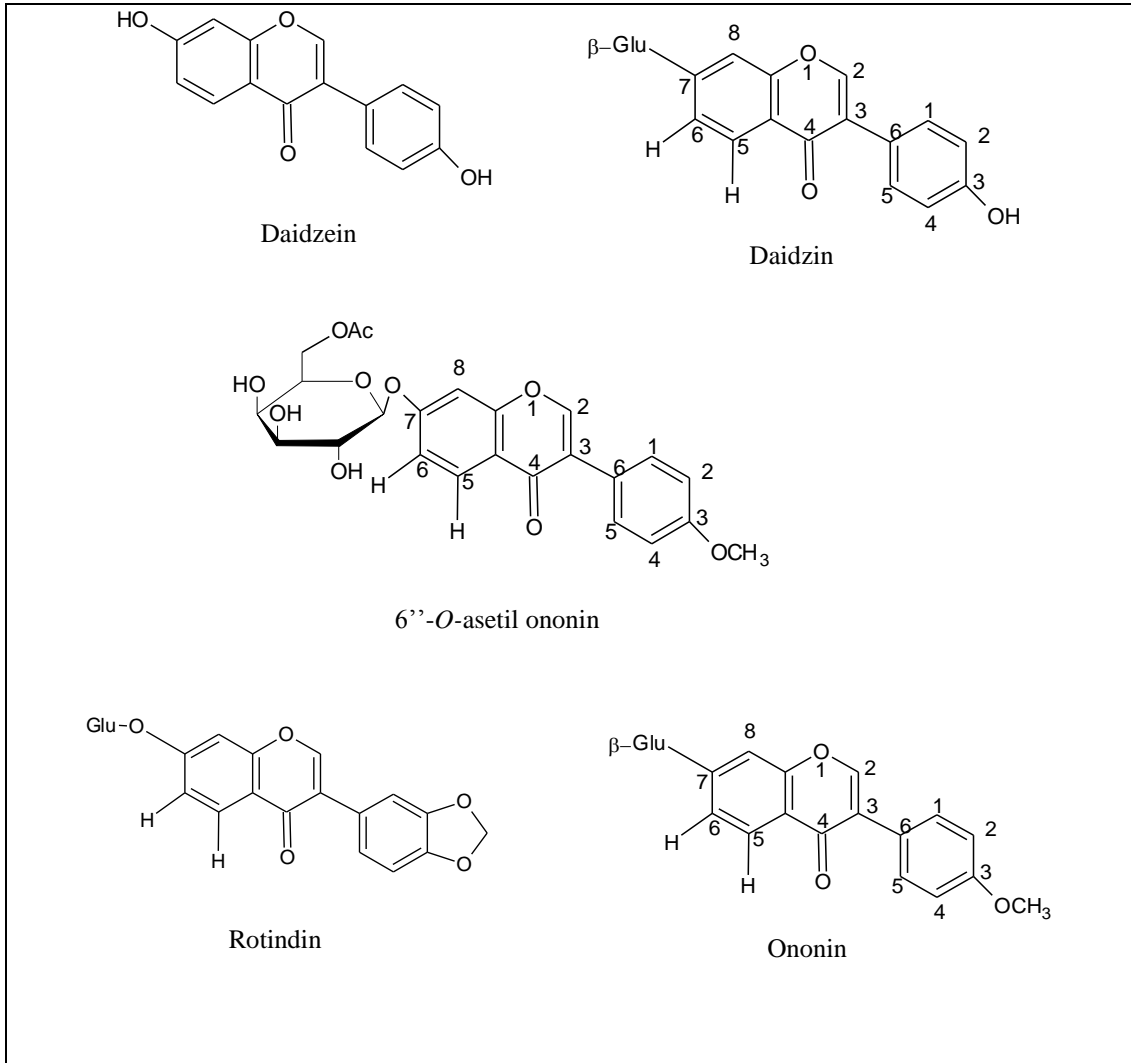
O. vaginalis'in çiçeklerinden hazırlanan etanol ekstresinin partiyonu ile elde edilen butanol fraksiyonundan flavanon C-glikoziti olan hemifolin bileşiği elde edilmiştir (Abdel-Kader, 1997). Benzer bir çalışmada, *O. vaginalis*'in kurutulmuş köklerinin etanol ile hazırlanan ekstresinin partiyonu sonucunda alınan eter fraksiyonundan 3-hidroksi-4,9-dimetoksikumestan, 3,4,9-trimetoksipteroکارپان, maakiain, medikarpin ve trifolirhizin izole edilmiş ve bileşiklerin yapısı IR, MS ve NMR teknikleri yardımıyla aydınlatılmıştır (Abdel-Kader, 2001).

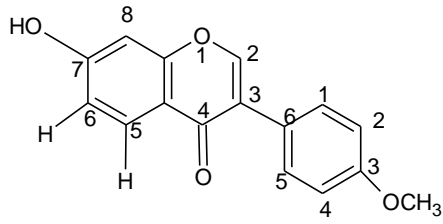
O. vaginalis bitkisinden butanolla hazırlanan ekstreden bir flavonoit glikoziti olan 3-*O*-[2-*O*-(*E*)-*p*-kumaroil- β -D-galaktopiranozil]-7-*O*- β -D-glukopiranozilkemferol ve pterokarpan glukoziti olan 3,4-di-*O*- β -D-glukopiranozil-4-hidroksimedikarpin izole edilmiş ve NMR ve MS yardımıyla yapı tayini yapılmıştır (Shaker ve ark., 2004).

O. sicula'nın etanol ekstresinin metanolde çözünen fraksiyonundan formononetin, aserosin, maakiain-3-*O*- β -D-glukozit (trifolirhizin) ve medikarpin-3-*O*- β -D-glukozit izole edilmiş ve bileşiklerin fiziksel, kimyasal ve spektroskopik verileri değerlendirilerek yapı tayini yapılmıştır (Kassem, 2007).

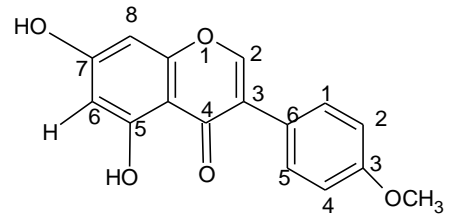
Taze bitkisel materyalin yüzeyinde biriken flavonoit türevi bileşiklerin araştırıldığı bir çalışmada, *O. tridentata* L., *O. fruticosa* L. ve *O. natrix*'in yüzeyinde birikmiş lipofilik bileşikler aseton kullanılarak alınmış ve çözücü uçurularak ekstre elde edilmiştir.

Fraksiyonlama ve saflaştırma sonucunda, *O. fructicosa*'da flavon türevlerinden, apigenin, genkvanin, akasetin, apigenin-7,4'-dimetil eter, pektolinarigenin, salvigenin, luteolin, luteolin-7-metileter; flavonol türevlerinden, kersetin, kersetin-3-glukozit; *O. natrix*'te flavon türevlerinden, apigenin, pektolinarigenin, luteolin-7-metil eter, ksantomikrol, nevadensin, nepetin, hipolaetin-8,3',4'-trimetileter, sideritiflavon, aserosin, 5,4'-dihidroksi-6,7,8,3'-tetrametoksi flavon, himenoksin, agekorinin D; *O. tridentata*'da ise flavon türevlerinden, sirsimaritin, salvigenin, luteolin, luteolin-7-metil eter, krizoeriol, velutin, nepetin, jaseosidin, sirsilineol, 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon, 5,4'-dihidroksi-6,7,8,3'tetrametoksiflavon tespit edilmiştir (Wollenweber ve ark., 2003).

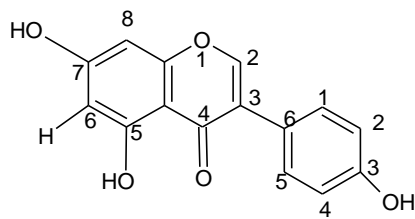




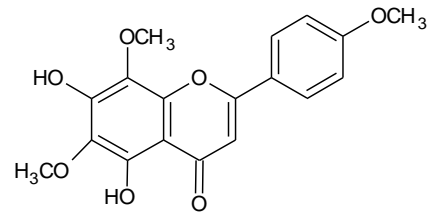
Formononetin



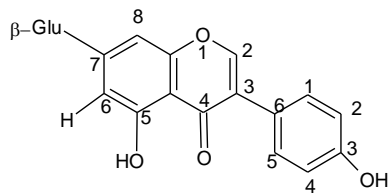
Biokanin A



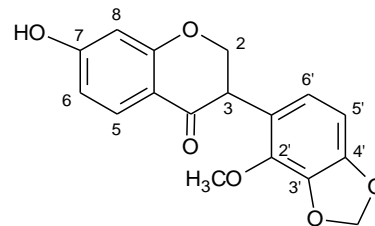
Genistein



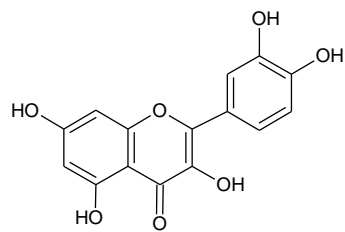
Nevadensin



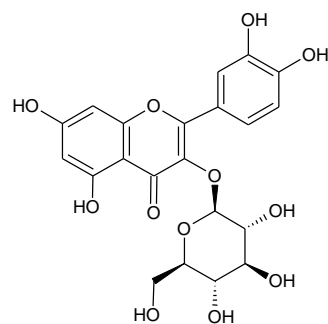
Genistin



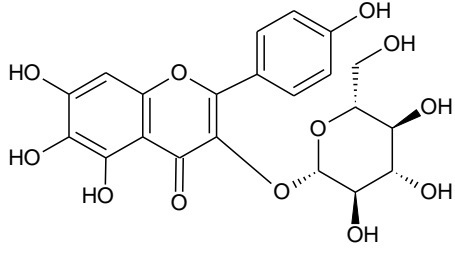
Onogenin



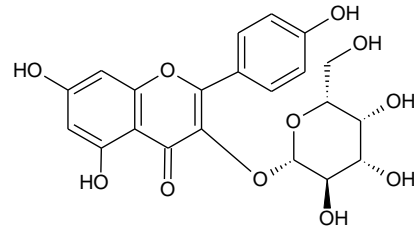
Kersetin



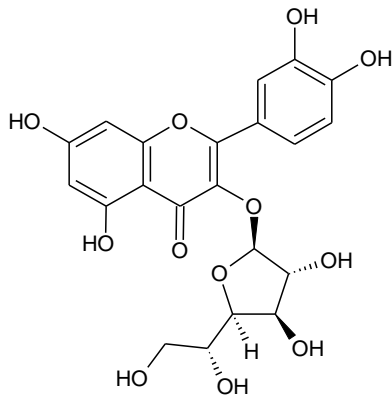
Kersetin-3-glukozit



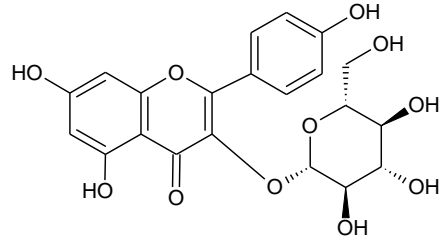
6-hidroksikemferol-3-glukozit



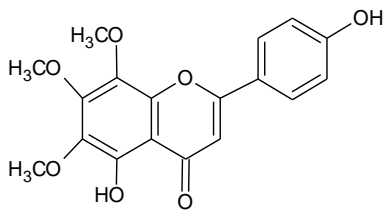
Trifolin



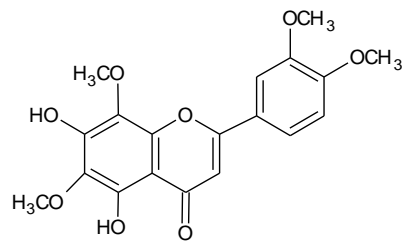
İzokersitrin



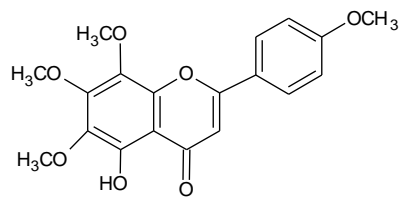
Astragalin



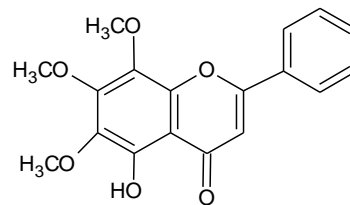
Ksantomikrol



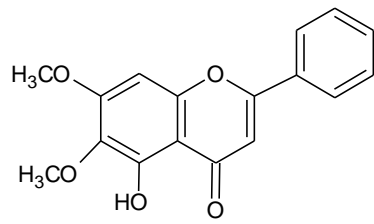
Himenoksin



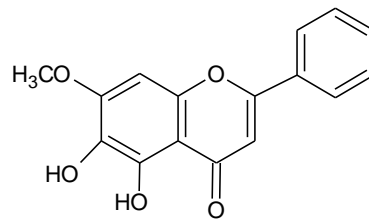
Gardenin B



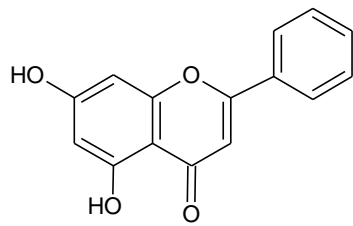
Alnetin



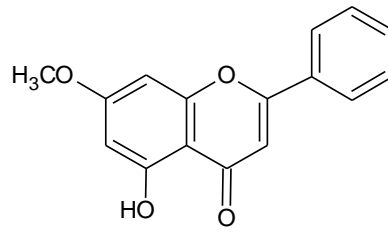
6,7-di-O-metilbaikalein



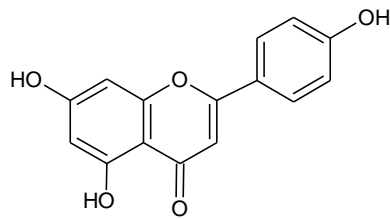
Negletein



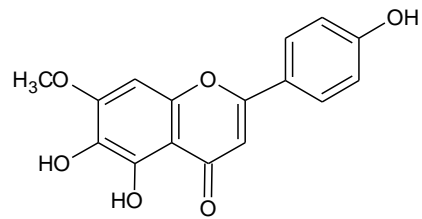
Krizin



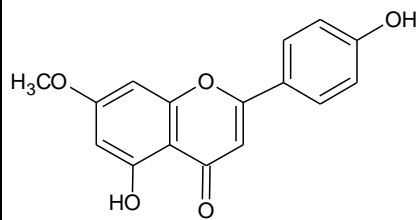
Tetrokrizin



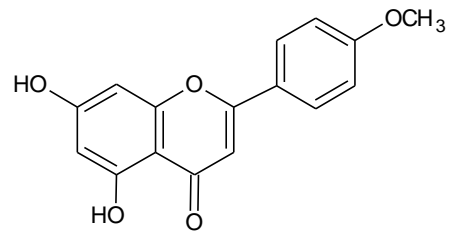
Apigenin



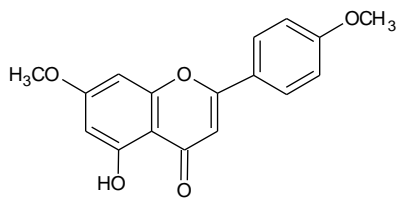
Sorbifolin



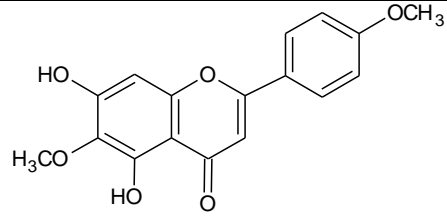
Genkvanin



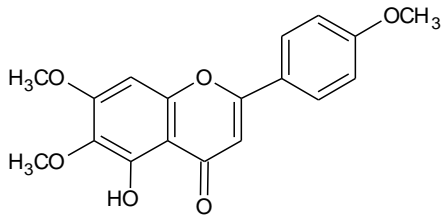
Akasetin



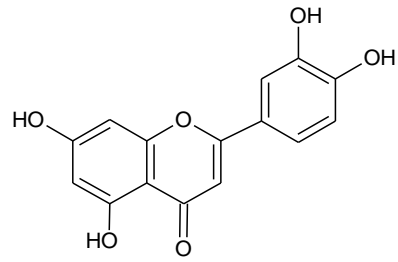
Apigenin-7,4'-dimetil eter



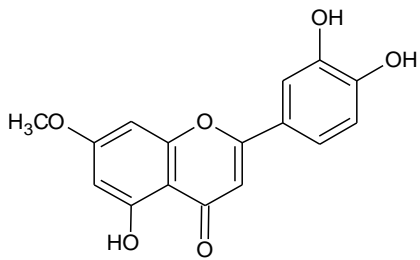
Pektolinarigenin



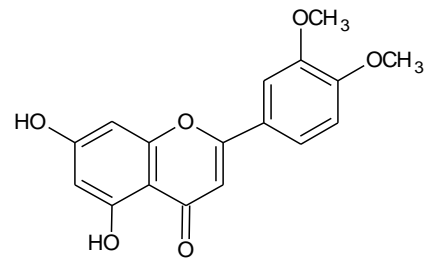
Salvigenin



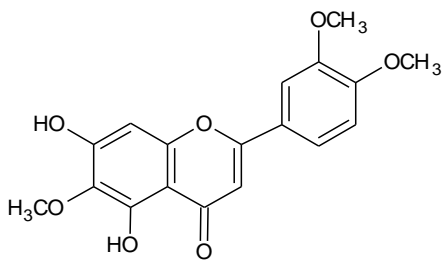
Luteolin



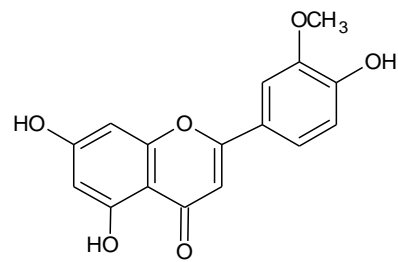
Luteolin-7-metileter



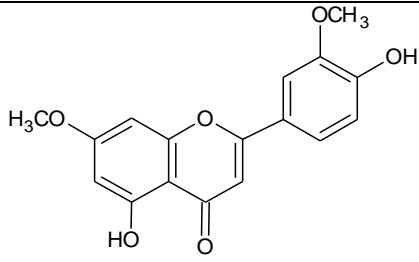
Luteolin-3',4'-dimetileter



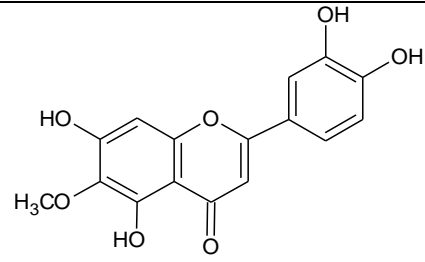
Eupatilin



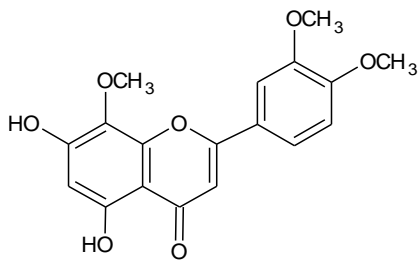
Krizoeriol



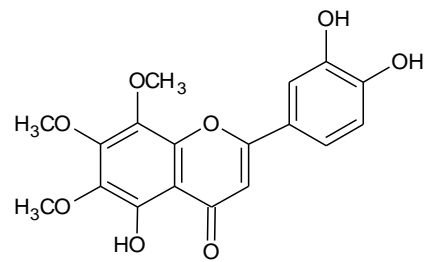
Velutin



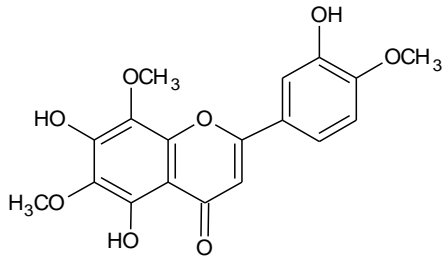
Nepetin



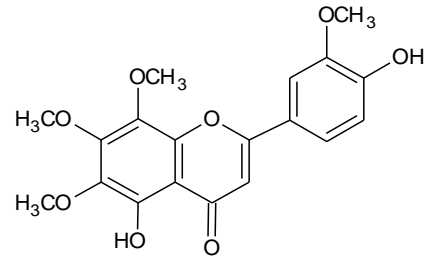
Hipolaetin-8,3',4'-trimetileter



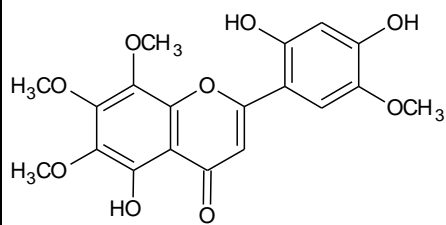
Sideritiflavon



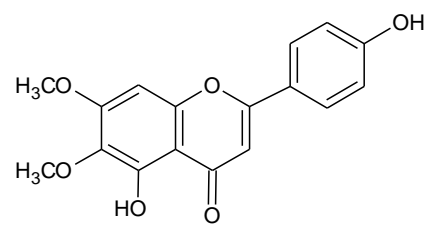
Aserosin



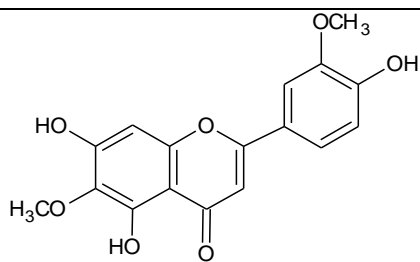
5,4'-dihidroksi-6,7,8,3'-tetrametoksi flavon



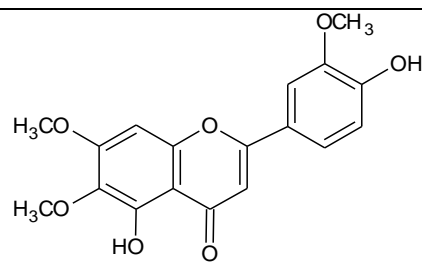
Agekorinin D



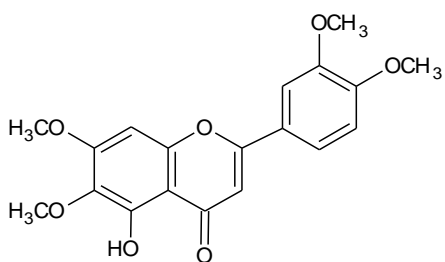
Sirsimaritin



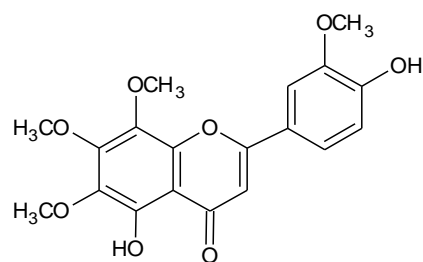
Jaseosidin



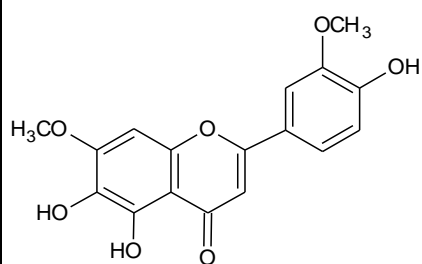
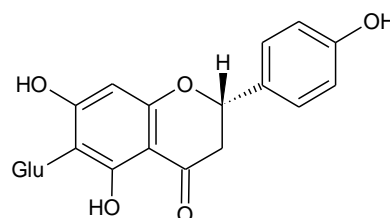
Sirsilineol



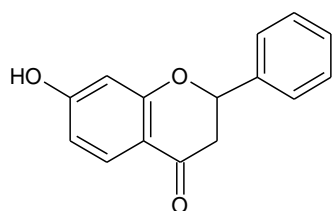
5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon



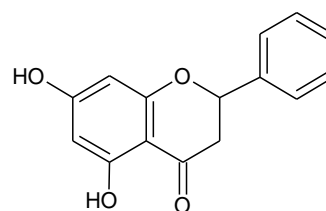
5,4'-dihidroksi-6,7,8,3'-tetrametoksiflavon

5,6,4'-trihidroksi-7,3'-
dimetoksidi-metoksiktetrametoksiflavon

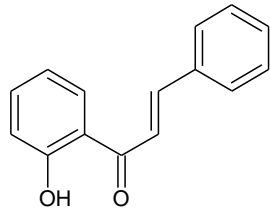
Hemifolin



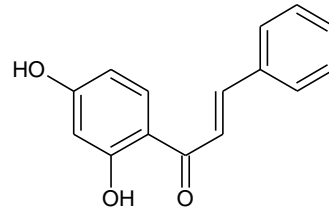
7-hidroksiflavanon



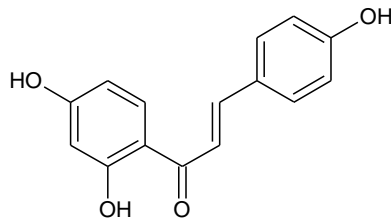
5,7-dihidroksiflavanon



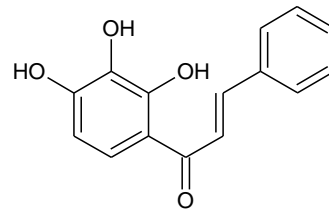
2'-hidroksikalkon



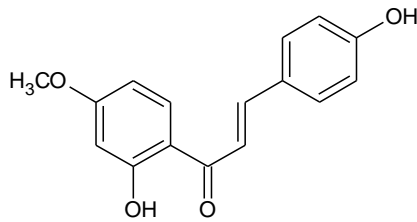
2',4'-dihidroksikalkon



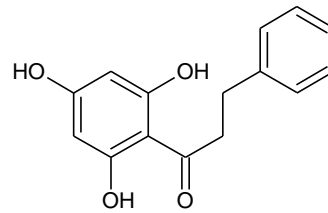
4,2',4'-trihidroksikalkon



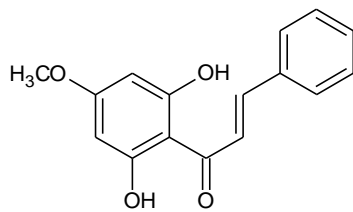
2',3',4'-trihidroksikalkon



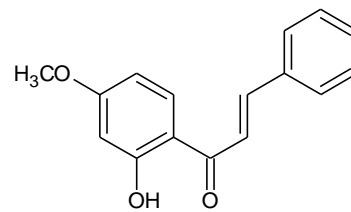
2',4',6'-trihidroksidihidrochalcone



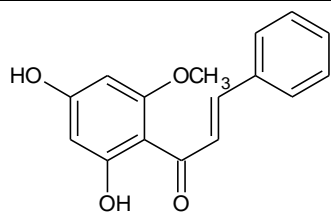
4,2'-dihidroksi-4'-metoksikalkon



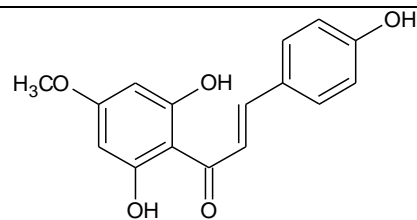
2',6'-dihidroksi-4'-metoksikalkon



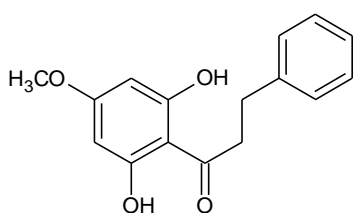
2'-hidroksi-4'-metoksikalkon



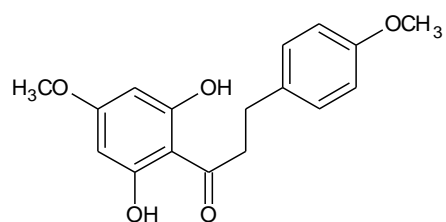
2',4'-dihidroksi-6'-metoksikalkon



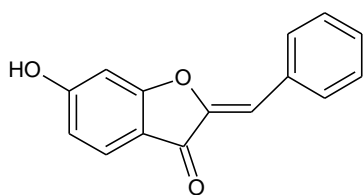
4,2',6'-trihidroksi-4'-metoksikalkon



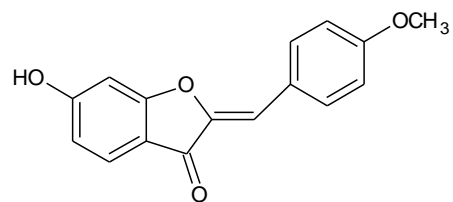
2',6'-dihidroksi-4'-metoksidihidrokalkon



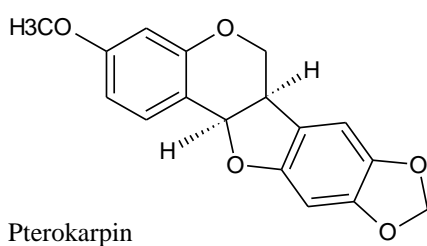
2',6'-dihidroksi-4,4'-dimetoksidihidrokalkon



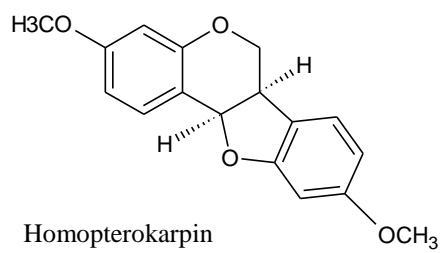
6-hidroksiauron



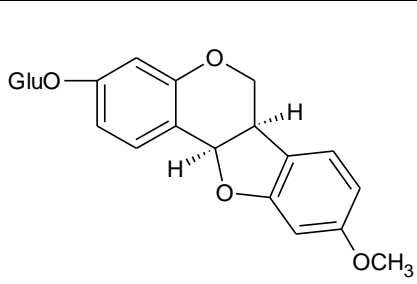
6-hidroksi-4'-metoksiauron



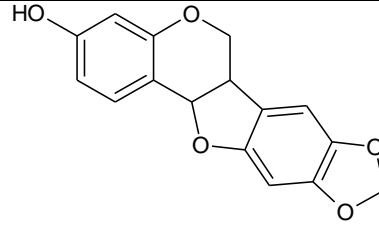
Pterokarpin



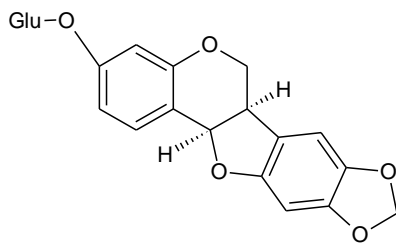
Homopterokarpin



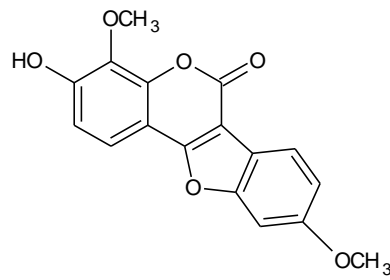
7-demetoksi-7-D-(glukoziloksi)- homopterokarpin



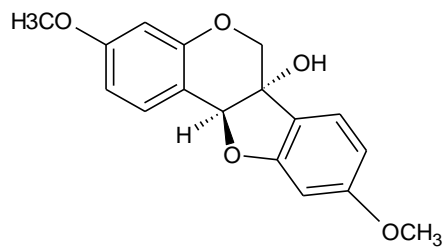
Maakiain



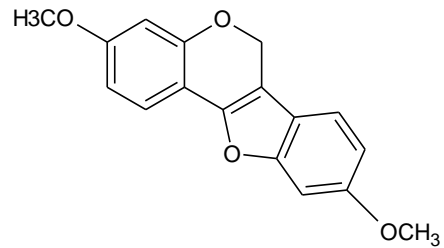
Trifolirhizin



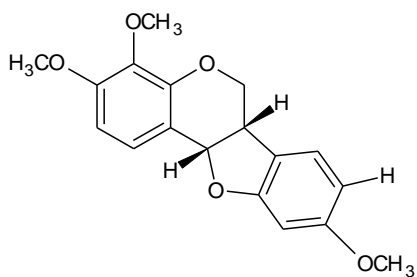
3-hidroksi-4,9-dimetoksikumestan



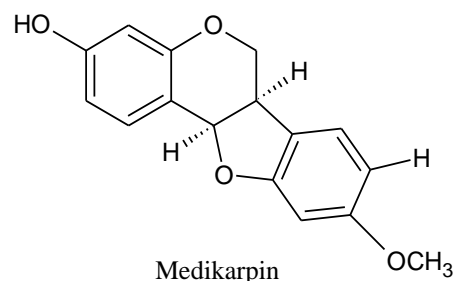
Variabilin



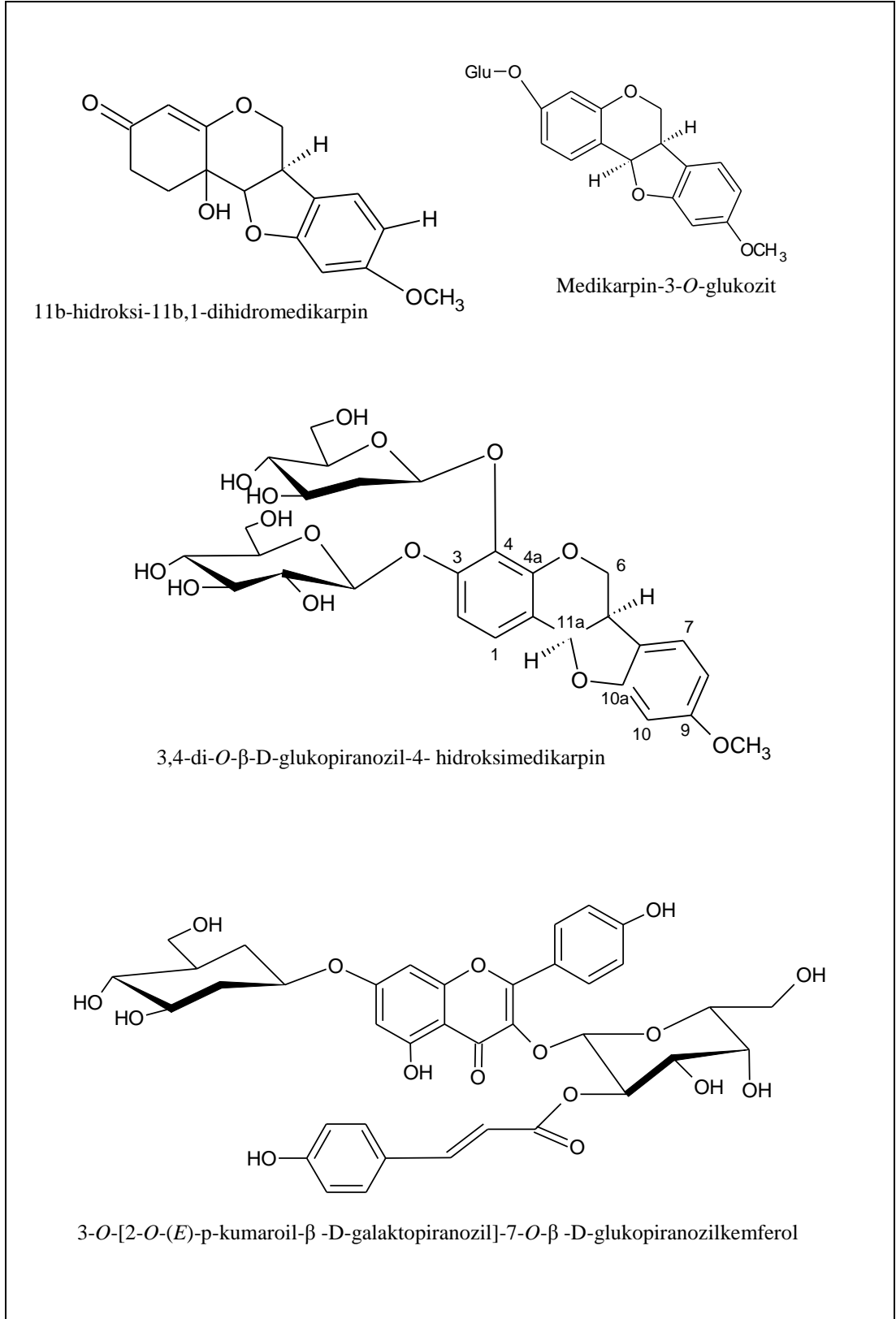
Anhidrovvariabilin



3,4,9-trimetoksipterokarpin



Medikarpin



Şekil 1.6. *Ononis* L. türlerinde bulunan flavonoitler

1.5.3. Kumarinler

O. natrix bitkisi ile yapılan bir çalışmada, (3R)-8-hidroksi-6-metoksi-3-undesil-3,4-dihidroizokumarin (**1**) izole edilmiş ve maddenin yapısı NMR, MS ve IR spektrumlarından yararlanılarak aydınlatılmıştır (San Feliciano ve ark., 1983).

Soxhlet ekstraksiyonuyla *O. natrix*'ten hazırlanan *n*-hekzan ekstresi kullanılarak yapılan bir çalışmada dihidroizokumarin türevi bileşikler izole edilmiştir. Bu bileşiklerin, (3R)-6,8-dihidroksi-3-undesil-3,4-dihidroizokumarin (**2**), (3R)-6,8-dihidroksi-3-(6-oksoundesil)-3,4-dihidroizokumarin (**3**), (3R)-6,8-dihidroksi-3-(6-hidroksiundesil)-3,4-dihidroizokumarin (**4**), (3R)-8-hidroksi-6-metoksi-3-(6-oksoundesil)-3,4-dihidroizokumarin (**5**), (3R)-8-hidroksi-6-metoksi-3-(6-hidroksiundesil)-3,4-dihidroizokumarin (**6**), (3R)-6,8-dimetoksi-3-undesil-3,4-dihidroizokumarin (**7**), (3R)-6,8-dimetoksi-3-(6-oksoundesil)-3,4-dihidroizokumarin (**8**), (3R)-6,8-diasetoksi-3-(6-asetoksiundesil)-3,4-dihidroizokumarin (**9**), (3R)-8-hidroksi-3,6-dimetoksi-3-undesil-3,4-dihidroizokumarin olduğu belirlenmiştir (San Feliciano ve ark., 1990).

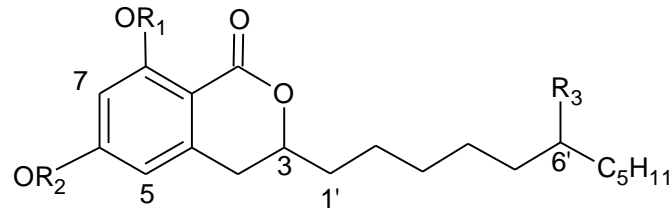
O. natrix subsp. *hispanica*'nın toprak üstü kısımlarının *n*-hekzan ekstresi üzerinde yapılan çalışmada (3R)-6,8-dihidroksi-3-(6-oksoundesil)-3,4-dihidroizokumarin, (3R)-8-hidroksi-6-metoksi-3-undesil-3,4-dihidroizokumarin, (3R,6'S)-6,8-dihidroksi-3-(6-hidroksiundesil)-3,4-dihidroizokumarin izole edilmiştir (Barrero ve ark., 1990). Başka bir çalışmada da, yine *O. natrix*'in toprak üstü kısımlarından kloroformla hazırlanan ekstreden 8-hidroksi-6-metoksi-3-undesil-3,4-dihidroizokumarin izole edilmiştir (Al-Khalil, 1995a).

O. viscosa subsp. *brevifolia*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan kloroformla ekstreden (3R)-8-hidroksi-6-metoksi-3-undesil-3,4-dihidroizokumarin, (3S)-8-hidroksi-6-metoksi-3-(7-oksiundesil)-3,4-dihidroizokumarin, (3R)-8-hidroksi-6-metoksi-3-(11-hidroksiundesil)-3,4-dihidroizokumarin, (3R)-8-hidroksi-6-metoksi-3-(6-hidroksi-5-oksoundesil)-3,4-dihidroizokumarin, (3R)-8-hidroksi-6-metoksi-3-(6-

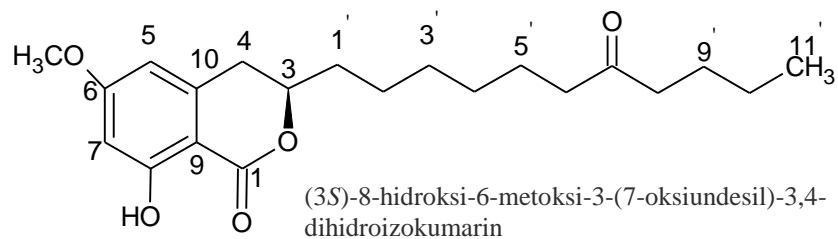
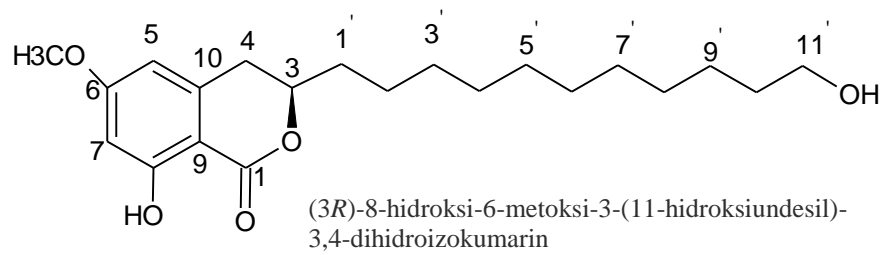
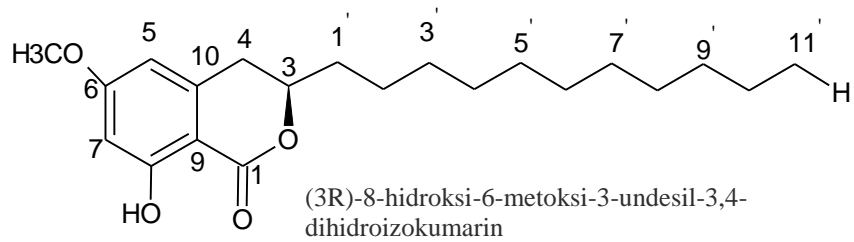
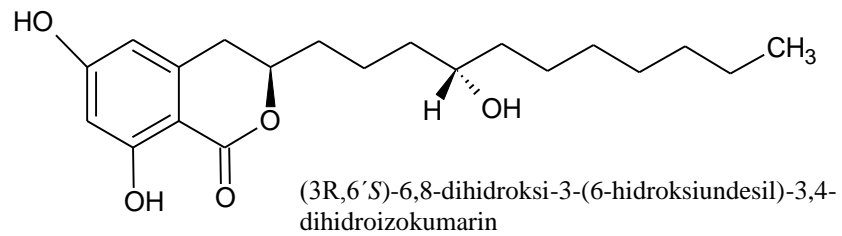
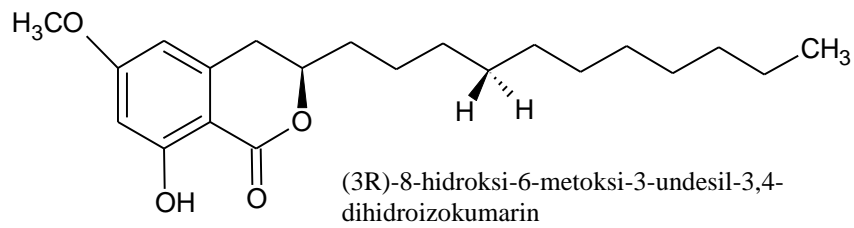
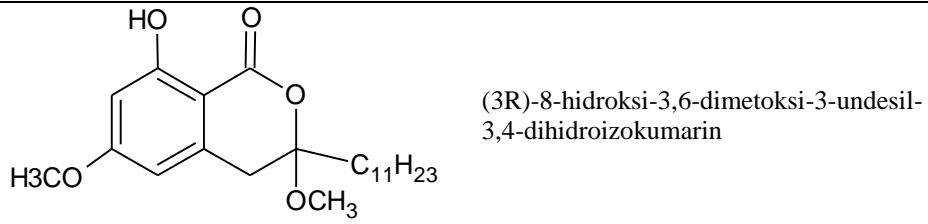
hidroksi-5-oksotridesil)-3,4-dihidroizokumarin bileşikleri izole edilmiştir (Barrero ve ark., 1994a).

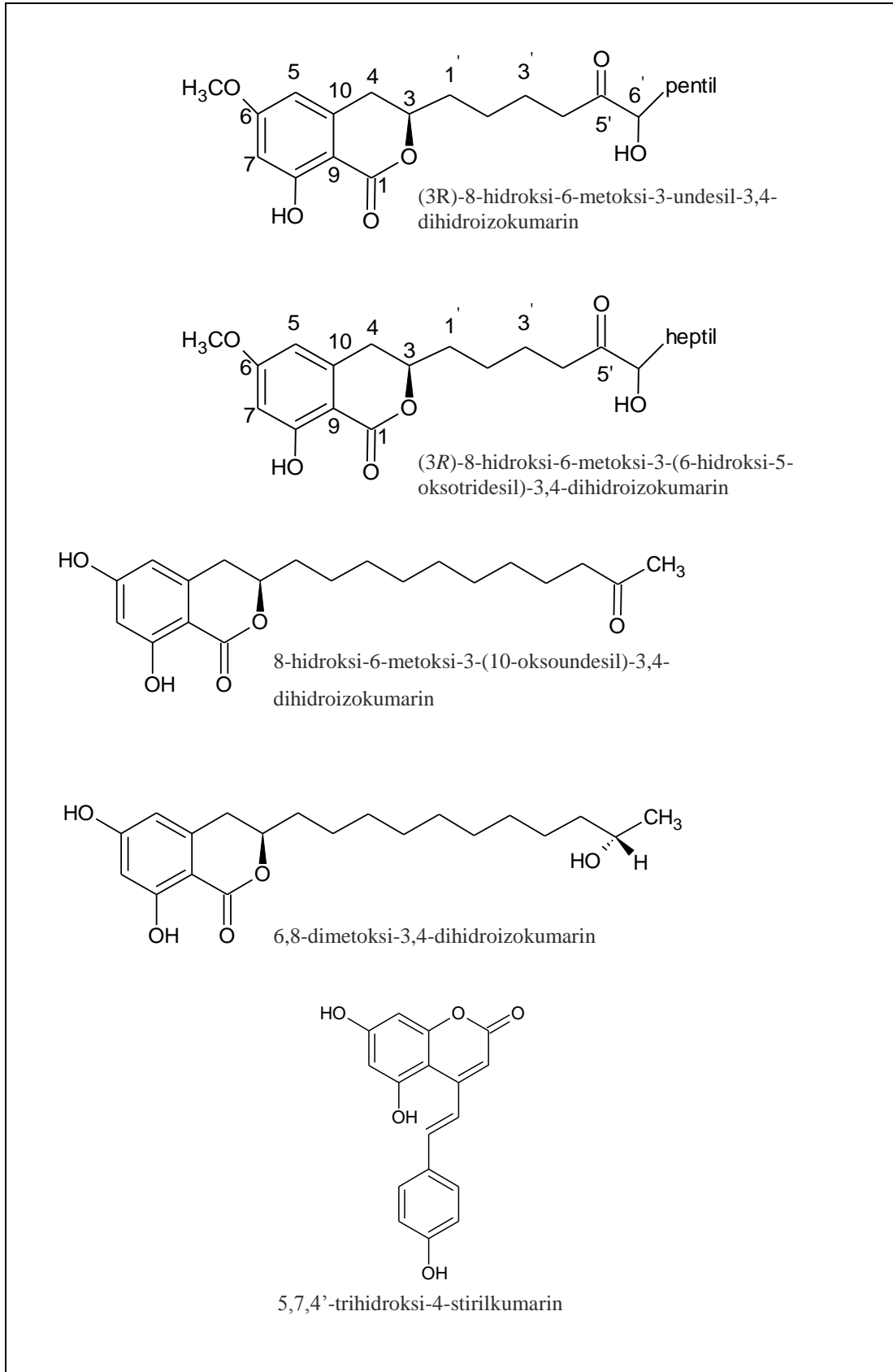
O. pubescens'in toprak üstü kısımları üzerinde yapılan bir çalışmada, bitkisel materyal kloroform ile Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulmuş ve elde edilen ekstreden 8-hidroksi-6-metoksi-3-(10-oksoundesil)-3,4-dihidroizokumarin, 6,8-dimetoksi-3,4-dihidroizokumarin gibi izokumarin türevi bileşikler izole edilmiştir (Barrero ve ark. 1994b).

O. vaginalis'in kurutulmuş köklerinin etanol ile hazırlanan ekstresinin partisiyonu ile elde edilen eter fraksiyonundan 5,7,4'-trihidroksi-4-stirilokumarin izole edilmiş ve bileşiğin yapısı IR, MS ve NMR teknikleri yardımıyla aydınlatılmıştır (Abdel-Kader, 2001).



	R ₁	R ₂	R ₃
1	H	CH ₃	H
2	H	H	H
3	H	H	O=
4	H	H	OH
5	H	CH ₃	O=
6	H	CH ₃	OH
7	CH ₃	CH ₃	H
8	CH ₃	CH ₃	O=
9	Ac	Ac	OAc





Şekil 1.7. *Ononis L.* türlerinde bulunan kumarinler

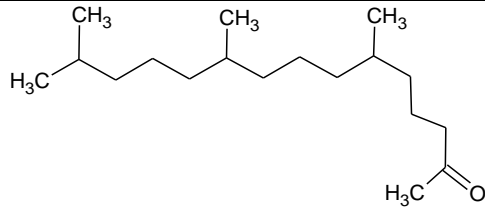
1.5.4. Uçucu Bileşikler

O. viscosa subsp. *brevifolia*'dan su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın GC-MS analizi sonucunda tespit edilen 40 kadar bileşik arasında majör olarak, heksahidrofarnesilaseton, karvakrol, laurik asit, nonanal, (*E*)-geranilaseton, dodekanal olduğu görülmüştür (Erdemgil ve ark., 2002).

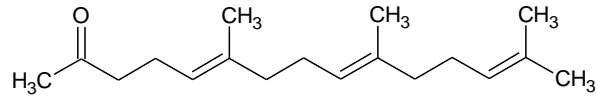
Fas'tan toplanmış olan *O. natrix*'in toprak üstü kısımlarından su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın GC-MS analizi sonucunda, uçucu yağın majör bileşeninin kafur (%16,2) olduğu, bununla beraber, seskiterpenler bakımından oldukça zengin olduğu ve temel bileşenlerin β -karyofilen (%9), β -farnesen (%6,5), γ -murolen (%6,6) olduğu tespit edilmiştir (Khallouki ve ark., 2002). Yine Fas'tan toplanan *O. natrix* ile yapılan bir çalışmada, bitkiden su distilasyonu ile uçucu yağ elde edilmiş ve GC-MS ile uçucu yağ içeriği tespit edilmiştir. Uçucu yağın bileşeninde temel bileşikler olarak farnesilaseton (%27,3), geranilaseton (%20,3), timol (%13,7) ve kafur (%5,5) bulunduğu görülmüştür (Elamrani ve Benaissa, 2010).

Başka bir çalışmada, Ürdün'den toplanmış olan *O. natrix* ve *O. sicula* türlerinin uçucu yağ bileşimlerinin GC ve GC-MS ile incelendiği bir çalışmada; *O. sicula*'dan elde edilen uçucu yağda majör olarak selin-11-en-4- α -ol (%12,76) ve α -selinen (%6,27) bulunurken, *O. natrix*'in uçucu yapında majör olarak (2E, 6E) farnesol (%18,83), dodekanal (%12,58) ve 2-feniletiltiglat (%5,2) tespit edilmiştir (Al-Qudah ve ark., 2014).

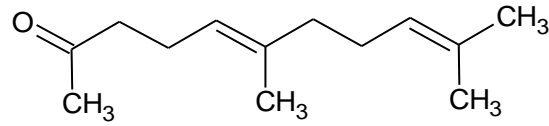
O. angustissima'dan buhar distilasyonu yoluyla elde edilen uçucu yağın, GC ve GC-MS analizinde, yağın temel bileşenlerinin *trans*-fitol (%17,4), β -ödesmol (%7,5), Z,Z-farnesol olduğu bulunmuştur (Youcef ve ark., 2014).



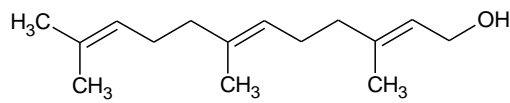
Hekzahidrofarnesilaseton



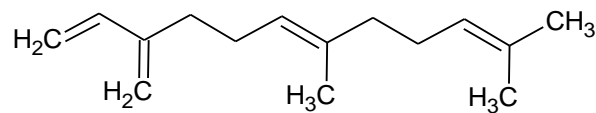
Farnesilaseton



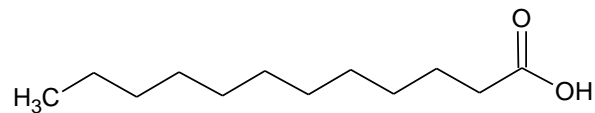
Geranil aseton



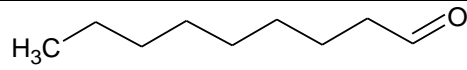
(2E, 6E) farnesol



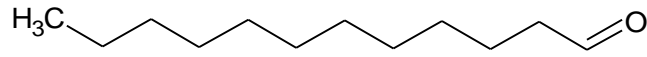
(Z)-β-farnesen



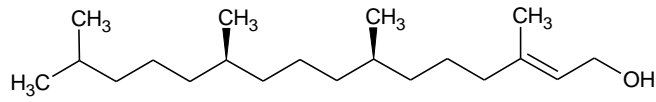
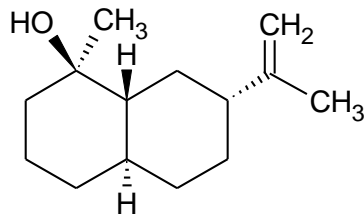
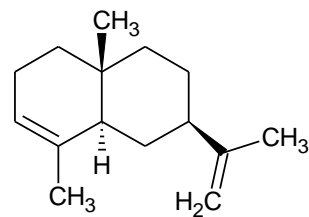
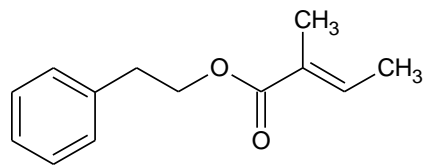
Laurik asit



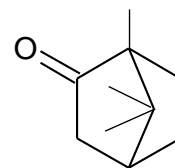
Nonanal



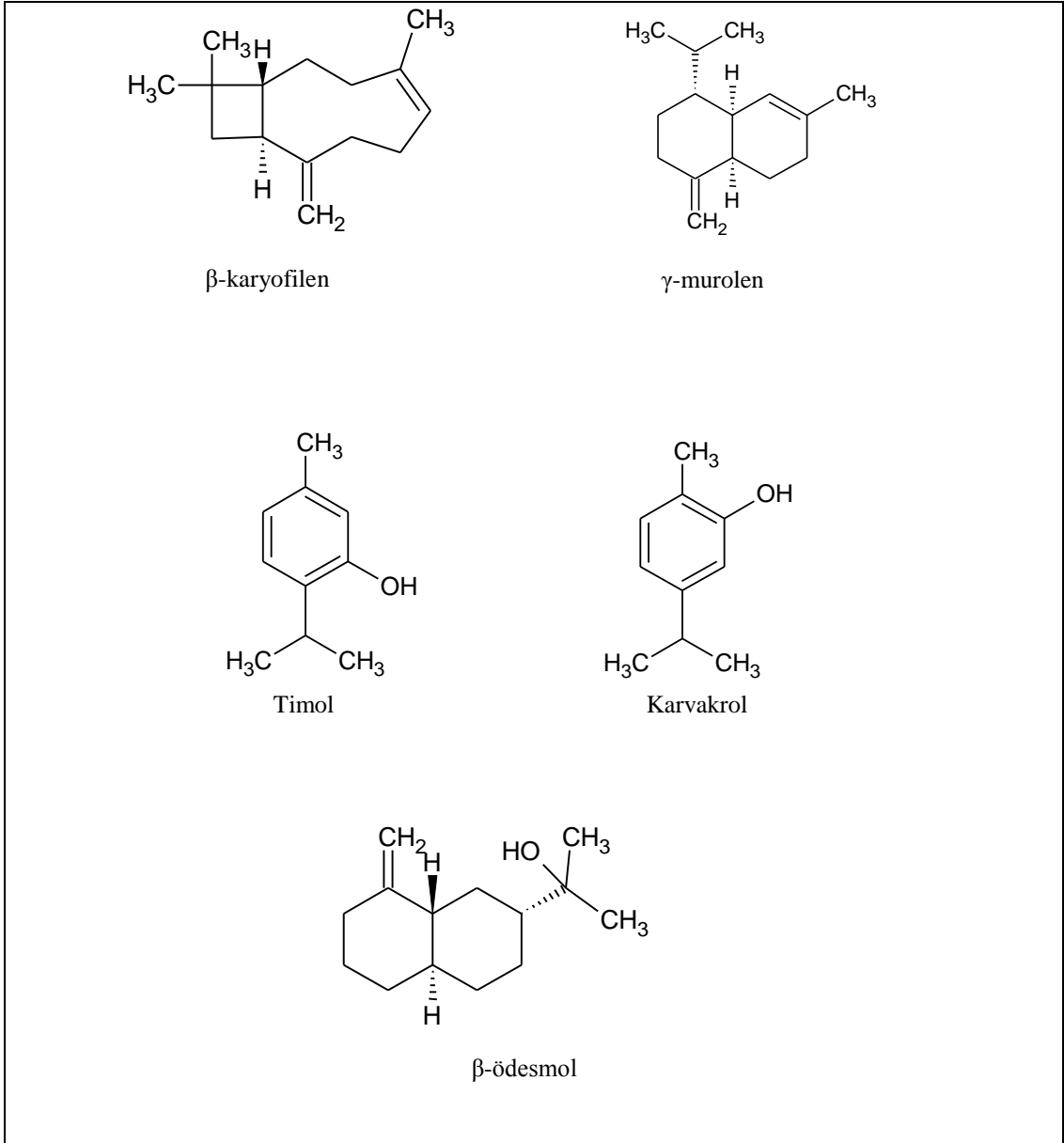
Dodekanal

*trans*-fitolSelin-11-en-4- α -ol α -selinen

2-feniletigtlat



Kafur



Şekil 1.8. *Ononis L.* türlerinde bulunan uçucu bileşikler

1.5.5. Diğer Bileşikler

Asit hidrolizi yapılmış *O. spinosa* ekstresi ile yapılan ultra performanslı sıvı kromatografisi sonucunda ekstrenin *p*-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, sirinjik asit ve *p*-kumarik asit içerdiği tespit edilmiştir (Klejdus, 2008).

O. spinosa subsp. *leiosperma*'nın köklerinden hazırlanan metanol ekstresinden, bir glukozit olan spinonin elde edilmiş, NMR ve MS teknikleri yardımıyla yapı tayini yapılmıştır (Kırmızıgül ve ark., 1997).

O. natrix bitkisi ile yapılan bir çalışmada, poliketit türevi bileşikler izole edilmiştir. Bu bileşiklerden birinin yapısı 5-(2-asetoksitridesil)-3-metoksifenol olarak tespit edilmiş ve diğer iki türevin bu bileşiğin asetilasyon ve redüksiyon ürünü olduğu saptanmıştır (San Feliciano ve ark., 1983).

Barrero ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada (1990), *O. natrix* subsp. *hispanica*'nın toprak üstü kısımlarından *n*-hekzan ile hazırlanan ekstreden yağ asitleri; miristik asit, palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, *N*- Δ -dokosenoilantranilik asit, (2'*R*)-6-(2-asetoksitridesil)-2-hidroksi-4-metoksibenzoik asit izole edilmiştir. Aynı çalışmada; ekstreden rezorsinol türevi bileşikler; (2'*R*)-5-(2-asetoksitridesil)rezorsinol metil eter, (2'*R*)-5-(2-asetoksitridesil)rezorsinol, (2'*R*)-5-(2-hidroksitridesil)rezorsinol metil eter, (2'*R*,8'*S*)-5-(2,8-dihidroksitridesil) rezorsinol, (2'*R*,8'*S*)-5-(2,8-dihidroksitridesil)rezorsinol metil eter, (2'*R*)-5-(2-hidroksi-8-oksitridesil)rezorsinol izole edilmiştir.

Canedo ve ark. tarafından (1997) yapılan çalışmada, *O. natrix*'ten *n*-hekzan ile hazırlanan ekstreden 5-alkilrezorsinol türevi bileşikler elde edilmiştir. Yapıları ise; 1-*O*-metil-5-(2-asetoksitridesil)rezorsinol (1), 1-*O*-metil-5-(2-asetoksi-8-oksotridesil)rezorsinol (2), 1-*O*-metil-5-(2-asetoksi-8-hidroksitridesil)rezorsinol (3), 1-*O*-metil-5-(2-hidroksitridesil)rezorsinol (4), 1-*O*-metil-5-(2-hidroksi-8-oksotridesil)rezorsinol (5), 1-*O*-metil-5-(2,8-dihidroksitridesil) rezorsinol (6), 5-(2-asetoksitridesil)rezorsinol (7), 5-(2-asetoksi- 8-oksotridesil)rezorsinol (8), 5-(2-asetoksi- 8-didroksitridesil)rezorsinol (9), 5-(2-hidroksi- 8-oksotridesil)rezorsinol (10), 5-(2,8-dihidroksitridesil)rezorsinol (11) olarak tayin edilmiştir.

Al-Khalil tarafından (1995a) yapılan çalışmada, *O. natrix*'in toprak üstü kısımlarının kloroformlu ekstresinden *N*-araşidilantranilik asit saflaştırılmıştır.

O. natrix subsp. *ramosissima* üzerinde yapılan çalışmada, yine rezorsinol türevi bileşiklerden 5-(2-asetoksi-8-oksotridesil)rezorsinol ve 5-(2-asetoksi-7-hidroksi-8-oksotridesil)rezorsinol izole edilmiştir. Aynı çalışmada fenil propanoit yapısında olan kavikol β -D-glukozit ve poliprenol yapısındaki betulaprenol-6 izole edilmiştir (Barrero ve ark., 1997).

O. viscosa'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanmış kloroform ekstresinde (2'R,12'S)-5-(2-asetoksi-12-hidroksitridesil)rezorsinol, (2'R,12'S)-6-(2-asetoksi-12-hidroksitridesil)-2,4-dihidroksibenzoik asit, (2'R,12'S)-6-(2,12-diasetoksi-tridesil)-2,4-dihidroksibenzoik asit tespit edilmiştir (Barrero ve ark., 1991). Başka bir çalışmada *O. viscosa* subsp. *brevifolia*'nın toprak üstü kısımlarının kloroform ekstresinden 5-(13-hidroksitridesil)-1-O-metilrezorsinol, (2'R)-5-(2,13-dihidroksitridesil)rezorsinol, (2R)-5-(2-asetoksi-13-hidroksitridesil)-1-O-metilrezorsinol, (10'R)-5-(10-hidroksitridesil)-1-O-metilrezorsinol, (2'R,8'S)-5-(2-asetoksioksitridesil) rezorsinol, (2'R)-1,3-di-O-asetil-5-(2-asetoksi-8-oksioksitridesil)rezorsinol, (2'R)-1-O-asetil-5-(2,8-diasetoksitridesil)-3-O-metilrezorsinol izole edilmiştir. Aynı çalışmada, ekstreden izole edilen alkil bezoik asit türevlerinden metil-2-hidroksi-4-metoksi-6-(2-oksitridesil)benzoat, metil(2'R)-6-(2-asetoksi-13-hidroksitridesil)-2-hidroksi-4-metoksibenzoat, metil(2'R)-6-(2-asetoksitridesil)-2-hidroksi-4-metoksibenzoatın ve 13'-dokosenoilantranilik asidin yapıları aydınlatılmıştır (Barrero ve ark., 1994a). Aynı alt tür ile yapılan diğer bir çalışmada, bitkinin kloroform ekstresinden 2-hidroksi-4-metoksi-6-(13-hidroksi-2-oksotridesil)benzoik asit izole edilmiştir (Barrero ve ark., 1998).

O. speciosa'nın çiçeklerinden hazırlanan ekstreden 6-(pentadek-8Z-enil)-2,4-dihidroksibenzoik asit, 6-(10-asetoksi-pentadek-8Z-enil)-2,4-dihidroksibenzoik asit ve 5-(10-asetoksi-pentadek-8Z-enil)-rezorsinol izole edilmiştir (Barrero ve ark., 1989a). Aynı türün çiçeklerinin etanol ile hazırlanan ekstresinden aromatik lakton yapısında olan spesionin ile glukozitleri spesiozot A ve B izole edilmiştir (Barrero ve ark., 1989b).

Başka bir çalışmada *O. pubescens*'in toprak üstü kısmından da rezorsinol türevi bileşikler izole edilmiştir (Barrero ve ark., 1994b).

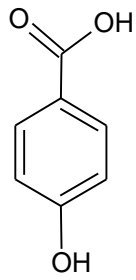
O. vaginalis'in çiçeklerinden hazırlanan etanol ekstresinin partiyonu ile elde edilen butanol fraksiyonundan norfenilpropanoit türevi bileşikler olan *trans*- ve *cis*-vajinozitol elde edilmiştir (Abdel-Kader, 1997).

O. vaginalis'in butanol ekstresinden mirkoin ve onun 7-*O*-glukopiranozitol izole edilmiştir. Yapı tayininde, bileşiklerin NMR bulgularından faydalanılmıştır (Bernhardt ve ark., 2000).

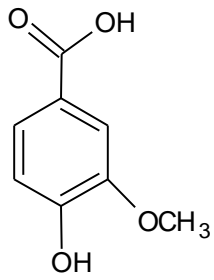
O. vaginalis'in kurutulmuş köklerinin etanol ekstresinin partiyonu ile elde edilen eter fraksiyonundan maginaldehit izole edilmiş ve bileşiğin yapısı IR, MS ve NMR teknikleri ile aydınlatılmıştır (Abdel-Kader, 2001).

O. pusilla L.'nin etil asetat ile hazırlanan ekstresinden antranilik asit türevi bileşikler olan, N-(R)-3'-hidroksidokosanoilantranilik asit, N-(R)-3'-hidroksitrikosanoil antranilik asit ve N-(R)-3'-hidroksitetrakosanoilantranilik asit izole edilmiş ve yapıları ESI-MS, NMR gibi spektroskopik teknikler ve literatürde verilen bilgilerle kıyaslanarak aydınlatılmıştır (Khouni ve ark., 2014).

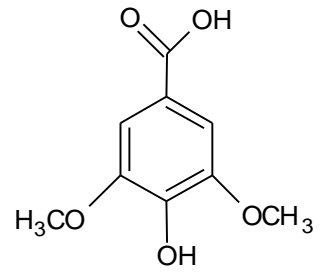
O. serrata'nın *n*-butanol ile hazırlanan ekstresi ile yapılan bir çalışmada, 9-*O*-metil spinonin ve ononitol izole edilmiştir. Bileşiklerin yapısı MS ve NMR gibi spektroskopik yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir (Amer, 2001a). Başka bir çalışmada *O. serrata*'nın etanol ekstresinden elde edilen kloroform ve etil asetat fraksiyonları birleştirilerek 2-fenoksikromon türevi bileşikler olan kapillarisin ve 6-demetoksikapillarisin elde edilmiştir. Bileşiklerin yapı tayininde kimyasal ve spektroskopik tekniklerin yanında X-ışını kırınım analizlerinden de yararlanılmıştır (Amer ve ark., 2004).



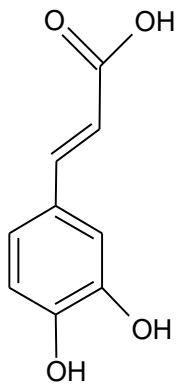
p-hidroksi
benzoik asit



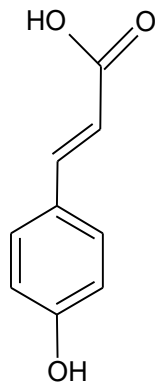
Vanilik asit



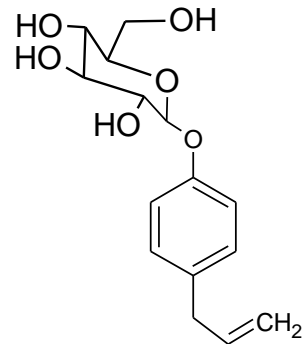
Sirinjik asit



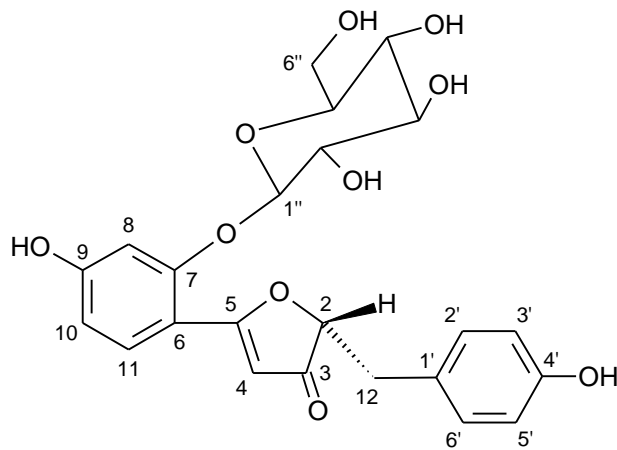
Kafeik asit



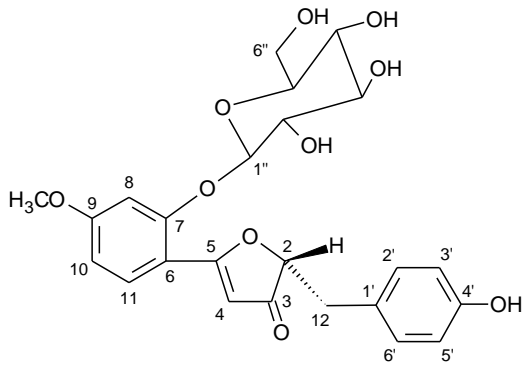
p-kumarik asit



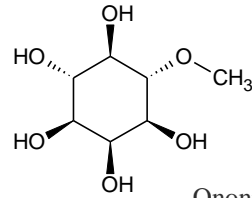
kavikol β -D-glukozit



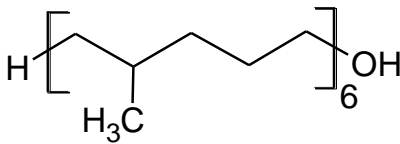
Spinonin



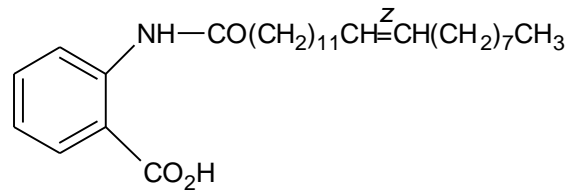
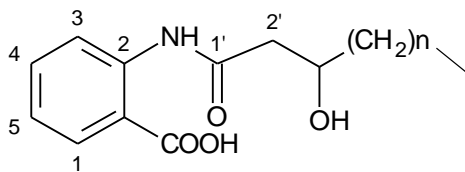
9-O-metil spinonin



Ononitol



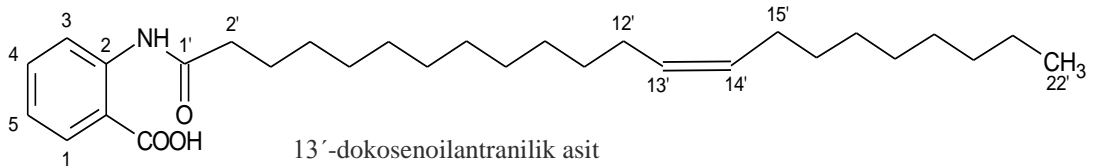
Betulaprenol-6

*N*-Δdokosenoilantranilik asit

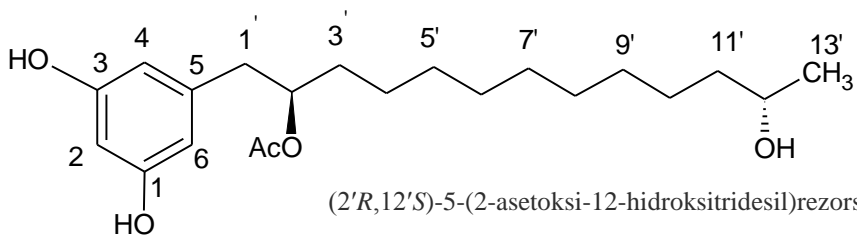
n= 17...N- 3'-hidroksitrikosanoilantranilik asit

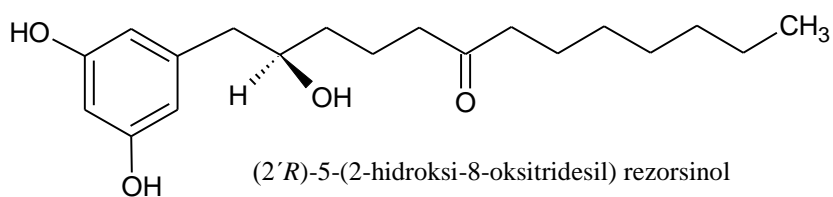
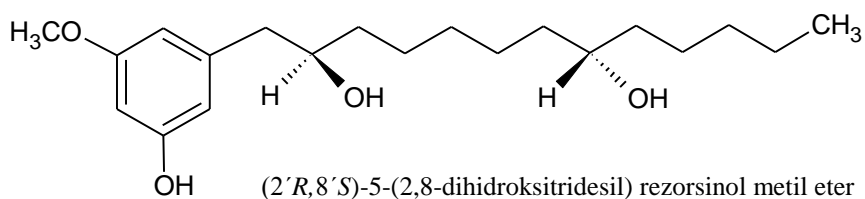
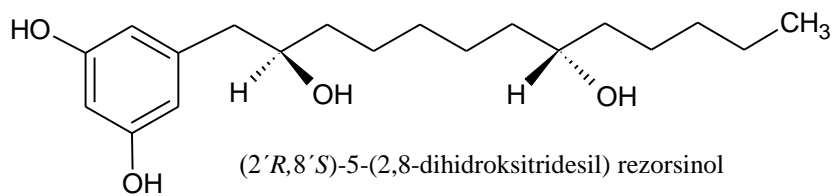
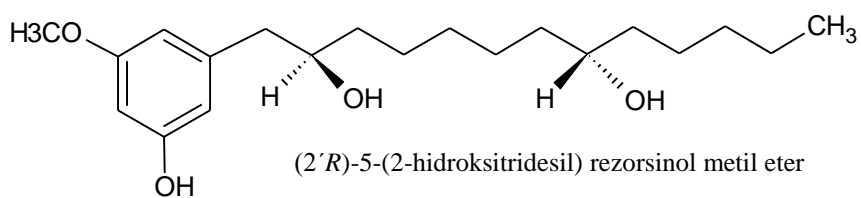
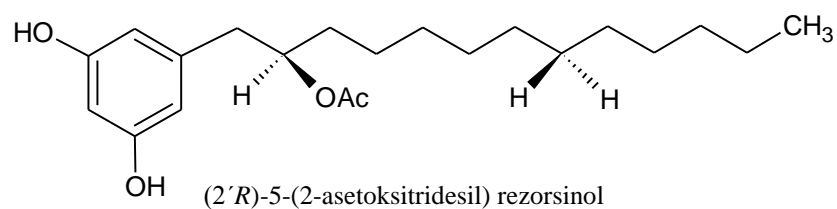
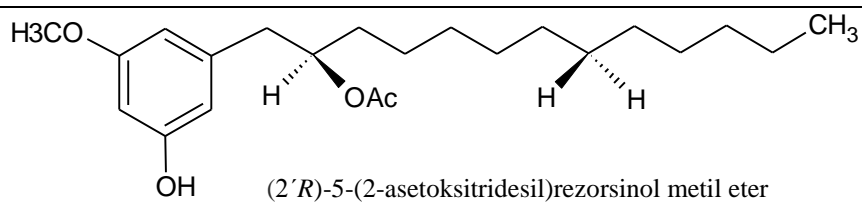
n= 18...N- 3'-hidroksidokosanoilantranilik asit

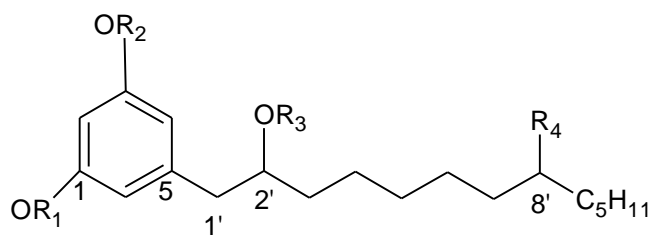
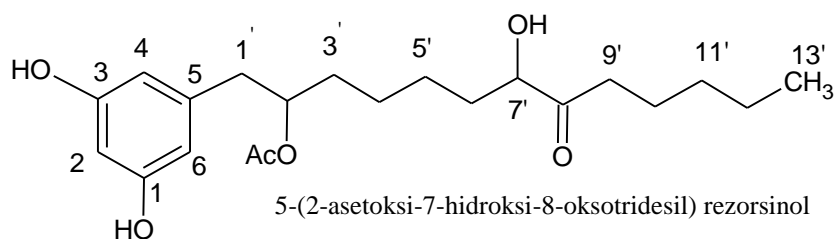
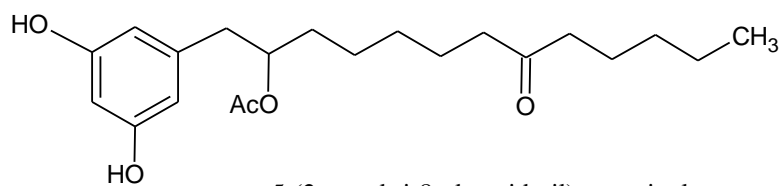
n=20...N- 3'-hidroksitetrakosanoilantranilik asit



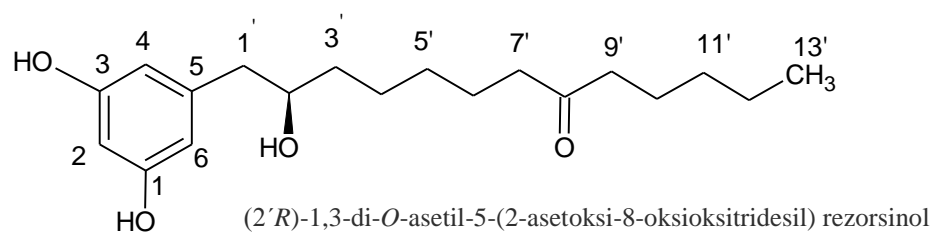
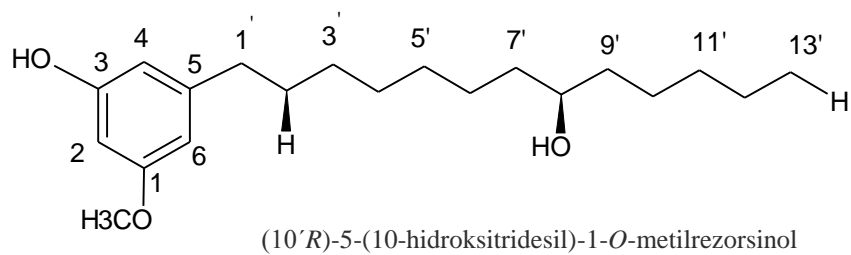
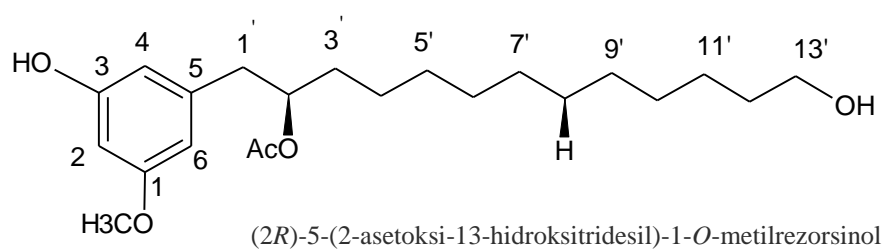
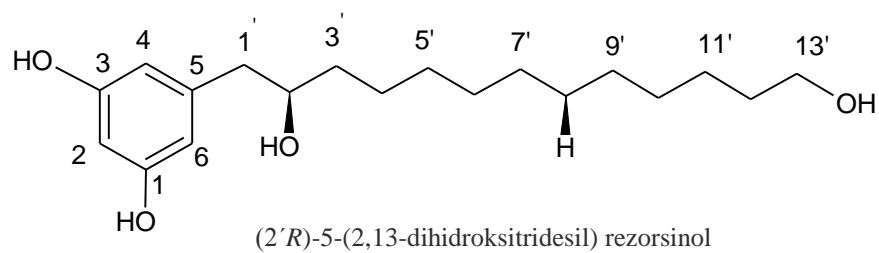
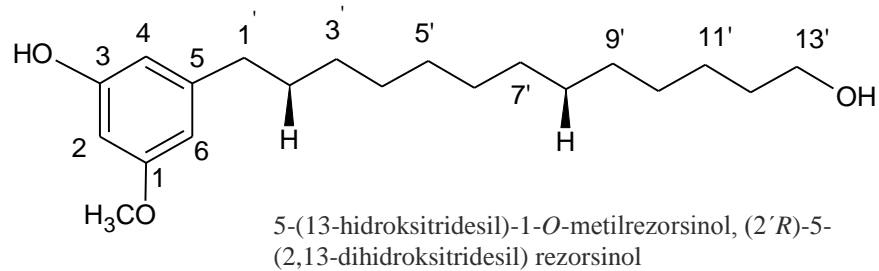
13'-dokosenoilantranilik asit

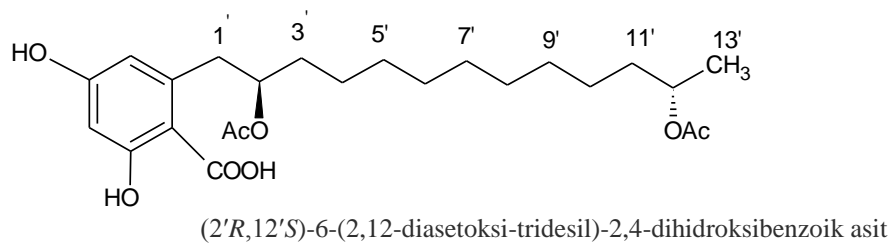
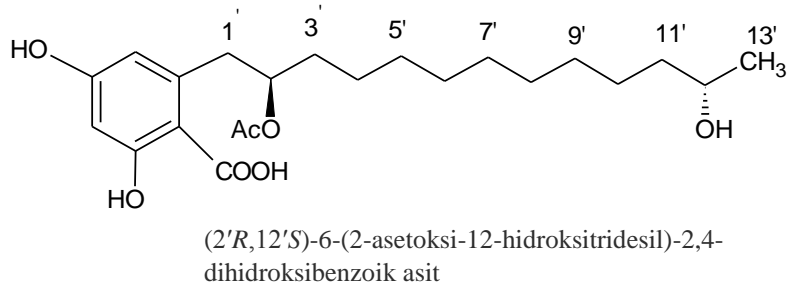
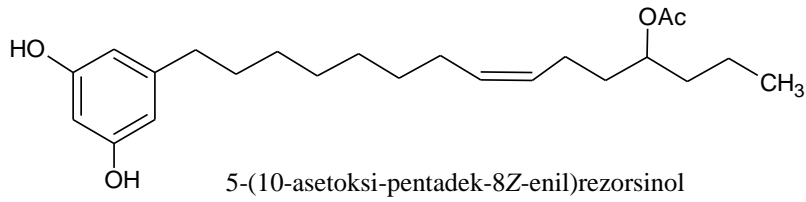
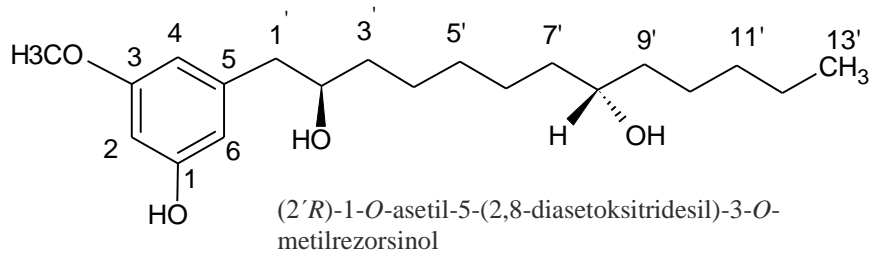
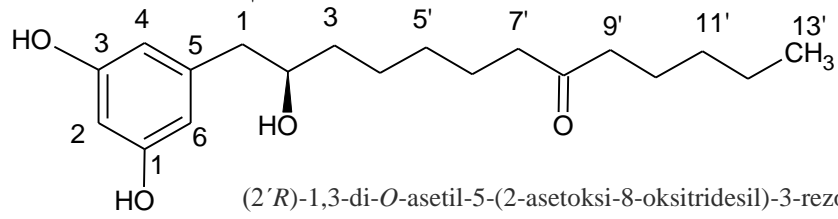
(2'*R*,12'*S*)-5-(2-asetoksi-12-hidroksitridesil)rezorsinol

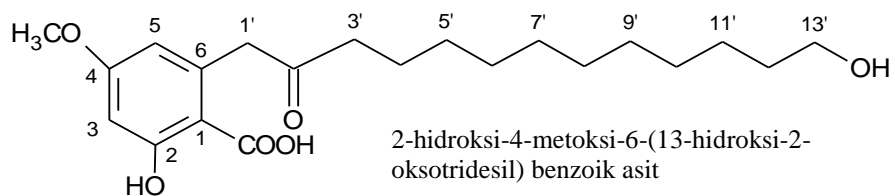
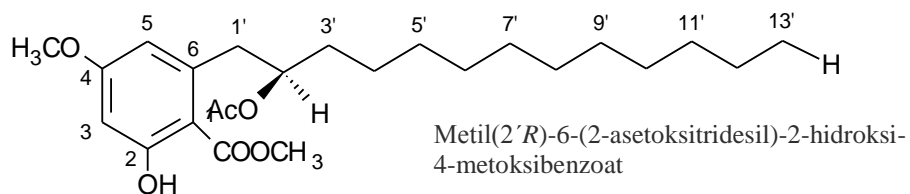
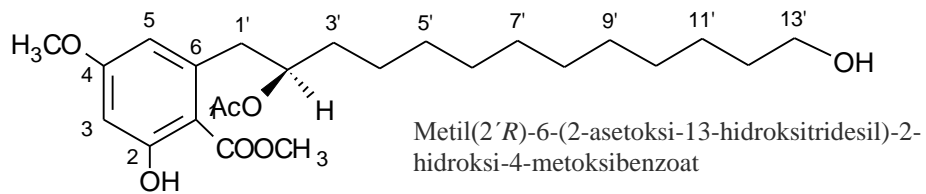
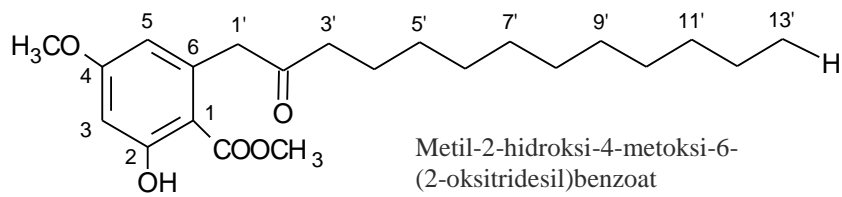
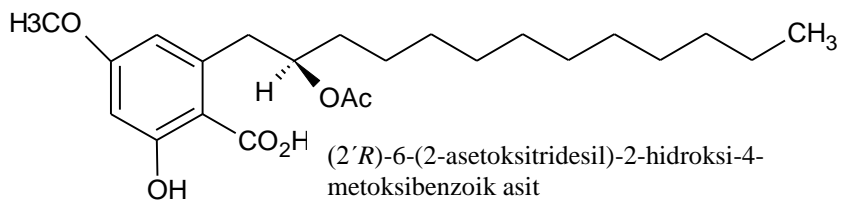
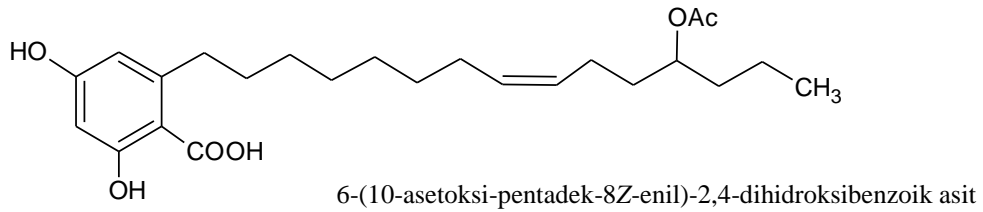
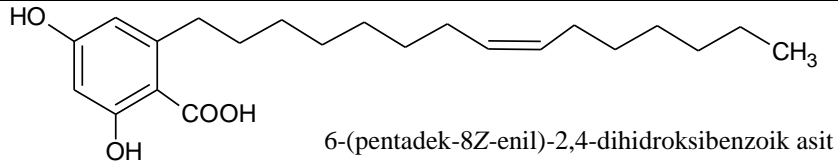


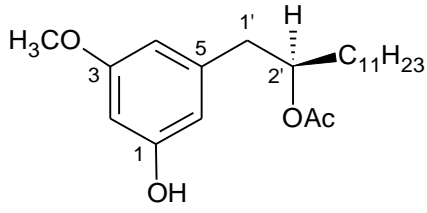


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	CH ₃	H	Ac	H
2	CH ₃	H	Ac	O=
3	CH ₃	H	Ac	OH
4	CH ₃	H	H	H
5	CH ₃	H	H	O=
6	CH ₃	H	H	OH
7	H	H	Ac	H
8	H	H	Ac	O=
9	H	H	Ac	OH
10	H	H	H	O=
11	H	H	H	OH

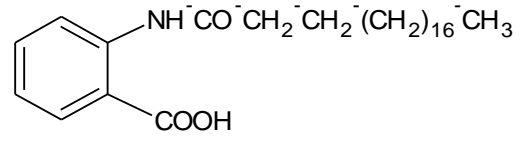
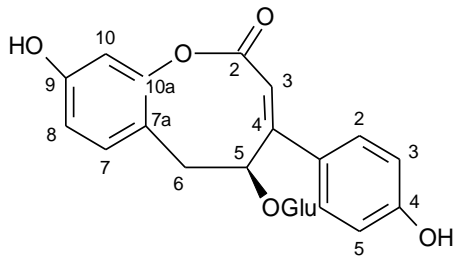




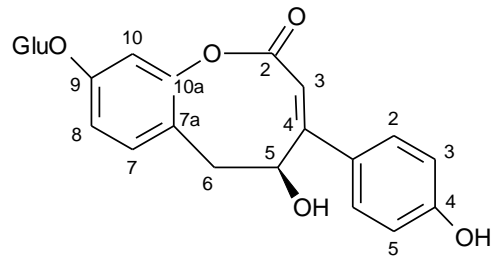




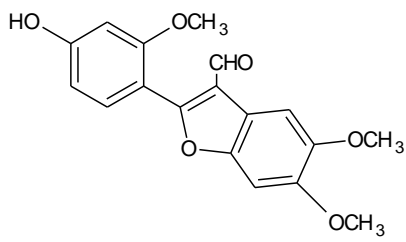
5-(2-asetoksitridesil)-3-metoksifenol

*N*-araşidilantranilik asit

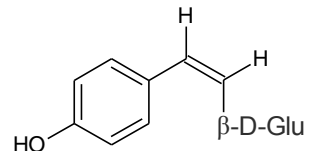
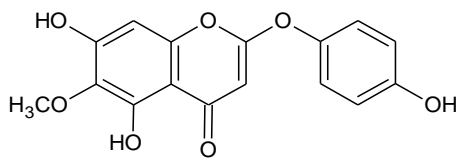
Spesiozit A



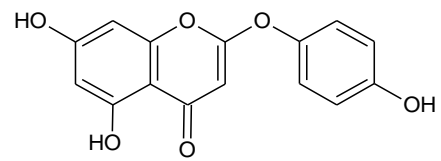
Spesiozit B



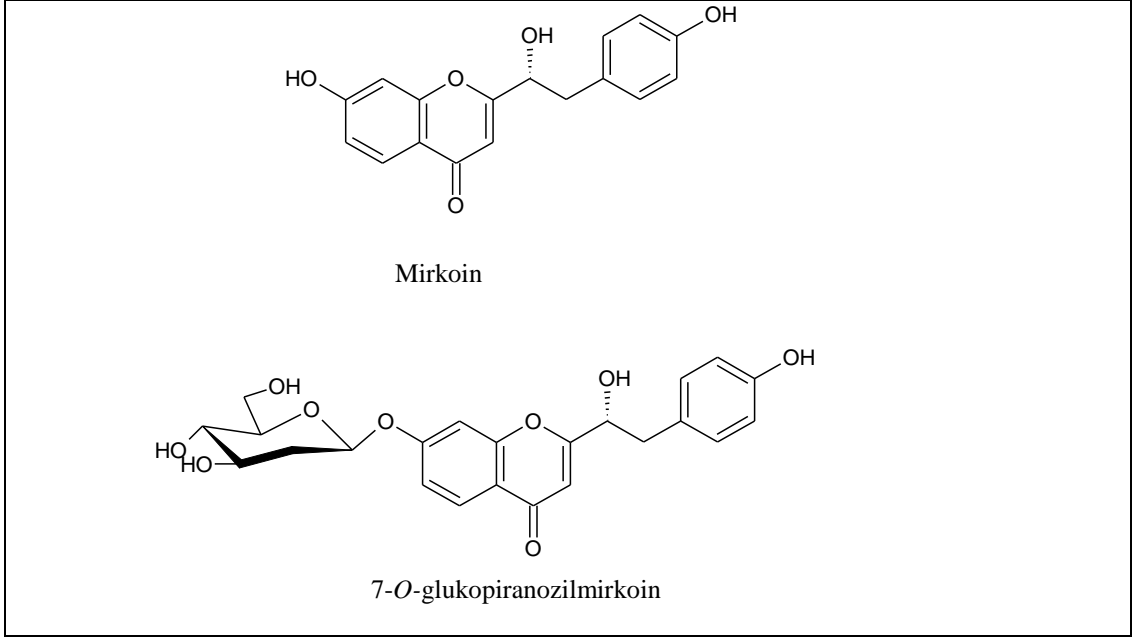
Maginaldehit

*cis*-vajinozit

Kapillarisin



6-demetoksikapillarisin



Şekil 1.9. *Ononis* L. türlerinde bulunan diğer bileşikler

1.6. *Ononis* Türleri Üzerinde Yapılan Aktivite Çalışmaları

1.6.1. Analjezik Aktivite

O. spinosa'nın çiçekli toprak üstü kısımlarından, hazırlanan sulu maseratın analjezik aktivitesi, ağrı eşiği ölçümüne dayanan kuyruk kaldırma testi ile değerlendirilmiş; 25, 50 ve 100 mg/kg dozlarda çalışılan deneyde, farelere numune uygulanmasından 30, 90 ve 150 dakika sonra ölçüm yapılmış, referans olarak aspirin ve morfin kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, ekstre, özellikle 50 ve 100 mg/kg dozlarda belirgin analjezik aktivite göstermiştir (Sever Yılmaz ve ark., 2006).

1.6.2. Antiinflamatuvar Aktivite

Bitki ekstralarının araşidonik asit metabolizması üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, *O. spinosa*'nın köklerinden hazırlanan metanol ekstresinin 5-lipoksijenaz enzimi üzerindeki inhibe edici etkisi değerlendirilmiştir.

Çalışma sonucunda ekstre aktif bulunmuş ve IC₅₀ değeri 7,8 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Pterokarpan türevi olan medikarpinin aktiviteden önemli ölçüde sorumlu olduğu belirlenmiştir (Dannhardt ve ark., 1992).

Antienflamatuvar aktivite tayininde pro-enflamatuvar sinyalizasyon ve özellikle NF-κB yolağı üzerine odaklanılan bir çalışmada, ekstrelerin; IL-6, IL-8, TNF- α ve PGE₂ üzerindeki *in vitro* etkileri, sitotoksik ve pro-apoptotik potansiyelleri ile hücre döngüsü üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, bitkisel materyalden etanol ekstresi hazırlanmış ve bu ekstreden petrol eteri, etil asetat ve metanol kullanılarak aşamalı ekstraksiyon yoluyla alt ekstreler elde edilmiştir. Analizler sonucunda, *O. ramosissima*'nın petrol eteri ve etil asetat ekstreleri ile *O. tridentata*'nın etil asetat ve etanol ekstrelerinin 10 µg/ml dozda %60'ın üzerinde TNF- α inhibisyonu yaptığı tespit edilmiştir. Bitkinin etil asetat ekstresinin 100 µg/ml dozda, minimum toksisiteyle, 5.1 hücrelerindeki NF-κB aktivasyonunu %80-100 oranında inhibe ettiği görülmüştür. 100 µg/ml dozda kullanılan petrol eteri ekstresi, insan monositlerinde %80-100 oranında IL-6 inhibisyonu yaparken; 10 µg/ml dozda test edilen petrol eteri ve metanol ekstreleri, insan monositlerinde %60-80 oranında IL-1β inhibisyonu yapmıştır. Ekstrelerin sitotoksitesinin ölçümü amacıyla, 50 µg/ml dozda sebep olduğu hücre ölümü yüzdesi ve 100 µg/ml dozda HeLa hücrelerinin apoptoz yüzdesi ölçümleri yapılmış ve sonuçta çalışılan ekstrelerin sitotoksite göstermediği tespit edilmiştir (Bremner ve ark., 2009).

O. vaginalis'in köklerinden izole edilen maakiain ve onun glikoziti trifolirhizinin antienflamatuvar aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada, deney modeli olarak sıçanlarda karragenin-nedenli arka ayak ödemi testi uygulanmış ve uygulamadan 3 saat sonra, ödem inhibisyonu kontrol grubu ile karşılaştırılıp % olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan indometasinin inhibisyonu %79,8 bulunurken, maakiain ve trifolirhizinin sırasıyla %65,7 ve %35,5 inhibisyon sağladığı görülmüştür (Abdel-Kader, 2010).

Türkiye'de endemik olarak yetişen *O. sessilifolia* Bornm., *O. basiadnata* Hub.-Mor. ve *O. macrosperma* Hub.-Mor. türlerinin etanol ve sulu ekstreleri ile yapılan bir *in-*

vivo çalışmada, ekstrelerin sağladığı, asetik asit nedenli kapiller permeabilite artışı inhibisyonu ölçülerek, ekstrelerin antienflamatuvar aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, *O. macrosperma* toprak üstü kısımlarının sulu ve etanollü ekstreleri, 200 mg/kg dozda, sırasıyla %35,7 ve %37,6 inhibisyon ile en yüksek aktiviteyi gösterirken, *O. sessilifolia* toprak üstü kısımlarının etanol ekstresi de aynı dozda, orta derecede antienflamatuvar aktivite sergilemiştir (Süntar ve ark., 2011).

1.6.3. Antikanser Aktivite

Farklı kanser hücre serileri ile yapılan *in vitro* bir çalışmada, *O. sicula*'dan hazırlanan etanol ekstresinin fraksiyonları, prostat adenokarsinoma (PC-3, LNCaP) ve meme adenokarsinoma (MCF-7) hücre serilerine karşı %10-95 oranında inhibisyon göstermiş, çalışılan fraksiyonlar arasında özellikle aseton ve eter fraksiyonlarının aktiviteleri dikkat çekici bulunmuştur. Bu çalışmada; aseton fraksiyonu PC-3 ve MCF-7 hücrelerine karşı %94'ten fazla inhibisyon gösterirken, LNCaP hücrelerine karşı inhibisyonu %75 olarak tespit edilmiştir. Eter fraksiyonu ise, LNCaP ve MCF-7 hücre serilerine karşı %40'tan fazla inhibisyon sağlamıştır (Khaleeliah, 2001).

O. serrata'nın etanol ekstresinin kloroform ve etil asetat fraksiyonlarından izole edilen 2-fenoksikromon türevi bileşikler olan kapillarisin ve 6-demetoksikapillarisinin insan ovaryum kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, bileşikler için sırasıyla 23 µg/ml ve 21 µg/ml IC₅₀ değerleri bulunmuş ve bileşiklerin zayıf sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Amer ve ark., 2004).

Aralarında *O. hirta* ve *O. sicula*'nın da bulunduğu farklı bitki türlerinin Vero hücre serilerine karşı sitotoksik aktivitelerinin 3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile araştırıldığı bir çalışmada, *O. sicula*'nın toprak üstü kısımlarından etanol ile hazırlanmış ekstrenin IC₅₀ değeri 325,17 µg/ml±3,00 bulunurken, *O. hirta*'nın toprak üstü kısımlarının etanol ekstresinin sitotoksik aktivitesi 72,5 µg/ml±1,34 IC₅₀ değeriyle dikkat çekici bulunmuştur (Talib ve Mahasneh, 2010a).

MTT testi ile *in vitro* antiproliferatif aktivitenin araştırıldığı başka bir çalışmada, ilk olarak farklı bitkilerden etanolla hazırlanan ekstraların Hep-2 ve MCF-7 hücre serilerine karşı aktiviteleri incelenmiştir. Bu basamakta, aralarında *O. hirta* ve *O. sicula*'nın bulunduğu ekstralar, hücre serilerinin proliferasyonunu %50'den yüksek oranda inhibe etmiştir. Çalışmanın 2. basamağında, bitkilerden, etanol, metanol, kloroform, *n*-hekzan, su ve butanol ile fraksiyonlanarak hazırlanan ekstraların, Hep-2, MCF-7 ve Vero hücre serilerine karşı aktivitesi araştırılmış ve 100 µg/ml dozda dikkat çekici aktivite gösteren *O. hirta*'nın kloroform, *n*-hekzan ve metanol fraksiyonları ile *O. sicula*'nın kloroform ve *n*-hekzan fraksiyonlarının IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir. 27,96±0,54 µg/ml IC₅₀ değeri ile, *O. hirta*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol fraksiyonunun, MCF-7 hücrelerine karşı selektif antiproliferatif aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) verilerine göre, ham bir ekstrenin sitotoksik aktivite gösterdiğine dair kriter olan en yüksek IC₅₀ değeri 30 µg/ml'dir. Çalışmanın üçüncü basamağında, TUNEL kolorimetrik tayin yöntemi ile aktif fraksiyonların apoptotik aktivitesine bakılmış ve *O. hirta*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen metanollü ekstrenin, kanser hücrelerinde apoptozisi indüklemek suretiyle antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Talib ve Mahasneh, 2010b).

O. hirta'nın toprak üstü kısımlarının *in vivo* ve *in vitro* antiproliferatif aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, *in vitro* aktivite MTT testi ile tayin edilmiş ve bitkinin etanol ekstresinden elde edilen metanol ve kloroform fraksiyonlarının Vero hücre serilerine karşı IC₅₀ değerleri NCI'nin sitotoksik aktivite kriterlerine uygun bulunmuştur. Bu değerler metanol ve kloroform fraksiyonları için, sırasıyla 16,6 µg/ml ve 21,03 µg/ml olarak tespit edilmiştir. *In vivo* çalışmalar, fare meme kanser hücre serileri kullanılarak yürütülmüş ve bu hücre serisine karşı LD₅₀ değeri 285 mg/kg olarak saptanmıştır. Örneklerin verildiği farelerde, kontrol grubu ile kıyaslandığında, tümör inhibisyonu dolayısıyla hayvanların kütlelerinde azalma ve tümör büyüklüğünde gerileme görülmüştür. En yüksek aktivite, kütlede %2,97 azalma ve tümör boyutunda %33,5 gerileme ile ekste-*Bifidobacterium longum* kombinasyonunun verildiği grupta tespit edilmiştir. Sadece ekstrenin uygulandığı gruptaki hiçbir farede tam iyileşme görülmezken, kombinasyon tedavisi uygulanan grubun %30'unda tam iyileşme

gözenmiştir (Talib ve Mahasneh, 2012).

1.6.4. Antimikrobiyal Aktivite

Mahasneh ve El-Oqlah'ın (1999) yaptığı bir çalışmada, *O. spinosa*'nın toprak üstü kısımları petrol eteri ve etanol ile aşamalı olarak ekstre edilmiş, ardından etanol ekstresi, kloroform ve su ile fraksiyonlanmıştır. Kloroform fazının tekrar fraksiyonlanmasıyla *n*-hekzan ve metanollü; su fazının fraksiyonlanması ile *n*-butanol ve sulu alt fraksiyonlar elde edilmiştir. Tüm ekstre ve fraksiyonların antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, agar difüzyon testi için 4 mg/ml konsantrasyonda uygulama yapılmış ve Gram-pozitif ve negatif bakterilere karşı butanol fraksiyonunun orta derecede etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca etanol, petrol eteri ekstreleri ile *n*-butanol fraksiyonu dikkate değer antifungal aktivite göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada, *O. spinosa*'nın toprak üstü kısımlarının %75 sulu etanol ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon testi ile değerlendirilmiştir. Test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *C. glabrata* ve *C. krusei*'nin kullanıldığı çalışma sonucunda, ekstrenin, başta *C. albicans* ve *C. krusei* olmak üzere, test edilen tüm mikroorganizmalara karşı iyi derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Saltan Çitoğlu ve Altanlar, 2003).

O. spinosa'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan %75 sulu etanol ekstresinin antilisteriyal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, test mikroorganizmaları olarak *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovi*, *L. innocua* ve *L. murrayi*; referans olarak da ofloksazin kullanılmıştır. Yapılan disk difüzyon testi sonuçlarına göre, hazırlanan ekstrenin *L. monocytogenes*'e karşı referans maddeye yakın antilisteriyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Altanlar ve ark., 2006).

Bakteriyel sayım ve 3'-[1-(fenilamino)-karbonil]-3,4-tetrazolyum]-bis(4-metoksi-6-nitro) benzensülfonik asit hidrat (XTT) kolorimetrik yöntemleri kullanılarak, *O.*

natrix'in etanol ile hazırlanan ekstresinin *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktivitesinin test edilmesi sonucunda, etanollü ekstrelerin özellikle Gram (+) bakterilere karşı gösterdiği etkinin dikkat çekici olduğu görülürken, ekstrenin Gram (-) bakteriler üzerinde belirgin etkisi gözlenmemiştir (Al-Bakri ve Afifi, 2007).

Disk difüzyon testi ile antimikrobiyal aktivitenin değerlendirildiği başka bir çalışmada, *O. natrix*'in *n*-hekzan, aseton ve metanol ile hazırlanan ekstrelerinin 20 mg/ml konsantrasyondaki çözeltileri disklere emdirilmiş ve *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterococcus faecali*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. sapraophiticus*, *S. aureus*, *Enterobacter cloaceae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens* suşlarına karşı gösterdiği aktivite değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda ekstrelerin düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Sassi ve ark., 2007).

O. natrix'ten su distilasyonu yoluyla elde edilen uçucu yağın, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Salmonella enteritidis* suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, disk difüzyon testi, MIC değerinin hesaplanması için de mikrodilüsyon testi uygulanmış, sonuçta uçucu yağın *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu suşlara karşı hesaplanan MIC değerleri, sırasıyla 15,6 µl/ml ve 7,81 µl/ml olarak bulunmuştur (Elamrani ve Benaissa, 2010).

Mikrodilüsyon testi ile antimikrobiyal aktivite tayini yapılan bir çalışmada, *O. hirta* ve *O. sicula*'nın toprak üstü kısımlarından etanolla hazırlanan ekstrelerin farklı bakteri ve mantar suşlarına karşı aktiviteleri değerlendirilmiş ve çalışma sonucunda *O. hirta*'nın etanol ekstresi *S. typhimurium* suşu üzerinde %93,40 oranında inhibisyon gösterirken, *O. sicula*'nın ise *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* ve *B. cereus* suşlarında sırasıyla %79,03; %60,75 ve %74,67 oranlarında inhibisyon sağladığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, etanol ekstresinin fraksiyonlanması ile elde edilen hekzan, metanol, su ve *n*-butanol fraksiyonları arasında *O. hirta*'nın su ve *n*-hekzan fraksiyonlarının aktiviteleri, *P. aeruginosa*'ya karşı 125µg/ml olarak bulunan minimum inhibisyon konsantrasyonu ile dikkat çekici bulunmuştur (Talib ve Mahasneh, 2010a).

O. natrix yapraklarından metanolle hazırlanan ekstrenin antimikrobiyal aktivitesinin disk difüzyon testi ile araştırıldığı çalışmada aktivite, *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* suşlarına karşı değerlendirilmiş ve ekstrenin tüm mikroorganizmalara karşı etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ekstrenin, *E. faecalis* ve *S. aureus* üzerinde kuvvetli inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir (Mhamdi ve ark., 2015).

O. speciosa'nın klorofomla hazırlanmış ekstresinden izole edilen bileşiklerin antibakteriyel aktivitesinin incelendiği bir çalışmada; 6-(pentadek-8Z-enil)-2,4-dihidroksi benzoik asit ve 6-(10-asetoksi-pentadek-8Z-enil)-2,4-dihidroksi benzoik asit çalışılan Gram (+) bakterilere karşı aktivite gösterirken, Gram (-) bakteriler ve mantarlar izole edilen bileşiklere karşı hassasiyet göstermemiştir. Söz konusu çalışmada, bileşiklerin antibakteriyel aktivitesinin gözlemlendiği Gram (+) bakteriler; *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *E. faecalis*, *Micrococcus lysodeikticus* ve *S. aureus* olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada izole edilen rezorsinol türevi diğer bileşikler, çalışılan suşlara karşı aktivite göstermemiştir (Barrero ve ark., 1993).

Bir çalışmada, *O. serrata*'nın etanol ekstresinin kloroform ve etil asetat fraksiyonlarından izole edilen kapillarisin ve 6-demetoksikapillarisinin *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *Bordetella bronchiseptica*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış ve iki bileşiğin de sırasıyla 32 µg/ml ve 48 µg/ml MIC değerleri ile *B. subtilis*'e karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, kapillarisinin aynı zamanda *B. bronchiseptica*'ya karşı da aktif olduğu (MIC= 64 µg/ml) görülmüştür (Amer ve ark., 2004).

Antiviral aktivitenin plak redüksiyon testi ile değerlendirildiği bir çalışmada, *O. vaginalis*'in kurutulmuş köklerinin etanol ekstresinin partiyonu ile elde edilen eter fraksiyonundan izole edilen 5,7,4'-trihidroksi-4-stiril Kumarin bileşiği, *Herpes simplex* Tip I virüsüne karşı 4 µg/ml dozda dikkat çekici aktivite gösterirken, bileşiğin konak

hücre üzerinde sitotoksitesinin ($IC_{50}=20 \mu\text{g/ml}$) zayıf olduğu tespit edilmiştir (Abdou-Karam ve Shier, 1990; Abdel-Kader, 2001).

1.6.5. Antioksidan Aktivite

Süperoksit anyon oluşumu ve lipit peroksidasyon düzeylerinin ölçümüyle antioksidan aktivitenin değerlendirildiği bir çalışmada, *O. spinosa*'nın toprak üstü kısımlarının etanol ekstresinin, 2,5-10 mg/ml aralığında, doz bağımlı olarak süperoksit radikal süpürücü aktivite gösterdiği, ancak lipit peroksidasyon düzeylerinin ölçümünde 0,5-10 mg/ml dozlarda görülen aktivitenin doz bağımlı olmadığı tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada, süperoksit radikal süpürücü aktivite tayininde ekstrenin IC_{50} değeri 1,35 mg/ml olarak bulunurken, lipit peroksidasyonu deneyinde çalışılan dozlarda, %27'den daha yüksek inhibe edici etki göstermediği saptanmıştır (Çoban ve ark., 2003).

O. spinosa'dan Soxhlet ekstraksiyonuyla hazırlanan metanollü ekstrenin antioksidan etkisi, linoleik asit peroksidasyon testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçta, ekstrenin 40 μg dozda %91,06 \pm 1,50 oranında inhibisyon yaptığı ve IC_{50} değerinin 2,37 μg olduğu tespit edilmiştir (Souri ve ark., 2004).

O. spinosa'nın köklerinin hazırlanan etanollü ve metanollü ekstreden elde edilen kloroform ve etil asetat fraksiyonlarının, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) testleri kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri tespit edilmiştir. Etanollü ekstrenin kloroform fraksiyonunun aktivitesi dikkat çekici bulunmuştur. Bu fraksiyon için sonuçlar, DPPH testinde 0,235 mmol/g; ABTS testinde ise 0,264 mmol/g olarak tespit edilmiştir (Valyova ve ark., 2008).

Farklı bitki türlerinde su ve metanol ile hazırlanan ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin ABTS yöntemi ile, total fenol içeriklerinin ise Folin-Ciocalteu yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada, *O. natrix*'in sulu ekstresinin total fenol içeriğinin gallik

asit eşdeğeri olarak $16,9 \pm 0,4$ mg/g kuru materyal olduğu; troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesinin $82,0 \pm 1,5$ $\mu\text{mol/g}$ kuru materyal olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, bitkinin metanollü ekstresinin total fenol içeriği gallik asit eşdeğeri olarak $21,1 \pm 0,7$ mg/g kuru materyal olduğu; troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesinin ise $76,7 \pm 2,0$ $\mu\text{mol/g}$ kuru materyal olduğu belirlenmiştir (Tawaha ve ark., 2007).

O. natrix'in antioksidan kapasitesinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin yapraklarından metanol ile hazırlanan ekstrenin total fenol içeriği gallik asit eşdeğeri olarak 51 mg/g kuru materyal, total flavonoid içeriği kateşin eşdeğeri olarak 14,76 mg/g kuru materyal olarak bulunmuştur. Çalışmada, bitkinin metanol ekstresinin, gallik asit eşdeğeri olarak 60,94 mg/g kuru materyal değeri ile yüksek total antioksidan kapasitesinin olduğu ve 29 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunan IC_{50} değeri ile yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçlara göre, EC_{50} değeri 100 $\mu\text{g/ml}$ bulunan ekstrenin indirgeme gücünün de yüksek olduğu görülmüştür (Mhamdi ve ark. 2015).

O. natrix ve *O. sicula* türlerinin uçucu yağlarının antioksidan aktivitelerinin DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak değerlendirildiği bir çalışma sonucunda; elde edilen uçucu yağların doz bağımlı olarak orta/iyi derecede aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Al-Qudah ve ark., 2014).

1.6.6. Antiplatelet Aktivite

O. vaginalis'in köklerinden izole edilen pterokarpan türevi maakiain ve onun glikoziti olan trifolirhizin ile yapılan bir çalışmada, sıçanlardan elde edilen platelet bakımından zengin plazmada ADP nedenli platelet agregasyonu oluşturularak bileşiklerin antiplatelet etkileri incelenmiştir. Deneide, bileşiklerin trombosit agregasyonunu inhibe edici etkileri PGI_2 ile karşılaştırılmak suretiyle % olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda trifolirhizin 800 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda %54,2 oranında inhibisyon gösterirken maakiainin aktivitesinin 1400 $\mu\text{g/ml}$ dozda %45,65 oranı ile çok daha düşük olduğu görülmüştür (Abdel-Kader, 2010).

1.6.7. Hepatoprotektif Aktivite

O. spinosa'nın çiçekli toprak üstü kısımlarından, hazırlanan sulu ekstrenin, CCl₄-nedenli akut karaciğer toksisitesi üzerine koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ekstrenin hepatoprotektif etki göstermediği tespit edilmiştir (Sever Yılmaz ve ark., 2006).

CCl₄-nedenli hepatotoksositeye karşı koruyucu aktivitenin araştırıldığı bir çalışmada, *O. vaginalis*'in köklerinden izole edilen maakiain ve trifolirhizinin sıçanlardan alınan serumda enzim düzeyleri ve non-protein sülfidril gruplarının tayini yapılmıştır. Sonuçlar, CCl₄ sebebiyle serumda artış gösteren transaminazlar, alkalın fosfataz, total bilirubin ve non-protein sülfidril grupları düzeylerindeki düşüşün yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak silimarin kullanılan çalışmanın sonucunda, serum enzim düzeylerinin düşüşüne bakıldığında aynı dozda verilen trifolirhizinin, maakiainden daha yüksek, silimarinin de yaklaşık yarısı oranında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Non-protein sülfidril grupları düzeyine bakıldığında ise maakiainin aktivitesinin trifolirhizinden daha yüksek olduğu görülmüştür (Abdel-Kader, 2010).

1.6.8. İnsektisit Aktivite

Depolanmış tahıllarda görülen bir parazit olan *Tribolium castaneum*'a karşı insektisit aktivitenin değerlendirildiği bir çalışmada, *O. natrix*'in %50 sulu metanol ile hazırlanmış ekstresinin pupa evresindeki parazit ile temas sonrasında, parazit üzerinde toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada, 25,5 µg/cm² konsantrasyonda yapılan uygulamada %100 mortalite gözlenmiştir (Pascual-Villalobos ve Robledo, 1999).

1.6.9. Östrojenik Aktivite

Östrojenik aktivitenin, sıçanlara intraperitoneal yolla uygulanan test numunelerinin uterus ağırlığı üzerinde meydana getirdiği artış ile değerlendirildiği bir çalışmada *O.*

vaginalis'in köklerinden izole edilen maakiain ve trifolirhizinin aktiviteleri araştırılmış glukozit yapısındaki trifolirhizinin aglikon yapısındaki maakiainden yaklaşık 10 kat daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 17 β -östradiolün 1 mg/kg dozda verilmesi, uterusu %172,7 ağırlık artışı ile sonuçlanırken trifolirhizinin sebep olduğu artış %93,0 olarak bulunmuştur. Düşük aktivite gösteren maakiain verilen grupta ise uterusu %9,1 ağırlık artışı görülmüştür (Abdel-Kader, 2010).

1.6.10. Yara İyileştirici Aktivite

Çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon deney modellerini takiben deri örneklerinin histopatolojik incelemeleri yapılarak, *O. sessilifolia*, *O. basiadnata* ve *O. macrosperma* türlerinin *in vivo* yara iyileştirici aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, referans madde olarak, içeriğinde %1 *Centella asiatica* ekstresi bulunan Madecassol® merhem kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, *O. macrosperma*'nın etanol ve sulu ekstresinin en yüksek aktiviteyi gösterdiği görülmüştür. Diğer ekstrelerin aktivitesi belirgin bulunmamakla birlikte, *O. macrosperma*'nın etanol ekstresinden elde edilen etil asetat fraksiyonunun, ekstreden daha düşük, ancak yine de dikkat çekici yara iyileştirici aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan histopatolojik incelemelerin de, çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon deney modellerinin sonuçlarını destekleyici doğrultuda olduğu gözlenmiştir (Süntar ve ark., 2011).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bitkisel Gereç

Bu çalışmada aşağıda isimleri ve toplandığı lokaliteler belirtilen bitkilerin kurutulmuş toprak üstü kısımları ve kökleri ayrılarak kullanıldı (**Çizelge 2.1**). Herbaryum için seçilen örnekler preslenip kurutulduktan sonra teşhis edilerek Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumuna (AEF) kaldırıldı.

Çizelge 2.1. *Ononis* türlerinin toplandığı lokaliteler

Bitki Türü	Herbaryum Numarası	Lokalite	Toplanma Tarihi	Toplayan	Teşhis Eden
<i>Ononis spinosa</i> L. subsp. <i>leiosperma</i> (Boiss.) Sirj.	AEF 26000	C4, Konya, Aliçerçi Köyü-Ahırlı yolu kenarında sağ taraf, yolun 150 m kadar içerisi, 1249 m 37° 15, 245 N 32° 08, 485 E	24.06.2011	B. Ergene	H. Duman
<i>Ononis variegata</i> L.	AEF 25998	C3, Antalya, Side, Sorgun, sahilden 300 m kadar içerisi, kumullar, 4 m 36° 45, 902 N 31° 24, 343 E	26.06.2011	B. Ergene	H. Duman
<i>Ononis viscosa</i> L. subsp. <i>brevifolia</i> (DC) Nym.	AEF 25997	C4, Antalya, Akseki, Çukurköy, Karaorman mevki, 1114 m 36° 52, 823 N 31° 49, 514 E	25.05.2011	B. Ergene	H. Duman
<i>Ononis natrix</i> L. subsp. <i>natrix</i> L.	AEF 26328	C2, Antalya, Fethiye-Korkuteli yolu, 33-35. km, sol taraf, yol kenarı, 832 m 36° 42, 982 N 29° 25, 406 E	28.05.2012	B. Ergene	O. Tugay

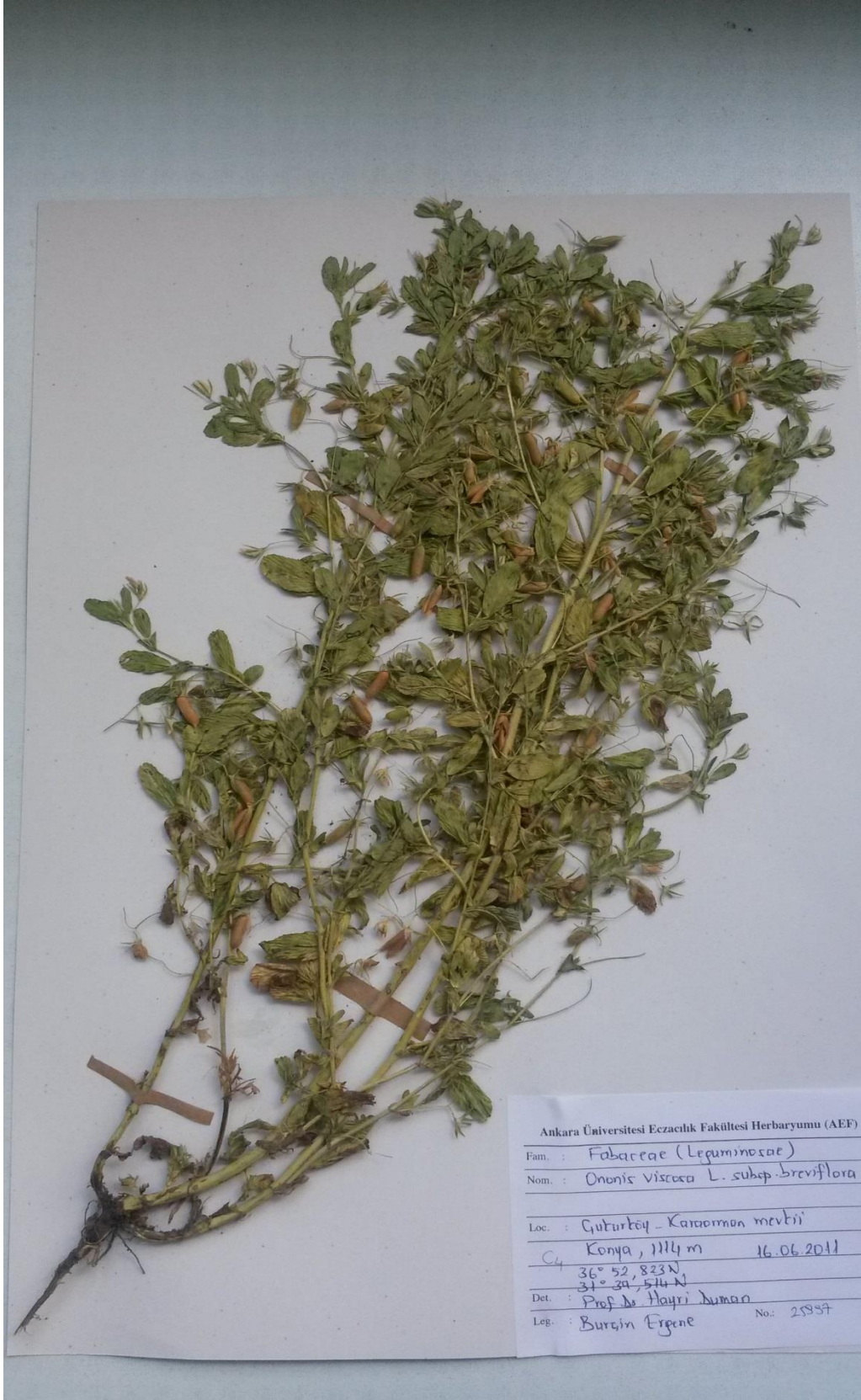
Toplanan *Ononis* türlerine ait herbaryum örneklerinin resimleri Şekil 2.1-2.4'te verilmiştir.



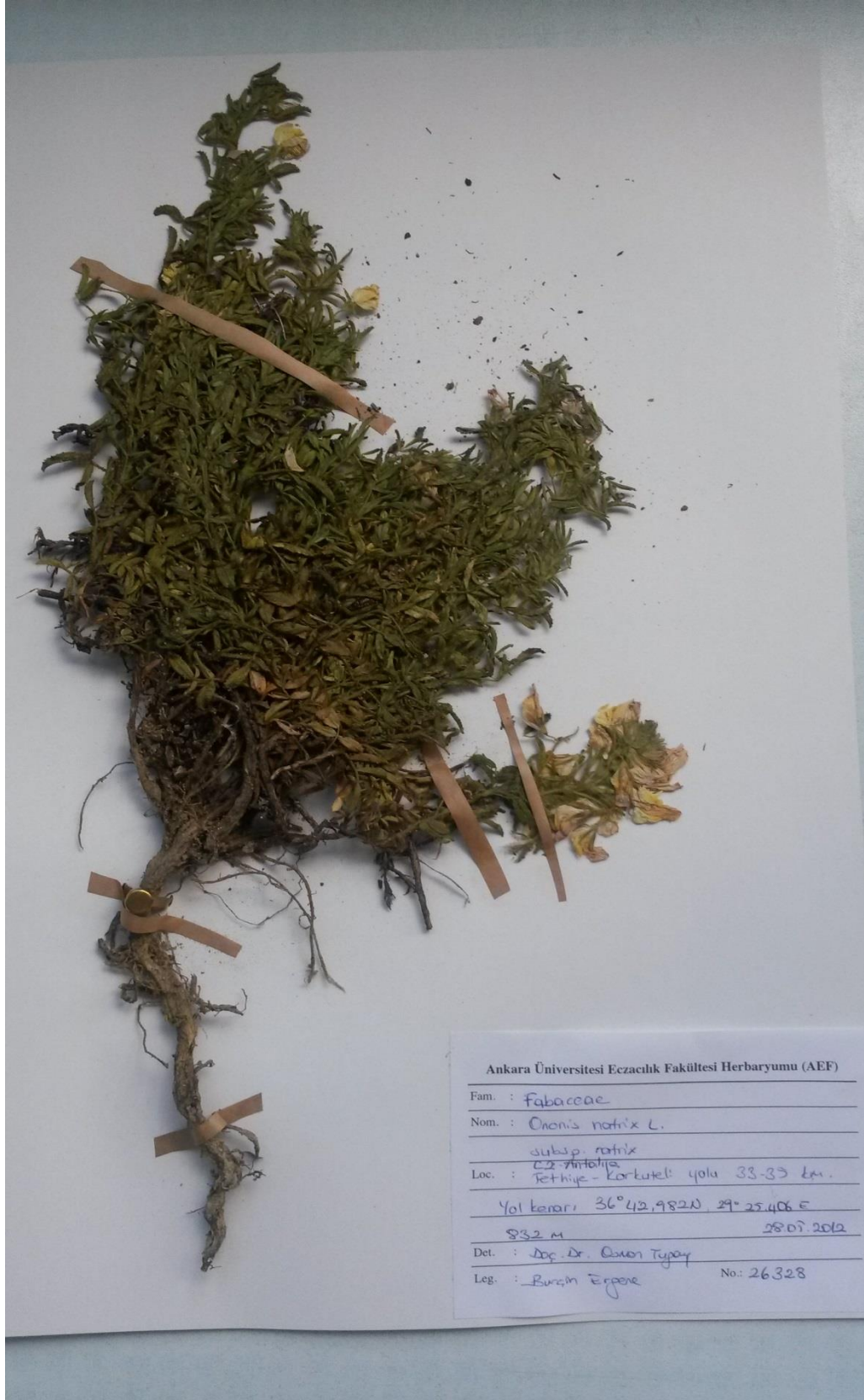
Şekil 2.1. *Ononis spinosa* L. subsp. *leiosperma* (Boiss.) Sirj.



Şekil 2.2. *Ononis variegata* L.



Şekil 2.3. *Ononis viscosa* L. subsp. *brevifolia* (DC) Nym.



Şekil 2.4. *Ononis natrix* L. subsp. *natrix* L.

2.1.2. Deneş Hayvanları

Deneşlerde kullanılan erkek Sprague Dawley sıçanlar (160-180 g ağırlığında) ve erkek Swiss Albino fareler (25-30 g ağırlığında), Kobay firması deneş hayvanları üretim merkezinden temin edildi ve öncelikle laboratuvar ortamına alıştırmak amacıyla, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık uygulaması yapılan ortamda, oda sıcaklığında en az 3 gün bekletildi. Bu süre içinde hayvanların beslenmesinde standart pellet yem ve su kullanıldı. Deneşler için altışar hayvanlık gruplar kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce Gazi Üniversitesi Hayvan Deneşleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (G.Ü.E.T-11.058).

2.1.3. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

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

2.2. Yöntem

2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

2.2.1.1. Ekstraksiyon

Biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlamada (BAYF) ilk basamak olarak bitkiden aşamalı olarak üç farklı polaritede ekstre hazırlandı. İlk etapta, çalışılan her tür için 30 g bitkisel materyal kullanılarak ekstrelerin verim hesabı ve aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi tespit edilen türde fraksiyonlama ve saflaştırma işlemlerinde kullanmak amacıyla, aşağıda belirtilen yöntem takip edilerek, 1200 g bitkisel materyal ve her

seferinde 12 litre olmak üzere toplam 36 litre çözücü kullanılmak suretiyle tekrar ekstre hazırlandı.

2.2.1.1.1. *n*-Hekzan Ekstrelerinin Hazırlanışı

Çalışma materyali olarak seçilmiş olan *Ononis* cinsine ait; *O. spinosa* subsp. *leiosperma*, *O. variegata*, *O. viscosa* subsp. *brevifolia* ve *O. natrix* subsp. *natrix* örneklerinin kurutulmuş kök ve toprak üstü kısımları toz edildi. 30 g bitkisel materyal 300 ml *n*-hekzan ile 24 saat süre sonunda pilili süzgeç kağıdından süzülüp taze çözücü ilave etmek suretiyle 3 gün boyunca, oda sıcaklığında, hareketli maserasyon yöntemi ile ekstre edildi. 3 günün sonunda elde edilen süzüntüler birleştirilerek alçak basınç altında yoğunlaştırıldı. Kurutulan ekstrelerin %verimleri hesaplandı.

2.2.1.1.2. Etil Asetat Ekstrelerinin Hazırlanışı

n-Hekzan ile ekstraksiyon ve süzme işlemi sonrasında kalan bitkisel materyal kurutulmuş üzerine 300 ml etil asetat ilave edildi. 24 saat sonra pilili süzgeç kağıdından süzülüp taze çözücü ilave etmek suretiyle 3 gün boyunca, oda sıcaklığında, hareketli maserasyon yöntemi ile ekstre edildi. 3 günün sonunda elde edilen süzüntüler birleştirilerek alçak basınç altında yoğunlaştırıldı. Kurutulan ekstrelerin % verimleri hesaplandı.

2.2.1.1.3. Metanol Ekstrelerinin Hazırlanışı

Etil asetat ile ekstraksiyon ve süzme işlemi sonrasında kalan bitkisel materyal kurutulmuş üzerine 300 ml metanol ilave edildi. 24 saat sonra pilili süzgeç kağıdından süzülüp taze çözücü ilave etmek suretiyle 3 gün boyunca, oda sıcaklığında, hareketli maserasyon yöntemi ile ekstre edildi. 3 günün sonunda elde edilen süzüntüler birleştirilerek alçak basınç altında yoğunlaştırıldı. Kurutulan ekstrelerin % verimleri hesaplandı.

2.2.1.2. Kromatografik Yöntemler

2.2.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

O. spinosa subsp. *leiosperma*, *O. variegata*, *O. viscosa* subsp. *brevifolia* ve *O. natrix* subsp. *natrix* türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstreler ve sonrasında aktivitesi tespit edilen ekstrenin fraksiyonları İTK ile incelendi.

Adsorban	: Silika jel 60 F ₂₅₄ (Merck, 1. 05554 20x20) hazır kaplı alüminyum plak
Çözücü Sistemi 1	: Etil asetat:Glasiyal asetik asit:Formik Asit:Su (100:11:11:26)
Çözücü Sistemi 2	: Toluen:Kloroform:Etanol (40:40:10)
Çözücü Sistemi 3	: <i>n</i> -Hekzan: Etil asetat (80:20)
Revelatör	: Anisaldehyt-H ₂ SO ₄ reaktifi

O. spinosa bitkisinin toprak altı kısmından hazırlanan metanollü ekstresinden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen fraksiyonlar ise Silika jel 60 F₂₅₄ (Merck, 105554 20x20) kaplı hazır plaklar üzerinde, her bir fraksiyon için ayrı olarak Çizelge 2.2.'da belirtilen çözücü sistemleri kullanılarak incelendi. Bileşiklere ait lekeler Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile ısıtma sonucunda belirlendi.

Farklı polaritedeki ekstrelerin ve fraksiyonların incelenmesi için en uygun olanı bulmak amacıyla farklı çözücü sistemleri kullanıldı. Bileşiklerin oluşturduğu lekeler 254 nm, 366 nm dalga boyundaki ışık altında ve revelatör olarak vanilin-H₂SO₄ reaktifi püskürtülüp sıcaklık uygulanması sonrasında gözlendi. Kullanılan diğer çözücü sistemleri ve incelenen ekstre/fraksiyonlar Çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Ekstre ve fraksiyonlarının İTK analizi için kullanılan solvan sistemleri

Fraksiyon	Kullanılan İTK Solvan Sistemleri
<i>n</i> -Hekzan ekstresi	<i>n</i> -hekzan: etil asetat (9:1; 7:3)
Etil asetat ekstresi	etil asetat: metanol: su (100:13,5:10; 100:16,5:13,5) kloroform:metanol:su (61:32:7; 65:25:4;70:32:7) kloroform:metanol (8:2; 7:3) diklorometan: metanol (8:2)
Fraksiyonlar	etil asetat:glasiyal asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) etil asetat:metanol:su (100:13,5:7) kloroform:metanol:su (65:25:4) diklorometan:metanol (8:2)

Elde edilen fraksiyonların birleştirilmesi sırasında ters faz plakta da ayrımın görülmesi amacıyla değişen oranlarda metanol:su sistemi kullanılarak İTK analizi yapıldı.

Adsorban : Silika jel 60 RP-18 F_{254S} (Merck, 105559 20x20) hazır kaplı alüminyum plak

Çözücü Sistemi : Metanol:su (40:60; 50:50; 60:40; 70:30)

Revelatör : Vanilin-H₂SO₄ reaktifi

2.2.1.2.2. Kolon Kromatografisi

Etkiden sorumlu olabilecek bileşik/bileşikleri izole etmek için, en yüksek yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktiviteye sahip ekstre olan *O. spinosa* subsp. *leiosperma*'nın etil asetat ekstesinin kullanılmasına karar verildi. Bu amaçla izolasyona öncelikle kolon kromatografisi yöntemiyle başlandı.

2.2.1.2.2.1. Kolonun Hazırlanması

2.2.1.2.2.1.1. Silika Jel Kolonun Hazırlanması

Silika jel, elüsyona başlanan çözücü/çözücü sistemi ile karıştırıldıktan sonra hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde kolona dolduruldu. Ardından ayrımı yapılacak ekstre kolona uygulanarak elüsyona başlandı.

O. spinosa subsp. *leiosperma* 'nın etil asetat ekstesinin (29,64 g) fraksiyonlanması için hazırlanan kolonda ve 666 g Silika jel [Silika jel 60 (70-230mesh; 0,063-0,200 mm; Merck 107734)] tartılarak diklorometan ile karıştırıldıktan sonra 6 cm çapında ve 55 cm boyundaki cam kolona hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu.

Bu kolondan elde edilen fraksiyonların arasında aktivitesi en yüksek olan fraksiyonun (E5=6,5 g) saflaştırılması amacıyla kurulan kolon için 185 g silikajel [silika jel 60 (230-400mesh, 0,040-0,063 mm, Merck 109385)] tartılarak diklorometan ile karıştırıldıktan sonra 4 cm çaplı cam kolona hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu.

2.2.1.2.2.1.2. Sefadeks Kolonun Hazırlanması

Kolon dolgu materyali olarak Sefadeks LH-20 (Sigma LH20100) kullanıldı. Kolona doldurulacak olan 188 g Sefadeks metanol ile karıştırılarak 1-2 saat kadar bekletildi, ardından 3,5 cm çapında ve 45 cm boyundaki cam kolona hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu.

E5 fraksiyonunun Silika jel kolondan toplanan Fr. 17-18 (700 mg) ve Fr. 19-27 (1397 mg) fraksiyonları ile yine bu kolondan alınmış Fr. 15-16'nın preparatif İTK uygulaması sonucunda elde edilen Fr. 15-16 Prep. 5 (348,8 mg) fraksiyonunun saflaştırma işlemleri Sefadeks kolon ile gerçekleştirildi.

2.2.1.2.2.2. Ekstrenin Kolona Uygulanması

Ekstrenin Silika jel kolona uygulanması kuru tatbik metoduna göre yapılmıştır. Bu amaçla ekstre tam olarak tartıldıktan sonra bir kapsülde tam olarak çözüldüğü çözücü içerisinde tamamen çözüldü ve ağırlığı kadar Silika jel ile karıştırıldı. Kuruması için, zaman zaman karıştırılmak üzere, çeker ocak altına bırakıldı. Tamamen kurutulduktan sonra Silika jele emdirilmiş ekstre kolona tatbik edildi. Ekstrenin üst kısmına bir

miktar daha silika jel ilave edilerek ekstrenin havalanması engellendi. Elüsyon işlemiyle ekstre fraksiyonlanmaya başlandı.

Fraksiyonların sefadeks kolona uygulanması ıslak tatbik metoduna göre yapılmıştır. Bu amaçla, ayrımı yapılacak numune mümkün olduğunca az miktarda metanol ile tamamen çözülerek kolona uygulandı.

2.2.1.2.2.3. Ekstrenin Fraksiyonlandırılması

O. spinosa subsp. *leiosperma*'nın etil asetat ekstresinin fraksiyonlanması işlemine diklorometan ile başlandı ve Çizelge 2.3'te belirtildiği şekilde diklorometan:metanol karışımının giderek artan polaritedeki karışımları ile devam edildi ve en son metanol kullanılarak elüsyon bitirildi. Her çözücü karışımından 1,5 litre kullanılarak 200 ml'lik hacimlerde fraksiyonlardan toplam 78 elde edildi. Elde edilen fraksiyonlar İTK ile incelendi ve R_f değerlerine göre aynı olan bileşikleri içeren fraksiyonlar birleştirildi.

Aktivitesi nedeniyle saflaştırma işlemlerine devam edilecek olan E5 fraksiyonu (29,64 g) 26-38. fraksiyonların birleştirilmesi ile elde edildi.

Çizelge 2.3. *O. spinosa* subsp. *leiosperma*'nın etil asetat ekstresinin fraksiyonlanmasında kullanılan çözücü oranları

Sistem No	Çözücü oranları
1	diklorometan
2	diklorometan:metanol (90:10)
3	diklorometan:metanol (80:20)
4	diklorometan:metanol (70:30)
5	diklorometan:metanol (60:40)
6	diklorometan:metanol (50:5)
7	metanol

Ön temizleme işleminden sonra fraksiyonların içerdiği bileşikleri saflaştırmak amacıyla tekrar kolon kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi ve kristallendirme gibi yöntemlerden yararlandı.

E5 fraksiyonunun saflaştırılması amacıyla kurulan silika kolonda, elüsyon için ilk olarak 1 litre diklorometan, ardından diklorometan:metanol (6:4) sistemi ile işleme devam edildi. 100 ml'lik hacimlerde fraksiyonlar toplandı. Elde edilen 92 fraksiyon, İTK ile incelendi ve R_f değerlerine göre aynı olan bileşikler içeren fraksiyonlar birleştirildi.

Fr. 17-18, Fr. 19-27 ve Fr. 15-16 Prep. 5 fraksiyonlarının her birinin sefadeks kolonda saflaştırma işlemi metanol ile yapıldı. Elüsyonun bitimi İTK ile kontrol ederek tespit edildi. Elde edilen alt fraksiyonlar, İTK ile incelendi ve R_f değerlerine göre aynı olan bileşikler içeren fraksiyonlar birleştirildi.

2.2.1.3.Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlarda bulunan bileşikler saflaştırmak amacıyla diğer bir kromatografik yöntem olarak preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlandı.

Normal faz preparatif ince tabaka kromatografisi için; Silika jel 60 F₂₅₄ (Merck, 1. 05554 20x20) hazır kaplı alüminyum plaklar bant halinde uygulanan Fr. 15-16 fraksiyonu (1718,3 mg) etil asetat:metanol:su (100:13,5:7) çözücü sistemi kullanılarak ayırım sağlandı. Plaklar üzerinde ayrılan bileşikler 254 nm, 366 nm UV ışık altında ve kesilen kenar kısmına vanilin-H₂SO₄ reaktifi püskürtülüp ısıtıldıktan sonra incelendi. Ayrılmak istenen bantlar, alüminyum plak kesilerek alındı. Kesilen bantlar metanol içine konarak ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilip süzüldü. Süzme işlemi Silika jeli geçirmeyecek çapta porlara sahip süzgeç kağıdından (S&S Filter paper circles, 125 mm, 589³ blue ribbon) yapıldı. Süzüntüler rotavaporda yoğunlaştırılarak, İTK ve YPSK ile saflıkları kontrol edildi.

Fr. 15-16 fraksiyonundan normal faz preparatif İTK ile elde edilen 2. fraksiyon olan Fr. 15-16 Prep 2 fraksiyonunun saflaştırılması amacıyla, ters faz preparatif ince tabaka kromatografisi uygulaması yapıldı. Bu amaçla, Silika jel 60 RP-18 F_{254S} (Merck, 105559 20x20) hazır kaplı alüminyum plaklar üzerine bant halinde uygulanan Fr. 15-16 Prep 2 fraksiyonu; metanol:su (60:40) çözücü sistemi kullanılarak ayırım sağlandı. Plaklar üzerinde ayrılan bileşikler 254 nm, 366 nm UV ışık altında ve kesilen kenar kısmına vanilin-H₂SO₄ reaktifi püskürtülüp ısıtıldıktan sonra incelendi. Ayrılmak istenen bantlar, alüminyum plak kesilerek alındı. Kesilen bantlar metanol içine konarak ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilip süzüldü. Süzme işlemi Silika jeli geçirmeyecek çapta porlara sahip süzgeç kağıdından (S&S Filter paper circles, 125 mm, 589³ blue ribbon) yapıldı. Süzüntüler rotavaporda yoğunlaştırılarak, İTK ve YPSK ile saflıkları kontrol edildi.

Kurulan kolonlardan toplanıp içerikleri kontrol edilerek birleştirilen veya preparatif İTK ile elde edilen fraksiyonlarda kristallenme olması durumunda, kristaller süzgeç kağıdından (S&S Filter paper circles, 125 mm, 589³ blue ribbon) süzülüp kurutuldu. Bu şekilde;

E5 fraksiyonunun kolona uygulanması sonrasında elde edilen Fr. 16'dan (OS-3),

Fr. 15-16'dan preparatif İTK ile ayrılan Prep. 2'den (OS-1),

Fr. 15-16 Prep. 2'den, ters faz plakla yapılan preparatif çalışmayla elde edilen Prep. 2 RP 2'den (OS-1),

Fr. 15-16 Prep. 5'in Sefadeks kolondan elde edilen 30-31 (OS-2) ve 34-35. (OS-3) fraksiyonlardan,

Fr. 19-27'nin Sefadeks kolondan toplanan 33-35. fraksiyonundan (OS-3) kristallenen kısımlar süzülerek ayrıldı. Bu şekilde elde edilen bileşikler, Şekil 2.5'te de özetlenmiştir.

2.2.1.4.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

2.2.1.4.1. Analitik Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Hazırlanan ekstratlar ve *O. spinosa* subsp. *leiosperma* 'nın etil asetat ekstesinden elde edilen fraksiyonlar İTK yanında YPSK ile de incelendi. Analiz, Agilent LC 1260 model cihaz (Agilent Technologies, California, USA) ile yapıldı ve veriler Agilent'ın yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Analiz şartları aşağıda belirtildiği şekildedir:

Kolon : ACE 5 C18 (250 mm×4,6 mm; 5 µm)

Kolon Sıcaklığı : 40°C

Dedektör : Diode Array Dedector

Dalga Boyu : 210 nm, 254 nm

Akış Hızı : 1 ml/dak.

Enjeksiyon Hacmi : 10 µl

Çözücü Sistemi : Asetonitril:%0,02 *o*-fosforik asitli su (Gradient çözücü sistemi Çizelge 2.4'de belirtilmiştir.)

Çizelge 2.4. YPSK analizinde kullanılan gradient çözücü sistemleri

Çözücü sistemi 1		
Zaman (dak)	Asetonitril (%)	%0,02 <i>o</i> -fosforik asitli su (%)
0	10	90
36	100	0
40	100	0
Çözücü Sistemi 2		
Zaman (dak)	Asetonitril (%)	%0,02 <i>o</i> -fosforik asitli su (%)
0	10	90
20	60	40
20,01	100	0
25	100	0

2.2.1.4.2. Semipreparatif Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Fr. 17-18'in Sefadeks kolona uygulanmasıyla elde edilen 36. fraksiyonundan (57,4 mg) izolasyon amacıyla semipreparatif YPSK yöntemi kullanıldı. Çalışmada, Agilent LC 1200 model cihaz (Agilent Technologies, California, USA) kullanıldı ve veriler Agilent'in yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Analiz şartları aşağıda belirtildiği şekildedir:

Kolon	: ACE 10 C18 (250 mm×10 mm; 10 µm)
Kolon Sıcaklığı	: 40°C
Dedektör	: Diode Array Dedector
Dalga Boyu	: 210 nm
Akış Hızı	: 5 ml/dak.
Enjeksiyon Hacmi	: 25 µl
Çözücü Sistemi	: Asetonitril:su (Gradient çözücü sistemi Çizelge 2.5'te belirtilmiştir.)

Çizelge 2.5. Semipreparatif YPSK çalışmasında kullanılan gradient çözücü sistemi

Zaman	Asetonitril (%)	Su (%)
0	10	90
15	47,5	52,5
15,01	100	0
20	100	0

Semipreparatif YPSK yöntemi ile istenen fraksiyonun pikleri ayrı ayrı toplandı, ardından çözücü olarak kullanılan asetonitril yoğunlaştırılıp sulu kısım liyofilize edildi. Bu yöntem ile ;

Fr. 17-18 Seph. 31-32 (OS-5),

Fr. 17-18 Seph. 33-35 (OS-2, OS-5),

Fr. 17-18 Seph. 36 (OS-2, OS4),

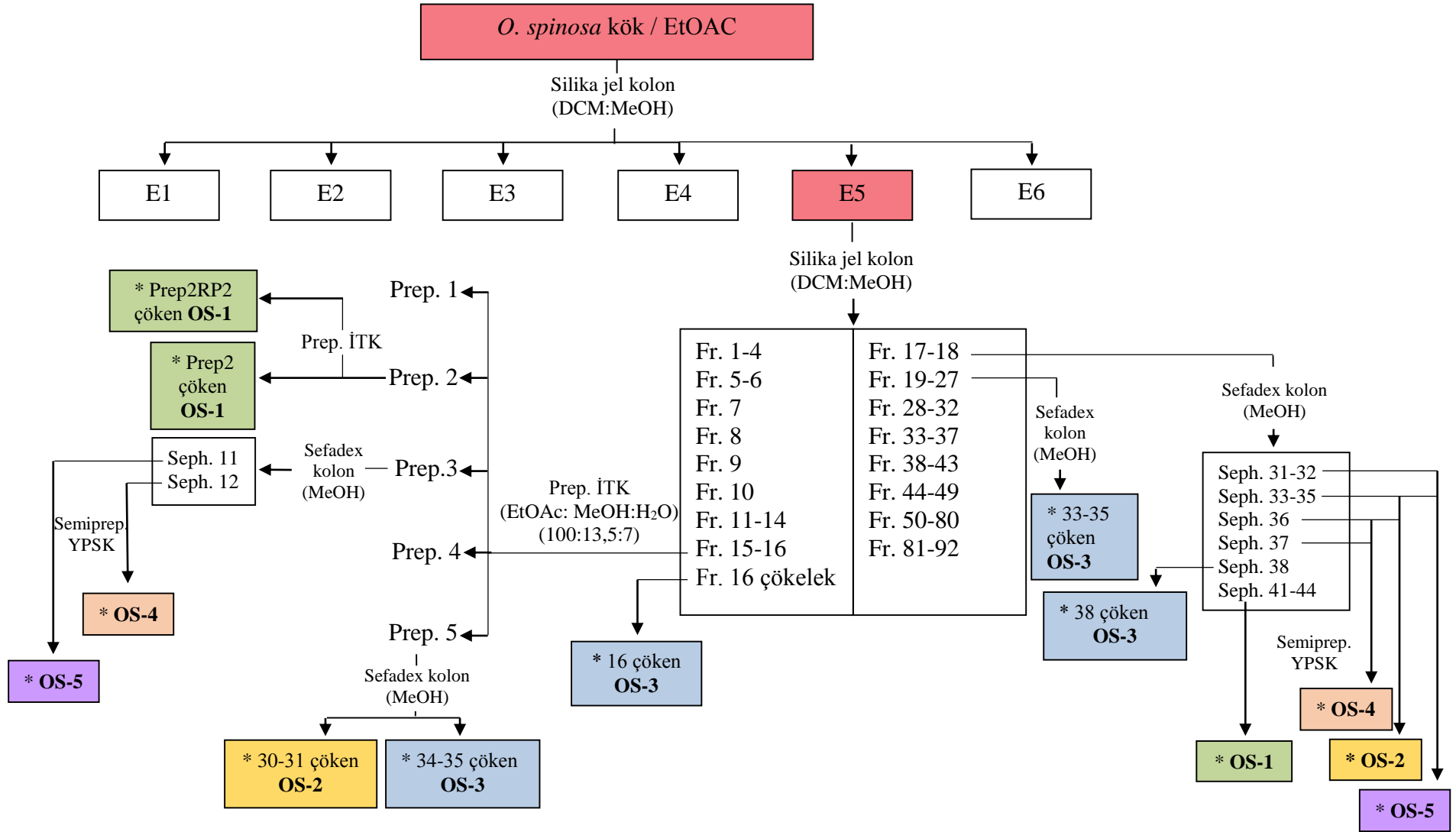
Fr. 17-18 Seph. 37 (OS-4),

Fr. 17-18 Seph. 41-44 (OS-1),

Prep 3 Seph. 11 (OS-5),

Prep. 3 Seph. 12 (OS-4, OS-5) fraksiyonlarından saf bileşikler elde edildi.

O. spinosa subsp. *leiosperma*'nın köklerinden hazırlanan etil asetat ekstresinin biyoaktivite yönlendirmeli olarak fraksiyonlanma, saflaştırma ve izolasyon basamakları, Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. *O. spinosa* subsp. *leiosperma*'nın köklerinden hazırlanan etil asetat ekstresinin aktivite yönlendirmeli fraksiyonlanma, saflaştırma ve izolasyon basamakları

2.2.2. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini

Kolon ve preparatif ince tabaka kromatografisi yardımıyla birbirinden ayrılan bileşikler kristallendirme ya da kromatografik yöntemlerle saflaştırıldı ve her bir bileşiğin yapısı aşağıda belirtilen spektroskopik yöntemlerle tayin edildi.

2.2.2.1. NMR Spektrometrisi

Bileşiklerin dötometanol (MeOD) ve dimetil sülfoksit (DMSO) içinde hazırlanan çözeltilerinin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR, DEPT, HMBC, HSQC, COSY, TOCSY ve NOESY spektrumları, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı II'de bulunan Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digi NMR Spektrometre cihazı kullanılarak alındı.

2.2.2.2. Kütle Spektrometrisi (MS)

İzole edilen bileşiklerin kütleleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı II'de bulunan Waters 2695 Allia Micromass ZQ marka LC/MS cihazı ile ölçüldü. Örnekler metanol içinde çözülüp, belirtilen şartlar altında 2 µl enjekte edilerek analizleri yapıldı.

YPSK Sistemi	: Waters Alliance
Kolon	: C 18
Hareketli Faz A	: Metanol:Su (50:50)
Hareketli Faz B	: Asetonitril
Akış Hızı	: 0,5 ml/dak
Sıcaklık	: 25°C
Enjeksiyon Hacmi	: 10 µl

2.2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bu çalışmada, biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yapılması dolayısıyla, önce tüm ekstrelerin aktivite tayinleri yapıldı ve ardından sonuçlar değerlendirilerek aktif ekstrenin (*O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin) fraksiyonlanması işlemine geçildi. Sonrasında bu ekstrede elde edilen fraksiyonların aktivite testlerinin sonuçları incelenerek saflaştırma işlemi ile devam edilecek fraksiyon tespit edildi (E5). Çalışmanın son basamağında, bu fraksiyondan izole edilen bileşiklerin aktivitelerinin tayini yapıldı.

2.2.3.1. Test Numunelerinin Hazırlanması

Yara iyileştirici aktivite tayini için test numuneleri, Madecassol® pomat'ın (Bayer) bazı olan glikol sterarat: 1,2 propilen glikol: sıvı parafin (3:6:1) içinde %1 oranında ekstre olacak şekilde hazırlandı.

Antienflamatuvar aktivite tayini için numuneler; %0,5'lik sodyum karboksimetil selüloz (CMC) çözeltisi içinde ekstrelerin süspanse edilmesiyle hazırlandı ve deney hayvanlarına özel mide gavajı ile, oral yolla uygulandı. Kontrol grubundaki hayvanlara yalnızca %0,5'lik CMC çözeltisi uygulandı.

2.2.3.2. Referans Maddelerin Hazırlanması

Yara iyileştirici aktivite tayini için; referans madde grubundaki deney hayvanlarına, standart yara iyileştirici madde olarak haricen, 500'er mg Madecassol® pomat uygulandı.

Antienflamatuvar aktivite tayini sonuçlarının karşılaştırılması için referans madde olarak 10 mg/kg indometasin içeren %0,5'lik CMC çözeltisi kullanıldı.

2.2.3.3. Yara İyileştirici Aktivite Tayini

2.2.3.3.1. *In Vivo* Deneyler

2.2.3.3.1.1. Çizgisel İnsizyon Yara Modeli

Bu modelde, Lodhi ve ark. (2006) ile Suguna ve ark.'nın (2002) yöntemi kullanılarak, test numunelerinin kolajen yapımı ve yara gerilme kuvvetini arttırıcı etkileri tespit edildi. Bu amaçla, genel anestezi yapılan sıçanların sırt kısımlarında iki tane insizyon yarası oluşturuldu. Yaraya cerrahi ipek iplikle dikiş atılıp, günde 1 kez olmak üzere 9 gün süre ile haricen 500 mg ekstre içeren merhem formülasyonu uygulandı. 9 günün sonunda dikişler alındı ve hayvanlar 10. gün yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Cerrahi makasla kesilerek alınan yara oluşturulmuş bölgelerden biri histopatolojik incelemeler için saklanırken, diğerinin tensiometre ile gerilme kuvveti ölçüldü (Süntar ve ark., 2011).

2.2.3.3.1.2. Dairesel Eksizyon Yara Modeli

Sadaf ve ark. tarafından geliştirilen yöntem (2006), bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı ve dairesel eksizyon yara modelinde yara alanları gün aşırı ölçülerek, yara alanlarındaki küçülme tespit edildi.

Genel anestezi yapılan farelerde, biyopsi punch ile 5 mm çapında dairesel eksizyon yarası oluşturuldu. Bu yaralara 12 gün süreyle, haricen 500 mg ekstre içeren merhem formülasyonu uygulandı ve her gün yaranın fotoğrafı çekildi. Çekilen fotoğraflardan, ve AutoCAD programı kullanılarak, yara alanlarındaki küçülme tespit edildi ve yüzde kontraksiyon oranları hesaplandı (Küpeli Akkol ve ark., 2011).

2.2.3.3.1.3. L (-) Hidroksiprolin Tayini

Hidroksiprolin tayini için, Woessner tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı (Woessner, 1961; Değim ve ark., 2002).

Öncelikle, 5 mg hidroksiprolin 50 ml 0.001 N HCl'de çözülerek hidroksiprolin standartı için stok çözelti hazırlandı ve 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 1,5 µg/ml; 2 µg/ml ve 2,5 µg/ml konsantrasyonda dilüe edildi.

Ölçüm yapılacak dokular tartılarak pyrex tüplere kondu ve 5 ml 6 N HCl ilave edildi. 130°C'de 3 saat hidroliz edildi. İndikatör olarak birkaç damla %0,02'lik metil kırmızısı eklendikten sonra, çözeltinin rengi sarıya dönene kadar (pH 6-7 arasında olana kadar) 2,5 N NaOH ilave edildi.

Standart ve test çözeltilerinin 2 ml'si üzerine 1 ml Kloramin T ilave edilerek 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından üzerine 1 ml perklorik asit ve 1 ml 0,2 g/ml *p*-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi eklendi. Oluşan tabakalanma kaybolana kadar çalkalandıktan sonra, 20 dakika süreyle 60°C su banyosunda bekletildi. Musluk suyunda 5 dakika soğutulan çözeltilerin absorbansı 557 nm'de ölçüldü.

2.2.3.3.1.4. Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik inceleme için alınan dokuların %10 tamponlu formalin içinde tespit edilmesi sonrasında dokular parafin içine gömüldü. Ardından parafinle bloklanmış dokular 5 µ kalınlığında kesildi. Hematoksilin-eozin ve Van Gieson ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelendi. Dokulardaki epidermal ve dermal re-modelleme hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi. Epidermisteki re-epitelizasyon veya ülser gelişimi ile dermisteki fibroblast proliferasyonu, mononükleer/polimorfonükleer hücreler, neovaskülarizasyon ve kolajen birikimi incelenerek epidermal ve dermal re-modelleme değerlendirildi. Sonrasında, tüm gruplardan elde edilen sonuçlar birleştirilerek yara iyileşmesinin fazları olan

enflamasyon, proliferasyon ve re-modelleme yönünde evrelendirildi (Süntar ve ark. 2010).

2.2.3.3.2. In Vitro Deneyleler

İzole edilen bileşikler *in vitro* testlere tabi tutuldu. Bu testlerde; bileşiklerin dokunun temel elemanlarından olan hyaluronik asit, kolajen ve elastinin yıkımına neden olan hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri edildi.

2.2.3.3.2.1. Hyaluronidaz Enzim İnhibisyonu Tayini

Lee ve Choi (1999) ile Sahasrabudhe ve Deodhar (2010) tarafından geliştirilen, sodyum hyaluronattan salınan *N*-asetilglukozamin miktarının tespitine dayalı yöntem ile hyaluronidaz enzim inhibisyonu tayin edildi.

Bu yöntemde, 7000 ünite/ml sığır hyaluronidazının 50 µl'si 0,1 M asetat tamponunda (pH 3,6) çözüldü. Bu karışım ile, %5 DMSO içinde iki ayrı konsantrasyonda çözülmüş olan test maddesinin 50 µl'si karıştırıldı. Kontrol grubunda yalnız 50 µl %5 DMSO kullanıldı. Hazırlanan karışım 37°C'de 20 dakika süreyle inkübe edildi ve ardından 50 µl 12,5 mM kalsiyum klorür ilave edilerek aynı şartlarda 20 dakika daha inkübasyona bırakıldı. 1,2 mg/ml konsantrasyondaki sodyum hyaluronattan 250 µl ilave edilip 37°C'de 40 dakika daha inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, karışım içine 50 µl 0,4 M sodyum hidroksit ile 100 µl 0,2 M sodyum borat eklendi ve 3 dakika süreyle kaynar su banyosunda bekletildi. Karışım soğuduktan sonra, 1,5 ml *p*-dimetil aminobenzaldehit çözeltisi ilave edildi ve tekrar 37°C'de 20 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan çözeltinin absorbansı, 585 nm dalga boyunda, Beckmann Due Spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Referans madde olarak, 100 µg/ml konsantrasyondaki tannik asit çözeltisi kullanıldı.

2.2.3.3.2.2. Kolajenaz Enzim İnhibisyonu Tayini

50 mM tris tamponu (10 mM CaCl₂ ve 400 mM NaCl ile) içinde, *Clostridium histolyticum* kolajenaz enzimi (ChC) 0,8 ünite/ml olacak şekilde çözüldü. Aynı tampon içinde 2 mM olacak şekilde substrat N-[3-(2-furil) akrilolil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) hazırlandı. Her kuyucuğa 25 µl tampon, test maddesi ve enzim eklenip 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Üzerine 50 µL substrat eklenip 340 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü (Barrantes ve Guinea, 2003). Her örnek üç tekrarlı çalışıldı. Referans madde olarak 100 µg/ml konsantrasyonda epigallokateşin gallat kullanıldı.

Enzim inhibisyon değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

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

A_a: Kontrol grubunun absorbans değeri

A_b: Test numunesinin absorbans değeri

2.2.3.3.2.3. Elastaz Enzim İnhibisyonu Tayini

Hazırlanan test maddeleri ve insan nötrofil elastaz enzimi (HNE) (17 mU/ml), 0,1 M tris-HCl tamponu (pH 7,5) içinde 25°C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Üzerine HNE'nin substratı olan N-(metoksisukkinil)-Ala-Ala-Pro-Val 4-nitroanilid (MAAPVN) (500 IM) ilave edilen karışım, bu kez 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Ardından karışım içine 1 mg/ml soya tripsin inhibitörü eklendi ve nitroanilin oluşumuna bağlı olarak 405 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü (Melzig ve ark., 2001).

Enzim inhibisyon değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

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

A_a : Kontrol grubunun absorbans değeri

A_b : Test numunesinin absorbans değeri

2.2.3.4. Antienflamatuvar Aktivite Tayini

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

Whittle'in geliştirdiği modele göre; kapiller damarlarda protein geçirgenliğini arttıran plazmanın vücut boşluğuna eksudasyonuna sebep olan asetik asit kullanılmakta ve proteine bağlanma yeteneğine sahip Pontamine Sky Blue veya Evans Blue gibi boyar maddeler yardımıyla, oluşturulan eksudasyon ile test numunesinin bu eksudasyonu inhibisyonu tespit edilmektedir (Küpeli, 2000).

Test numunesi ve referans zltiler farelere uygulandıktan 30 dakika sonra, farelerin marjinal kuyruk venasına %4'lk Evans Blue zltisinden enjekte edildi. Boyar madde enjeksiyonundan 10 dakika sonra, intraperitoneal yolla %0,5'lik asetik asit zltisi uygulandı. 20 dakika sonra, fareler servikal dislokasyonla öldürülerek periton içeriği distile su ile yıkanarak içinde 0,1 N NaOH bulunan 10 ml'lik balon jöjelere aktarıldı ve distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Beckman Due Spektrofotometre kullanılarak, 590 nm'de boyar maddenin absorbansı ölçüldü.

2.2.3.4.2. TPA-Nedenli Kulak Ödemi

Farelerin sağ kulağının iç ve dış tarafına 20 µl %70 etanol içinde çözülen 2,5 µg TPA'dan 10 µl; sol kulağına ise sadece etanol damlatıldı. TPA çözeltisinin ardından sağ kulağına %70 etanolde çözülmüş test numunesi (1 mg/kulak) ve referans madde (0,5 mg/kulak dozda indometasin) uygulandı. Uygulamadan 4 saat sonra, hayvanlar yüksek doz anestezik enjeksiyonu ile öldürüldü ve kulak kalınlıkları mikrometrik kompas (Ozaki Co, Tokyo, Japonya) yardımıyla ölçüldü, iki kulak arasındaki şişme farkı ödem miktarı olarak kaydedildi. Ardından, kulaklar bir mantar deleceği ile 5 mm'lik çapta kesildi ve hassas terazide tartıldı. Her iki kulak arasındaki ödemin ağırlık farkına bakılarak % inhibisyon değeri hesaplandı.

2.2.3.4.3. Karragenin-Nedenli Arka Ayak Ödemi

Bu çalışma için Kasahara ve ark. tarafından (1985) geliştirilen yöntem modifiye edilerek uygulandı (Yeşilada ve Küpeli, 2007).

Öncelikle farelere oral yolla test numuneleri ve referans (indometasin 10 mg/kg) uygulandı. Uygulamadan 1 saat sonra, farelerin sağ arka ayaklarının subplantar dokularına 25 µl karragenin süspansiyonu (Carrageenan, Sigma Co., No:C-1013) (50 mg'ı 2,5 ml serum fizyolojik içerisinde süspanse edilmiş); sol arka subplantar dokusuna ise kontrol amacıyla 25 µl serum fizyolojik solüsyonu enjekte edilerek ödem oluşturuldu. Ödem oluşumundan itibaren 90 dakika ara ile her iki ayak kalınlıkları mikrometrik kompas (Ozaki Co, Tokyo, Japonya) yardımıyla ölçülerek aralarındaki şişme farkı ödem miktarları olarak kaydedildi.

2.2.3.4.4. Freund's Complete Adjuvant-Nedenli Artrit Modeli

Sıçanlara 14 gün süreyle test maddesi ve referans madde (indometasin) per os verildi. Uygulama sonrasındaki 3. gün, sıçanların sağ arka ayaklarının subplantar dokularına 100 µl Freund's Complete Adjuvant (FCA) (Sigma Co., F-5881) enjekte edilerek ödem oluşumu sağlandı. Ödem oluşmasından sonraki 3. günde ve bunu takip eden 14

gün boyunca hayvanların sağ ve sol ayak hacimleri kompas ile ölçüldü ve ödem miktarı hesaplandı.

2.2.3.5. Antioksidan Aktivite Tayini

2.2.3.5.1. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Menekşe renkli bir bileşik olan DPPH radikalinin, antioksidan varlığında indirgenerek rengini kaybetmesi ve proton transferi sonucunda, 517 nm dalga boyunda çözeltinin absorbansındaki azalmanın ölçümüne dayalı olan bu yöntemde; metanolde çözülen test numunelerine, metanolde 80 µg/ml konsantrasyondaki DPPH çözeltisi ilave edildi ve 30 dakika bekletildi. Ardından çözeltinin absorbansı, spektrofotometrede, 517 nm dalgaboyunda ölçüldü (Albayrak ve ark., 2010; Pattanayak ve ark., 2011).

2.2.3.5.2. ABTS⁺ Radikalini Süpürücü Aktivite Tayini

Maksimum absorbansı 660, 734 ve 820 nm dalga boyunda görülen ABST radikal kationun (ABTS⁺) absorbansının bir antioksidan ile inhibisyonuna dayanan bu yöntemde test çözeltilerinin troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri değerlendirildi (Albayrak ve ark., 2010).

ABTS⁺ radikali oluşturmak amacıyla; ABTS'in sudaki çözeltisinin (7mM) potasyum persülfat (K₂S₂O₈) ile karıştırılmasıyla elde edilen, 2.45 mM konsantrasyondaki çözelti, 12-16 saat karanlıkta bekletildi ve çözeltinin absorbansı, oda sıcaklığında, 734 nm dalga boyunda, 0.700±0.030 olacak şekilde ayarlandı. Ardından, 15 µl test numunesi üzerine, hazırlanan radikal çözeltisinden 1.485 µl ilave edildi. Reaksiyon kinetiği 15 dakika süreyle, 1'er dakikalık aralıklarla 734 nm dalga boyunda ölçüldü. Konsantrasyona karşı inhibisyon yüzdeleri troloks eşdeğeri olarak hesaplandı (Pattanayak ve ark., 2011).

2.2.3.5.3. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi

Test numunesinden 1 ml alınarak üzerine 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH 6,6) ile %1 lik potasyum hekzasiyanoferrat çözeltisinden 2,5 ml ilave edildi. Karışım 50°C de 30 dakika bekletildikten sonra 2,5 ml %10 luk trikloro asetik asit çözeltisi eklenerek 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında üst kısımdan 2,5 ml alınıp, 2,5 ml su ve 0,5 ml %0.1 lik FeCl₃ çözeltisi ile karıştırılarak 700 nm dalga boyunda çözeltinin absorbansı okundu. Analizler iki tekrarlı yapıldı ve sonuçlar ortalama değerler olarak verildi. Numunelerin indirgeme gücü askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak belirtildi (Singhal ve ark., 2011).

2.2.3.5.4. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması

Test numunesinden 100 µl, 50 mM KH₂PO₄-NaOH tampon (pH 7,4) içindeki 5,6 mM 2-deoksiribozdan 500 µl, önceden hazırlanmış 100 µl FeCl₃ ve 104 mM EDTA (1:1 h/h) çözeltisi, 100 µl 1,0 mM H₂O₂ ve 1,0 mM sulu askorbik asit çözeltisinden 100 µl alınıp vorteksle karıştırıldı ve 50°C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon karışımı üzerine, 1 ml %2,8 trikloroasetik asit ve 1 ml %1,0 tiyobarbitürik asit ilave edildi. Elde edilen karışım tekrar 50°C'de 30 dakika bekletildi. Meydana gelen oksidasyon, 532 nm dalga boyunda ölçüldü. Analizler iki tekrarlı yapıldı ve sonuçlar ortalama değerler olarak verildi. Sonuçlar aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanarak mannitole eşdeğer (mmol mannitol/g örnek) olarak verildi (Pattanayak ve ark., 2011).

$$\text{İnhibisyon yüzdesi} = [(A_k - A_0) / A_k] \times 100$$

A_k: Kontrolün absorbansı

A₀: Örnek absorbansı

2.2.3.6. Deneyin Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

Tek yönlü “ANOVA” testini içeren “Instat” (Windows) istatistik programı kullanılarak deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi yapıldı. Aktif çıkan ekstre ve fraksiyonlarda ayrıca Students-Newman-Keuls posthoc testi kullanıldı.

Kontrol ve referans grubu ile karşılaştırılan deney sonuçlarındaki istatistiksel belirginliğin ifade edilişi * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ şeklinde yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

3.1.1. Ekstrelerin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

O. spinosa subsp. *leiosperma*, *O. variegata*, *O. viscosa* subsp. *brevifolia* ve *O. natrix* subsp. *natrix* örneklerinin kurutulmuş kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin yüzde verimleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Ononis* türlerinden hazırlanan ekstrelerin % verimleri

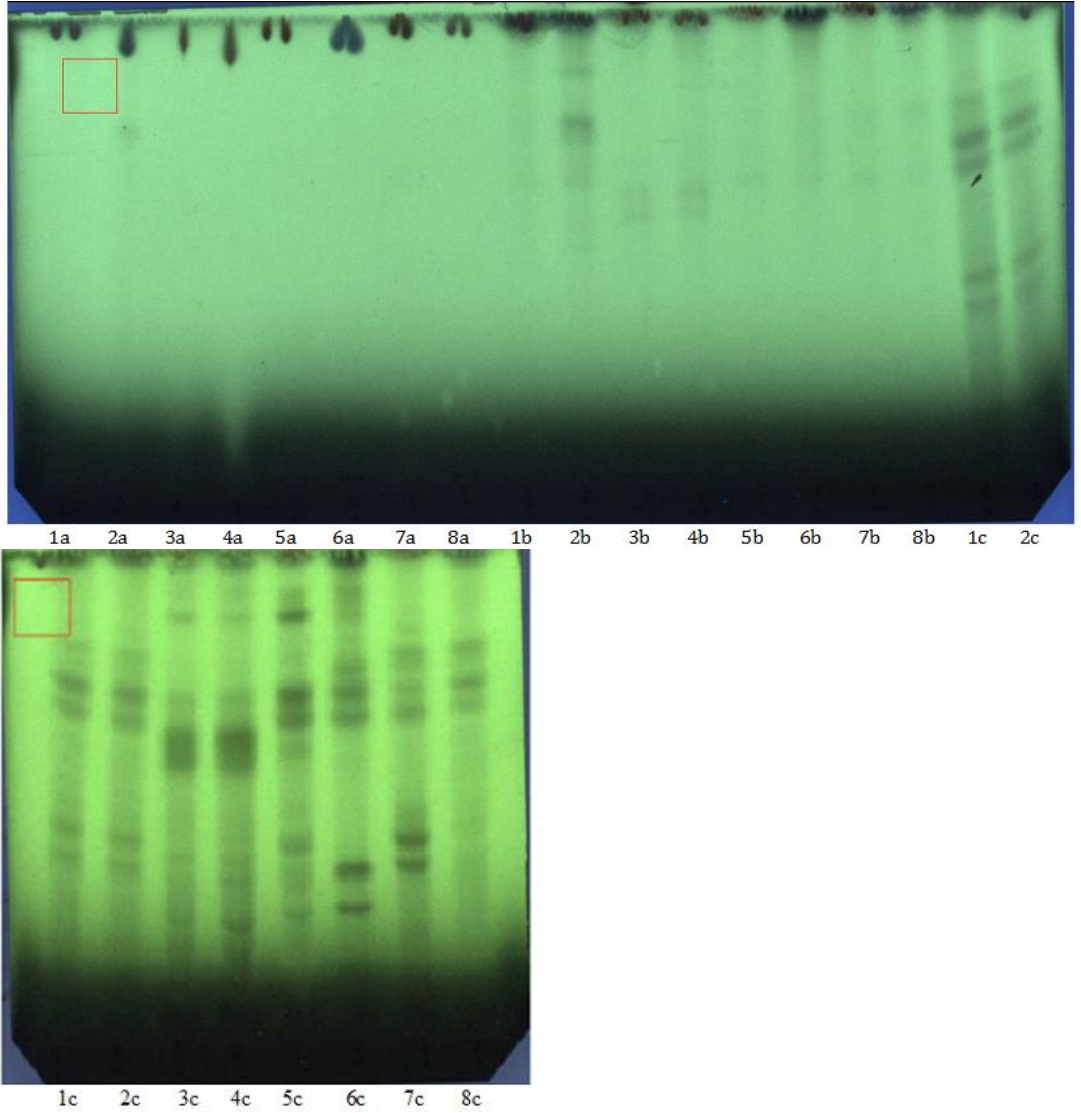
		% Verim		
		<i>n</i> -Hekzan	Etıl asetat	Metanol
<i>O. spinosa</i> subsp. <i>leiosperma</i>	Toprak üstü	0,75	0,97	8,47
	Kök	0,44	1,91	8,14
<i>O. variegata</i>	Toprak üstü	1,63	0,96	7,51
	Kök	1,14	0,96	6,88
<i>O. viscosa</i> subsp. <i>brevifolia</i>	Toprak üstü	1,03	1,09	9,11
	Kök	0,65	0,49	8,74
<i>O. natrix</i> subsp. <i>natrix</i>	Toprak üstü	4,14	5,34	6,55
	Kök	0,25	1,93	7,35

3.1.2. Kromatografik Bulgular

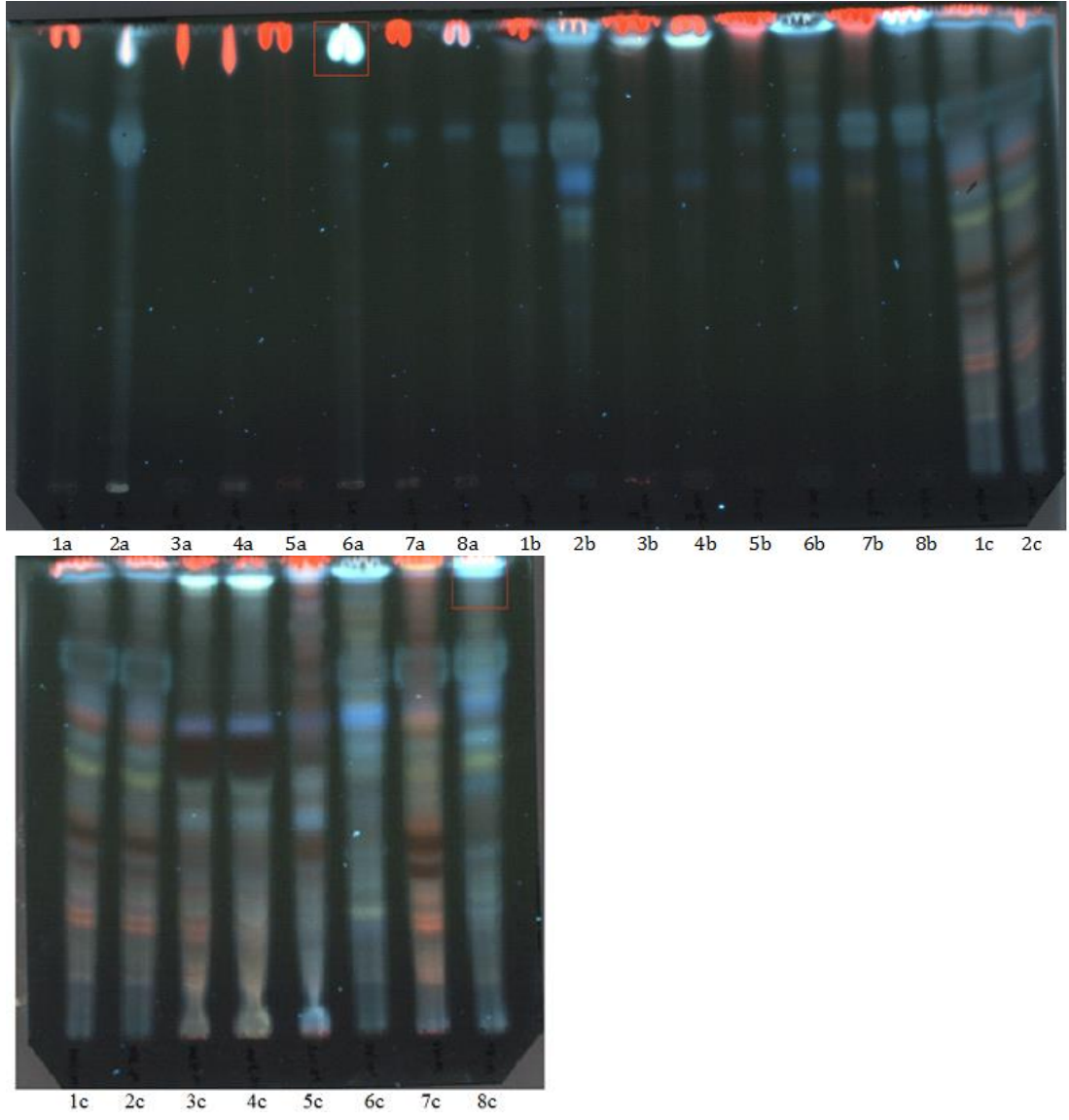
3.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları

O. spinosa subsp. *leiosperma*, *O. variegata*, *O. viscosa* subsp. *brevifolia* ve *O. natrix* subsp. *natrix* örneklerinin kurutulmuş kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin İTK analizleri 3 ayrı çözücü sistemi ile yapıldı, ardından UV lambası altında (254 nm, 366 nm) ve plaklara anisaldehit-H₂SO₄ reaktifi püskürtülüp ısıtıldıktan sonra görünür ışıkta incelendi. Şekil 3.1-3.9’da, 3 ayrı çözücü sisteminde, ekstreler [*O. natrix* subsp. *natrix* toprak üstü *n*-hekzan ekstresi (1a), köklerinin *n*-hekzan ekstresi (2a); *O. variegata* toprak üstü *n*-hekzan ekstresi (3a), kök *n*-hekzan ekstresi(4a); *O. spinosa* subsp. *leiosperma* toprak üstü *n*-hekzan ekstresi (5a), kök *n*-

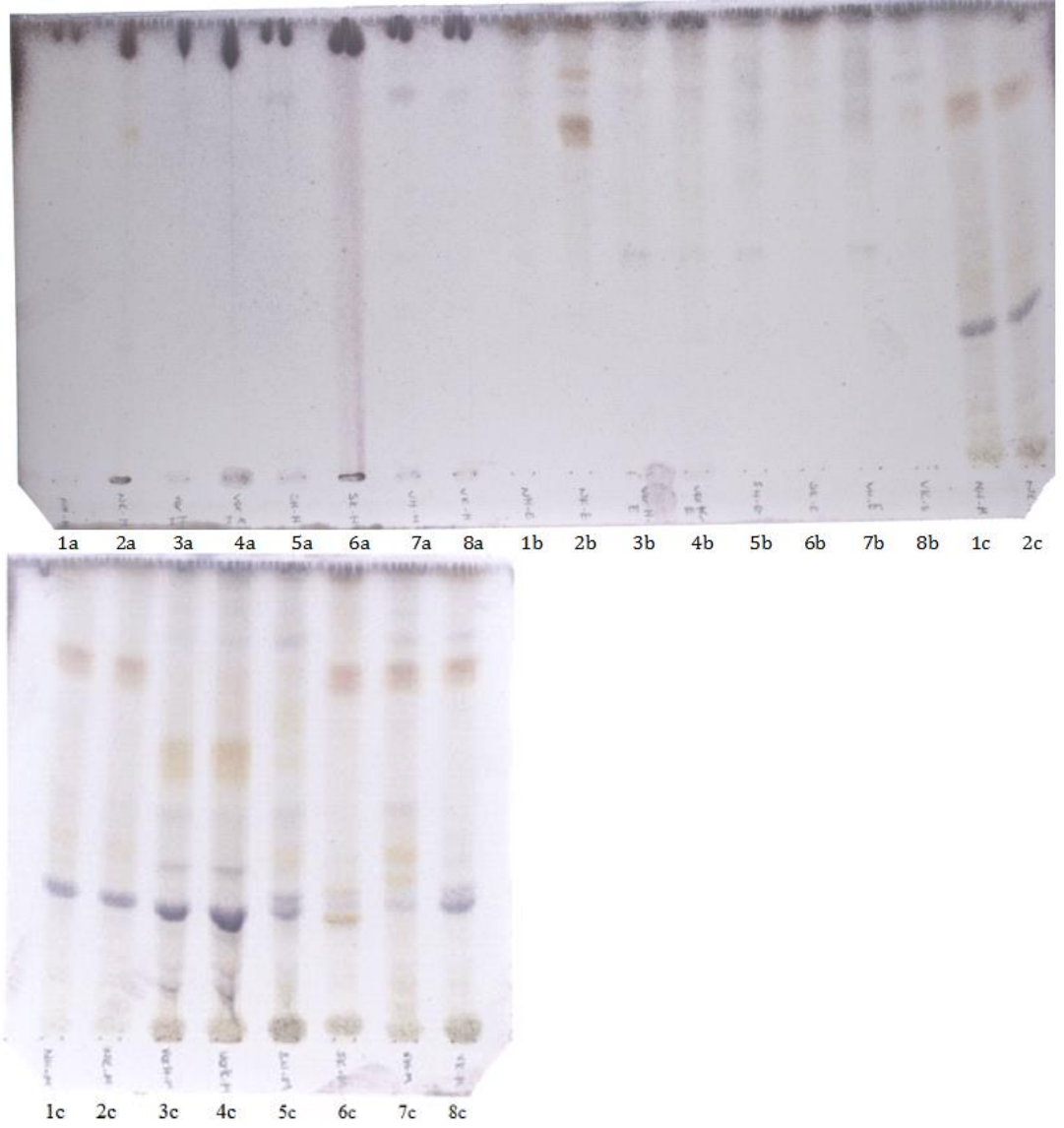
hekzan ekstresi (6a); *O. viscosa* subsp. *brevifolia* toprak üstü *n*-hekzan ekstresi (7a), kök *n*-hekzan ekstresi (8a); *O. natrix* subsp. *natrix* toprak üstü etil asetat ekstresi (1b), köklerinin etil asetat ekstresi (2b); *O. variegata* toprak üstü etil asetat ekstresi (3b), kök etil asetat ekstresi (4b); *O. spinosa* subsp. *leiosperma* toprak üstü etil asetat ekstresi (5b), kök etil asetat ekstresi (6b); *O. viscosa* subsp. *brevifolia* toprak üstü etil asetat ekstresi (7b), kök etil asetat ekstresi (8b); *O. natrix* subsp. *natrix* toprak üstü metanol ekstresi (1c), köklerinin metanol ekstresi (2c); *O. variegata* toprak üstü metanol ekstresi (3c), kök metanol ekstresi (4c); *O. spinosa* subsp. *leiosperma* toprak üstü metanol ekstresi (5c), kök metanol ekstresi (6c); *O. viscosa* subsp. *brevifolia* toprak üstü metanol ekstresi (7c), kök metanol ekstresi (8c)] gösterilmiştir.



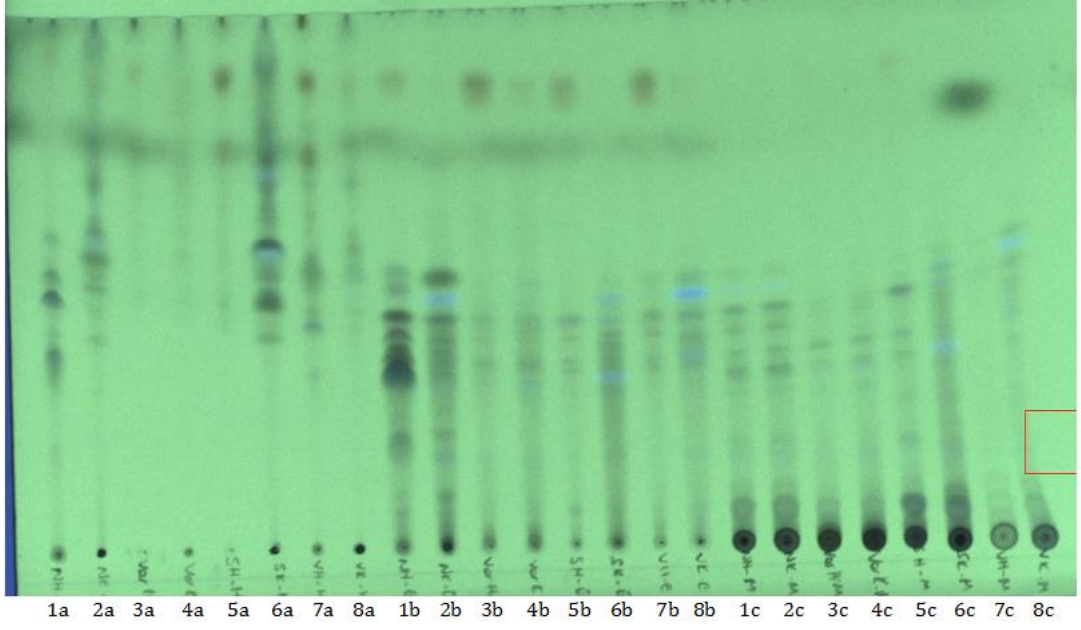
Şekil 3.1. *Ononis* türlerinin etil asetat:glasiyal asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) sisteminde UV 254 nm'deki İTK kromatogramları



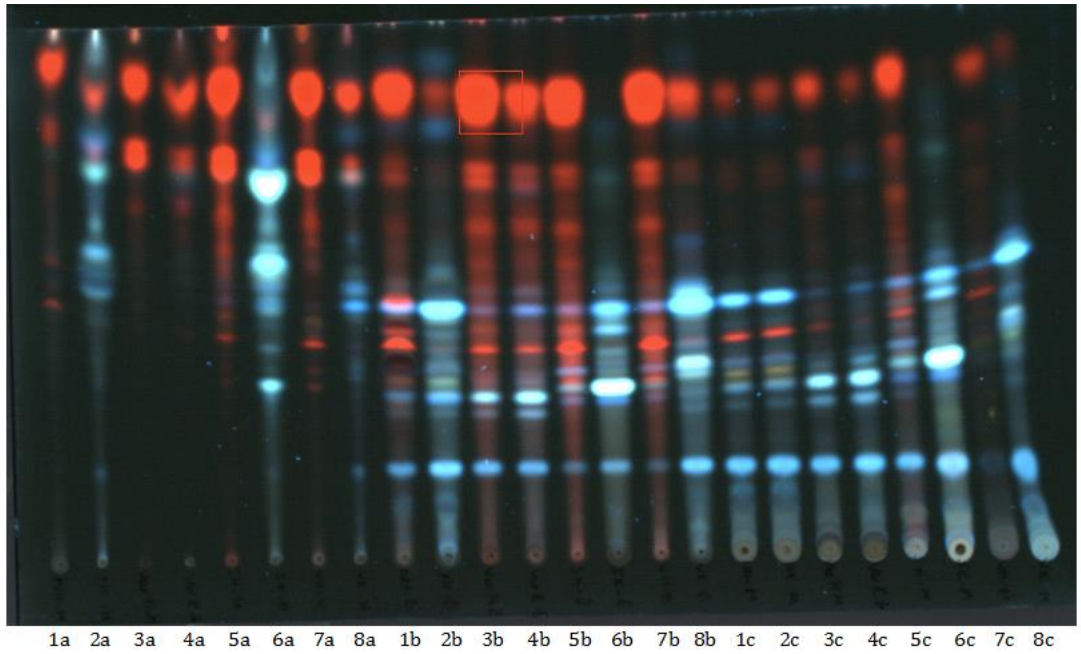
Şekil 3.2. *Ononis* türlerinin etil asetat:glasiyal asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) sisteminde UV 366 nm'deki İTK kromatogramları



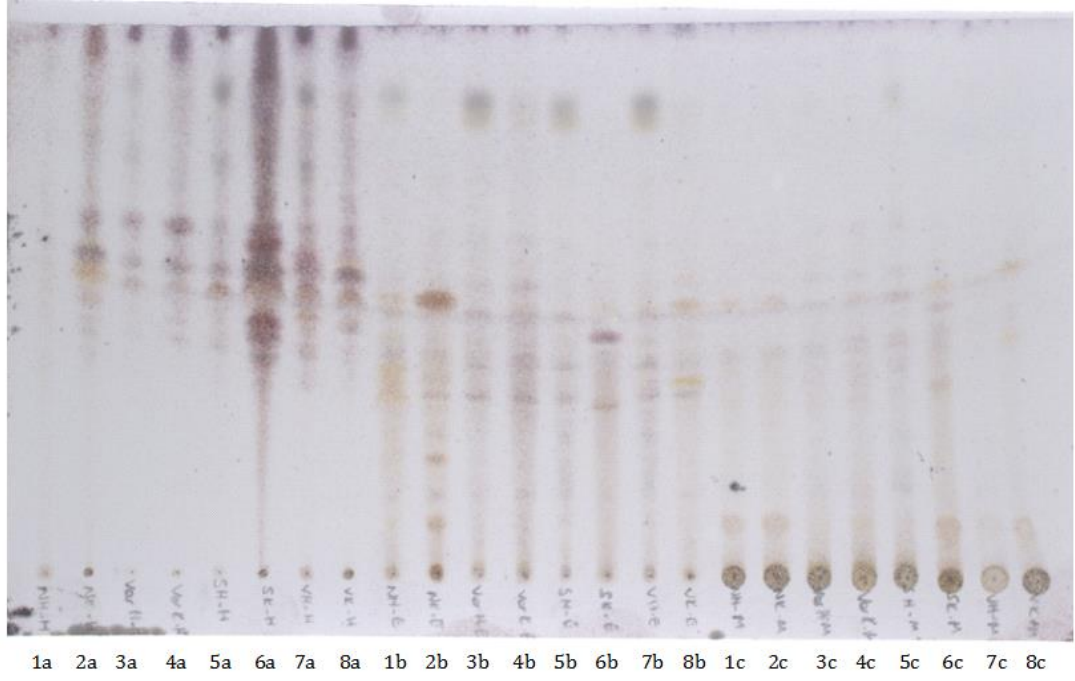
Şekil 3.3. *Ononis* türlerinin etil asetat:glasiyal asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) sisteminde anisaldehyt- H_2SO_4 ile muamele sonrası İTK kromatogramları



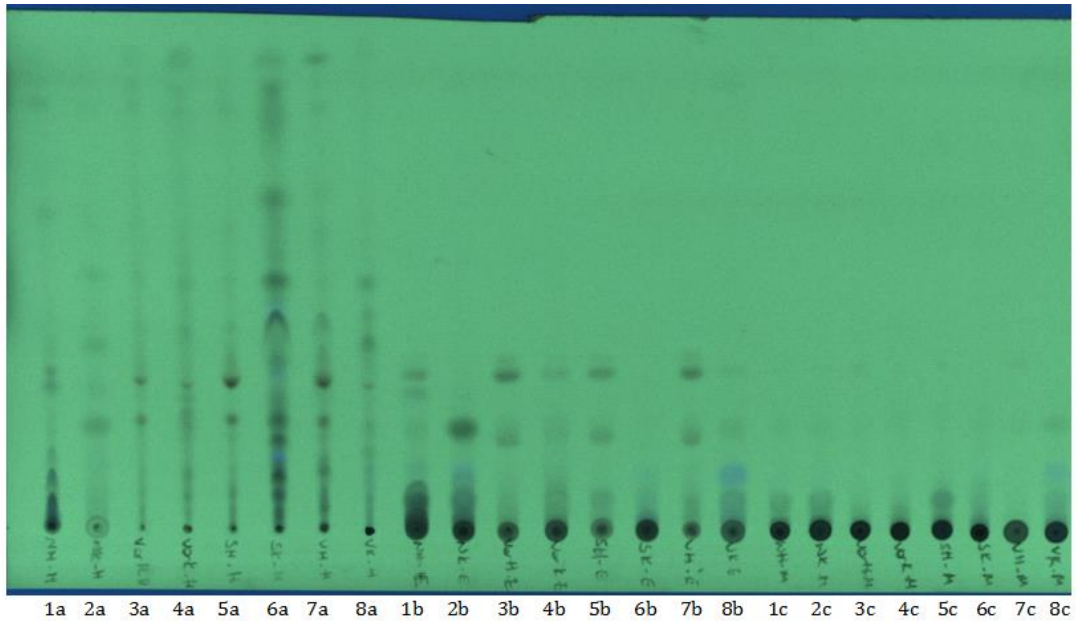
Şekil 3.4. *Ononis* türlerinin toluen:kloroform:etanol (40:40:10) sisteminde UV 254 nm'deki İTK kromatogramları



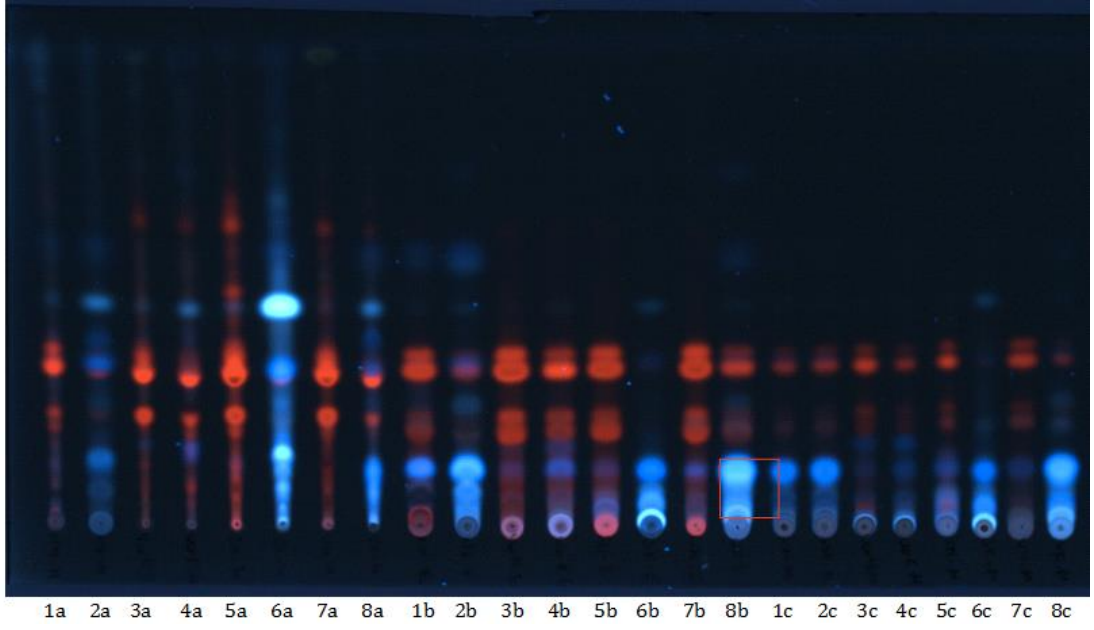
Şekil 3.5. *Ononis* türlerinin toluen:kloroform:etanol (40:40:10) sisteminde UV 366 nm'deki İTK kromatogramları



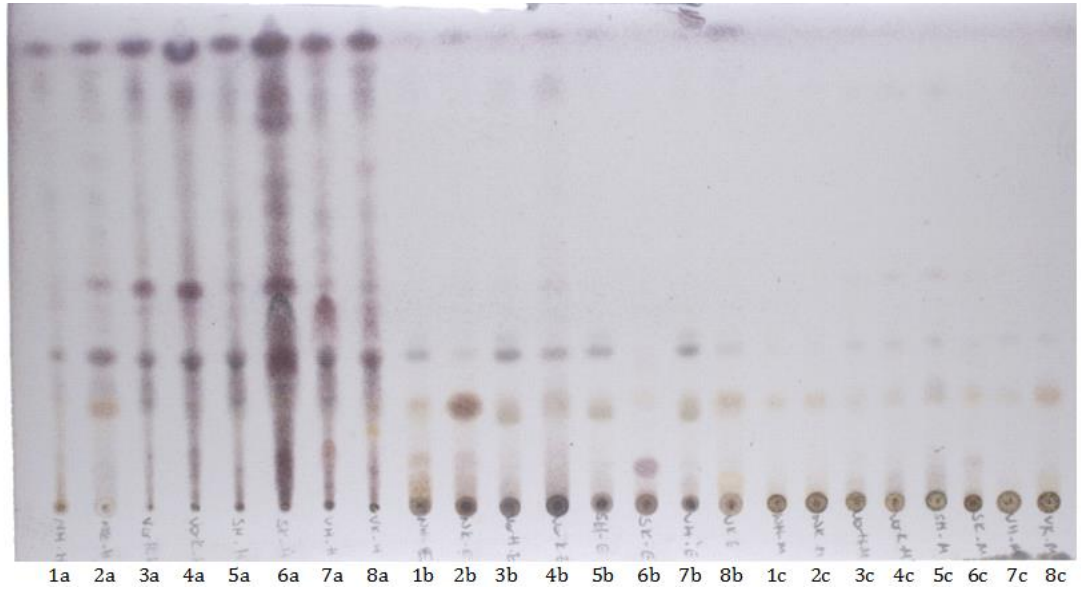
Şekil 3.6. *Ononis* türlerinin toluen:kloroform:etanol (40:40:10) sisteminde anisaldehit- H_2SO_4 ile muamele sonrası İTK kromatogramları



Şekil 3.7. *Ononis* türlerinin *n*-hekzan: etil asetat (80:20) sisteminde UV 254 nm'deki İTK kromatogramları



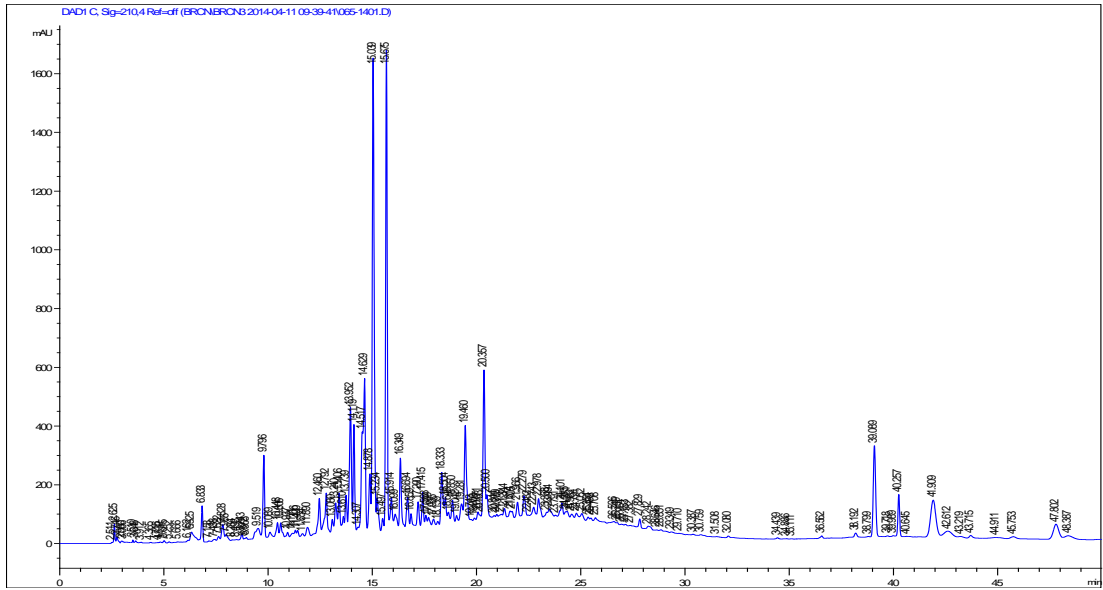
Şekil 3.8. *Ononis* türlerinin *n*-hekzan: etil asetat (80:20) sisteminde UV 366 nm'deki İTK kromatogramları



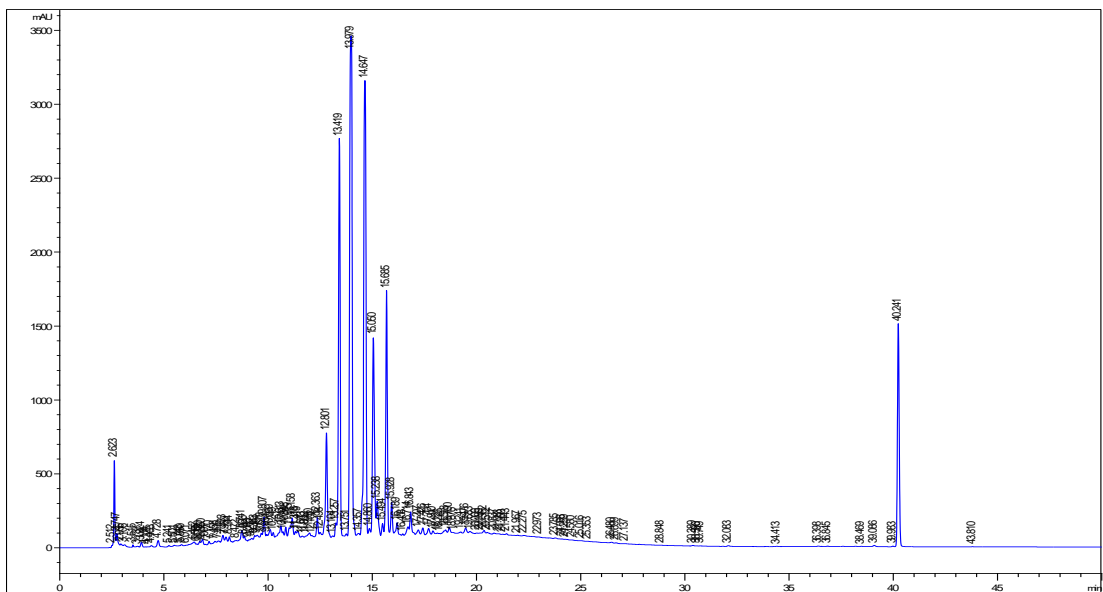
Şekil 3.9. *Ononis* türlerinin *n*-hekzan: etil asetat (80:20) sisteminde anisaldehyit-H₂SO₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları

3.1.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Bulguları

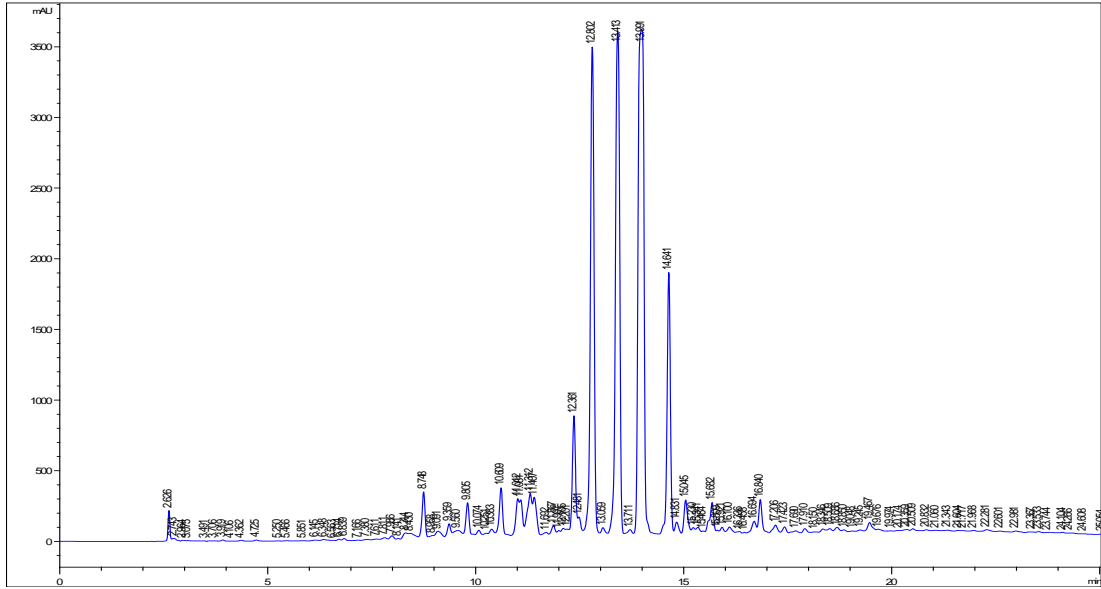
En yüksek yara iyileştirici ve antienflamatuar aktiviteye sahip ekstre olan *O. spinosa* subsp. *leiosperma*'nın etil asetat ekstresinin ve bu ekstrede, etkiden sorumlu bileşikler izole etme sürecinde elde edilen fraksiyonların 210 nm dalga boyundaki YPSK kromatogramları Şekil 3.10-3.19'da, izole edilen bileşiklerin 210 nm dalga boyundaki YPSK kromatogramları ve UV spektrumları Şekil 3.20-3.23'de verilmiştir.



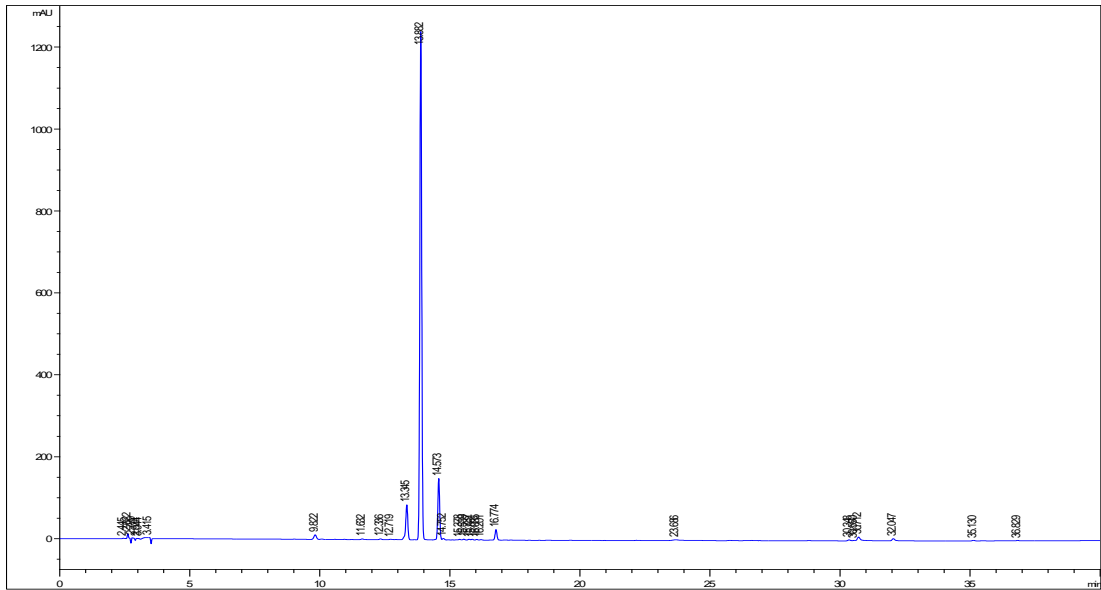
Şekil 3.10. *O. spinosa* subsp. *leiosperma*'nın etil asetat ekstresinin YPSK kromatogramı



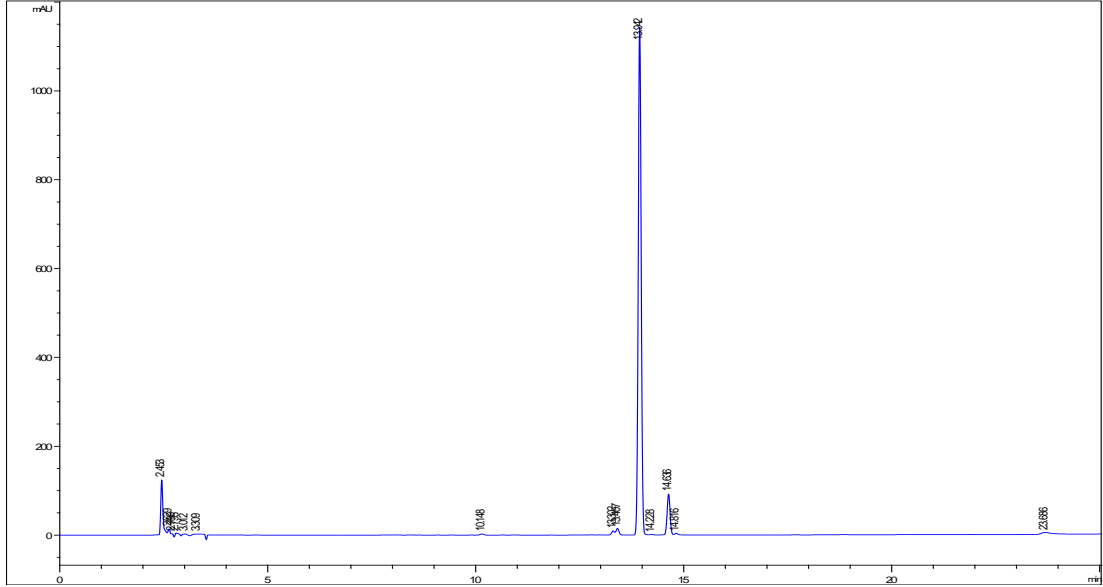
Şekil 3.11. E5 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



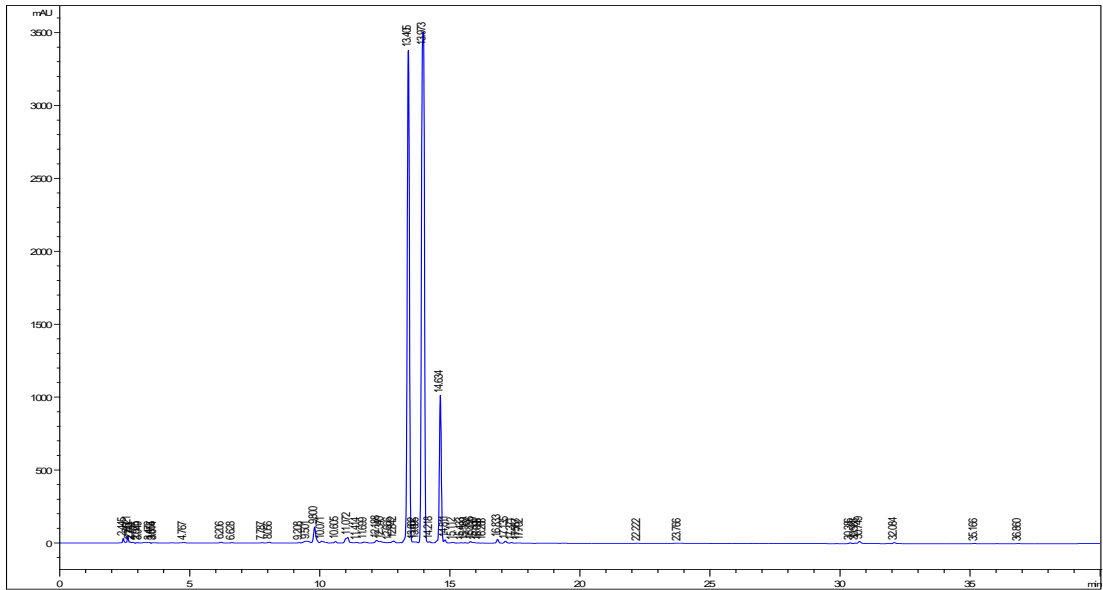
Şekil 3.12. Fr. 15-16 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



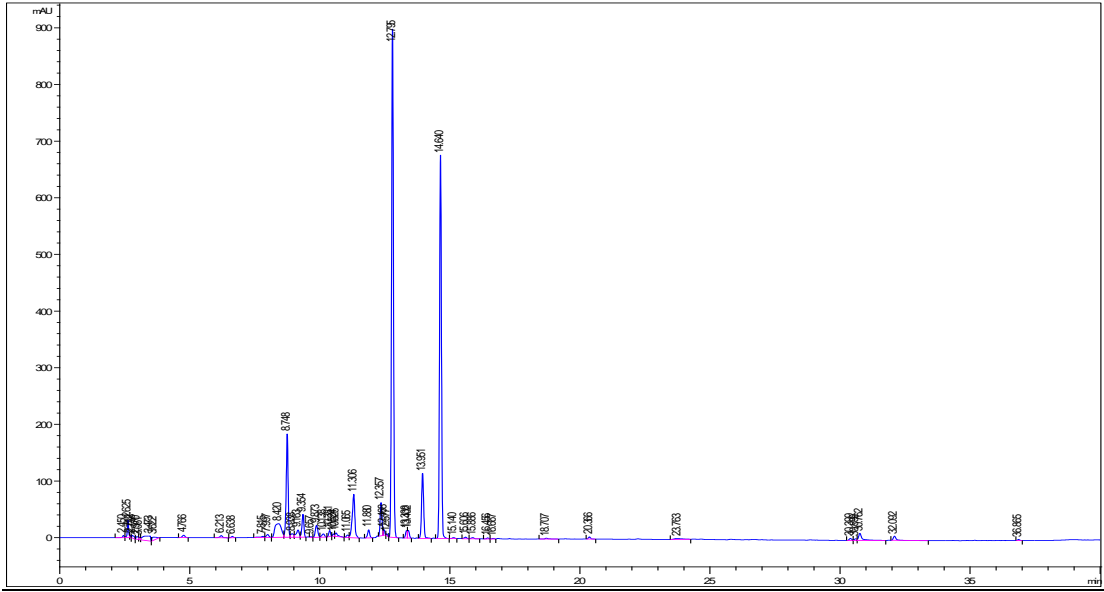
Şekil 3.13. Fr. 15-16 Prep. 2 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



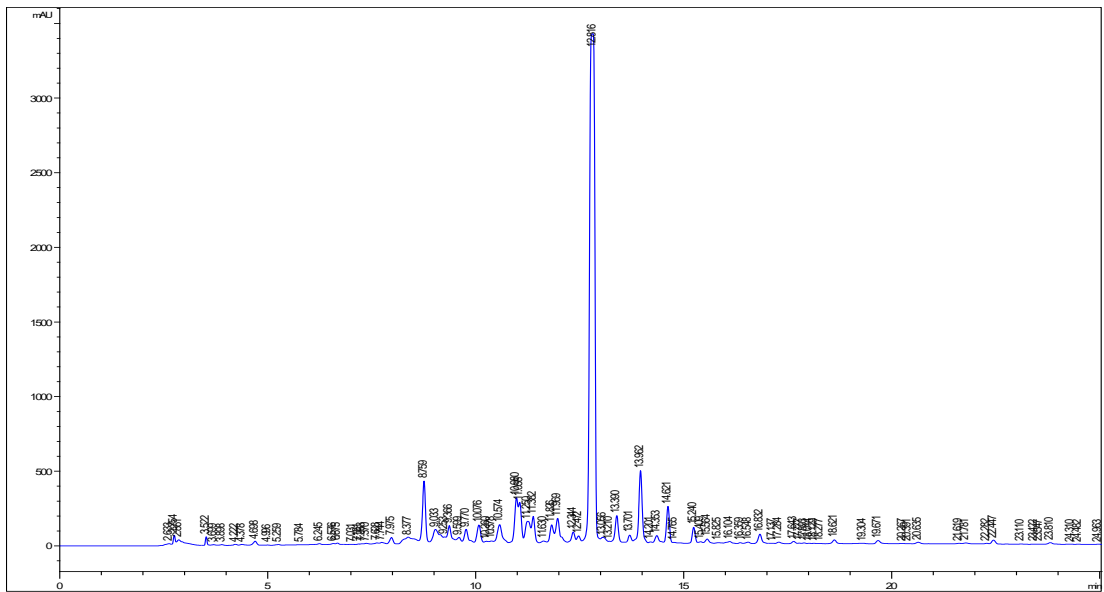
Şekil 3.14. Fr. 15-16 Prep. 2 RP-2 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



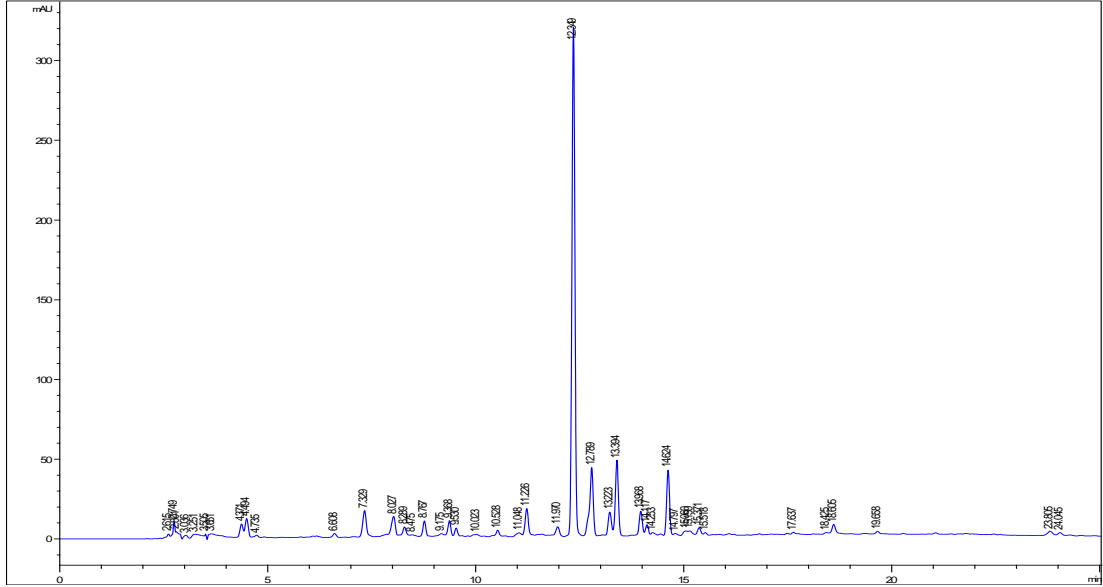
Şekil 3.15. Fr. 15-16 Prep. 3 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



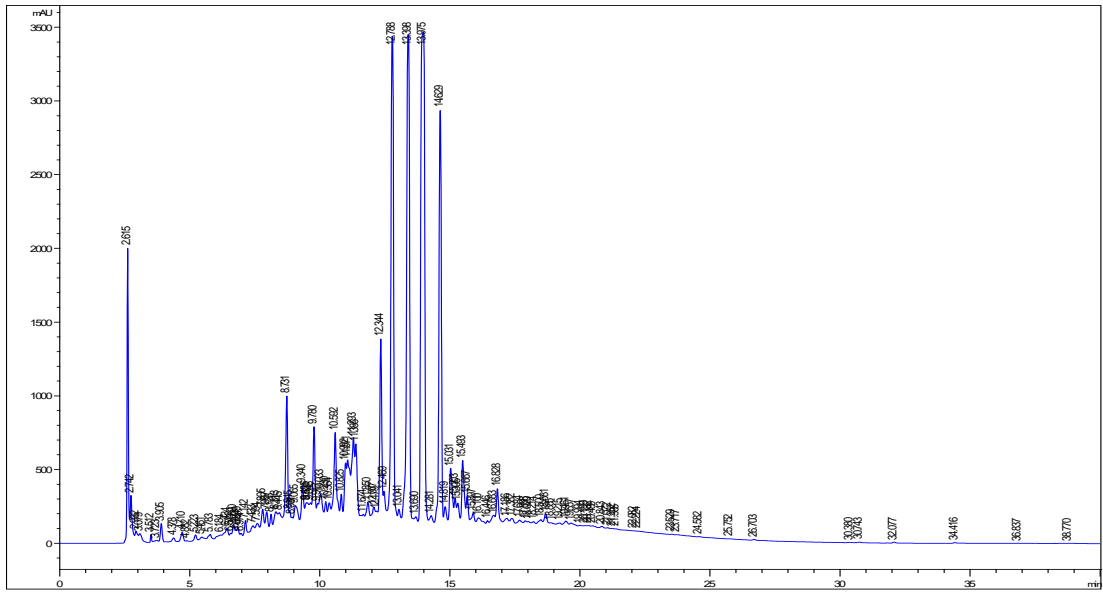
Şekil 3.18. Fr. 15-16 Prep. 5 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



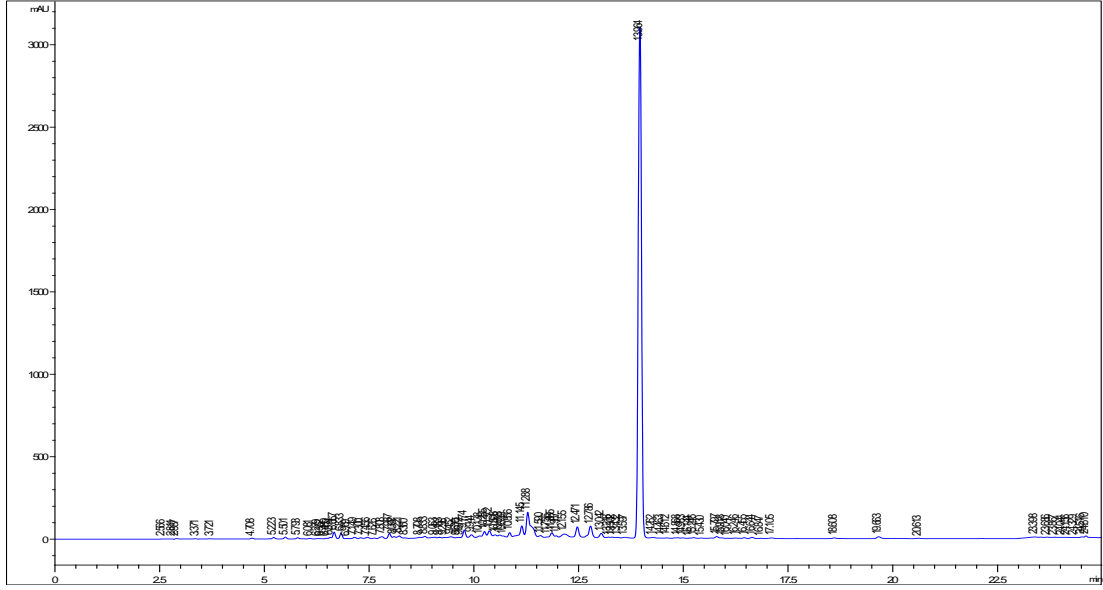
Şekil 3.19. Fr. 15-16 Prep. 5 Seph. 30-31 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



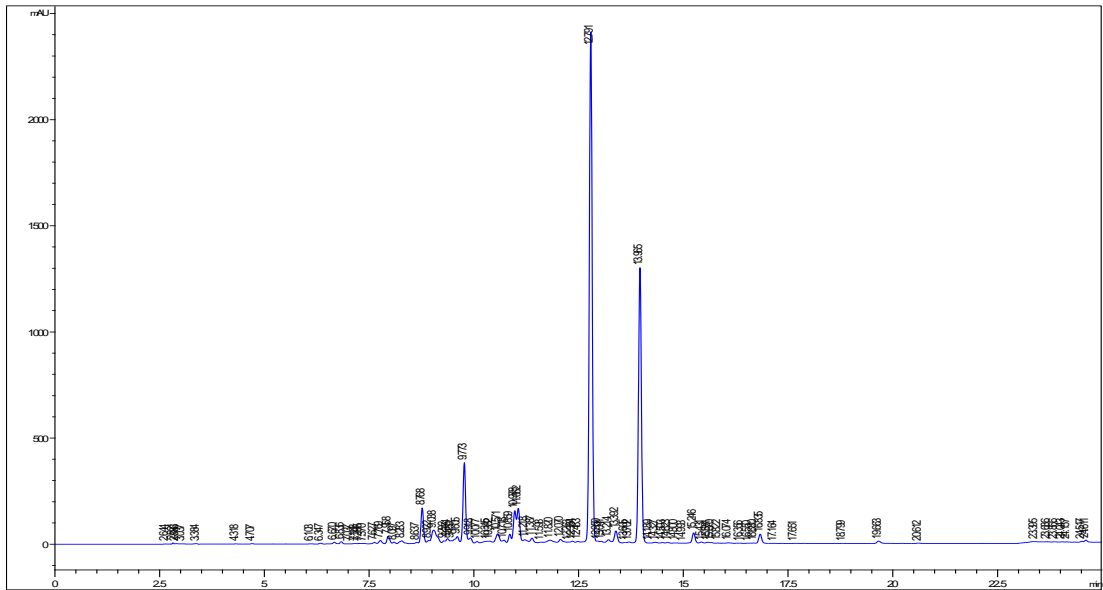
Şekil 3.20. Fr. 15-16 Prep. 5 Seph. 34-35 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



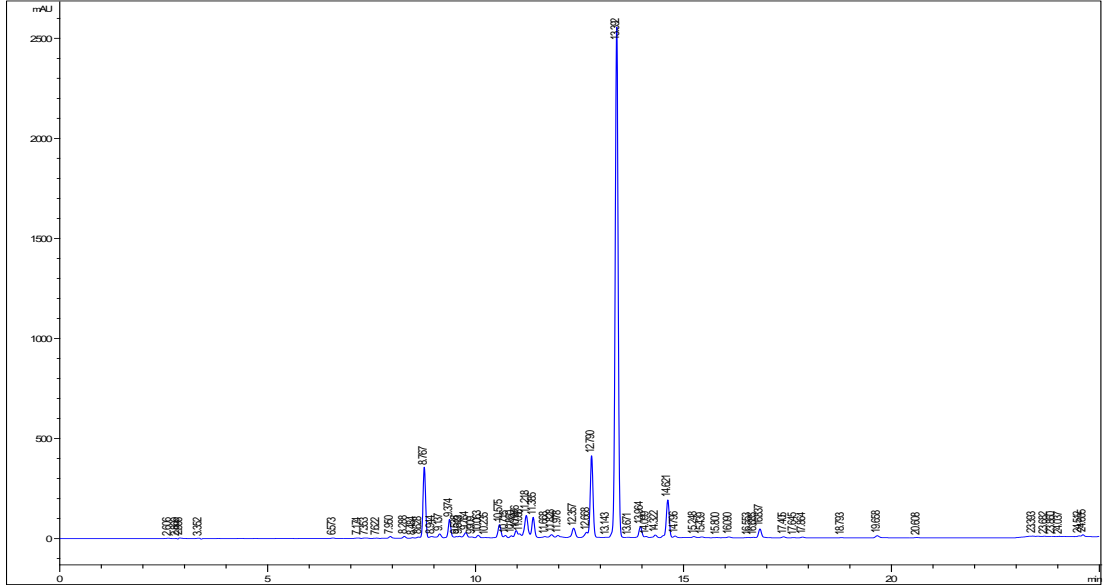
Şekil 3.21. Fr. 17-18 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



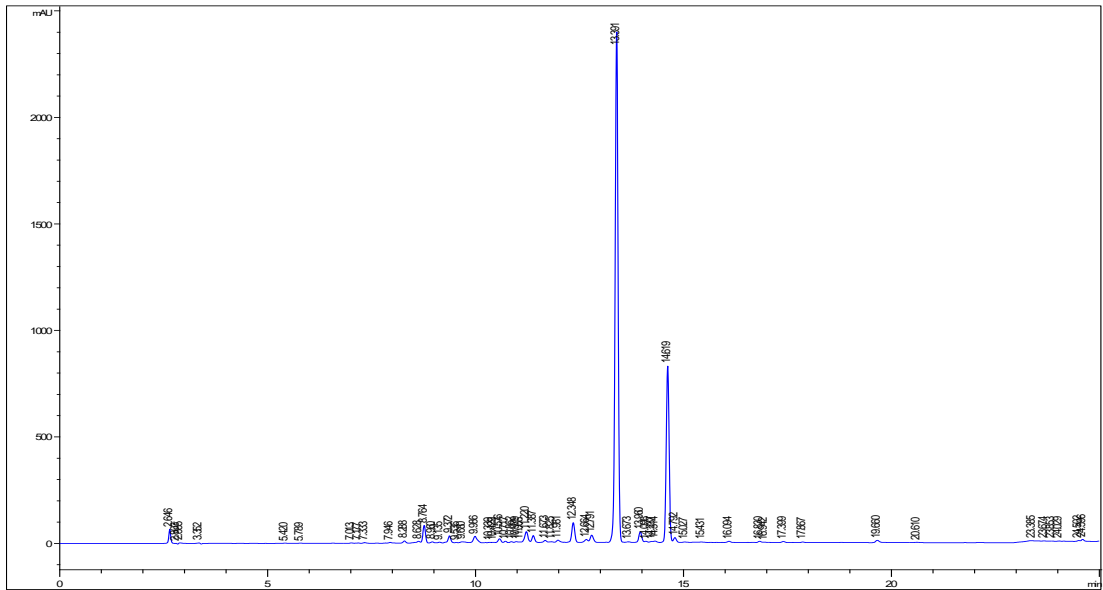
Şekil 3.22. Fr. 17-18 Seph. 31-32 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



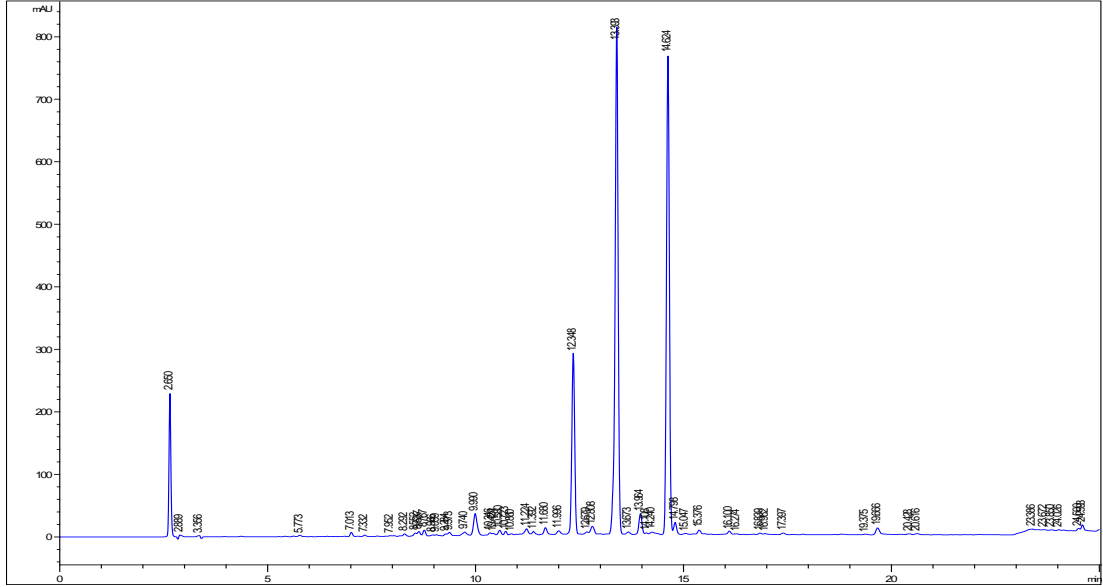
Şekil 3.23. Fr. 17-18 Seph. 33-35 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



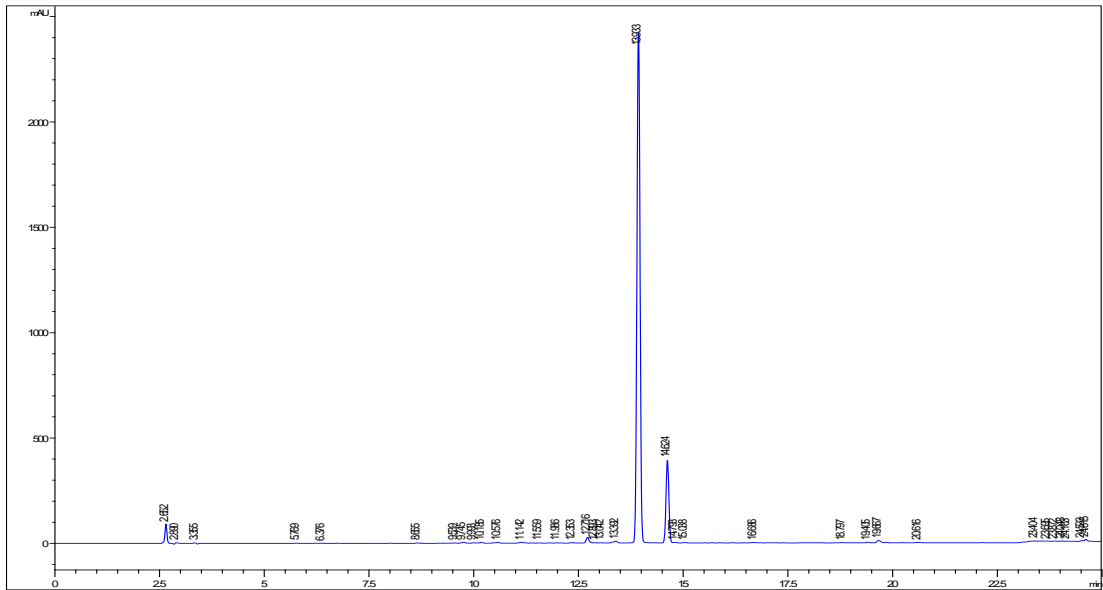
Şekil 3.24. Fr. 17-18 Seph. 36 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



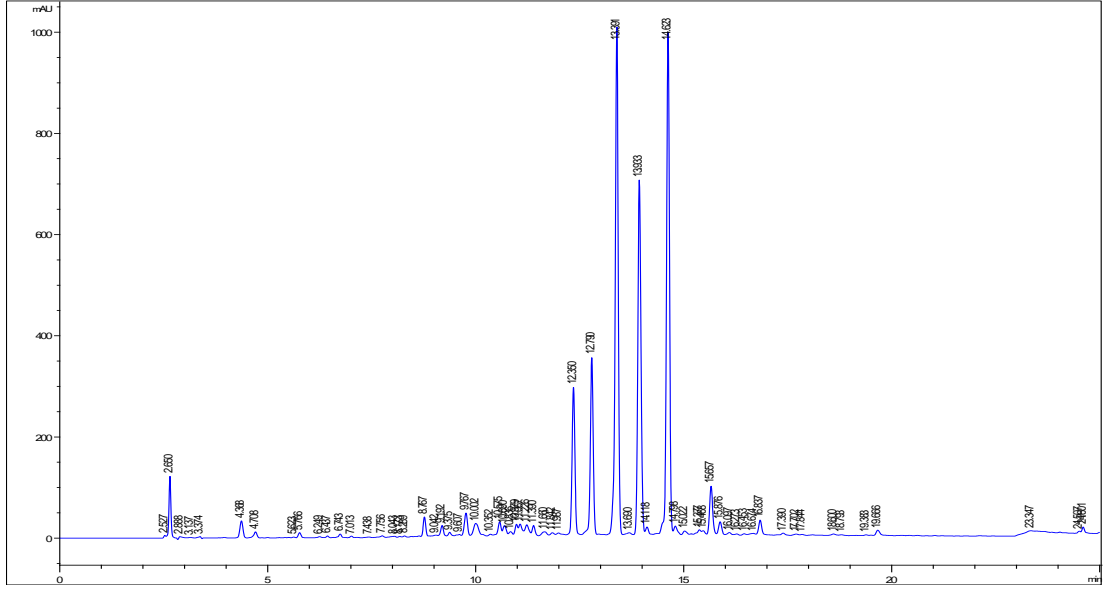
Şekil 3.25. Fr. 17-18 Seph. 37 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



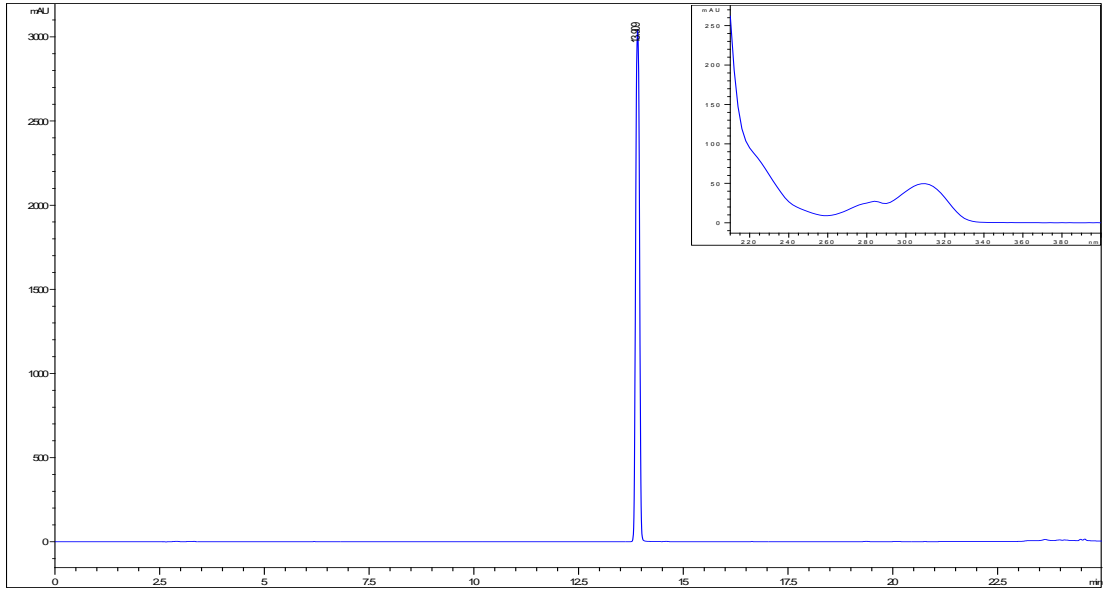
Şekil 3.26. Fr. 17-18 Seph. 38 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



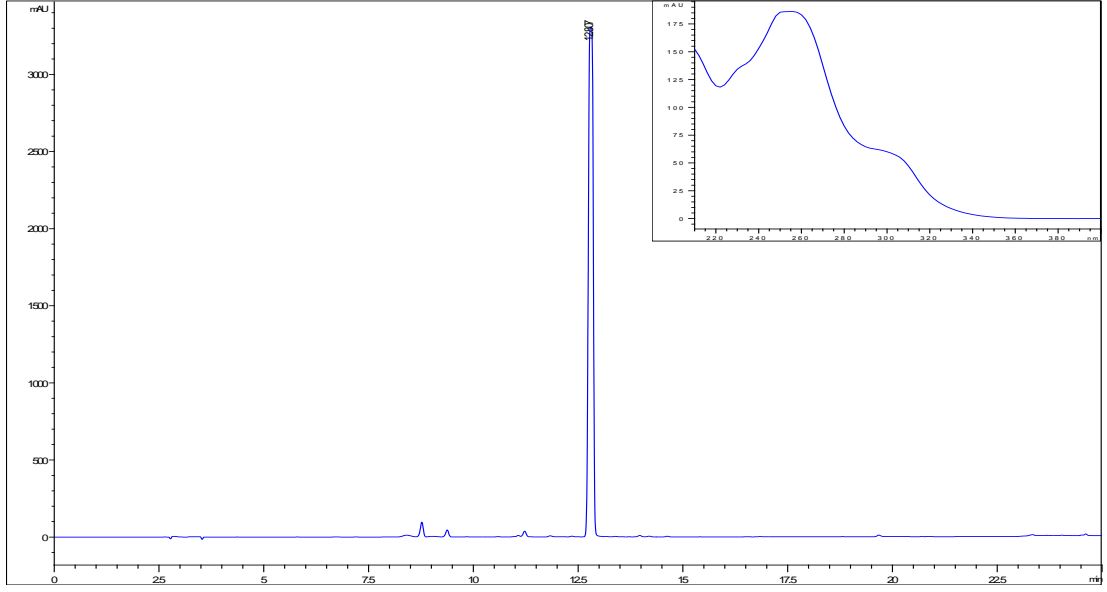
Şekil 3.27. Fr. 17-18 Seph. 41-44 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



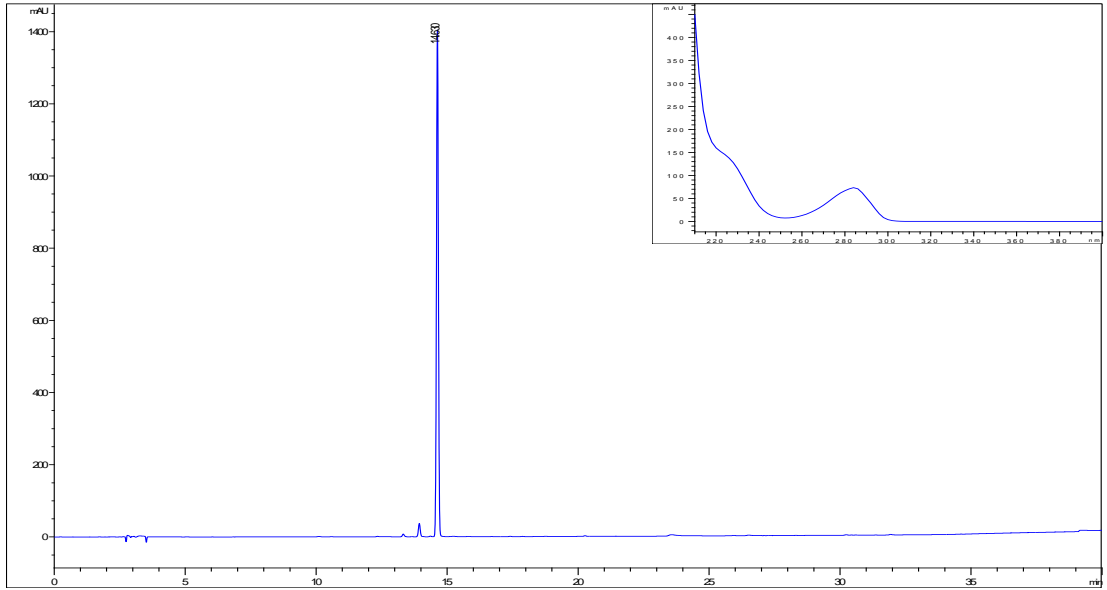
Şekil 3.28. Fr. 19-27 Seph. 33-35 fraksiyonunun YPSK kromatogramı



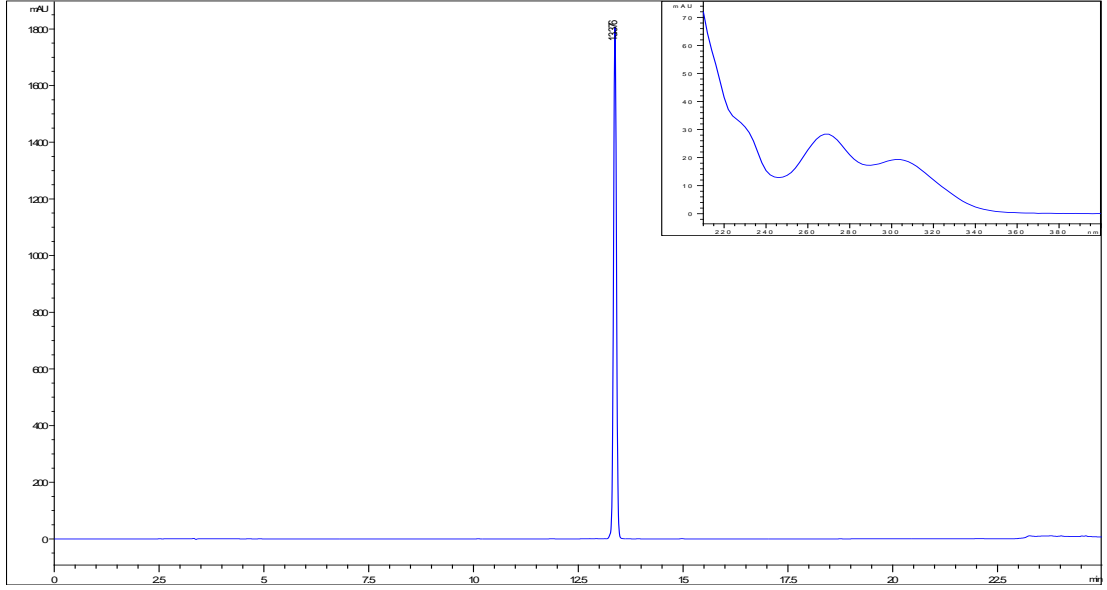
Şekil 3.29. OS-1 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu



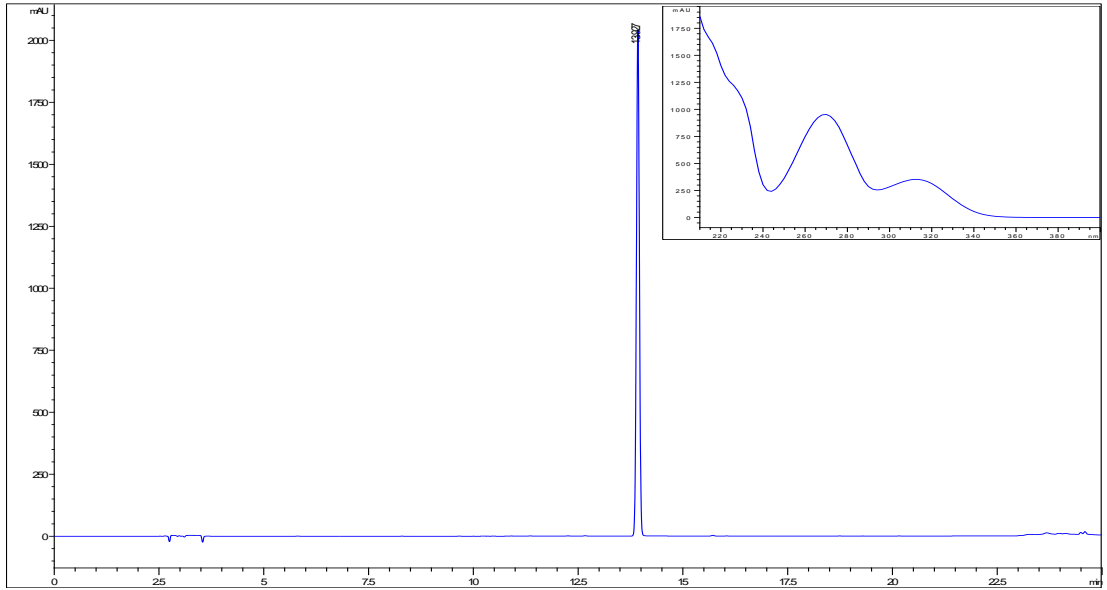
Şekil 3.30. OS-2 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu



Şekil 3.31. OS-3 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu



Şekil 3.32. OS-4 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu



Şekil 3.33. OS-5 maddesinin YPSK kromatogramı ve UV spektrumu

İzole edilen bileşiklerin retansiyon zamanları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

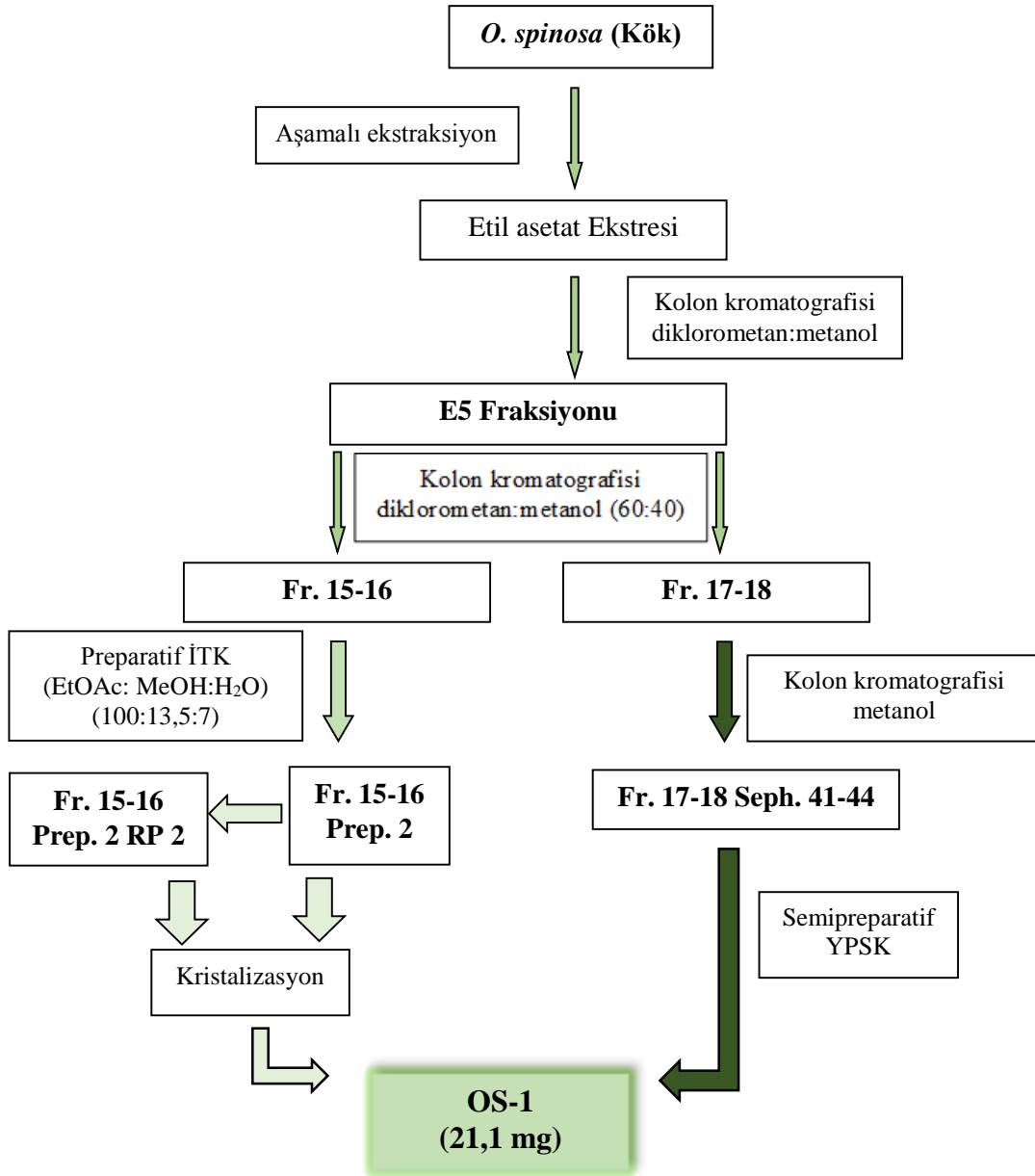
Çizelge 3.2. İzole edilen bileşiklerin retansiyon zamanları

Bileşik Kodu	Retansiyon Zamanı (dakika)
OS-1	13,9
OS-2	12,7
OS-3	14,6
OS-4	13,4
OS-5	13,9

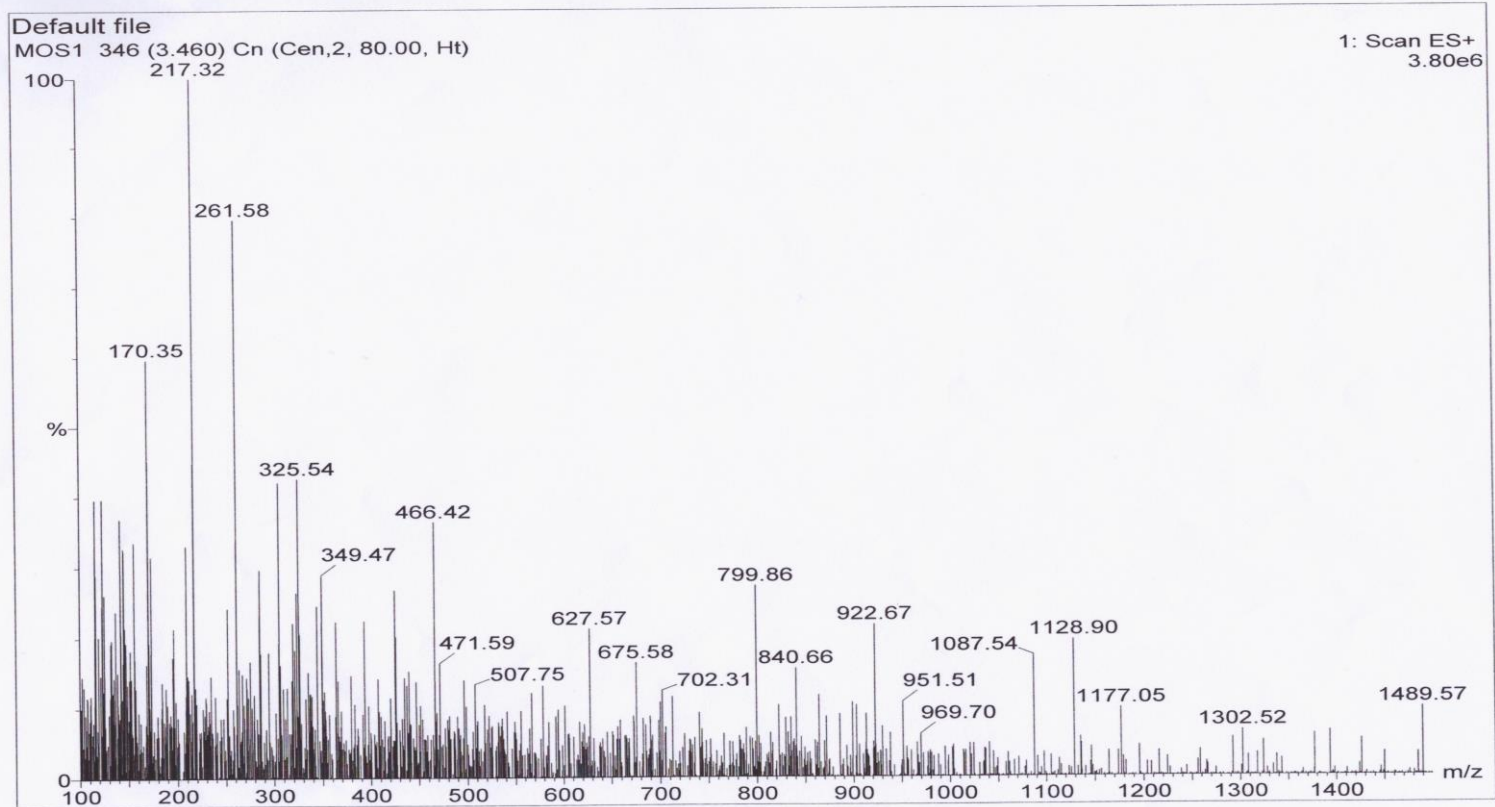
3.1.3. Yapı Tayini Bulguları

3.1.3.1. OS-1 Bileşiğinin Yapı Tayini

OS-1 bileşiğinin izolasyon şeması Şekil 3.24'te verilmiştir.



Şekil 3.34. OS-1 bileşiğinin izolasyon şeması



Şekil 3.35. OS-1 bileşiminin LC-MS spektrumu

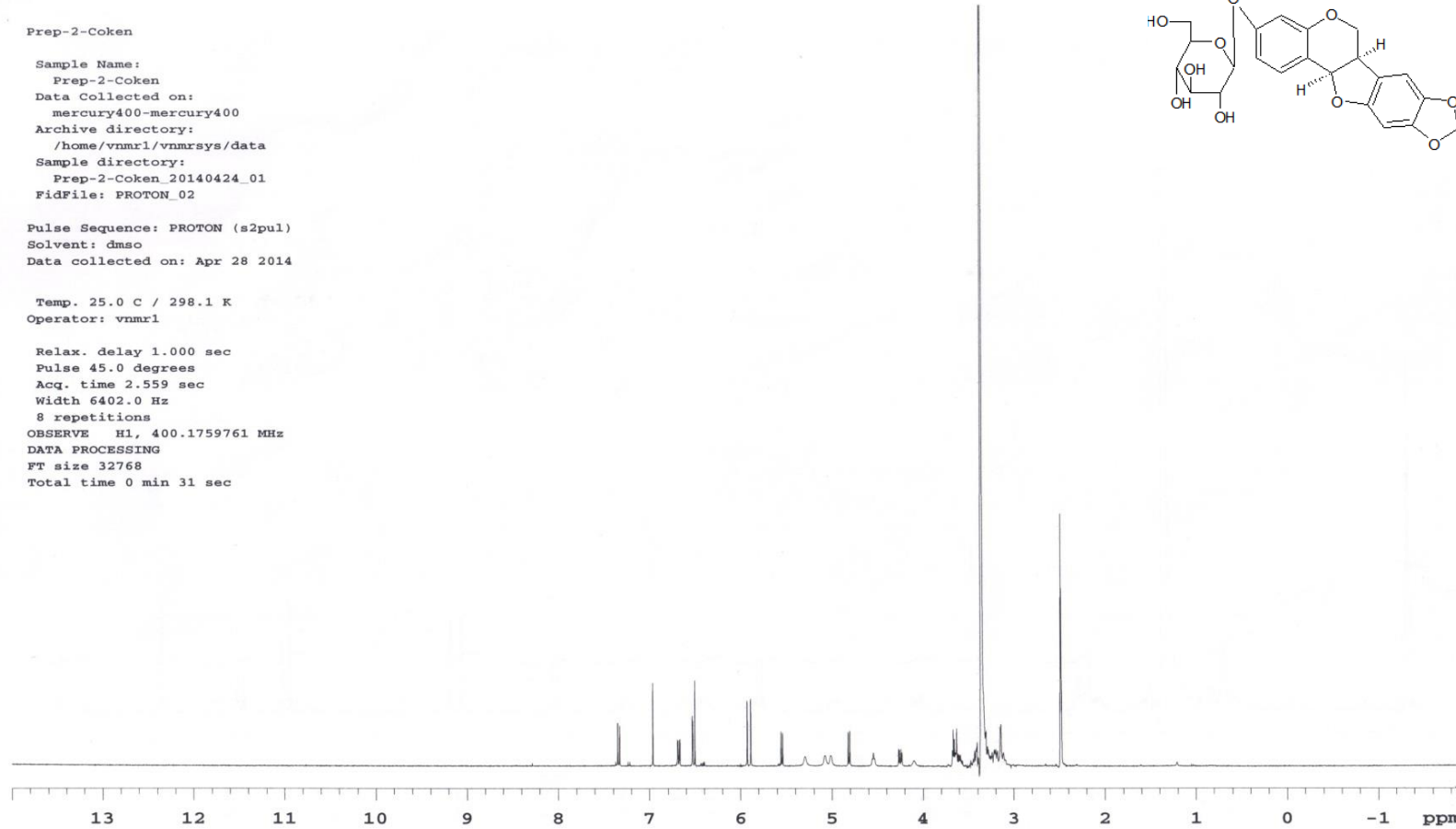
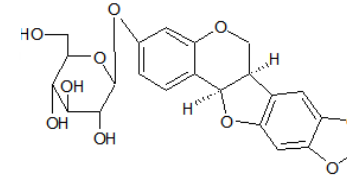
Prep-2-Coken

Sample Name:
Prep-2-Coken
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Prep-2-Coken_20140424_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Apr 28 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



Şekil 3.36. OS-1 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

Prep-2-Coken

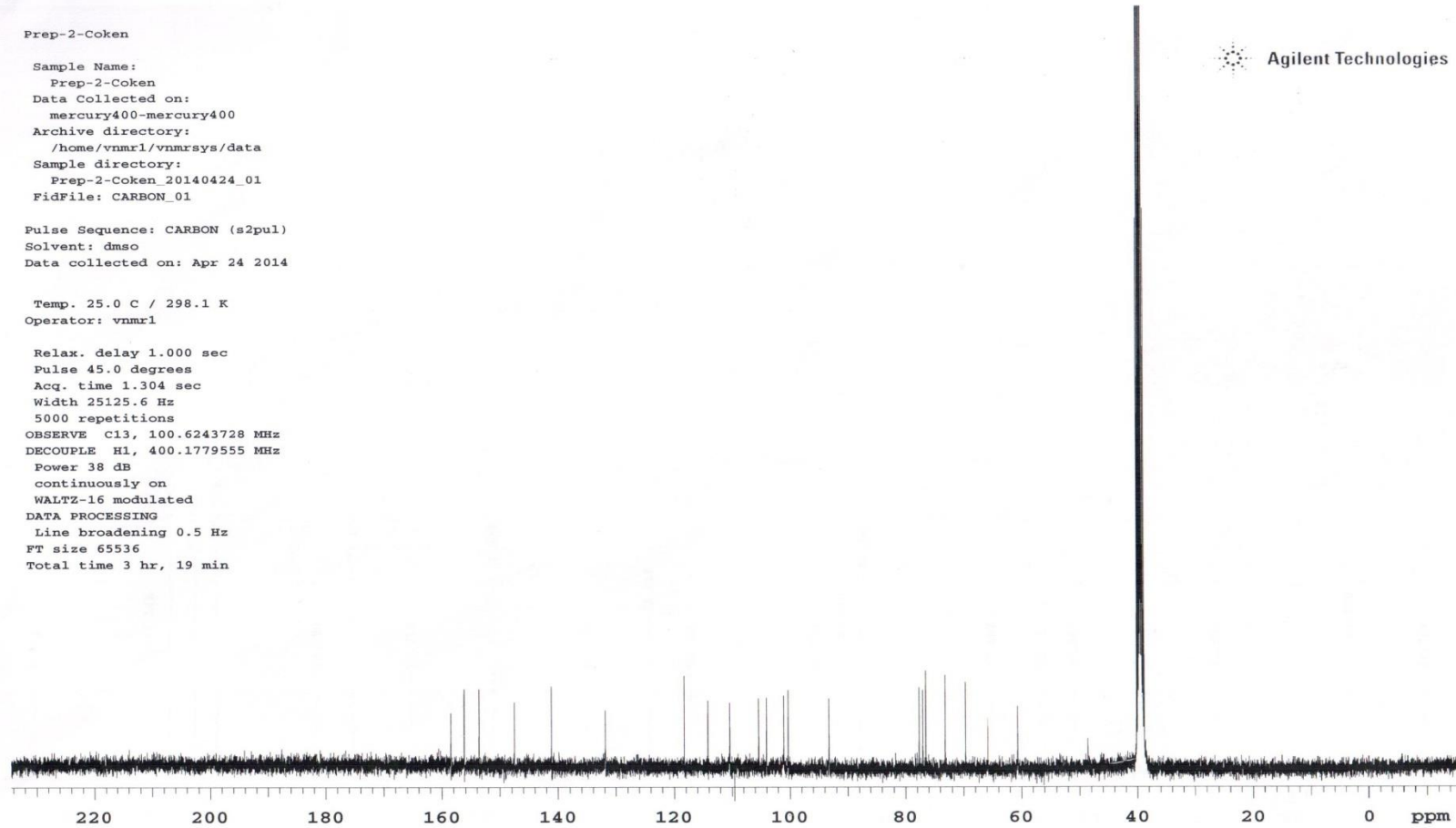
Sample Name:
Prep-2-Coken
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Prep-2-Coken_20140424_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Apr 24 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
5000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243728 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 3 hr, 19 min

Agilent Technologies



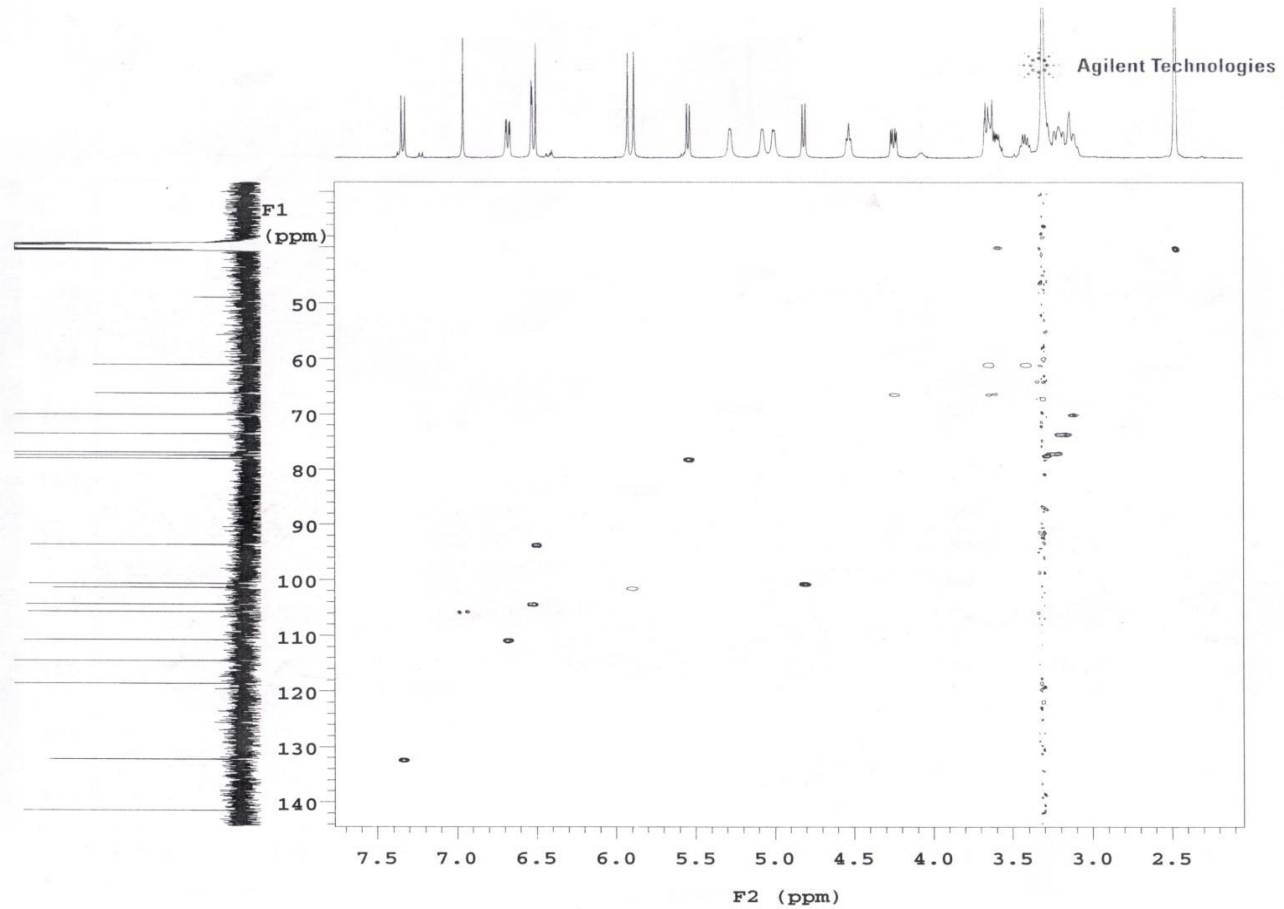
Şekil 3.37. OS-1 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

Prep--2-Coken
Sample Name:
Prep--2-Coken
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Prep--2-Coken_20140529_01
FidFile: gHSQC_01

Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: dmsc
Data collected on: May 29 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6402.0 Hz
2D Width 21130.5 Hz
16 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DECOUPLE C13, 100.6338890 MHz
Power 41 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.011 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 2 hr, 51 min



Şekil 3.38. OS-1 bileşiğinin HSQC spektrumu

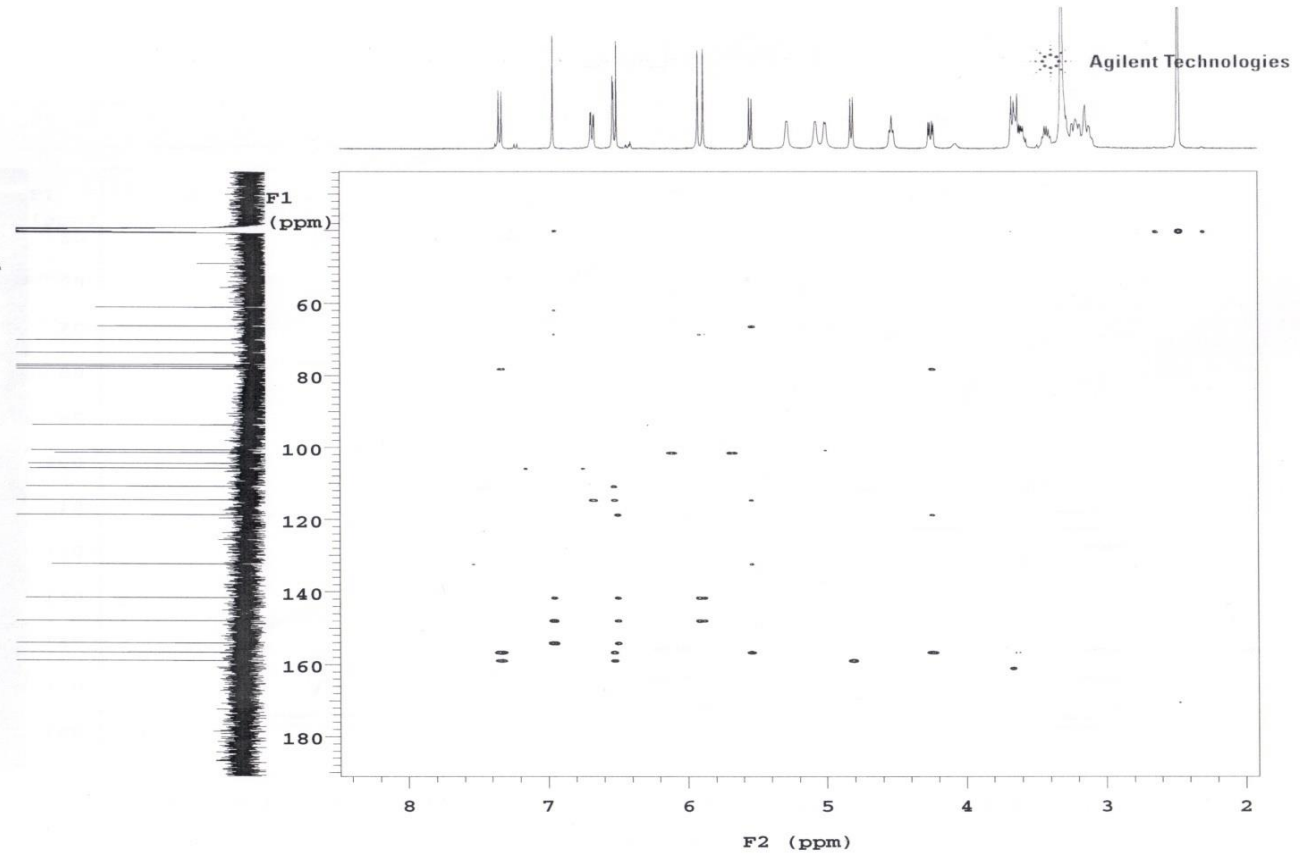
Prep--2-Coken

Sample Name:
Prep--2-Coken
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Prep--2-Coken 20140529_01
Fidfile: gHMBC_01

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: dmsc
Data collected on: May 30 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6402.0 Hz
2D Width 24147.3 Hz
16 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.010 sec
FT size 2048 x 4096
Total time 2 hr, 57 min



Şekil 3.39. OS-1 bileşiğinin HMBC spektrumu

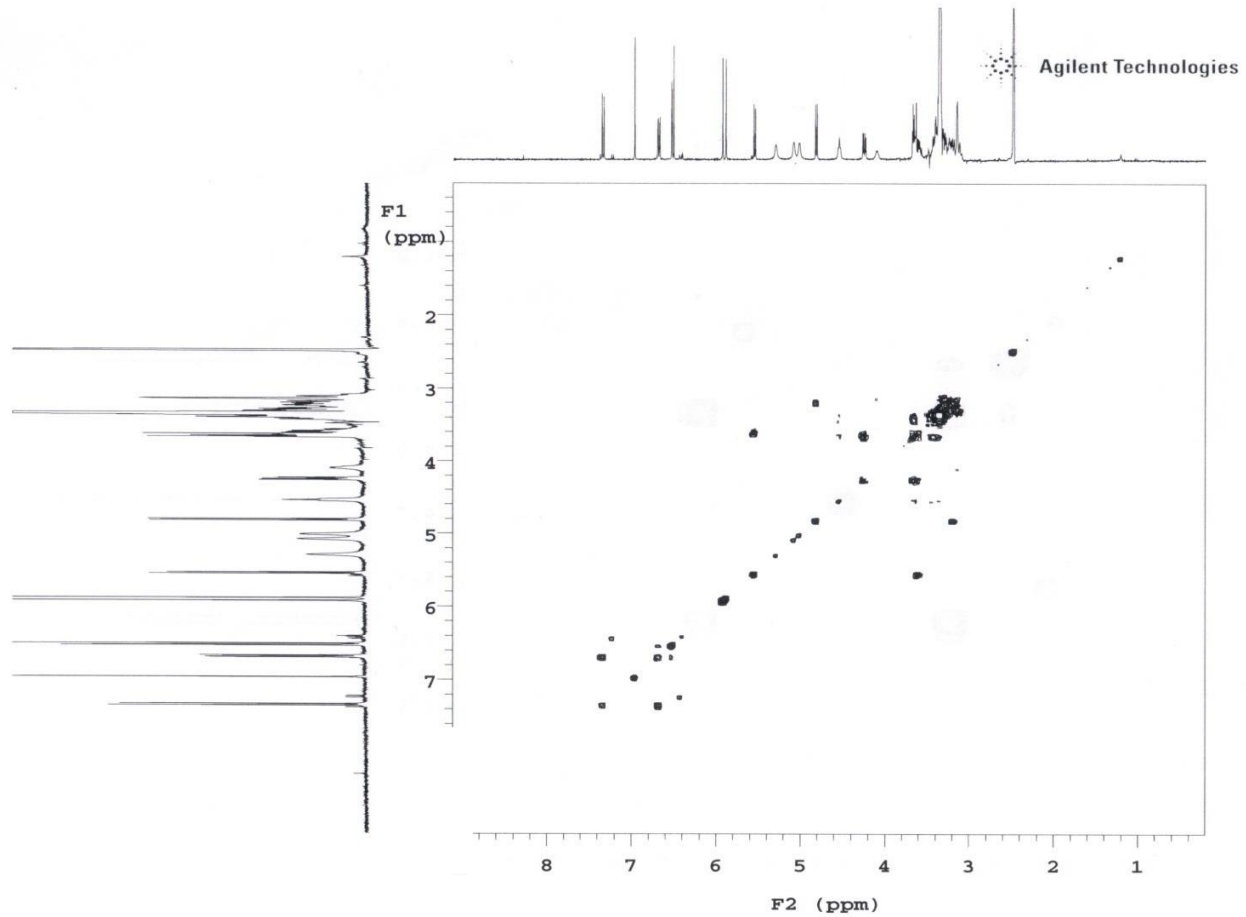
Prep-2-Coken

Sample Name:
Prep-2-Coken
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
Prep-2-Coken 20140424_01
FidFile: gCOSY_01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Apr 24 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 3563.8 Hz
2D Width 3563.8 Hz
4 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.036 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 12 min



Şekil 3.40. OS-1 bileşiğinin COSY spektrumu

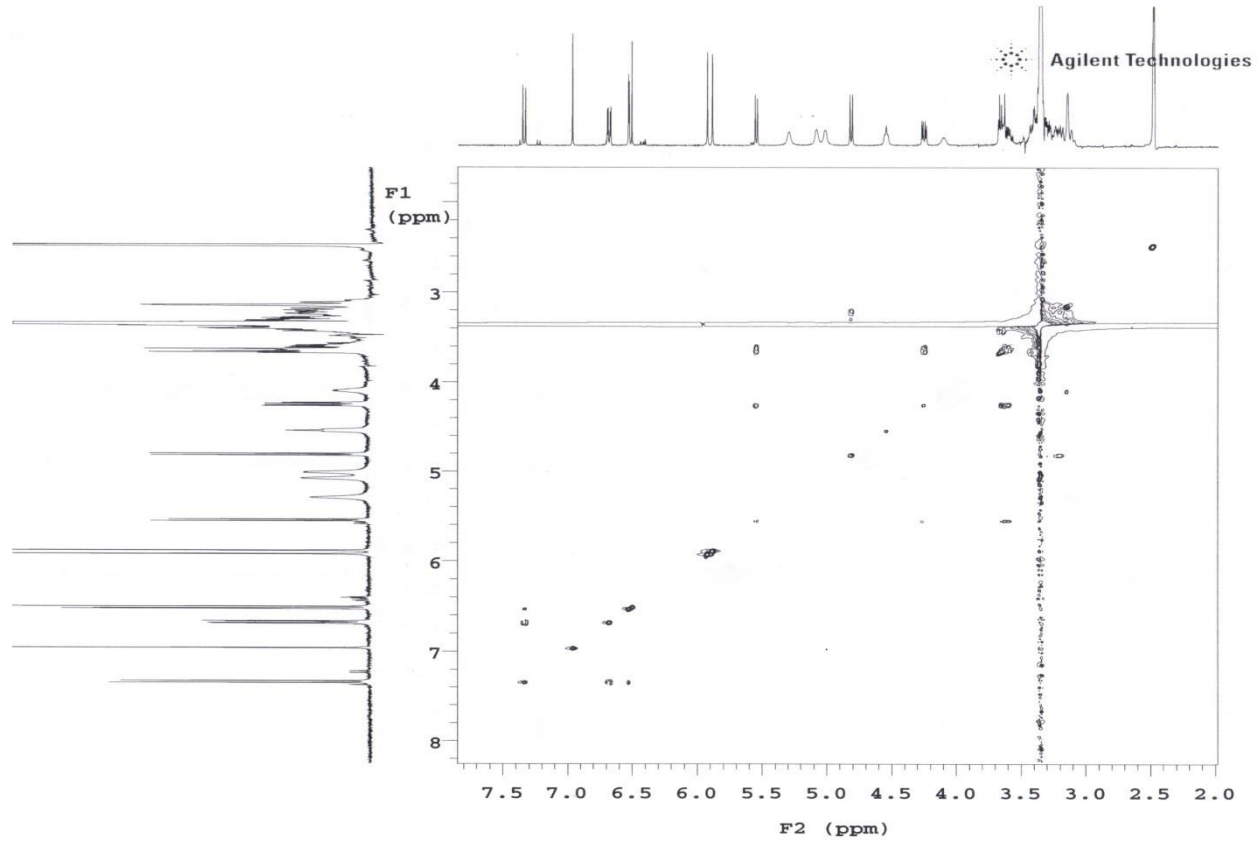
Prep-2-Coken

Sample Name:
 Prep-2-Coken
 Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmrSYS/data
 Sample directory:
 Prep-2-Coken_20140424_01
 FidFile: TOCSY_01

Pulse Sequence: TOCSY
 Solvent: dms0
 Data collected on: Apr 24 2014

Temp. 25.0 c / 298.1 K
 Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.150 sec
 Width 3563.8 Hz
 2D Width 3563.8 Hz
 2 repetitions
 2 x 200 increments
 OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.069 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.052 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 20 min



Şekil 3.41. OS-1 bileşiğinin TOCSY spektrum

Molekül Adı	Trifolirhizin
Molekül Ağırlığı	446.4146
Molekül Formülü	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀
Özelliği	Beyaz amorf toz

Şekil 3.42. OS-1 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular

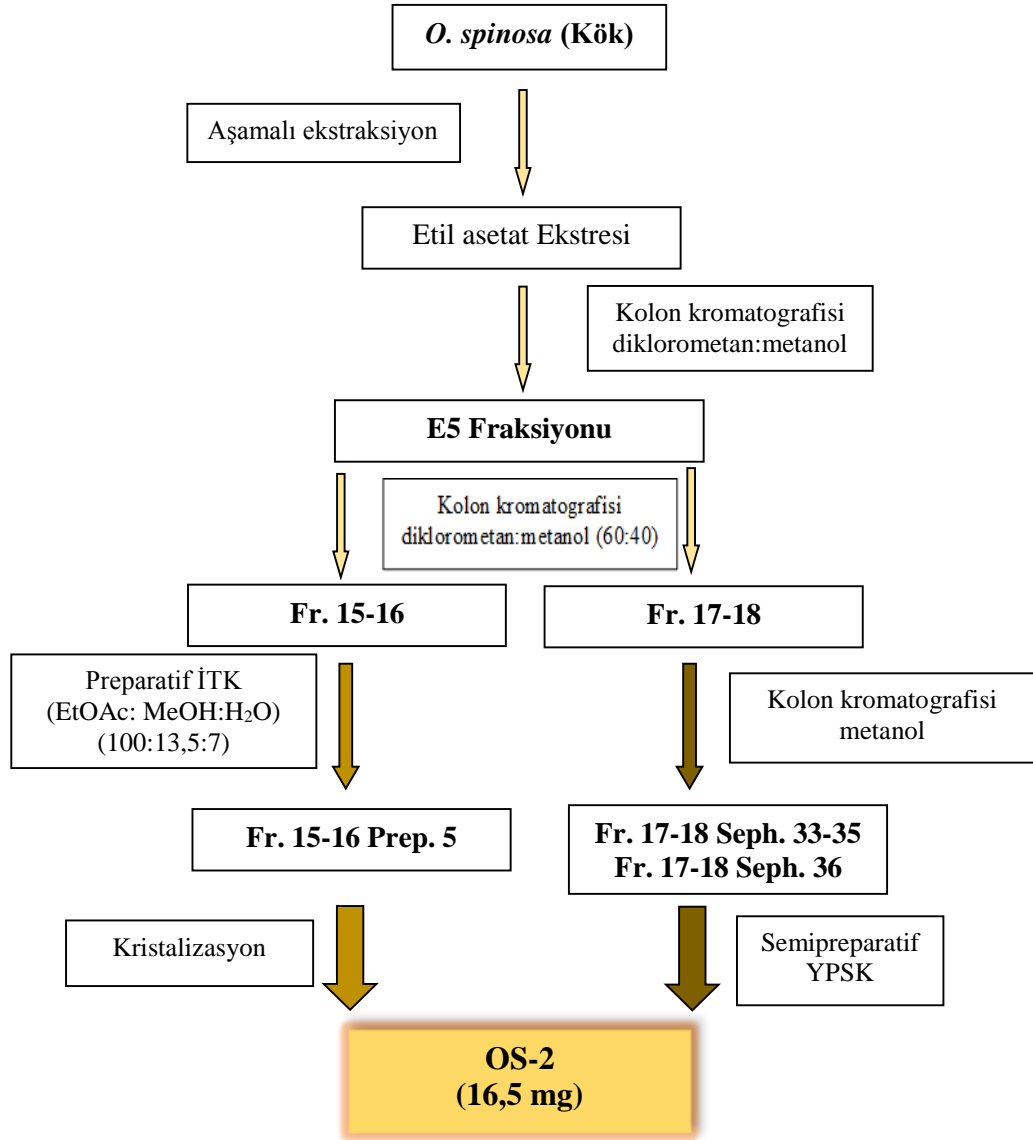
Çizelge 3.3. OS-1 bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR bulguları

Kimyasal kayma	Proton	C	δ (ppm)
7.34 (1H, d, <i>J</i> =8.4 Hz)	H-1	C-1	131.89
6.68 (1H, dd, <i>J</i> =2.8, 8.4 Hz)	H-2	C-2	110.39
	H-3	C-3	158.46
6.53 (1H, d, <i>J</i> =2.8 Hz)	H-4	C-4	104.02
		C-4a	156.19
4.25 (1H, dd, <i>J</i> =4.0, 6.8 Hz)	H-6	C-6	65.85
3.65 (1H, m)	H-6		
3.30 (1H, m)	H-6a	C-6a	48.60
		C-6b	118.25
6.96 (1H, s)	H-7	C-7	105.36
		C-8	141.45
		C-9	147.48
6.50 (1H, s)	H-10	C-10	93.26
		C-10a	153.65
5.54 (1H, d, <i>J</i> =7.2 Hz)	H-11a	C-11a	77.65
		C-11b	114.19
5.91 (2H, d, <i>J</i> =15.6 Hz)	-OCH ₂ O-	-OCH ₂ O-	101.05
4.81 (1H, d, <i>J</i> =7.2 Hz)	H-1'	C-1'	100.30
3.65-3.1 (m)	H-2'	C-2'	73.17
	H-3'	C-3'	76.51
	H-4'	C-4'	69.67
	H-5'	C-5'	77.05
	H-6'	C-6'	60.66

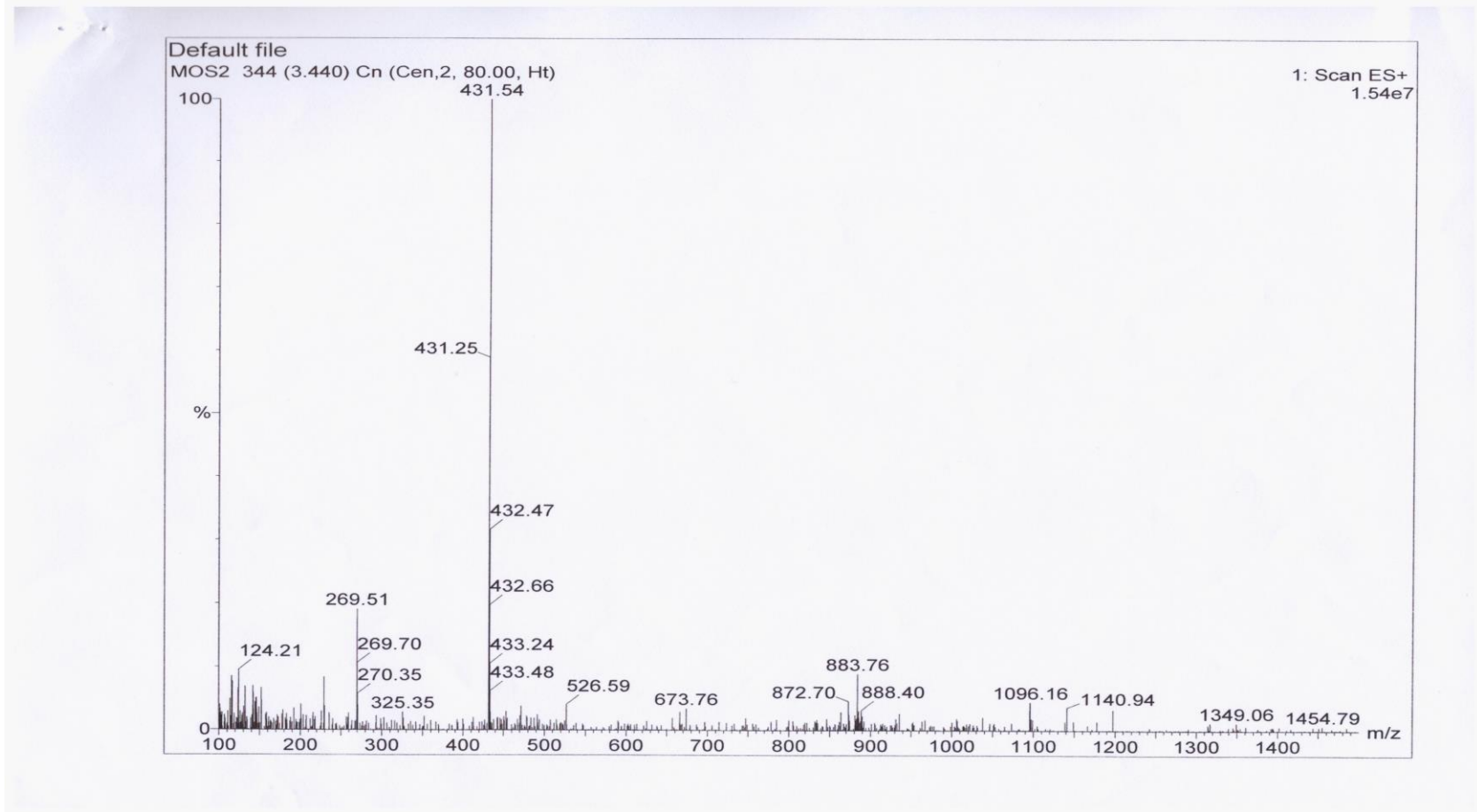
OS-1 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumuna bakıldığında δ 5.54 (d, $J=7.2$ Hz), 4.25 (dd, $J=4, 6.8$ Hz) ve 3.65 (m) ile 3.30 (m) ppm'lerde gözlenen sinyaller karakteristik pterokarpan halkasının sırasıyla H-11, H-6, H-6 ve H-6a sinyallerini işaret etmektedir. δ 5.90 ppm'de gözlenen dublet ($J=16$ Hz) iki oksijene komşu karbona bağlı $-\text{OCH}_2\text{O}-$ protonlarını göstermektedir. HMBC spektrumunda δ 5.90 ppm'de gözlenen dublet sinyalinin δ 141.45 (C-8) ve 147.48 (C-9) ppm'deki karbon sinyalleri ile etkileşimi metilendioksi grubunun aromatik halkaya bağlandığı konumu doğrulamıştır. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda δ 7.34 ppm'de gözlenen dublet ($J=8.4$ Hz), δ 6.68 ppm'de gözlenen dd ($J=2.8, 8.4$ Hz) ve δ 6.53 ppm'de gözlenen dublet ($J=2.86.9$ Hz) trisüstitüe benzen halkasını işaret etmektedir. Bu protonların benzen halkası üzerindeki konumları HMBC, HSQC ve COSY spektrum verileri ile doğrulanmıştır. δ 6.99 ve δ 6.53 ppm'lerdeki singletlerin ise $^1\text{H-NMR}$ verilerine göre aromatik halkaya bağlı protonlar olduğu ve HMBC spektrumuna göre metilendioksi grubuna komşu olan δ 141.45 (C-8) ve δ 147.48 (H-9) ppm'de sinyal veren karbon atomları ile etkileştiği tespit edilmiştir. δ 4.81 (1H, d, $J=7.2$ Hz) ppm'de gözlenen anomerik proton sinyali β pozisyonda bağlı oz molekülünü işaret etmektedir. $^{13}\text{C-NMR}$ ve $^1\text{H-NMR}$ verileri oz molekülünün glukoz olduğunu ortaya koymaktadır. HMBC spektrumunda δ 4.81 ppm'deki anomerik proton sinyali ile δ 158.46 (C-3) karbon atomu sinyali arasındaki etkileşim oz molekülünün aromatik halkaya 3. konumdan bağlandığını göstermektedir. Tüm veriler literatür bilgileri ile kıyaslandığında (Park ve ark., 2003; Zhao ve ark., 2009) OS-1 kodlu bileşiğin pterokarpan yapısında trifolirhizin (maakiain-3-O- β -D-glukopiranozit) olduğu doğrulanmıştır.

3.1.3.2. OS-2 Bileşiminin Yapı Tayini

OS-2 bileşiminin izolasyon şeması Şekil 3.32’de verilmiştir.



Şekil 3.43. OS-2 bileşiminin izolasyon şeması



Şekil 3.44. OS-2 bileşiğinin LC-MS spektrumu

B12

Sample Name:
B12

Data Collected on:
mercury400-mercury400

Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data

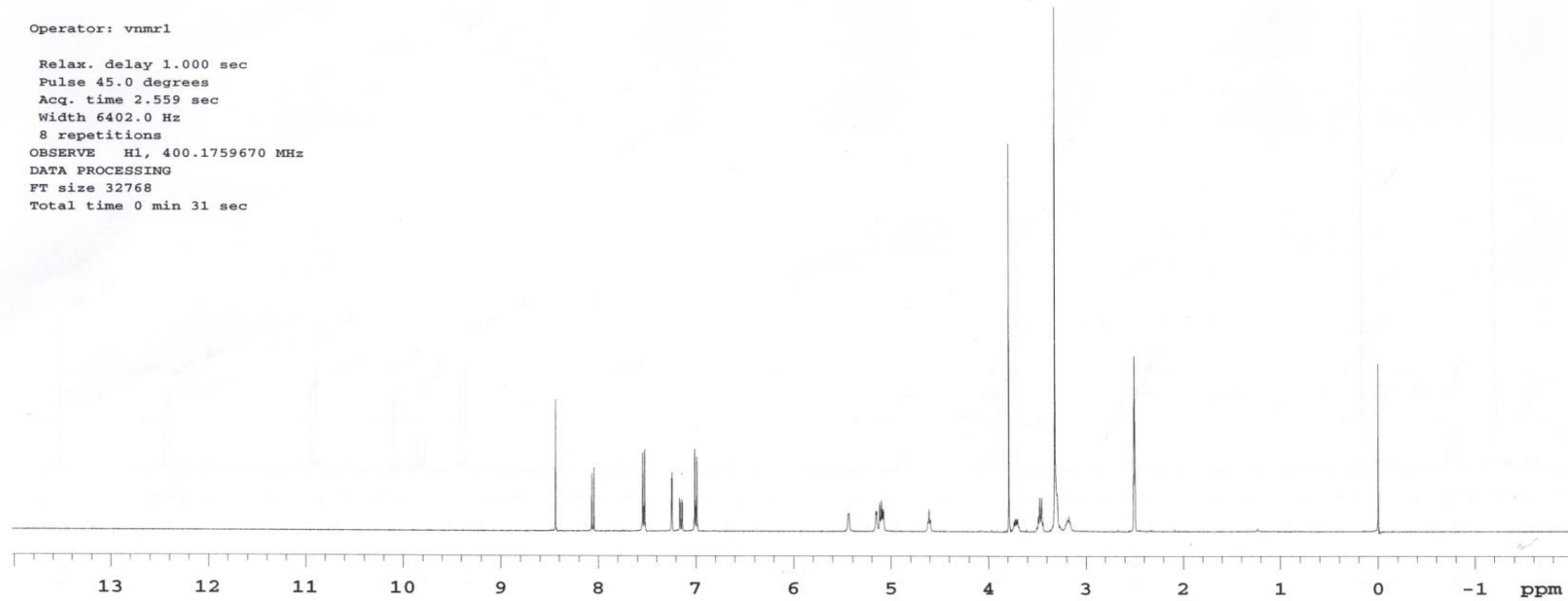
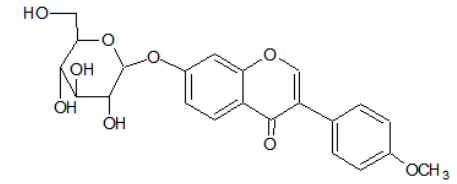
Sample directory:
B12_20140917_01

FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Sep 17 2014

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759670 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



Şekil 3.45. OS-2 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

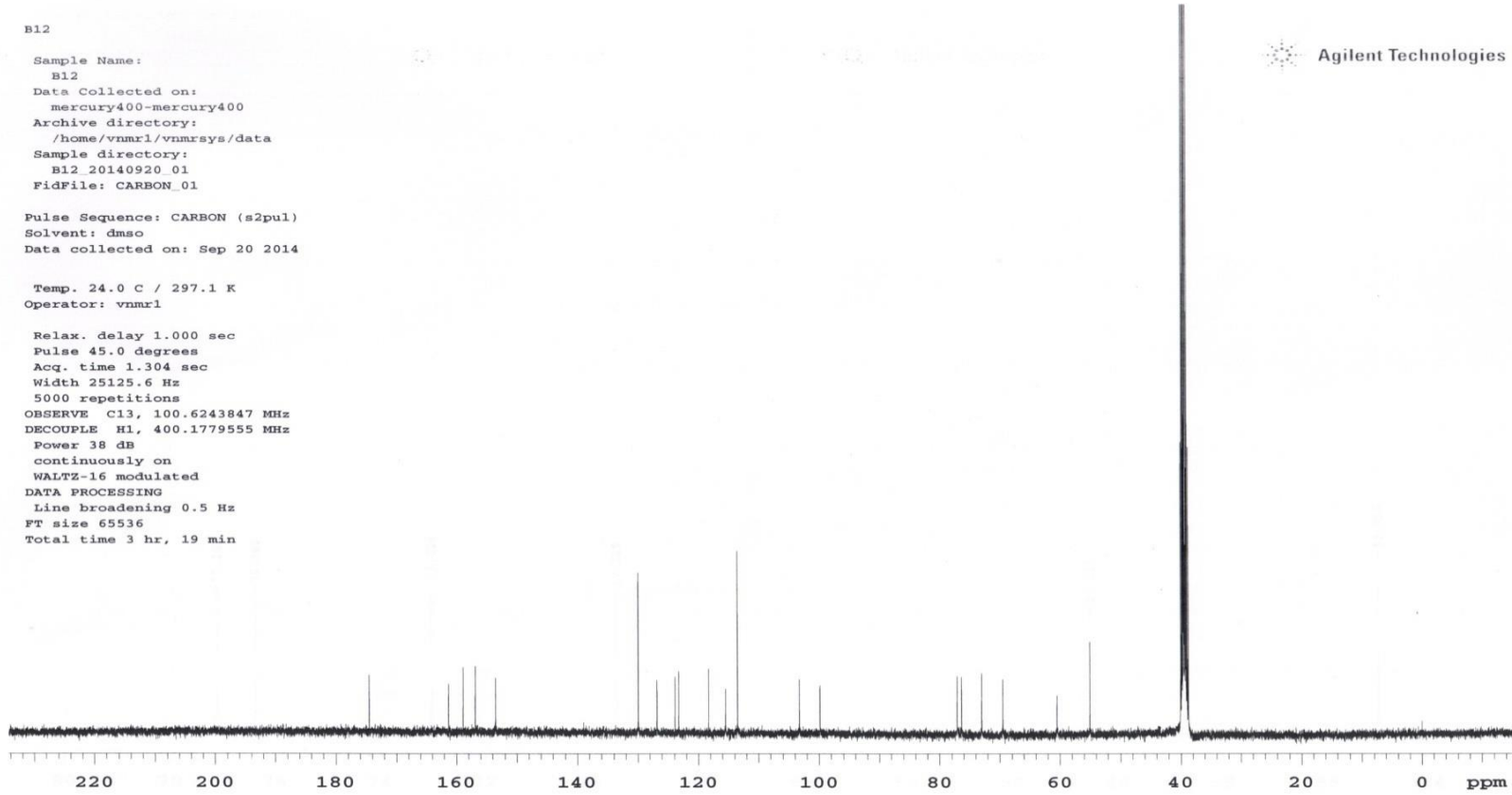
B12
Sample Name:
B12
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
B12_20140920_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Sep 20 2014

Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
5000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243847 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 3 hr, 19 min

Agilent Technologies



Şekil 3.46. OS-2 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

B12

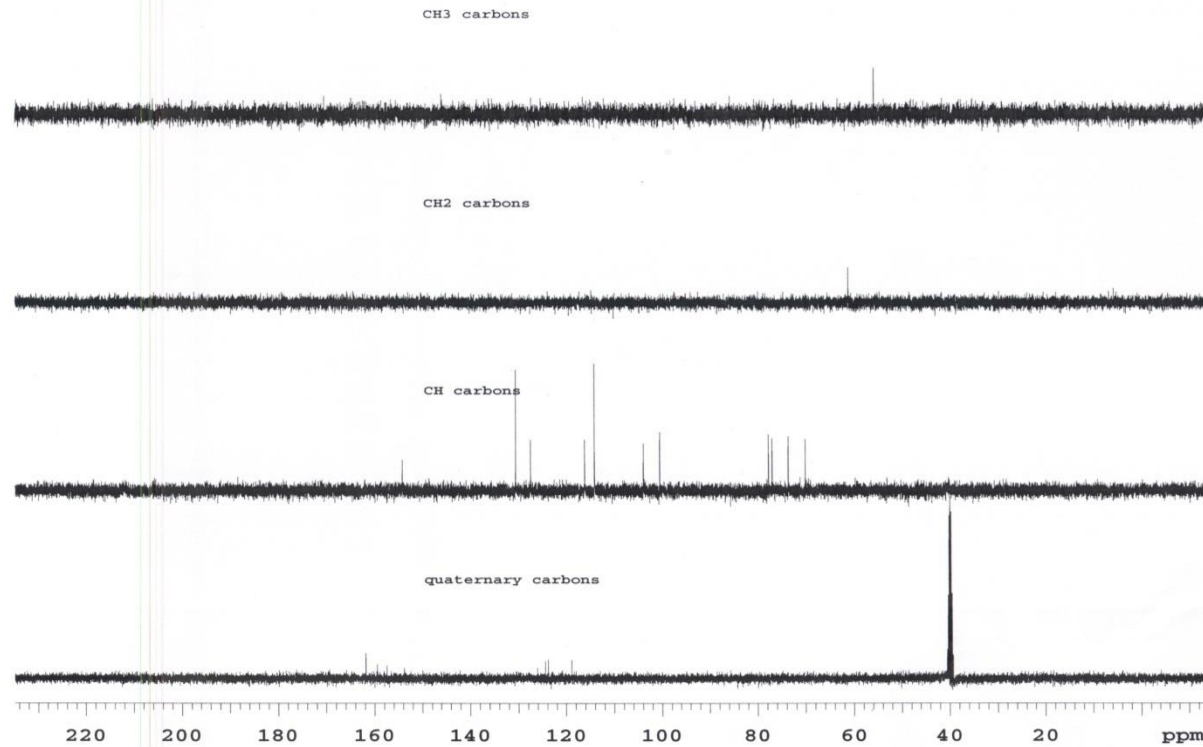
Sample Name:
B12
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
B12_20140920_01
FidFile: DEPT_01

Pulse Sequence: DEPT
Solvent: dmsd
Data collected on: Sep 20 2014

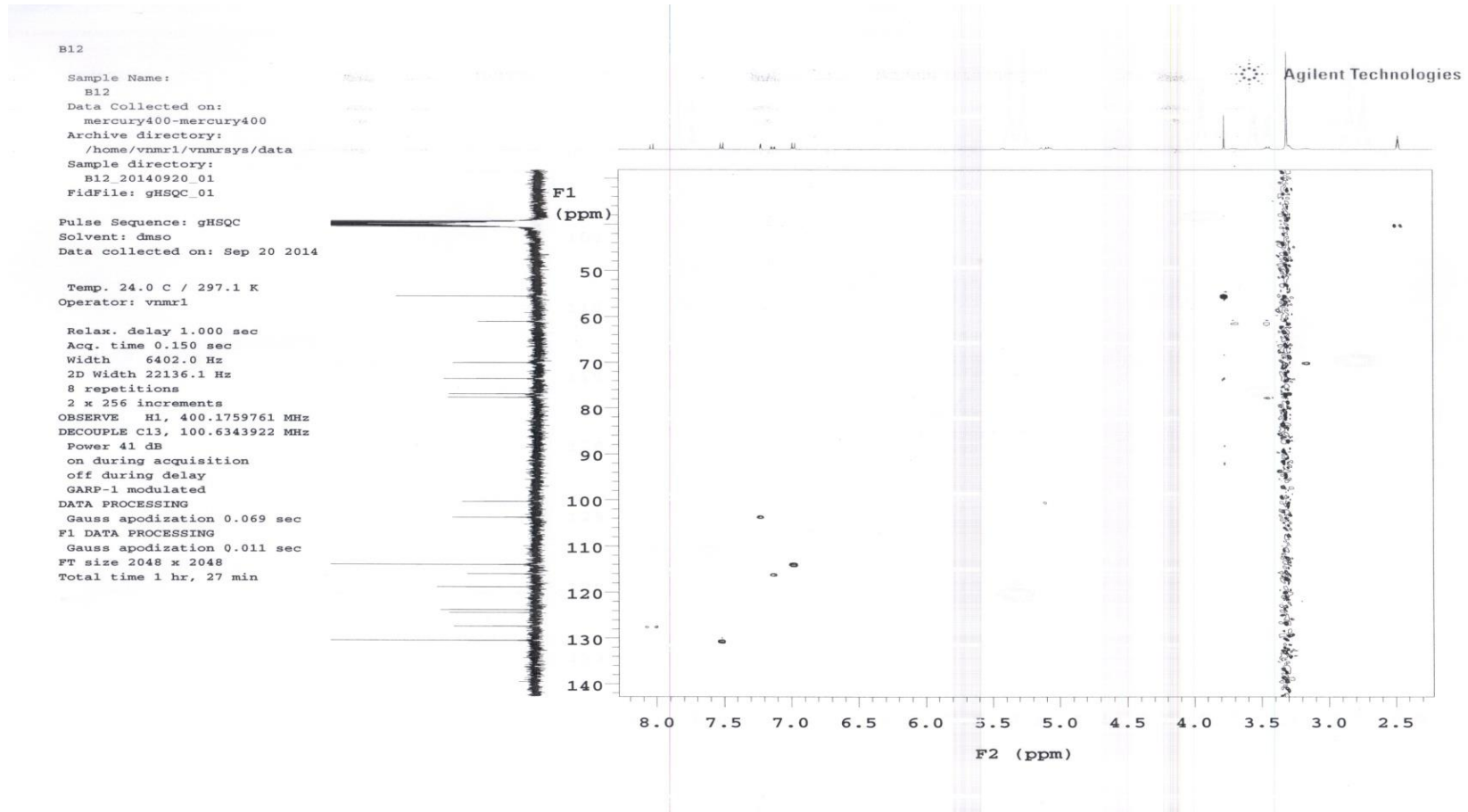
Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
128 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243292 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 58 min

Agilent Technologies



Şekil 3.47. OS-2 bileşiğinin DEPT spektrumu



Şekil 3.48. OS-2 bileşiğinin HSQC spektrumu

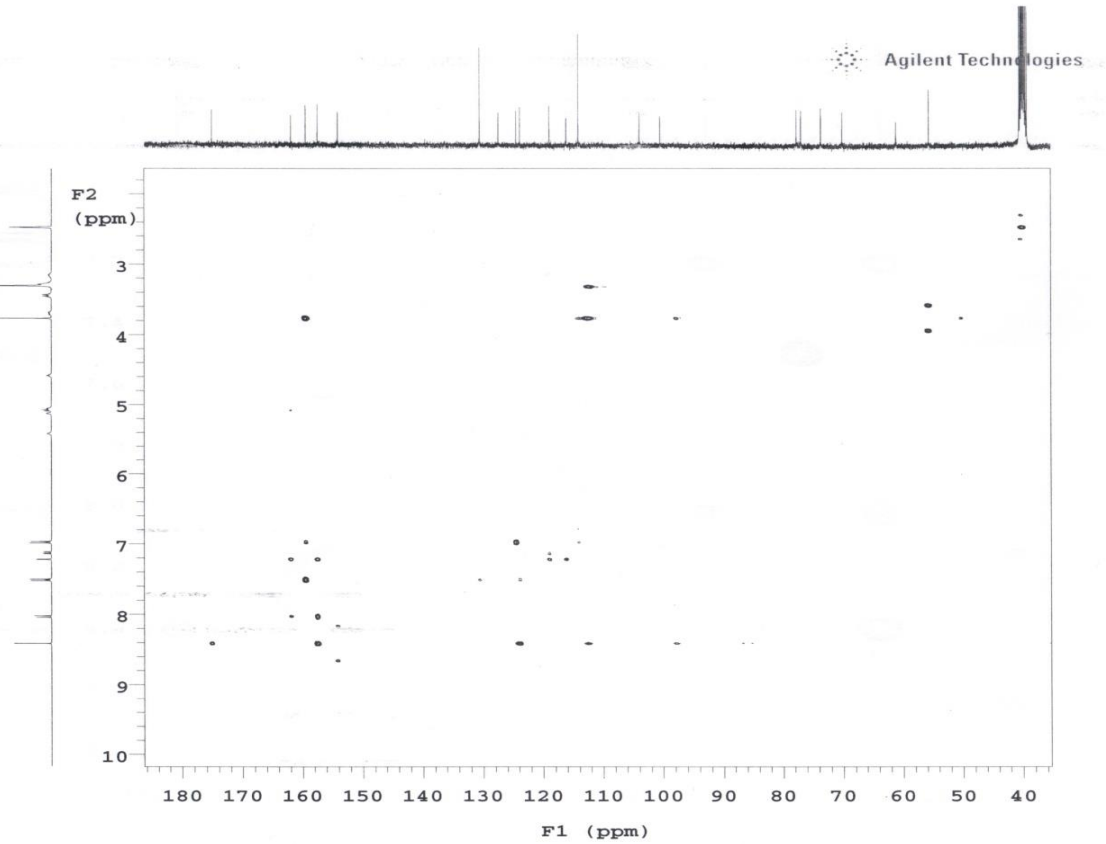
B12

Sample Name:
B12
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
B12_20140920_01
FidFile: gHMBC_01

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: dmsc
Data collected on: Sep 21 2014

Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6402.0 Hz
2D Width 24147.3 Hz
8 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.010 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 30 min



Şekil 3.49. OS-2 bileşiğinin HMBC spektrumu

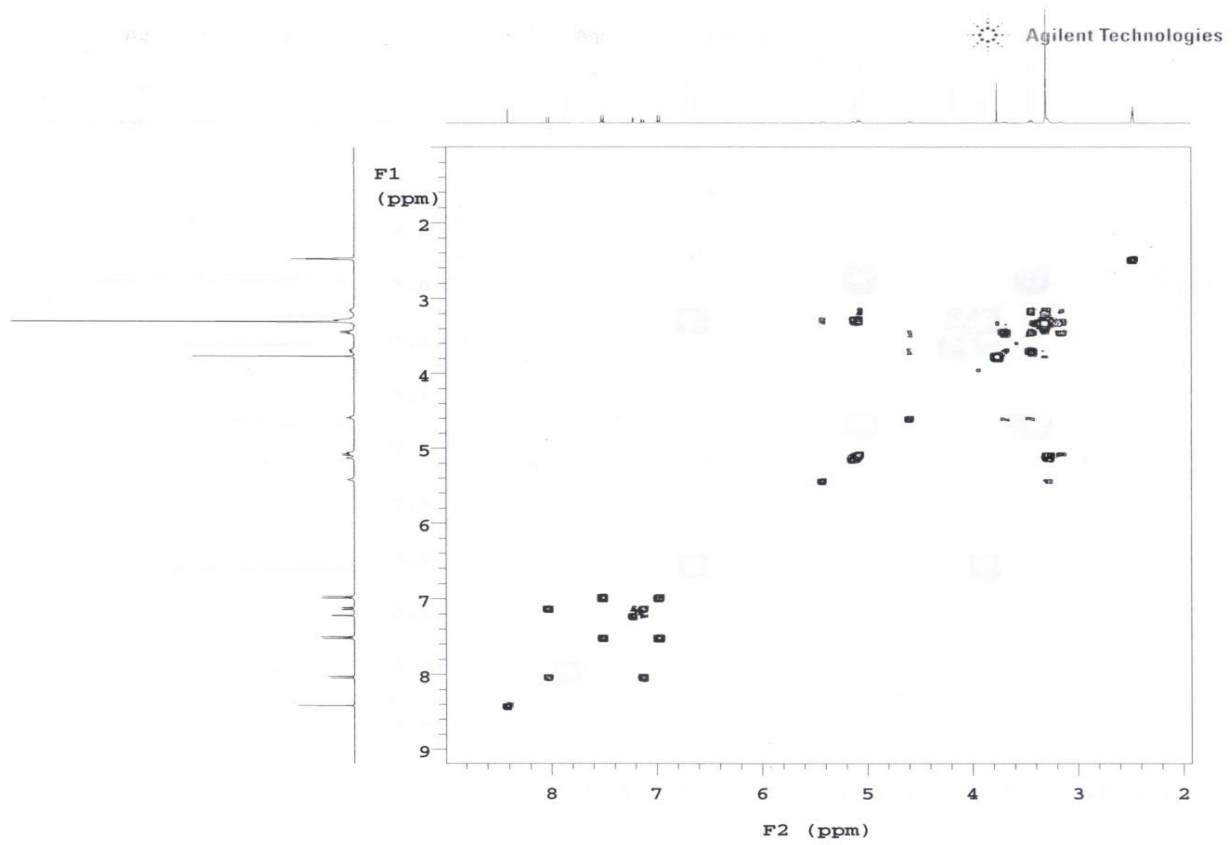
B12

Sample Name:
B12
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
B12_20140920_01
FidFile: gCOSY_01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Sep 20 2014

Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 4262.6 Hz
2D Width 4262.6 Hz
4 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.030 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 11 min



Şekil 3.50. OS-2 bileşiğinin COSY spektrumu

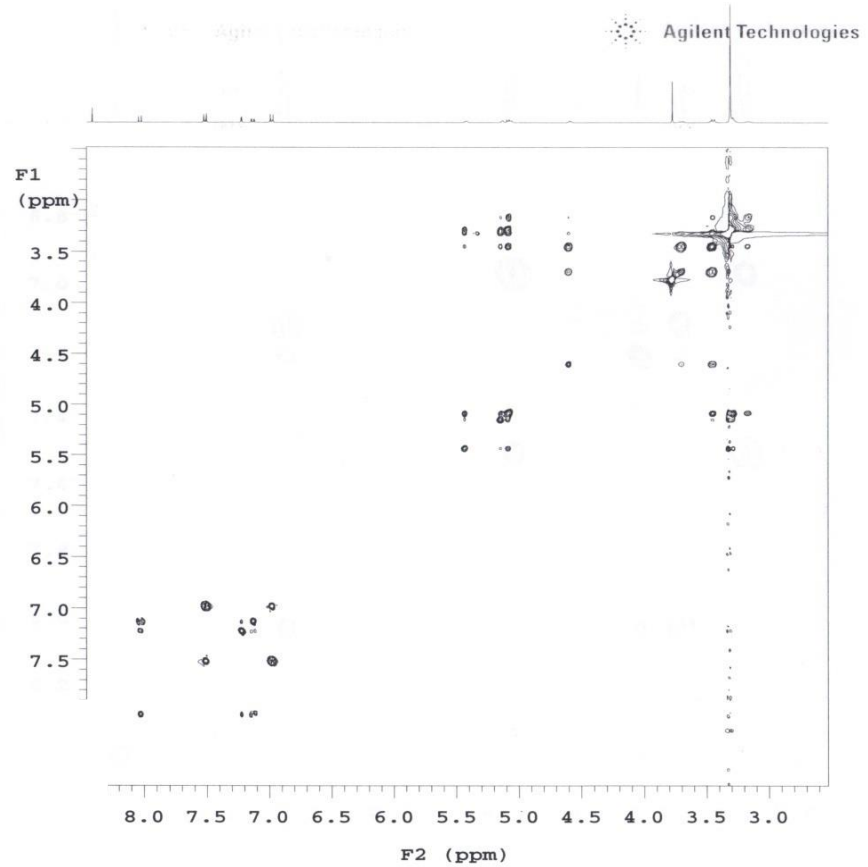
B12

Sample Name:
B12
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
B12 20140920_01
FidFile: TOCSY_01

Pulse Sequence: TOCSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Sep 20 2014

Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 4262.6 Hz
2D Width 4262.6 Hz
2 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.043 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 20 min



Şekil 3.51. OS-2 bileşinin TOCSY spektrumu

Molekül Adı	Ononin
Molekül Ağırlığı	430.4152
Molekül Formülü	C ₂₂ H ₂₂ O ₉
Özelliği	Renksiz kristaller

Şekil 3.52. OS-2 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular

Çizelge 3.4. OS-2 bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR bulguları

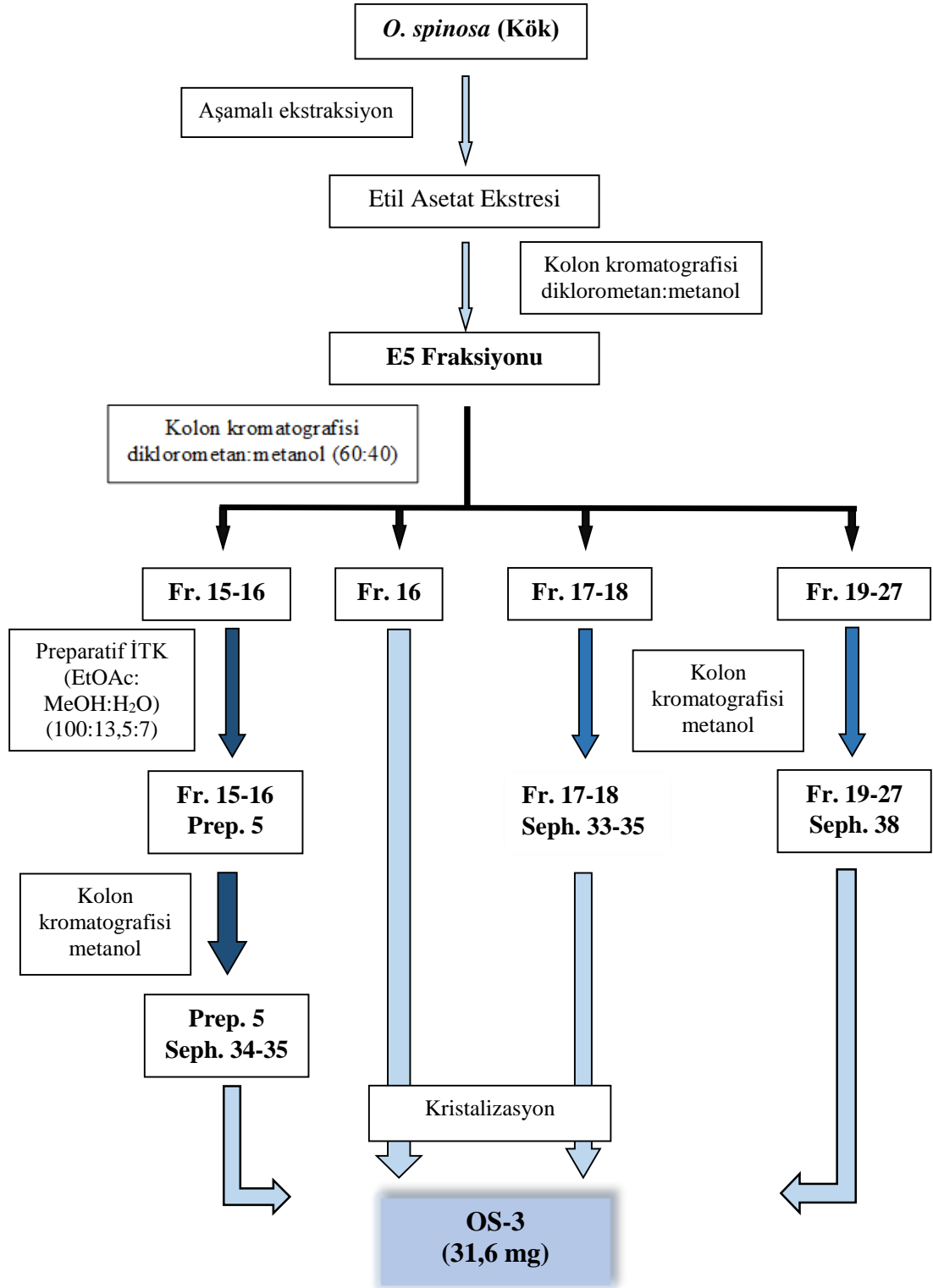
Kimyasal kayma	proton	C	δ (ppm)
----	----	----	----
8.41 (1H, s)	H-2	C-2	153.554
----	----	C-3	123.27
----	----	C-4	174.56
8.05 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz),	H-5	C-5	126.85
7.15 (1H, dd, <i>J</i> = 2.4, 8.8 Hz)	H-6	C-6	115.52
	H-7	C-7	161.34
7.24 (1H, d, <i>J</i> = 2.4 Hz),	H-8	C-8	103.30
----	----	C-9	156.94
----	----	C-10	118.34
----	H-1'	C-1'	123.90
7.53 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	H-2'	C-2'	129.97
7.00 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	H-3'	C-3'	113.53
----	----	C-4'	158.92
7.00 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz),	H-5'	C-5'	113.53
7.53 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	H-6'	C-6'	129.97
5.10 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz)	H-1''	C-1''	99.87
3.17–3.70 (2''-6'')	H-2''	C-2''	73.02
	H-3''	C-3''	76.36
	H-4''	C-4''	69.51
	H-5''	C-5''	77.10
	H-6''	C-6''	60.53
3.79 (3H, s, 4'-OCH ₃)		C-4'OCH ₃	55.05

OS-2 bileşiğinin ¹³C NMR spektrumunda 22 karbon atomuna ait sinyal gözlenmiştir. DEPT spektrumunun incelenmesi sonucunda 1 tane CH₃, 1 tane CH₂, 13 tane CH ve 7 tane kuarterner karbon atomunun varlığı tespit edilmiştir. ¹³C spektrumunda δ 55.05 ppm de gözlenen sinyal heteroatoma komşu bir C atomunu işaret etmektedir. DEPT

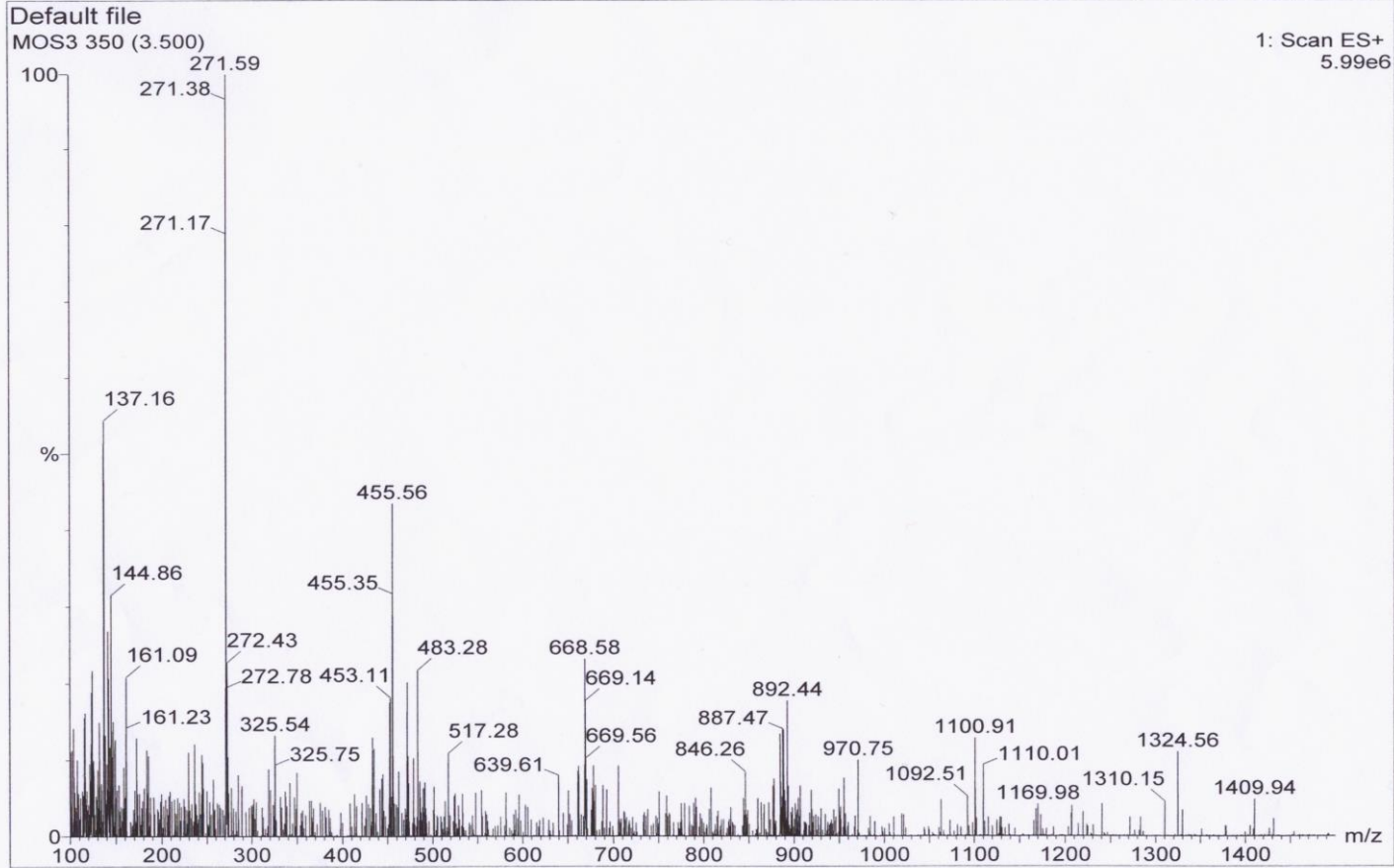
spektrumunda bu sinyalin metil karbonu olduğu ve HSQC spektrumunda δ 3.79 ppm'de (3H) singlet olarak sinyal veren protonlarla etkileştiği gözlenmiştir. HMBC spektrumunda δ 3.79 ppm'deki sinyalin δ 158.92 (C-4') ve δ 113.53 (C-3', C-5') ppm'deki karbon sinyalleri ile etkileştiği tespit edilmiştir. Bu bilgiler aromatik halkaya komşu bir -OCH₃ grubunu işaret etmektedir. ¹H NMR spektrumunda δ 7.53 ve δ 7.00 ppm'lerde gözlenen sinyaller aromatik halkaya bağlı protonları işaret etmektedir. COSY spektrumu ile bu protonların komşu protonlar olduğu ve sırasıyla δ 129.97 ve δ 113.53 ppm'lerdeki karbon atomlarına ait oldukları HSQC spektrumundaki etkileşimden tespit edilmiştir. ¹H NMR spektrumunda δ 8.44 ppm'de gözlenen singlet izoflavon halkasında H-2 için karakteristik olarak gözlenen sinyaldir. ¹³C NMR spektrumunda δ 174.6 ppm gözlenen sinyal karbonil grubunun varlığını ortaya koymaktadır. δ 8.05 ppm'de sinyal veren singlet H-5'e, δ 7.24 ppm'deki dublet ve 7.15 ppm'deki double dublet sırasıyla aromatik halkadaki H-8 ve H-6'ya aittir. δ 5.11 ppm'de gözlenen anomerik protona ait dublet oz varlığını işaret etmektedir. HMBC spektrumunda anomerik protonun δ 161.34 ppm'deki karbon sinyali ile etkileşimi ozun halkaya C-7 konumundan bağlandığını göstermektedir. Tüm veriler dikkate alındığında ve NMR verileri literatür bilgileri (Lv ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2009) ile doğrulandığında OS-2 bileşiğinin ononin olduğu tespit edilmiştir.

3.1.3.3. OS-3 Bileşiminin Yapı Tayini

OS-3 bileşiminin izolasyon şeması Şekil 3.41'de verilmiştir.



Şekil 3.53. OS-3 bileşiminin izolasyon şeması



Şekil 3.54. OS-3 bileşinin LC-MSspektrumu

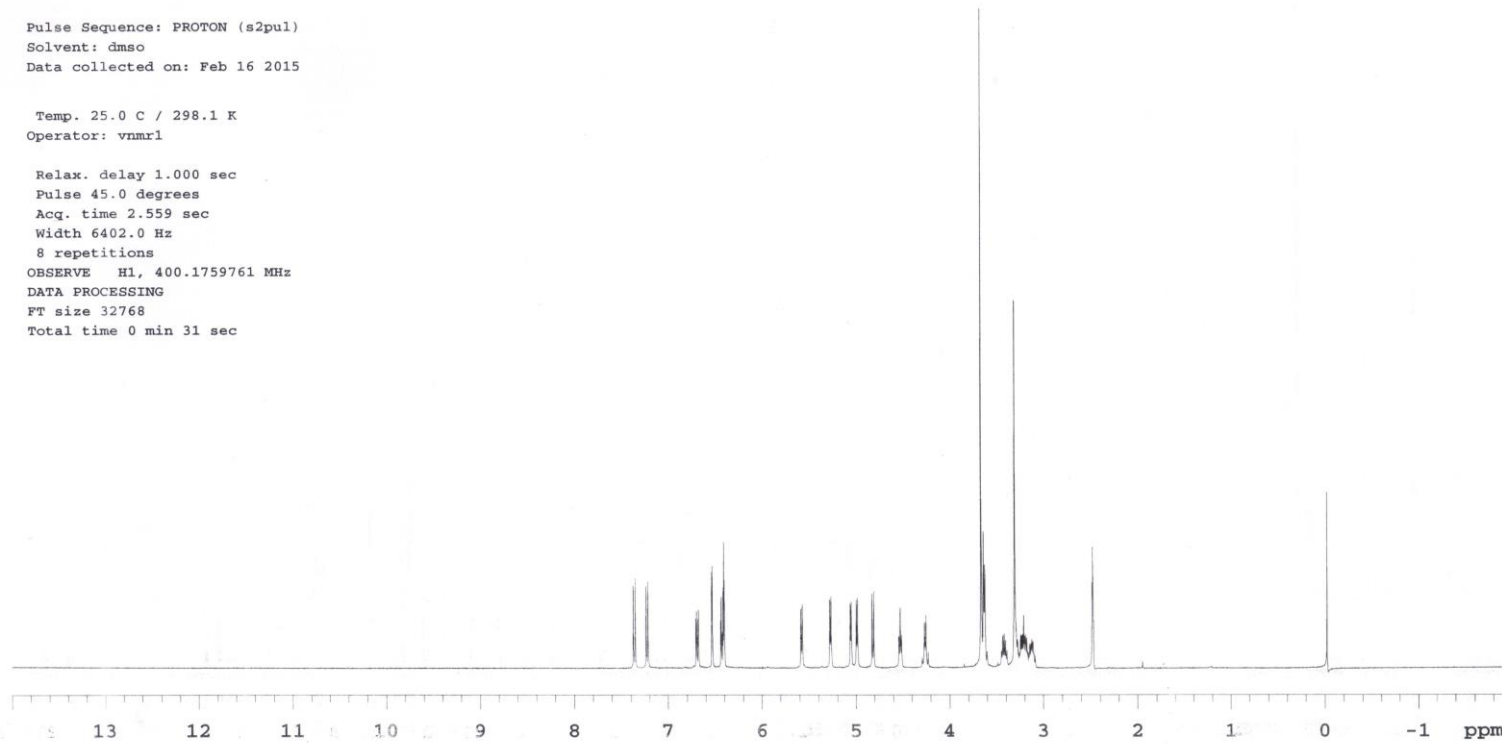
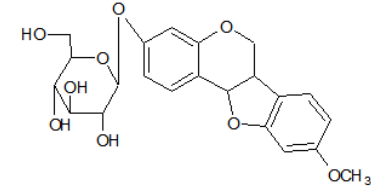
B15

Sample Name: B15
B15
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
B15_20150216_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 16 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



Şekil 3.55. OS-3 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

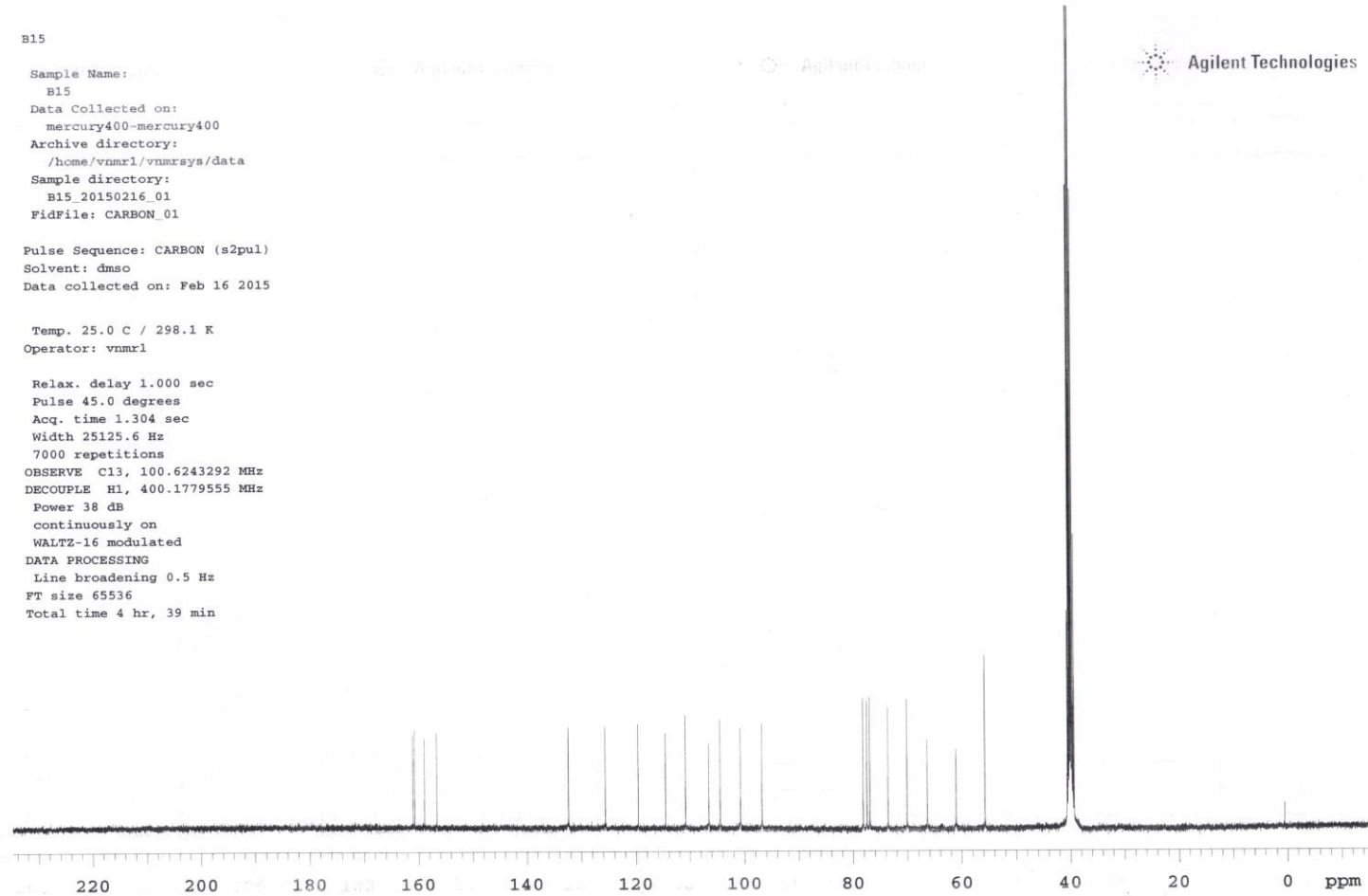
B15

Sample Name: B15
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
B15_20150216_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 16 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
7000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243292 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 4 hr, 39 min



Şekil 3.56. OS-3 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

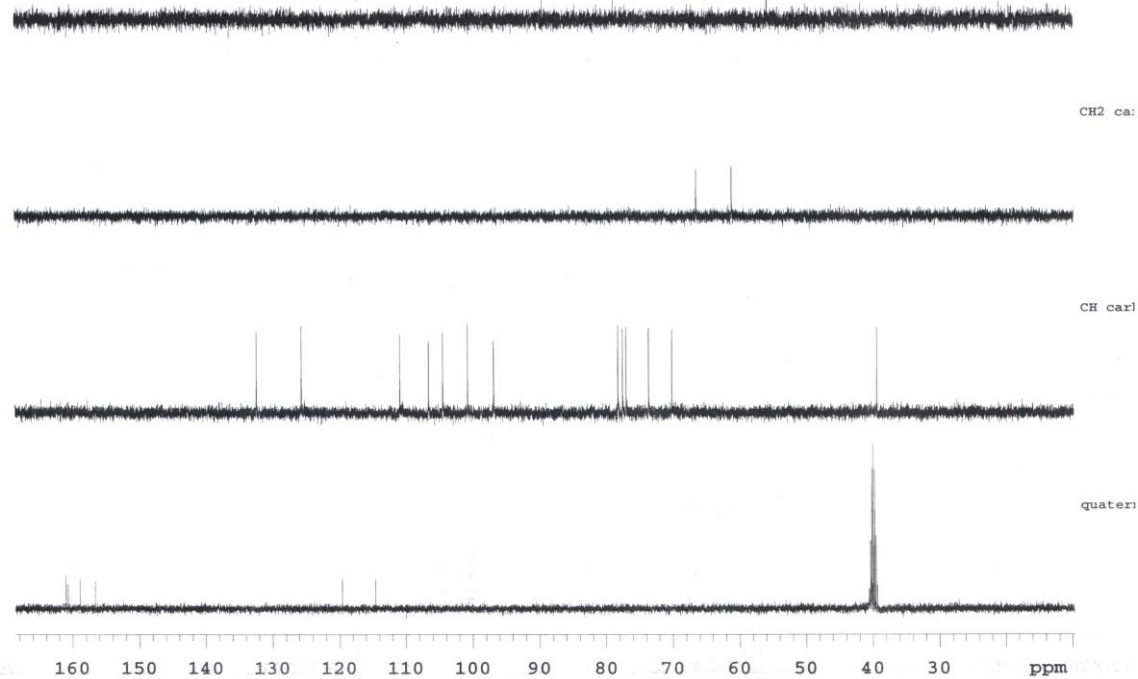
B15

Sample Name: B15
Data Collected on: mercury400-mercury400
Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: B15_20150216_01
FidFile: DEPT_01

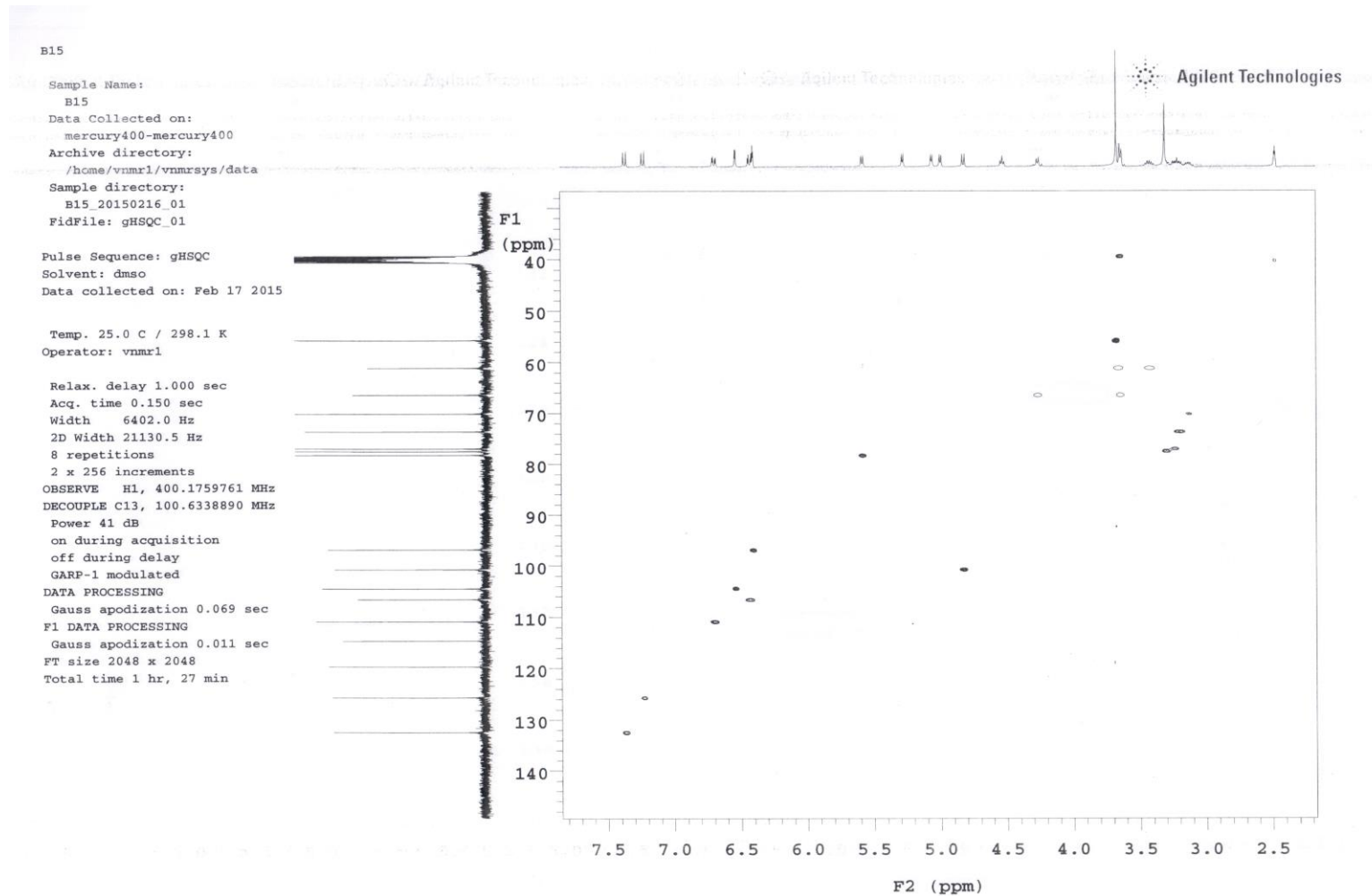
Pulse Sequence: DEPT
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 16 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

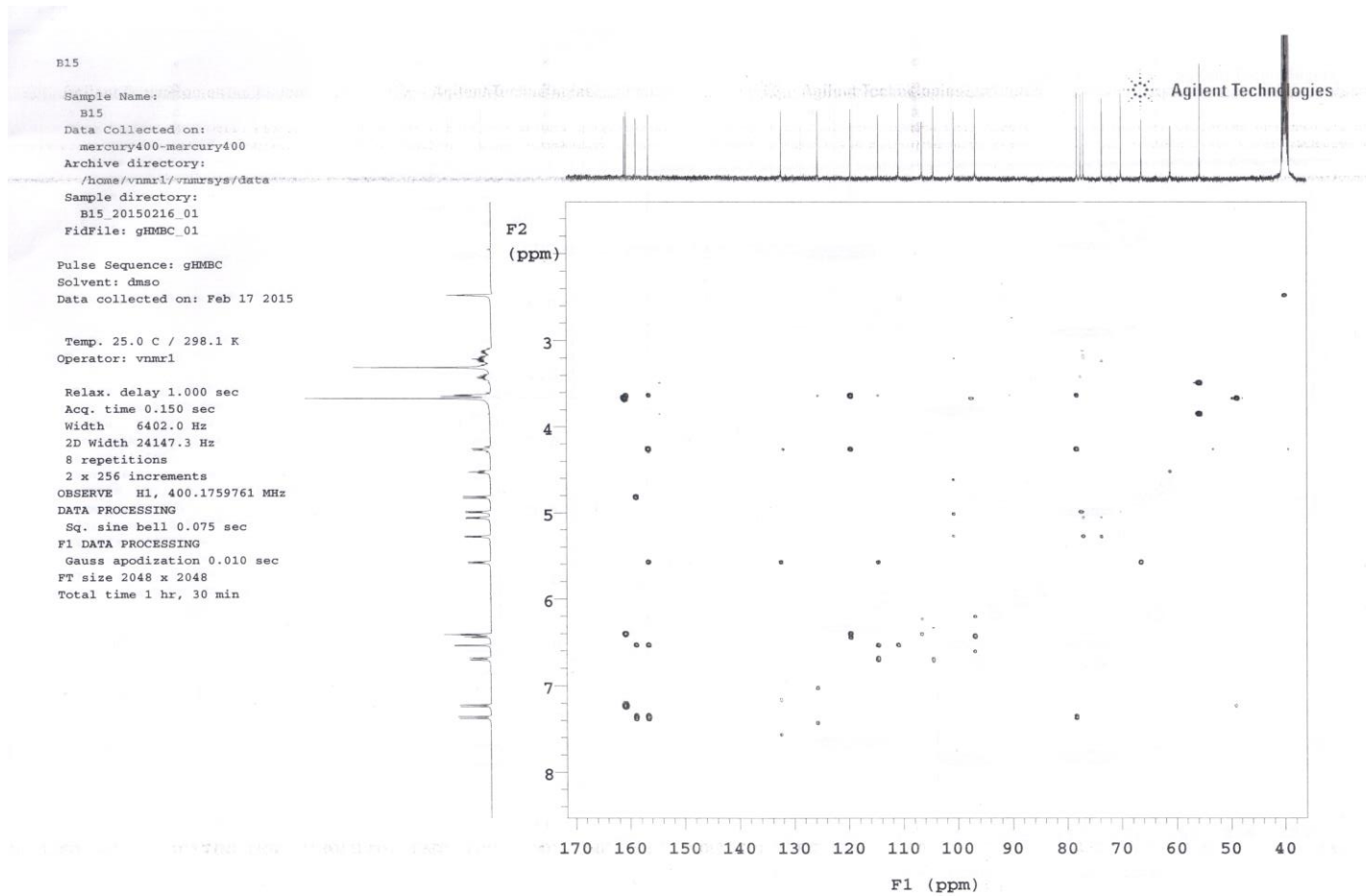
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
64 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243292 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 29 min



Şekil 3.57. OS-3 bileşiğinin DEPT spektrumu



Şekil 3.58. OS-3 bileşiğinin HSQC spektrumu



Şekil 3.59. OS-3 bileşğinin HMBC spektrumu

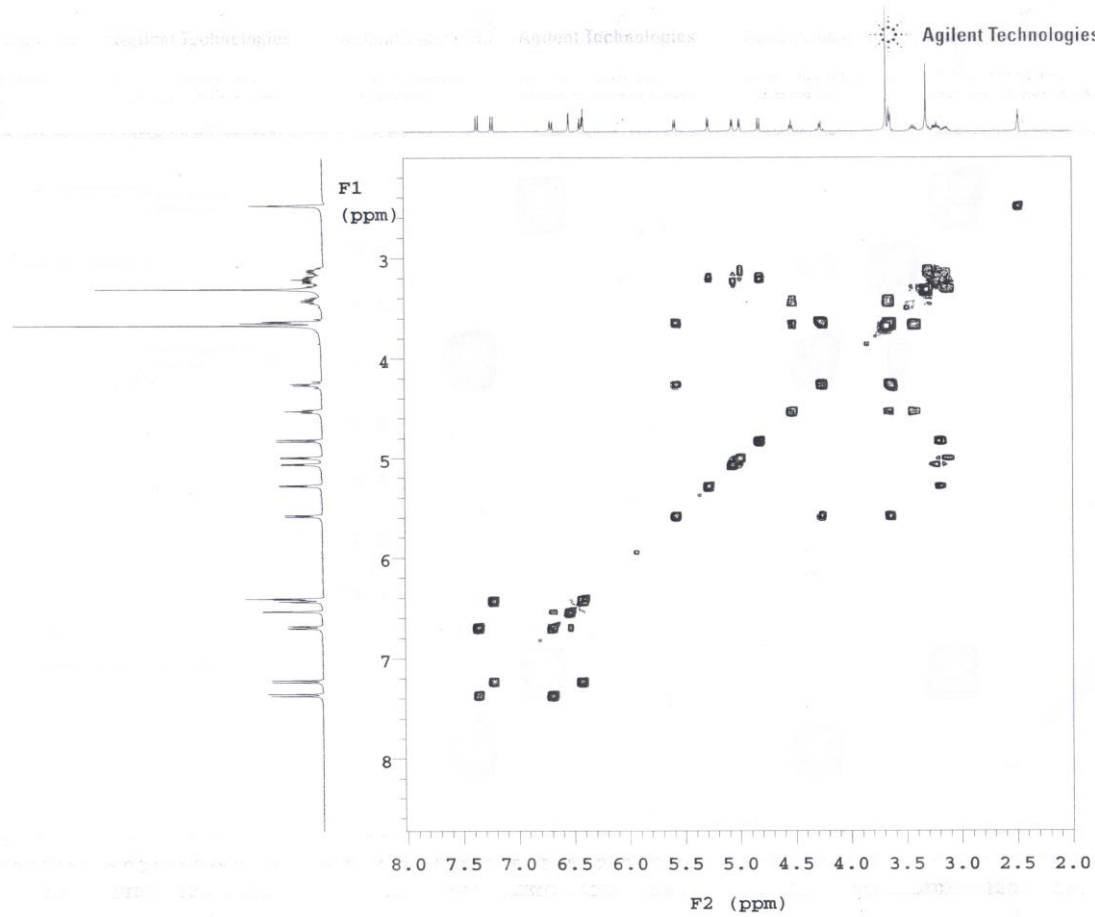
B15

Sample Name: B15
Data Collected on: mercury400-mercury400
Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: B15_20150216_01
FidFile: gCOSY_01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 16 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 4203.4 Hz
2D Width 4203.4 Hz
4 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.030 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 11 min



Şekil 3.60. OS-3 bileşiğinin COSY spektrumu

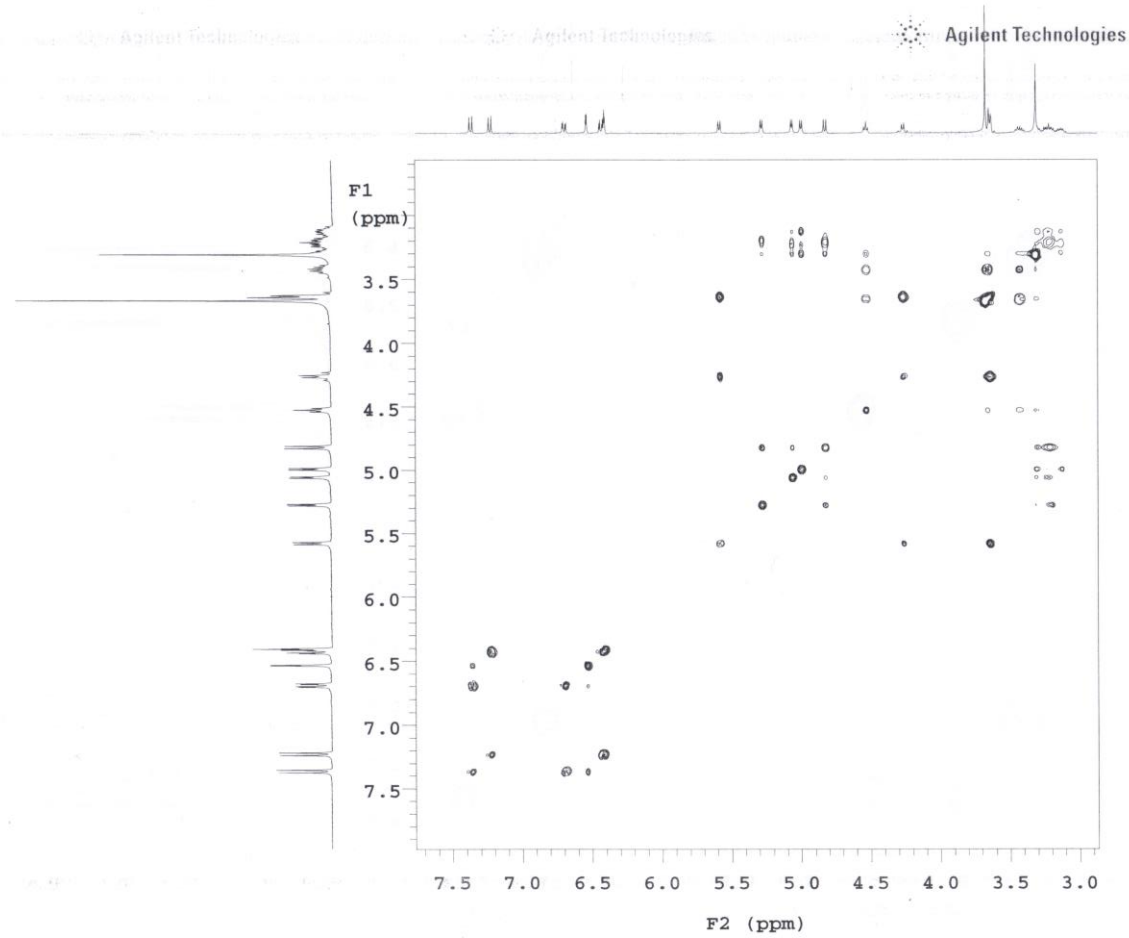
B15

Sample Name:
B15
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
B15_20150216_01
FidFile: TOCSY_01

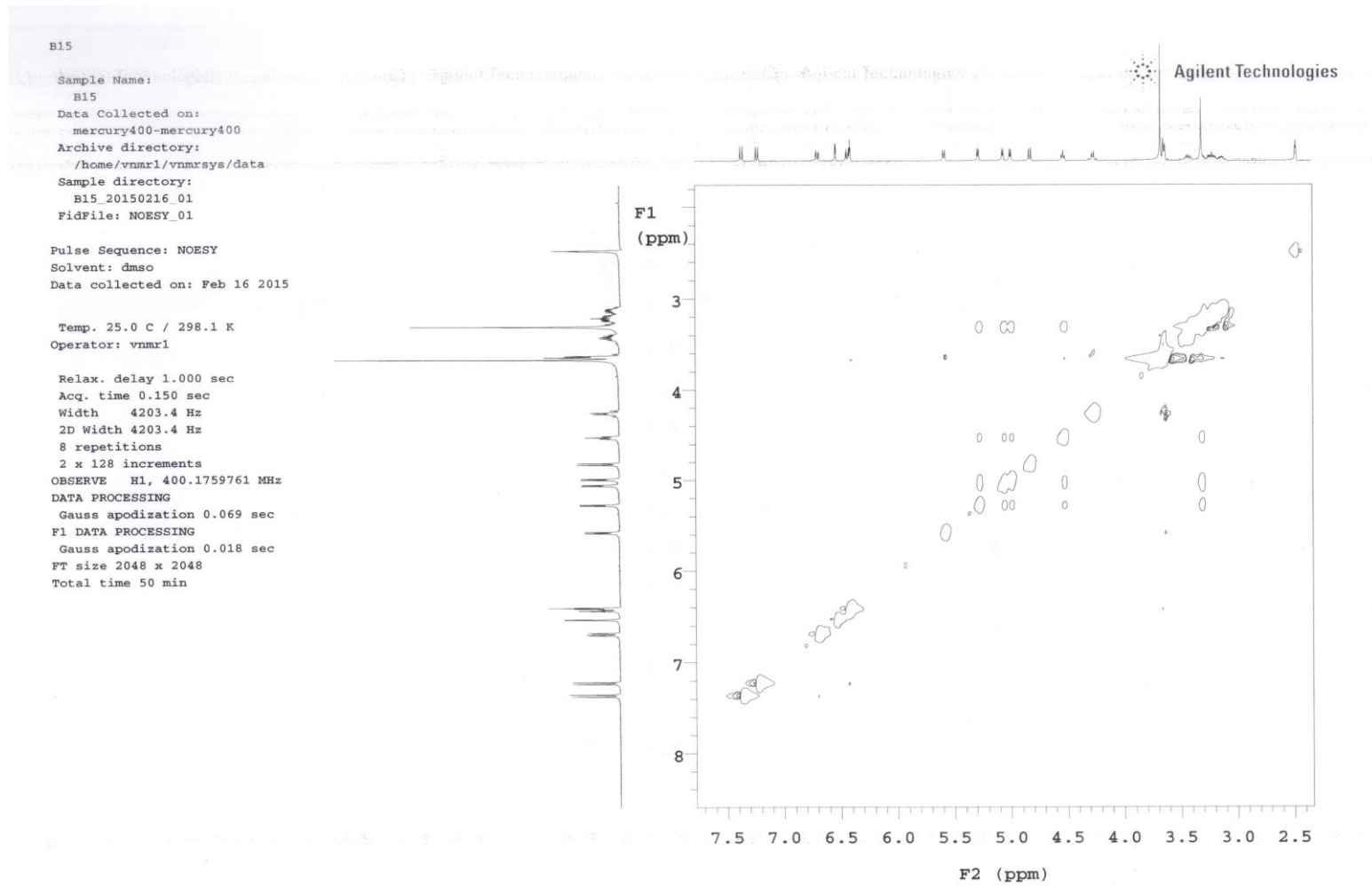
Pulse Sequence: TOCSY
Solvent: dmsd
Data collected on: Feb 16 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 4203.4 Hz
2D Width 4203.4 Hz
4 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.044 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 37 min



Şekil 3.61. OS-3 bileşiğinin TOCSY spektrumu



Şekil 3.62. OS-3 bileşiğinin NOESY spektrumu

Molekül Adı	Medikarpin-3- <i>O</i> -glukozit
Molekül Ağırlığı	432,43
Molekül Formülü	C ₂₂ H ₂₂ O ₉
Özelliği	Renksiz kristaller

Şekil 3.63. OS-3 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular

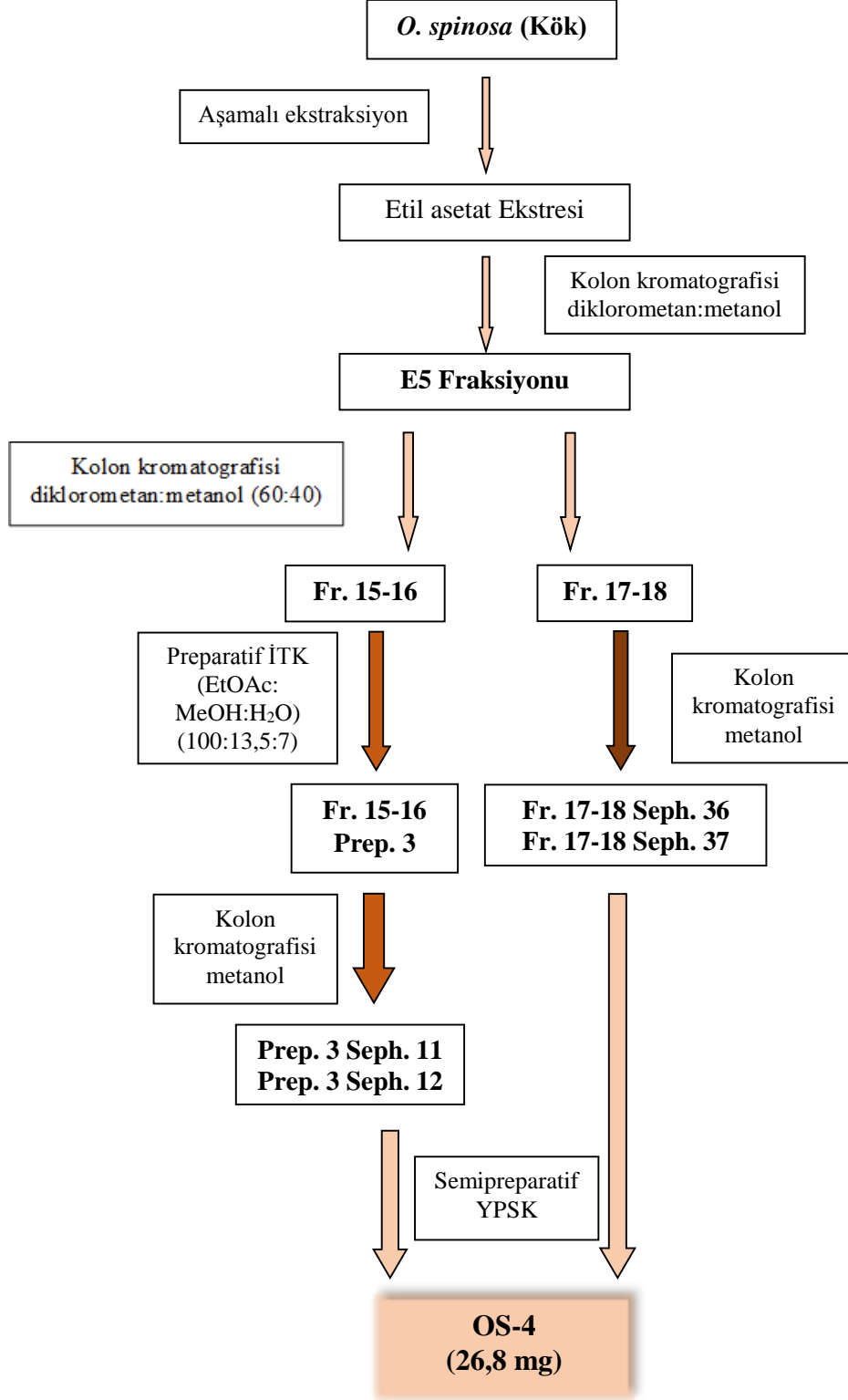
Çizelge 3.5. OS-3 bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR bulguları

Kimyasal kayma	Proton	C	δ (ppm)
7.36 (d, <i>J</i> =8.8 Hz)	H-1	C-1	132.39
6.69 (dd, <i>J</i> =2.4, 8.8 Hz)	H-2	C-2	110.84
-	H-3	C-3	158.92
6.53 (d, <i>J</i> =2.4 Hz)	H-4	C-4	104.46
-	-	C-4a	156.64
3.65 (m), 4.24 (m)	H-6	C-6	66.39
3.7 (m)	H-6a	C-6a	39.8
-	H-6b	C-6b	119.63
7.22 (d, <i>J</i> =8.0 Hz)	H-7	C-7	125.63
6.43 (dd, <i>J</i> =2.4, 8.0 Hz)	H-8	C-8	106.55
-	-	C-9	161.01
6.40 (d, <i>J</i> =2.4 Hz)	H-10	C-10	96.80
-	H-10a	C-10a	160.68
5.58 (d, <i>J</i> =6.4 Hz)	H-11a	C-11a	78.20
-	H-11b	C-11b	114.58
4.82 (d, <i>J</i> =7.6 Hz)	H-1'	C-1'	100.72
3.20 (m)	H-2'	C-2'	73.60
3.24 (m)	H-3'	C-3'	76.96
3.14 (m)	H-4'	C-4'	70.01
3.30 (m)	H-5'	C-5'	77.5
3.42 (m), 3.63 (m)	H-6'	C-6'	61.10
3.67 (s)	-OCH ₃	-OCH ₃	55.73

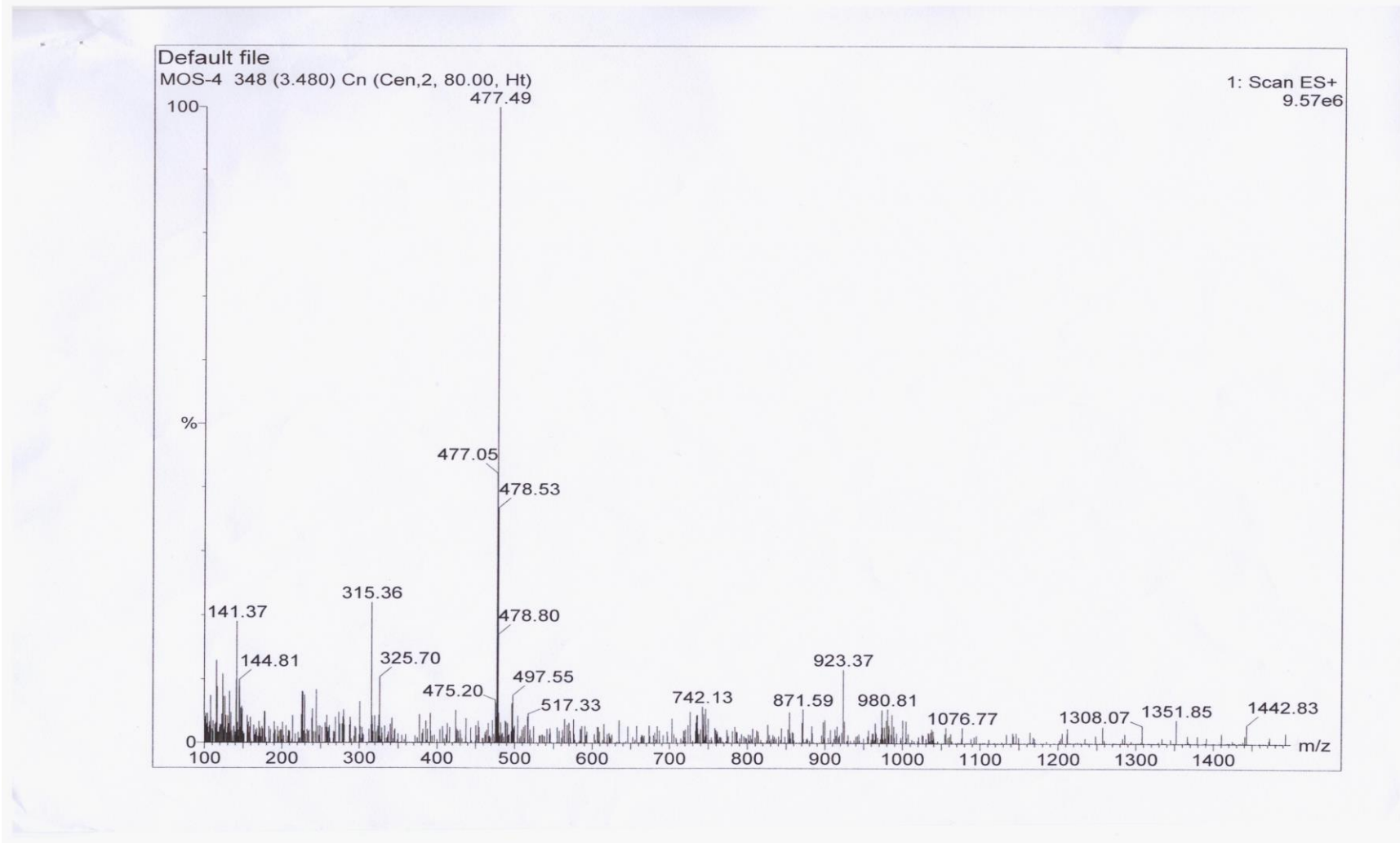
OS-3 kodlu bileşiğin ^{13}C -NMR ve DEPT spektrumları incelendiğinde toplam 22 karbon atomuna ait sinyal gözlenmiştir. Bu sinyallerden 1 tanesinin metil, 2 tanesinin metilen, 13 tanesinin metin, 6 tanesinin ise kuaterner karbon atomuna ait sinyaller olduğu DEPT spektrumundan anlaşılmıştır. ^1H -NMR spektrumuna bakıldığında δ 5.58 (d, $J=6.4$ Hz), 4.24 (m) ve 3.66 (m) ile 3.70 (m) ppm'lerde gözlenen sinyaller karakteristik pterokarpan halkasının sırasıyla H-11a, H-6, H-6 ve H-6a sinyallerini işaret etmektedir. ^1H -NMR spektrumunda δ 7.36 ppm'de gözlenen dublet ($J=8.8$ Hz), δ 6.69 ppm'de gözlenen dd ($J=2.4, 8.8$ Hz) ve δ 6.53 ppm'de gözlenen dublet ($J=2.4$ Hz) trisübstitüe benzen halkasını; δ 7.22 ppm'de gözlenen dublet ($J=8.0$ Hz), δ 6.43 ppm'de gözlenen dd ($J=2.4, 8.0$ Hz) ve δ 6.40 ppm'de gözlenen dublet ($J=2.4$ Hz) sinyalleri ise bir başka trisübstitüe benzen halkasının daha varlığını ortaya koymaktadır. Bu protonların benzen halkaları üzerindeki konumları HMBC, HSQC ve COSY spektrum verileri ile doğrulanmıştır. ^{13}C -NMR spektrumunda gözlenen δ 55.73 ppm'deki karbon atomu sinyalinin HSQC spektrumunda δ 3.67 ppm'de gözlenen singlet ile etkileşimi moleküldeki metoksil grubunun varlığını işaret etmektedir. Metoksil grubuna ait δ 3.67 ppm'de gözlenen singletin HMBC spektrumunda δ 161.01 ppm'de görülen kuaterner karbon atomu sinyali ile etkileşimi ise metoksil grubunun C-9 konumundan bağlandığını göstermektedir. δ 4.82 (1H, d, $J=7.2$ Hz) ppm'de gözlenen anomerik proton sinyali β pozisyonunda bağlı oz molekülünü işaret etmektedir. ^{13}C -NMR ve ^1H -NMR verileri oz molekülünün glukoz olduğunu ortaya koymaktadır. HMBC spektrumunda δ 4.82 ppm'deki anomerik proton sinyali ile δ 158.46 (C-3) karbon atomu sinyali arasındaki etkileşim oz molekülünün aromatik halkaya 3. konumdan bağlandığını göstermektedir. Bileşiğin ölçülen kütle spektrumuna gözlenen 271. 59 $[\text{M}+\text{H}]^+$ moleküler iyon piki, glukozun molekülden ayrılması sonucunda açığa çıkan medikarpin yapısının varlığını ortaya koymaktadır. Tüm veriler literatür bilgileri ile de kıyaslandığında (Abdel-Kader, 2004; Tsunoda ve ark., 2008) OS-3 bileşiğinin medikarpin-3-O- β -glukopiranozit olduğu doğrulanmıştır.

3.1.3.4. OS-4 Bileşiminin Yapı Tayini

OS-4 bileşiminin izolasyon şeması Şekil 3.51'de verilmiştir.



Şekil 3.64. OS-4 bileşiminin izolasyon şeması



Şekil 3.65. OS-4 bileşiğinin LC-MS spektrumu

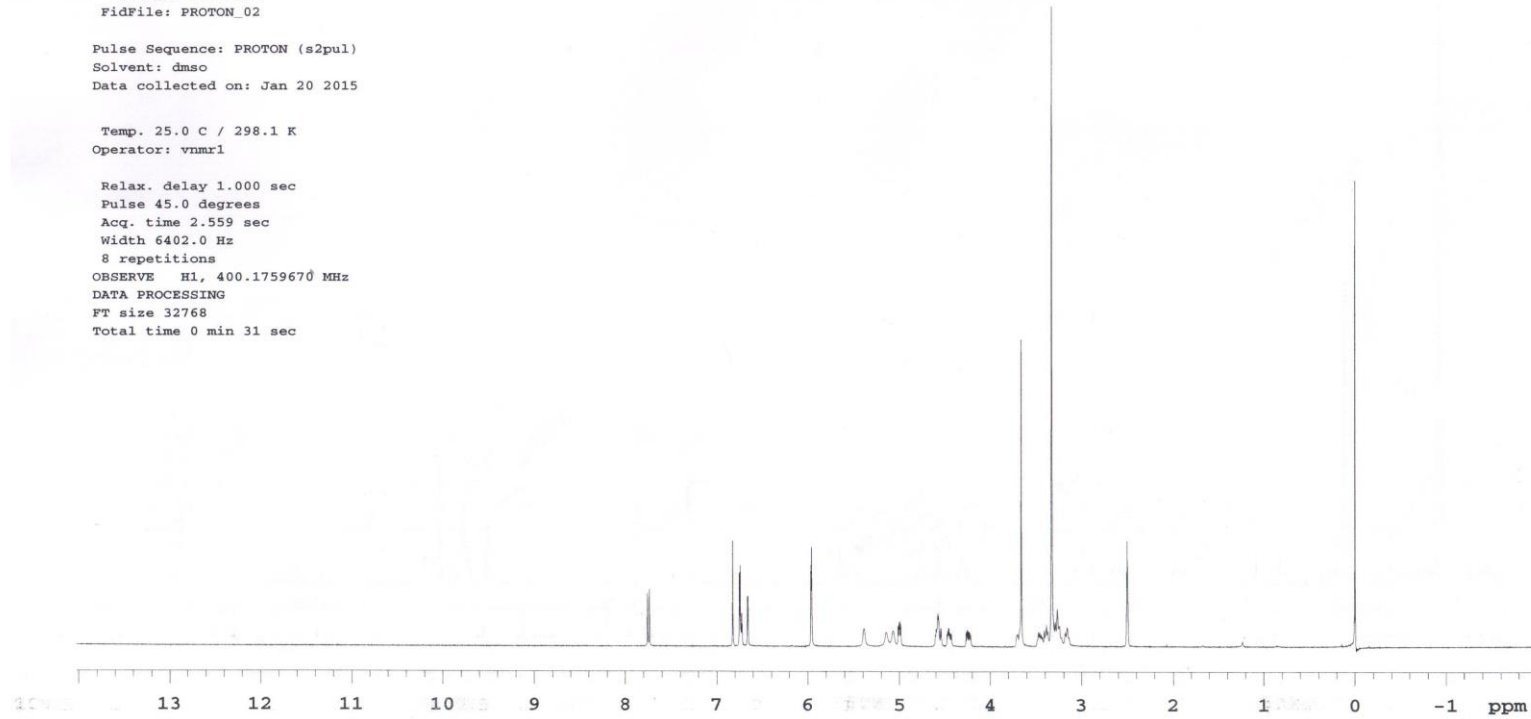
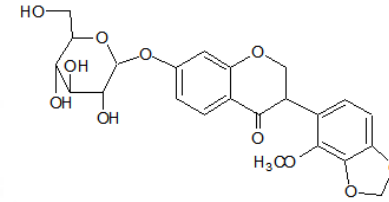
B-13

Sample Name: B-13
Data Collected on: mercury400-mercury400
Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: B-13_20150120_01
FidFile: PROTON_02

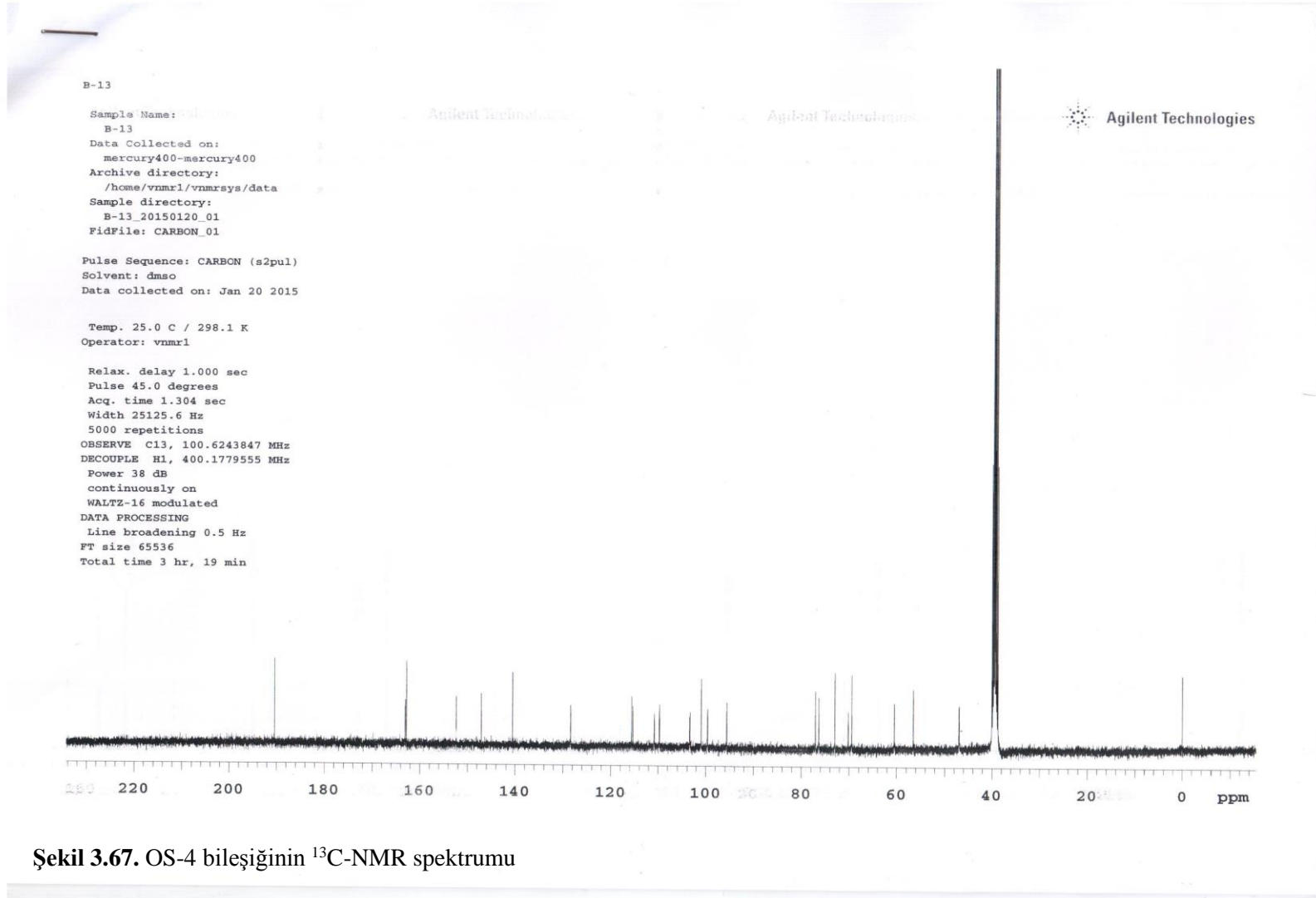
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Jan 20 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

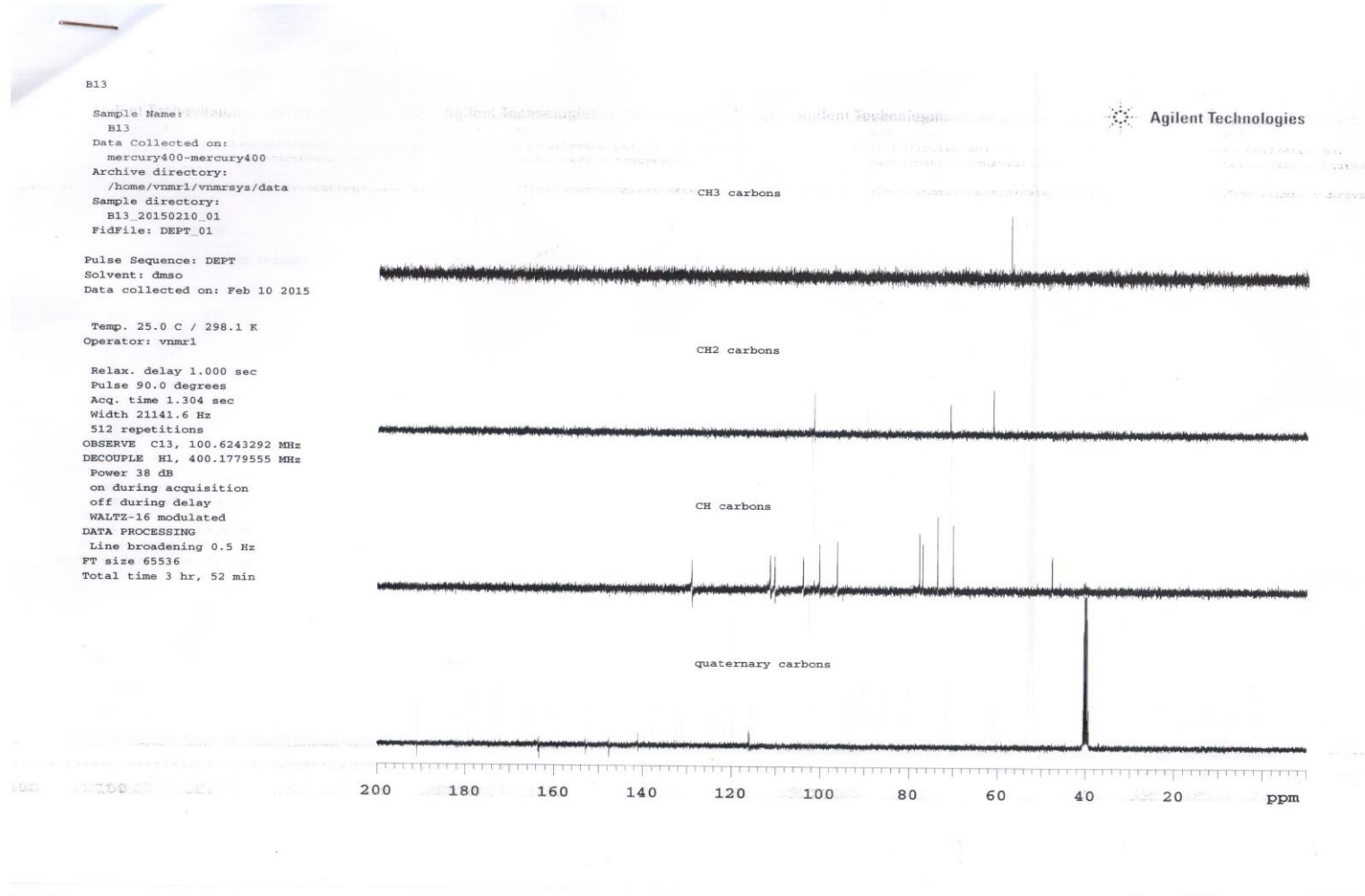
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759670 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



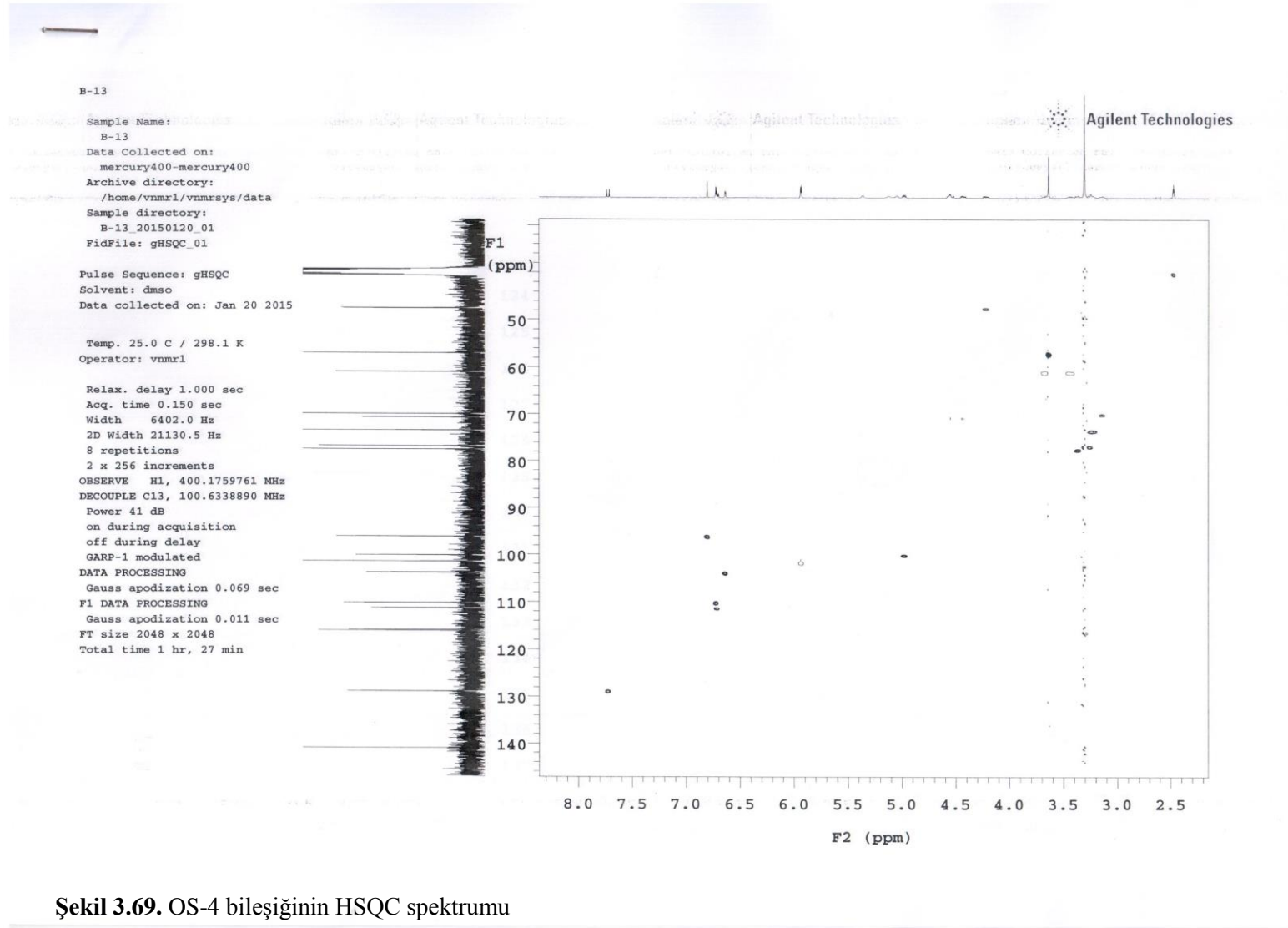
Şekil 3.66. OS-4 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



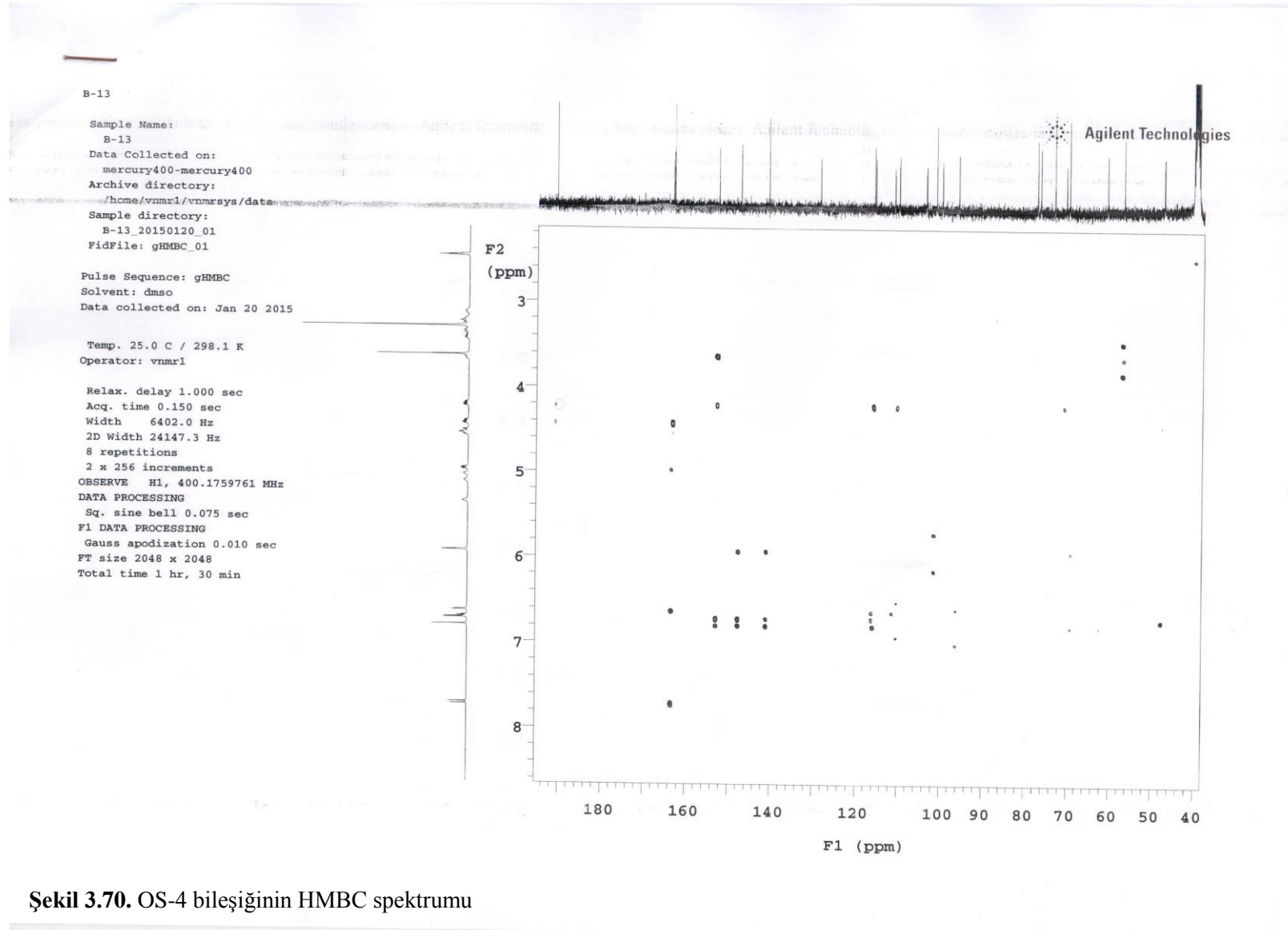
Şekil 3.67. OS-4 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 3.68. OS-4 bileşiğinin DEPT spektrumu



Şekil 3.69. OS-4 bileşiğinin HSQC spektrumu



Şekil 3.70. OS-4 bileşiğinin HMBC spektrumu

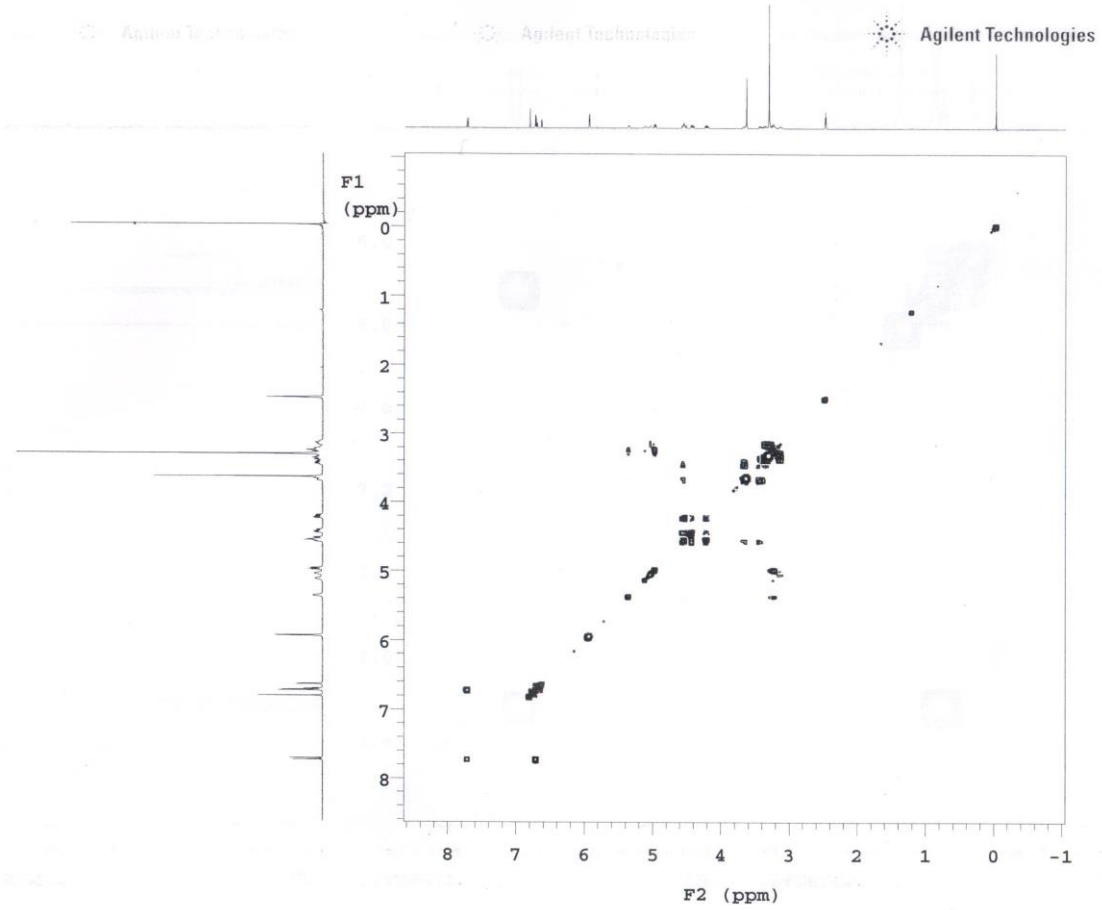
B-13

Sample Name: B-13
Data Collected on: mercury400-mercury400
Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: B-13_20150120_01
FidFile: gCOSY_01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Jan 20 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 3877.5 Hz
2D Width 3877.5 Hz
4 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.033 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 11 min



Şekil 3.71. OS-4 bileşiğinin COSY spektrumu

Molekül Adı	Onogenin-7- <i>O</i> -glukozit
Molekül Ağırlığı	477.49 [M+H] ⁺
Molekül Formülü	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁
Özelliği	Beyaz amorf toz

Şekil 3.72. OS-4 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular

Çizelge 3.6. OS-4 bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR bulguları

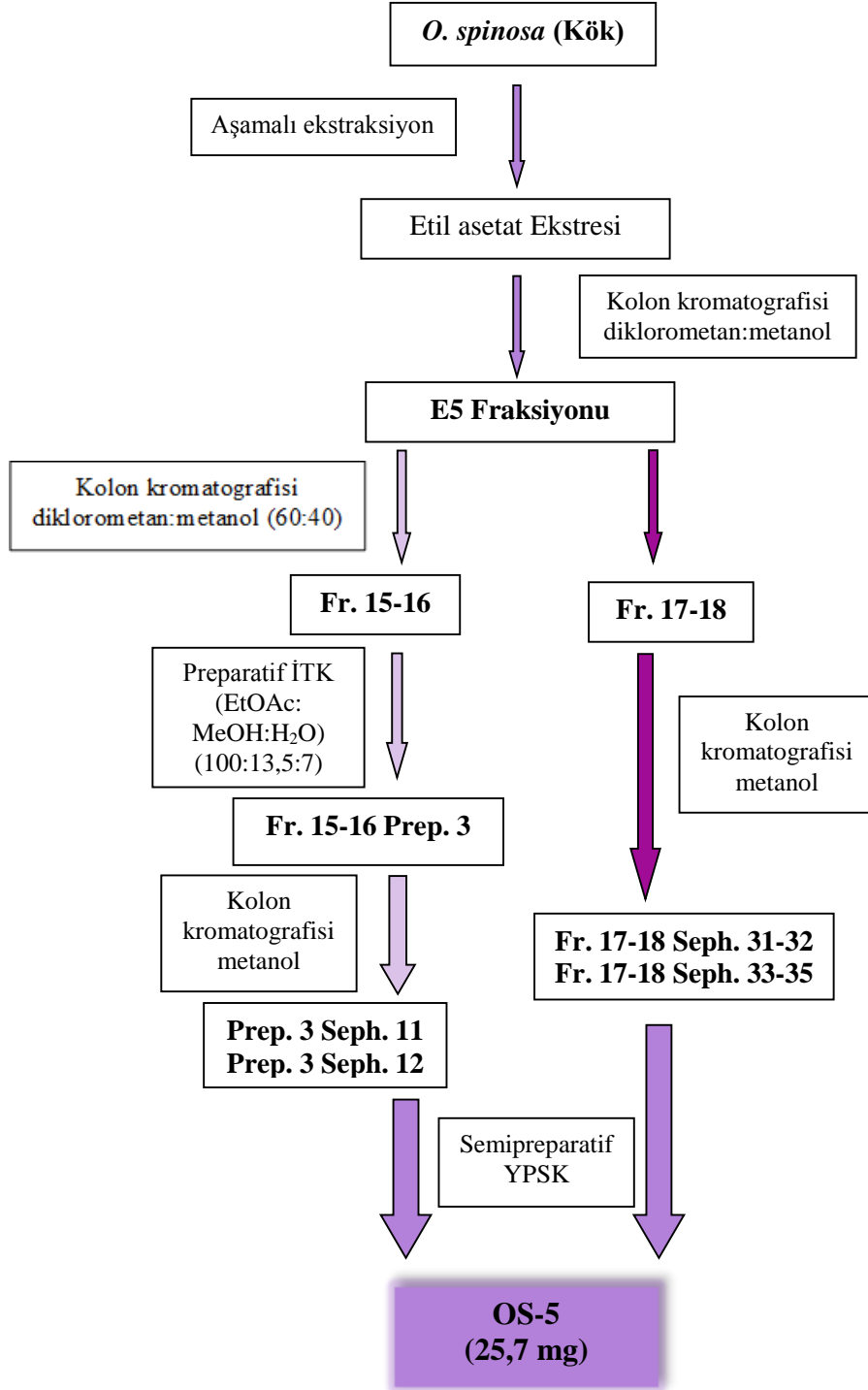
Kimyasal kayma	Proton	C	δ (ppm)
-	-	-	-
4.44 (1H, dd, (<i>J</i> = 2.8 Hz))	H-2	C-2	70.20
4.57 (1H, dd)	-	-	-
4.22 (1H, m) (<i>J</i> = 3.2 Hz)	H-3	C-3	46.98/47.077
-	-	C-4	190.43
7.74 (1H, d, <i>J</i> =9.2 Hz)	H-5	C-5	128.38/128.42
6.72 (1H, m)	H-6	C-6	110.78/110.85
-	H-7	C-7	163.10/163.04
6.66 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	H-8	C-8	103.31/103.39
-	H-9	C-9	162.82
-	-	C-10	115.65
-	-	C-1'	115.35/115.40
-	-	C-2'	152.38
6.74 (1H, s)	H-3'	C-3'	109.72/109.79
-	-	C-4'	147.12
-	-	C-5'	140.53
6.83 (1H, s)	H-6'	C-6'	95.64
5.96 (1H, d, <i>J</i> =2.8 Hz)	-OCH ₂ O-	-OCH ₂ O-	100.98
3.66 (3H, s)	-OCH ₃	-OCH ₃	56.55
4.99 (1H, dd, <i>J</i> =4.4; 7.6 Hz)	H-1''	C-1''	99.67
3.24 (1H, m)	H-2''	C-2''	72.98
3.28 (1H, m)	H-3''	C-3''	76.33/76.34
3.16 (1H, m)	H-4''	C-4''	69.48
3.38 (1H, m)	H-5''	C-5''	77.05
3.45 (1H, m)	H-6''	C-6''	60.50
3.72 (1H, m)	-	-	-

OS-4 kodlu bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde δ 4.22 (dd, $J= 3.2$ Hz) ppm'de gözlenen proton sinyali (H-3) ve 4.57 (m) ile 4.44 (dd, $J= 2.8$ Hz) ppm'lerde gözlenen proton sinyallerinin (H-2), HSQC spektrumunda sırasıyla δ 46.98/47.07 (C-3) ve δ 70.20 (C-2) karbon atomu sinyalleri ile etkileştiği gözlenmiştir. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumuna bakıldığında görülen δ 190.43 ppm'de gözlenen karbon atomu sinyali bir karbonil grubunun varlığını işaret etmektedir ve HMBC spektrumunda δ 4.22 (dd) ppm ile δ 4.44 (dd) ppm'de gözlenen protonların δ 190.43 ppm'deki karbonil grubu ile etkileşimleri karbonil grubunun C-4 konumunda yer aldığını işaret etmektedir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda aromatik bölgede δ 7.74 ppm (d, $J= 9.2$ Hz) ile δ 6.72 (m) ppm'de gözlenen proton sinyallerinin komşu protonlar oldukları COSY spektrumundan anlaşılmıştır. δ 6.66 (d, $J= 2$ Hz) proton sinyalinin ise δ 6.72 (m) ve δ 7.74 (d, $J= 9.2$ Hz) protonları ile aynı aromatik halkaya bağlı olduğu HMBC spektrumu verileri ışında doğrulanmıştır ve δ 6.72 (m) protonuna göre meta pozisyonda yer aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca δ 4.22 ppm'de yer alan (dd) proton sinyalinin δ 115.35/115.40 (C-1') karbon atomu sinyali ile etkileşimi C-3 konumundan bağlanan diğer aromatik halkayı işaret etmektedir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 6.74 (H-3') ve 6.83 (H-6') ppm'lerde gözlenen singletlerin HSQC spektrumuna göre sırasıyla δ 109.72/109.74 ppm ve δ 95.64 ppm'de yer alan karbon atomlarına bağlı oldukları ve HMBC spektrumuna göre her iki singletin de δ 140.53, δ 147.12 ve δ 152.8 ppm'lerde görülen karbon atomları ile aynı halkada yer aldıkları anlaşılmıştır. Bu veriler OS-4 bileşiğinin izoflavanon yapısında olduğunu ortaya koymaktadır. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda δ 5.96 ppm'de gözlenen dubletin ($J= 2.8$ Hz, 2H) HSQC spektrumunda δ 100.98 ppm'de gözlenen karbon atomu sinyali ile etkileşmesi ise metilendioksi grubunun varlığını ortaya koymaktadır. HMBC spektrumunda δ 5.96 ppm'de gözlenen protonların δ 147.12 (C-4') ve δ 140.43 (C-5') karbon atomları ile etkileşmesi metilendioksi grubunun 4' ve 5' konumlarından bağlandığını göstermektedir. DEPT spektrumunda δ 56.55 ppm'de gözlenen metil grubu ve $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda δ 3.66 ppm'de (3H) gözlenen singlet molekülün bir metoksil grubu taşıdığını işaret etmektedir. δ 3.66 ppm'de yer alan metoksil grubuna ait singletin HMBC spektrumunda δ 152.8 ppm'deki karbon atomu sinyali ile etkileşimi metoksil grubunun 2' konumundan bağlandığını işaret etmektedir. δ 4.99 (dd, $J= 4.4, 7.6$ Hz) anomerik protonu işaret etmektedir ve HMBC spektrum verilerine göre δ 163.4 ppm'de yer alan karbon atomu

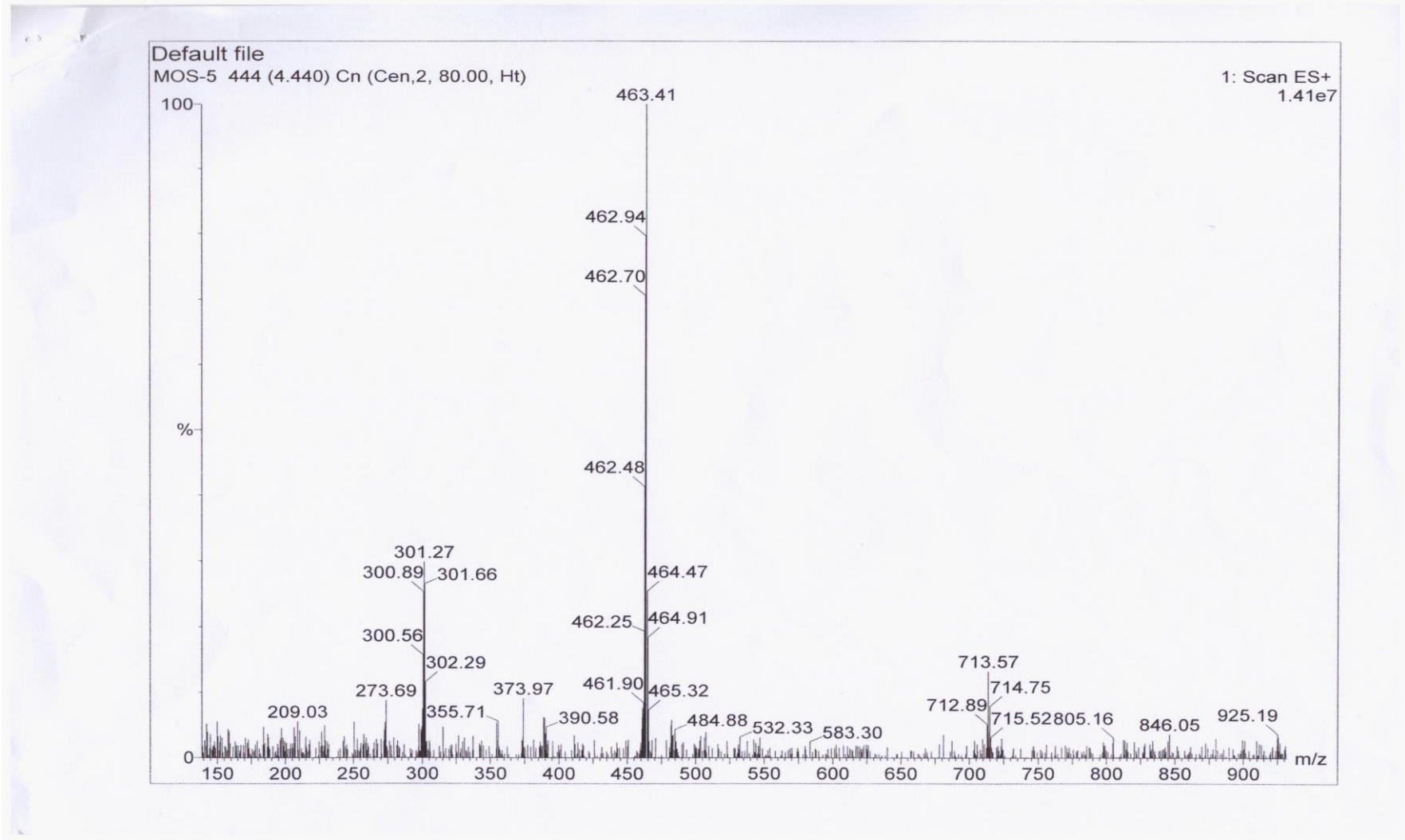
sinyali ile etkileşimi C-7 pozisyonundan bağlanan bir ozu işaret etmektedir. ^{13}C ve ^1H -NMR verilerine bakıldığında ozun glukoz olduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında bileşiğin onogenin-7-O-glukozit olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiler literatür bilgileri ile karşılaştırılmıştır (Kovalev ve ark., 1975). Anomerik protona ait J değerinin 4.4 Hz ve 7.6 Hz olarak bulunması, ^{13}C -NMR spektrumuna bakıldığında 33 karbon atomuna ait sinyalin gözlenmesi ve bu sinyallerden bazılarının çift olduklarının tespit edilmesi molekülde bir izomerizasyonun söz konusu olabileceğini işaret etmektedir. HSQC spektrumunda çift olarak gözlenen karbon atomlarından proton taşıyanların tek protona karşılık geldiği görülmüştür. Bileşiğin ölçülen molekül ağırlığı 477.49 $[\text{M}+\text{H}]^+$ olarak tespit edilmiştir. Bu veriler ve literatür bilgileri (Botta ve ark., 2003; Tsanuo ve ark., 2003; Zhao ve ark., 2007) izoflavonoidlerde asimetric karbon atomu nedeniyle oluşan epimerizasyonun varlığını işaret etmektedir.

3.1.3.5. OS-5 Bileşiminin Yapı Tayini

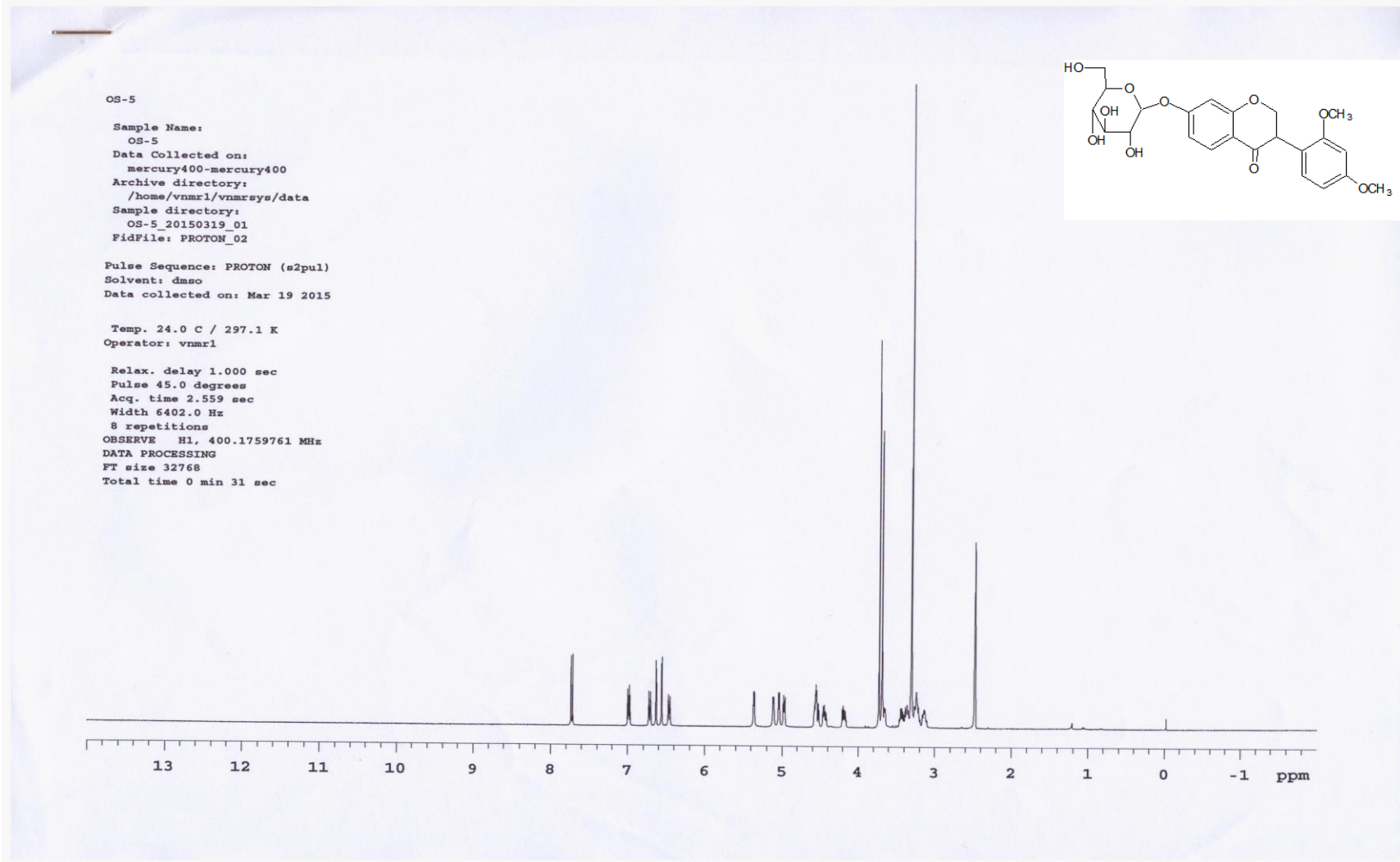
OS-5 bileşiminin izolasyon şeması Şekil 3.51'de verilmiştir.



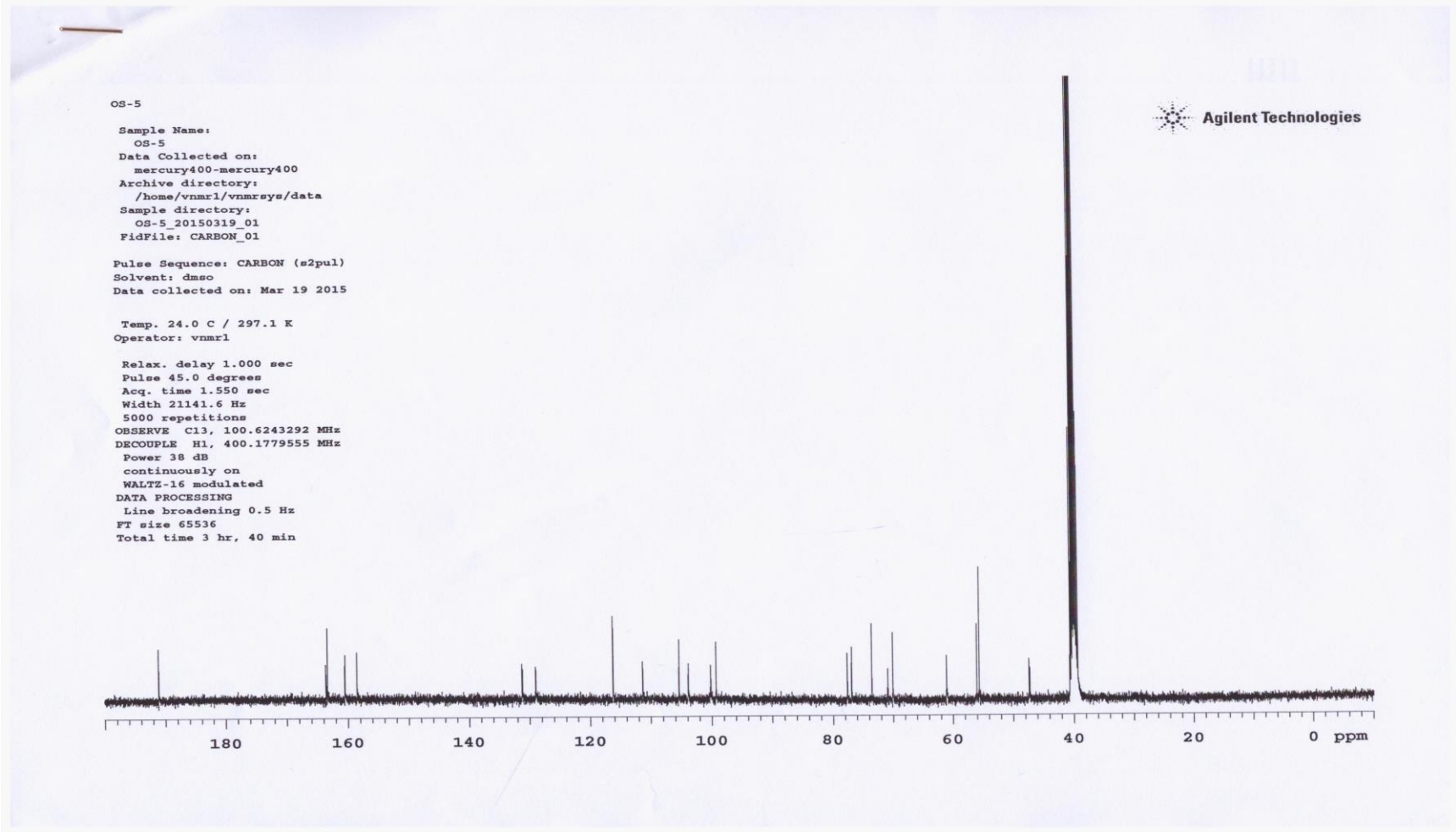
Şekil 3.73. OS-5 bileşiminin izolasyon şeması



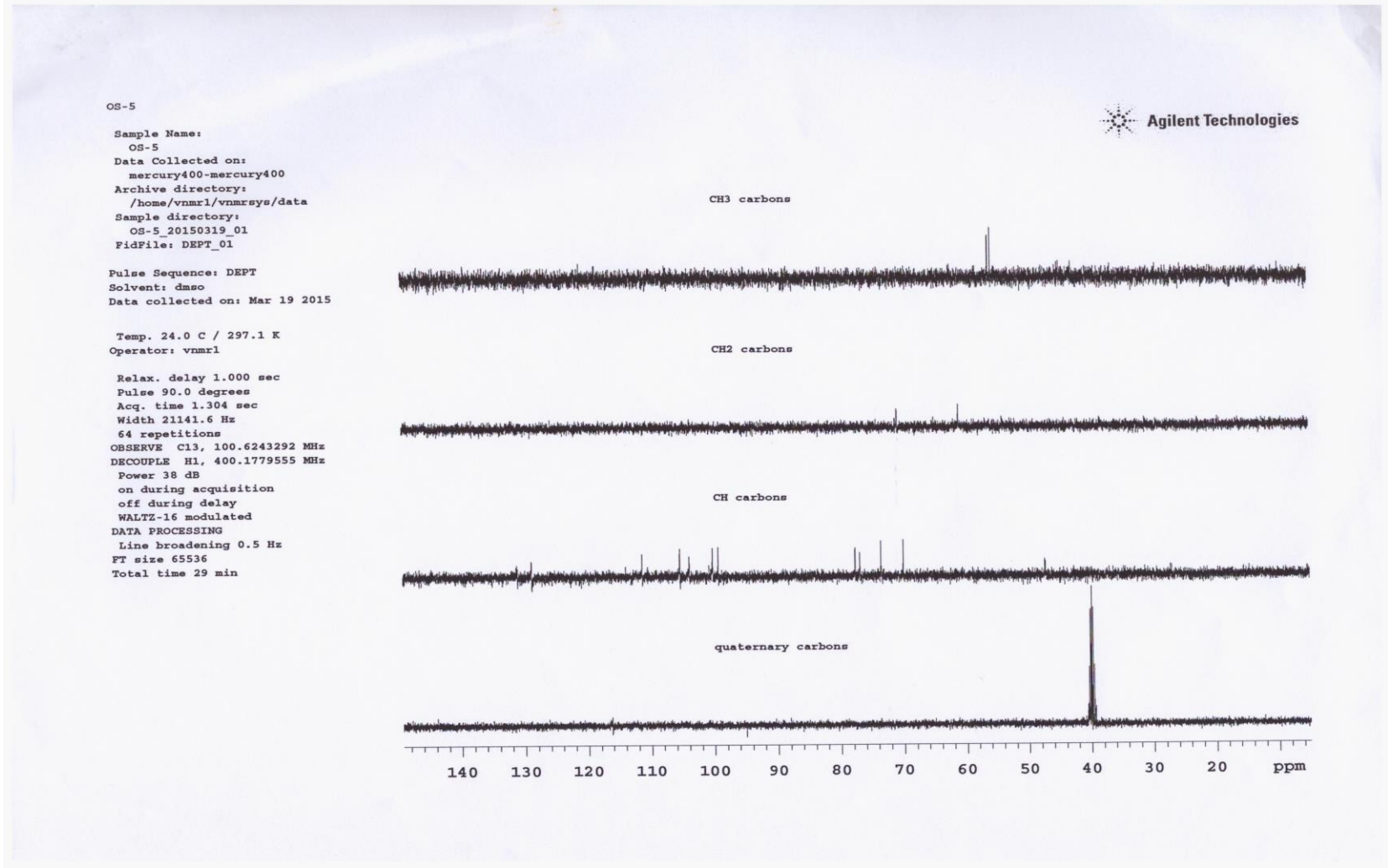
Şekil 3.74. OS-5 bileşiğinin LC-MS spektrumu



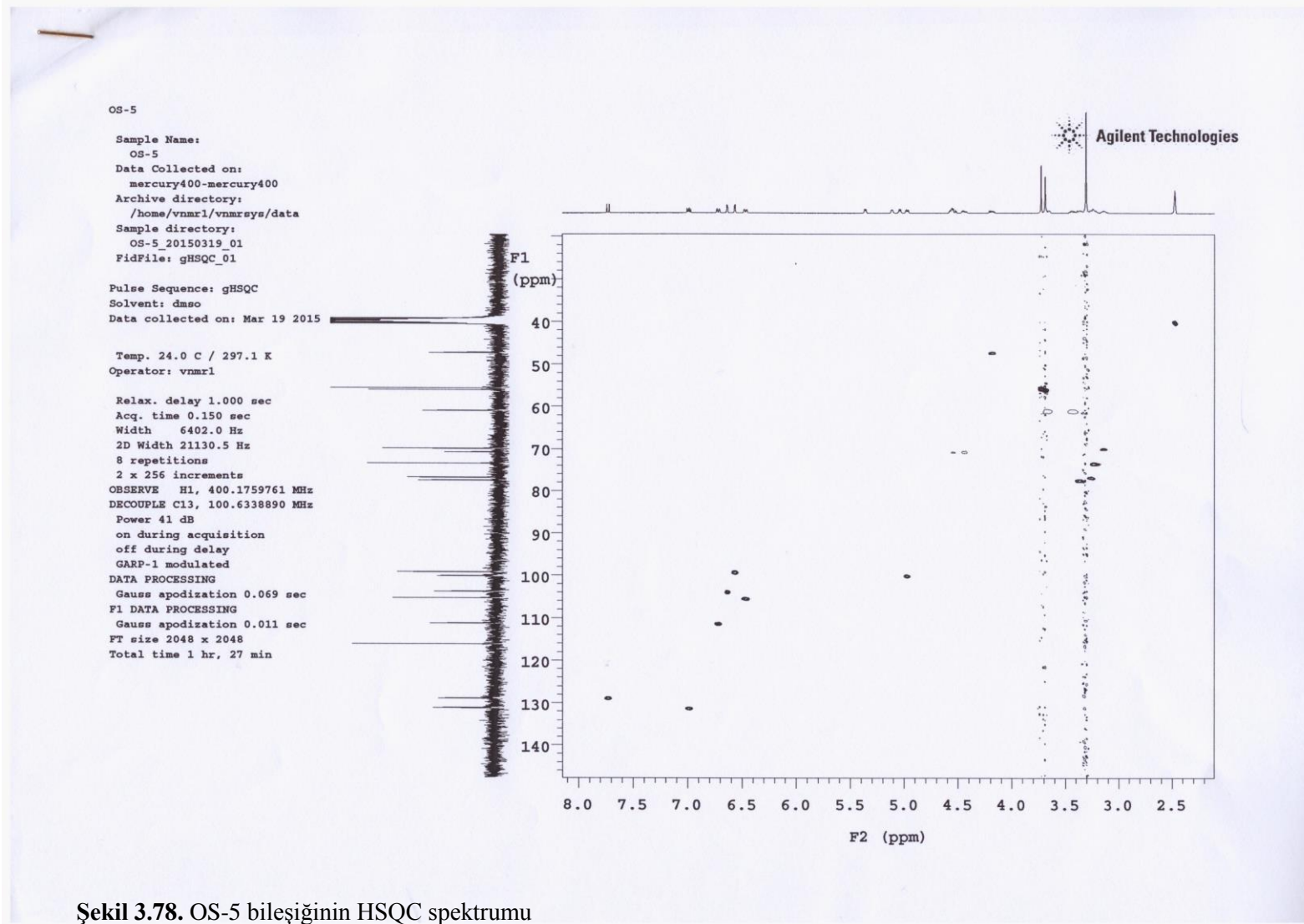
Şekil 3.75. OS-5 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 3.76. OS-5 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 3.77. OS-5 bileşiğinin DEPT spektrumu



Şekil 3.78. OS-5 bileşiminin HSQC spektrumu

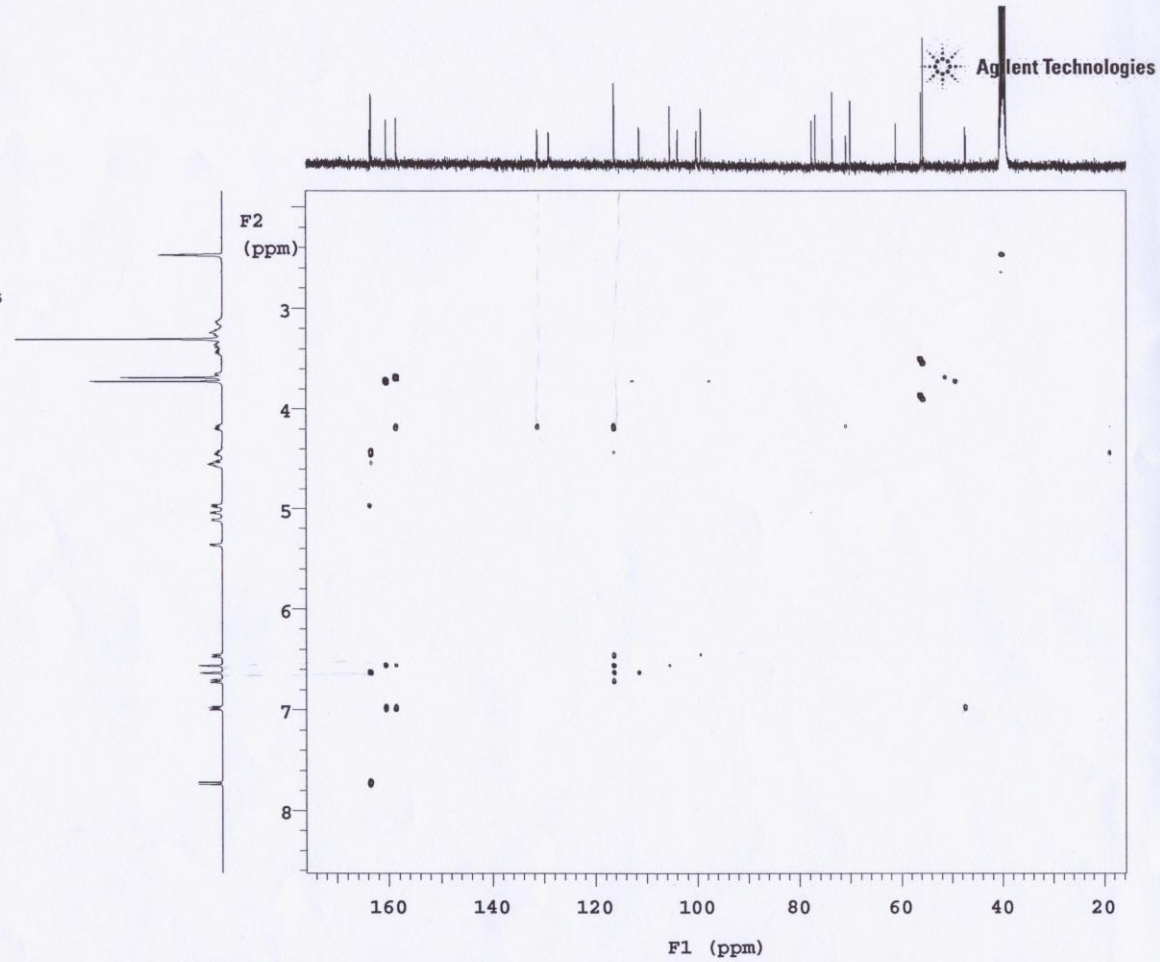
OS-5

Sample Name:
OS-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
OS-5_20150319_01
FidFile: gHMBC_01

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: dmsc
Data collected on: Mar 19 2015

Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6402.0 Hz
2D Width 24147.3 Hz
8 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.010 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 30 min



Şekil 3.79. OS-5 bileşiğinin HMBC spektrumu

OS-5

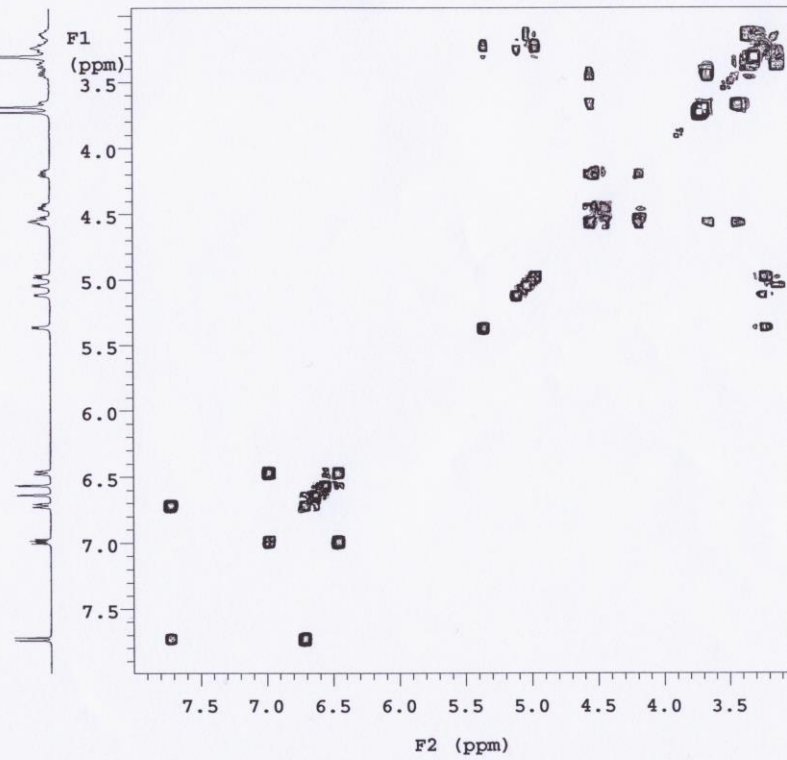
Sample Name:
OS-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
OS-5_20150319_01
FidFile: gCOSY_01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Mar 19 2015

Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 4140.8 Hz
2D Width 4140.8 Hz
4 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.031 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 11 min

Agilent Technologies



Şekil 3.80. OS-5 bileşiğinin COSY spektrumu

OS-5

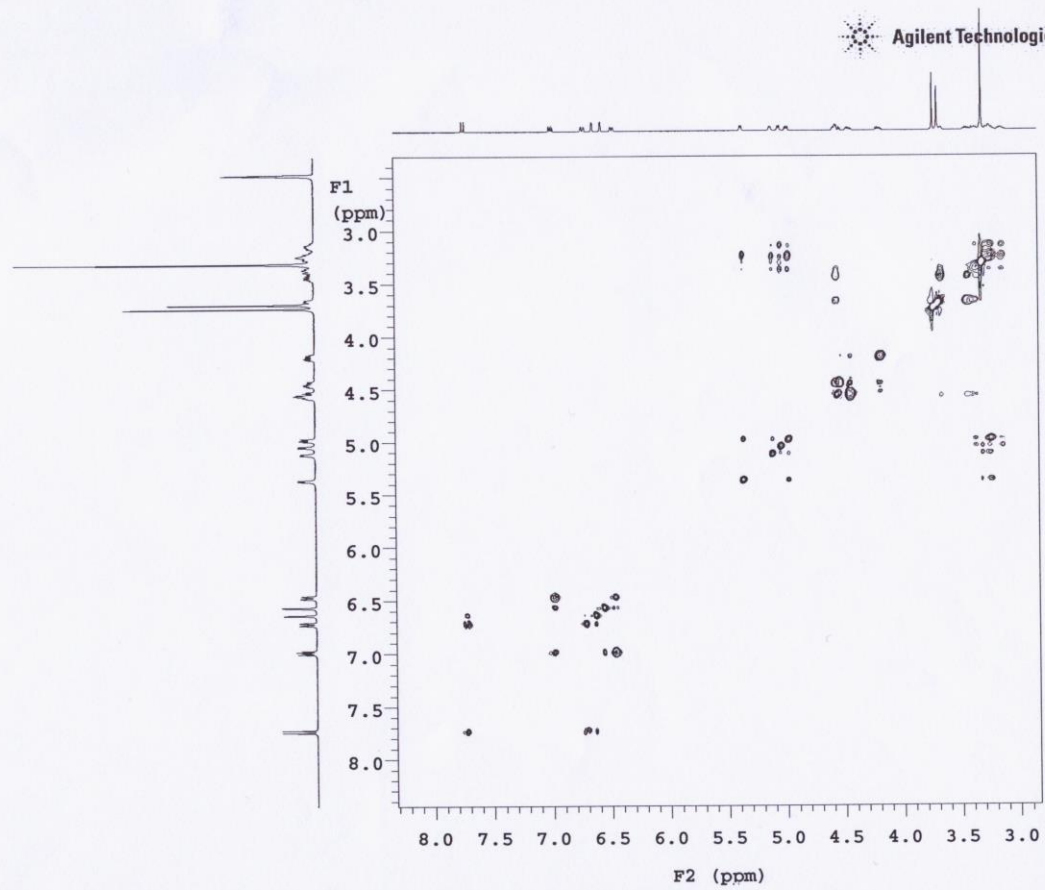
Sample Name:
OS-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrdata
Sample directory:
OS-5_20150319_01
FidFile: TOCSY_01

Pulse Sequence: TOCSY
Solvent: dmsd
Data collected on: Mar 19 2015

Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 4140.8 Hz
2D Width 4140.8 Hz
2 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.045 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 20 min

Agilent Technologies



Şekil 3.81. OS-5 bileşinin TOCSY spektrumu

Molekül Adı	Sativanon-7- <i>O</i> -glukozit
Molekül Ağırlığı	463.41 [M+H] ⁺
Molekül Formülü	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀
Özelliği	Beyaz amorf toz

Şekil 3.82. OS-5 bileşiğinin yapısıyla ilgili bulgular

Çizelge 3.7. OS-5 bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR bulguları

Kimyasal kayma	Proton	C	δ (ppm)
-	-	-	-
4.49 (1H, m)	H-2	C-2	70.85
4.52 (1H, m)	-	-	-
4.18 (1H, m)	H-3	C-3	47.25/47.37
-	-	C-4	191.13
7.72 (1H, d, <i>J</i> =8.4 Hz)	H-5	C-5	128.93/128.97
6.73 (1H, dd, <i>J</i> =2.4 Hz, 8.4 Hz)	H-6	C-6	111.33/111.37
-	H-7	C-7	163.59/163.64
6.63 (1H, d, <i>J</i> =2.4 Hz)	H-8	C-8	103.86/103.91
-	H-9	C-9	163.42
-	-	C-10	116.26
-	-	C-1'	116.26
-	-	C-2'	158.56/158.57
6.56 (1H, d, <i>J</i> =2.8 Hz)	H-3'	C-3'	99.30
-	-	C-4'	160.51
6.46 (1H, dd, <i>J</i> =2.0 Hz, 8.4 Hz)	-	C-5'	105.40
6.98 (1H, d, <i>J</i> =8.4 Hz)	H-6'	C-6'	131.16/131.25
3.69 (3H, s)	-OCH ₃	-OCH ₃ (C-2')	56.07
3.73 (3H, s)	-OCH ₃	-OCH ₃ (C-4')	55.66
4.98 (1H, d, <i>J</i> =7.6 Hz)	H-1''	C-1''	100.18/100.21
3.22 (1H, m)	H-2''	C-2''	73.53
3.24 (1H, m)	H-3''	C-3''	76.87
3.15 (1H, m)	H-4''	C-4''	70.01
3.36 (1H, m)	H-5''	C-5''	77.59/77.61
3.41 (1H, m)	H-6''	C-6''	61.04
3.54 (1H, m)	-	-	-

OS-5 kodlu bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde δ 4.18 (m) (H-3) ppm'de ve 4.52 (m) (H-2) ile 4.49 (m) (H-2) ppm'lerde gözlenen proton sinyallerinin HSQC spektrumunda sırasıyla δ 47.25/47.37 (C-3) ve δ 70.85 (C-2) karbon atomu sinyalleri ile etkileştiği gözlenmiştir. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumuna bakıldığında görülen δ 191.13 ppm'de (C-4) gözlenen karbon atomu sinyali bir karbonil grubunun varlığını işaret etmektedir ki bu veriler izoflavanon halkasının varlığını düşündürmektedir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda aromatik bölgede, δ 7.73 ppm (d, $J= 8.4$ Hz) ile δ 6.73 (dd, $J= 2.4$ Hz; 8.4 Hz) ppm'de gözlenen proton sinyallerinin komşu protonlar oldukları COSY spektrumundan anlaşılmıştır. TOCSY spektrumunda δ 6.63 ppm'de (d, $J= 2.4$ Hz) gözlenen proton sinyalinin de aynı halka sisteminde yer aldığı anlaşılmıştır. δ 6.98 ppm (d, $J= 8.4$ Hz) ile δ 6.46 (dd, $J= 2.0$ Hz; 8.4 Hz) ve δ 6.56 ppm'de (d, $J= 2.8$ Hz) gözlenen proton sinyallerinin de benzer şekilde aynı aromatik halkaya bağlı protonlar oldukları COSY ve TOCSY spektrum verilerinden anlaşılmıştır. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda δ 56.07 ve δ 55.66 ppm'lerde gözlenen karbon atomlarına ait sinyaller ve $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda gözlenen δ 3.69 (3H) ve δ 3.73 (3H) ppm'lerde gözlenen singletler aromatik halkaya bağlı iki metoksil grubunun varlığını ortaya koymaktadır. δ 3.69 ve δ 3.73 ppm'lerde gözlenen singletlerin HMBC spektrumunda sırasıyla δ 158.56/158.57 ve δ 160.51 ppm'de gözlenen karbon atomlarına ait sinyallerle etkileşimi metoksil gruplarının sırasıyla 2' ve 4' konumlarından bağlandığını işaret etmektedir. Bu veriler ışığında ve literatür bilgileri (Zhao ve ark., 2011) ile kıyaslandığında OS-5 kodlu bileşiğin aglikon kısmının sativanon olduğu tespit edilmiştir. Bileşiğin molekül ağırlığı 463.41 $[\text{M}+\text{H}]^+$ olarak ölçülmüştür. Ayrıca kütle spektrumunda gözlenen 301.27 $[\text{M}+\text{H}]^+$ bir heksozun varlığını ve OS-5 kodlu bileşiğin heterozit yapısında bir bileşik olduğunu düşündürmektedir. $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ verileri değerlendirildiğinde uzun glukoz olduğu tespit edilmiştir. HMBC spektrumunda anomerik protona ait δ 4.98 (1H, $J=7.6$ Hz) ppm'de gözlenen dublet ile δ 163.59/163.64 ppm'de gözlenen karbon atomu sinyali arasındaki etkileşim uzun C-7 konumundan β pozisyonda bağlı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu veriler ışığında bileşiğin sativanon-7-O-glukozit olduğu tespit edilmiştir. Literatür bilgileri incelendiğinde sativanon-7-O-glukozit bileşiğinin heterozit formunda daha önce izole edilmediği aglikon olarak izole edildiği tespit edilmiştir.

3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

3.2.1. Yara İyileştirici Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

O. spinosa subsp. *leiosperma* (S), *O. variegata* (Var), *O. viscosa* subsp. *brevifolia* (V) ve *O. natrix* subsp. *natrix* (N) kök (K) ve toprak üstü (H) kısımlarından hazırlanan *n-n*-hekzan (Hex), etil asetat (EtOAc) ve metanol (MeOH) ekstrelerinin yara iyileştirici aktivitesinin araştırılmasına dair bulgular Çizelge 3.8-3.9'da verilmiştir.

O. spinosa subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin (EtOAc-SK) çizgisel insizyon yara modelinde %42,6 oranında yara gerilme kuvveti ile anlamlı derecede etkinlik gösterdiği tespit edildi (Çizelge 3.8).

Dairesel eksizyon yara modelinde, çizgisel insizyon yara modeli ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin (EtOAc-SK) 12. günde yara alanını %60,1 oranında küçülttüğü tespit edildi (Çizelge 3.9).

Hidroksiprolin tayini deneyinde, *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin (EtOAc-SK) sağladığı hidroksiprolin düzeyi 41,3 µg/mg olarak tespit edildi (Çizelge 3.10). Bu sonuç da çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon yara modellerinden elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Çizelge 3.8. *Ononis* türlerinden hazırlanan ekstrelerin çizgisel insizyon yara modelindeki etkileri

Materyal	Yara gerilme kuvveti ± OSH	Yara gerilimindeki % artış
Baz merhem	12.38 ± 1.19	4.4
Negatif kontrol	11.86 ± 1.27	-
Hex-NH	12.99 ± 1.26	4.9
EtOAc-NH	13.37 ± 1.43	7.9
MeOH-NH	9.94 ± 1.16	19.7
Hex-NK	11,85±1,91	-
EtOAc-NK	16.23 ± 1.72	31.1*
MeOH-NK	15.42 ± 1.34	24.6
Hex-SH	11,70±1,28	-
EtOAc-SH	14,11±1,94	13,9
MeOH-SH	14.78 ± 1.31	19.4
Hex-SK	11,41±1,57	-
EtOAc-SK	17.66 ± 0.93	42.6***
MeOH-SK	16.77 ± 1.09	35.5**
Hex-VH	11.35 ± 1.34	-
EtOAc-VH	13.01 ± 1.64	5.1
MeOH-VH	13.20 ± 1.23	6.6
Hex-VK	10,03±1,72	-
EtOAc-VK	13,17±1,40	6,4
MeOH-VK	14.04 ± 1.05	13.4
Hex-VarH	11,20±1,38	-
EtOAc-VarH	11,72±1,63	-
MeOH-VarH	11.84 ± 1.25	-
Hex-VarK	10,11±1,86	-
EtOAc-VarK	13,02±1,53	5,2
MeOH-VarK	12.84 ± 1.22	3.7
Madecassol®	19.68 ± 0.82	58.9***

* : p < 0.05; ** : p < 0.01; *** : p < 0.001; OSH: Ortalama Standart Hata

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

Çizelge 3.9. *Ononis* türlerinden hazırlanan ekstrelerin dairesel eksizyon yara modelindeki etkileri

Materyal	Yara Alanı (mm ²) ± OSH (% Kontraksiyon)							
	Gün	0	2	4	6	8	10	12
Baz merhem		19,39±1,84	17,91±2,15 (1,6)	14,79±2,28 (2,8)	11,22±2,13 (8,9)	7,25±2,40 (8,3)	4,31±1,51 (6,5)	2,73±0,98 (6,8)
Negatif kontrol		20,02±1,61	18,21±2,17	15,20±2,56	12,31±2,08	7,91±1,74	4,61±1,44	2,93±0,79
Hex-NH		19,48±1,73	16,88±2,19 (5,8)	14,41±2,10 (2,6)	10,93±2,07 (2,6)	7,14±1,48 (1,5)	4,08±0,84 (5,3)	2,43±0,54 (10,9)
EtOAc-NH		19,36±1,59	17,21±2,85 (3,9)	14,13±2,07 (6,7)	11,10±1,89 (1,07)	6,99±1,86 (3,6)	3,80±1,29 (11,8)	2,10±0,38 (23,1)
MeOH-NH		19,88±1,91	17,26±2,26 (3,6)	13,85±2,04 (6,4)	10,91±1,26 (2,8)	7,16±1,13 (1,2)	3,87±0,81 (10,2)	2,30±0,67 (15,8)
Hex-NK		20,11±2,03	19,24±2,46 -	16,88±2,70 -	14,12±2,51 -	7,93±2,11 -	4,92±1,85 -	2,85±0,71 -
EtOAc-NK		19,65±1,57	16,32±2,48 (8,9)	12,17±2,31 (17,7)	8,86±1,42 (21,0)	5,06±0,91 (30,2)*	2,16±0,65 (49,9)**	1,79±0,50 (34,4)*
MeOH-NK		19,42±1,34	17,23±2,54 (3,8)	12,87±2,46 (12,9)	8,96±1,39 (20,1)	5,28±0,95 (27,2)	3,07±0,89 (28,8)	2,03±0,74 (25,6)
Hex-SH		19,47±2,02	18,61±2,45 -	15,66±1,97 -	12,41±2,02 -	7,11±2,45 (1,93)	4,58±1,66 -	2,88±0,99 -
EtOAc-SH		19,58±1,99	18,32±2,14 -	13,82±2,24 (6,6)	11,36±1,95 -	7,08±2,07 (2,3)	4,19±1,92 (2,8)	2,61±0,86 (4,4)
MeOH-SH		20,01±2,02	18,05±2,15 -	15,39±2,20 -	10,67±2,07 (4,9)	6,95±1,93 (4,1)	4,17±1,19 (3,2)	2,42±0,92 (11,4)
Hex-SK		19,93±2,11	17,96±2,03 -	16,35±2,16 -	11,29±1,83 -	7,36±2,33 -	4,48±1,59 -	2,79±0,81 -

EtOAc-SK	19,62±1,46	16,02±1,88 (10,6)	13,28±1,75 (10,2)	10,22±1,79 (8,9)	5,10±0,91 (29,7)	2,98±0,83 (30,9)*	1,09±0,21 (60,1)**
MeOH-SK	20,14±2,10	16,29±1,96 (9,0)	14,01±1,85 (5,3)	10,92±1,17 (2,7)	6,33±1,42 (12,7)	3,25±0,93 (24,6)	1,75±0,42 (35,9)*
Hex-VH	19,95±1,79	18,06±1,99 -	15,13±2,19 -	12,26±2,08 -	7,12±1,26 (1,8)	4,27±0,95 (0,9)	2,76±0,99 -
EtOAc-VH	19,81±1,59	17,88±2,03 (0,2)	14,91±1,69 -	13,16±1,45 -	8,14±2,43 -	5,16±1,40 -	3,01±0,86 -
MeOH-VH	19,40±1,22	17,96±2,14 -	15,16±2,11 -	12,07±1,88 -	7,05±0,78 (2,8)	4,86±1,32 -	2,51±0,81 (8,1)
Hex-VK	20,18±3,05	18,82±2,10 -	14,88±2,21 -	12,06±1,96 -	7,36±2,26 -	5,03±1,63 -	2,82±1,03 -
EtOAc-VK	20,31±3,13	17,40±1,96 (2,8)	15,01±2,16 -	11,45±2,08 -	7,48±2,41 -	5,19±1,74 -	2,77±0,88 -
MeOH-VK	19,59±1,54	17,26±1,85 (3,6)	12,91±2,21 (12,7)	9,44±1,60 (15,9)	5,39±0,86 (25,7)	3,20±0,93 (25,8)	1,99±0,96 (27,1)
Hex-VarH	19,48±2,36	17,21±2,08 (3,9)	13,98±2,03 -	11,96±1,97 -	7,04±2,13 -	4,78±1,89 -	2,96±0,92 -
EtOAc-VarH	20,04±2,95	18,12±2,01 -	14,95±2,16 -	11,38±2,16 -	8,01±2033 -	5,95±1,53 -	2,75±0,90 -
MeOH-VarH	19,46±1,27	17,95±2,13 -	15,24±2,22 -	12,06±1,15 -	7,16±1,21 (1,2)	4,45±0,87 -	2,91±0,88 -
Hex-VarK	19,98±2,24	18,03±2,19 -	15,08±2,20 -	11,77±1,67 -	7,80±1,95 -	4,45±0,87 -	2,82±0,79 -
EtOAc-VarK	19,52±2,30	18,10±1,99 -	14,92±2,07 -	11,29±2,10 -	7,93±1,97 -	4,69±1,29 -	2,60±0,91 (4,8)
MeOH-VarK	19,62±1,24	17,97±2,05 -	14,99±2,16 -	11,17±1,23 (0,4)	7,47±0,90 -	4,91±0,96 -	2,69±0,92 (1,5)
Madecassol®	19,70±1,32	16,07±1,91 (10,3)	12,04±1,56 (18,6)	7,01±1,06 (37,5)*	4,08±0,75 (43,7)**	1,25±0,27 (70,9)**	0,00±0,00 (100,00)***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; OSH: Ortalama Standart Hata

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

Çizelge 3.10. *Ononis* türlerinden hazırlanan ekstrelerin hidroksiprolin düzeyi üzerine etkileri

Materyal	Hidroksiprolin ($\mu\text{g}/\text{mg}$) \pm OSH
Baz merhem	9,4 \pm 1,23
Negatif kontrol	8,5 \pm 1,64
Hex-NH	11,8 \pm 1,22
EtOAc-NH	10,5 \pm 1,27
MeOH-NH	10,8 \pm 1,14
Hex-NK	9,1 \pm 1,17
EtOAc-NK	30,3 \pm 0,88*
MeOH-NK	29,5 \pm 1,05
Hex-SH	10,2 \pm 1,51
EtOAc-SH	12,3 \pm 1,32
MeOH-SH	18,7 \pm 1,49
Hex-SK	8,8 \pm 1,54
EtOAc-SK	41,3 \pm 0,51 **
MeOH-SK	32,4 \pm 0,83*
Hex-VH	9,1 \pm 1,95
EtOAc-VH	10,4 \pm 1,76
MeOH-VH	10,1 \pm 1,89
Hex-VK	8,8 \pm 1,46
EtOAc-VK	10,3 \pm 1,61
MeOH-VK	13,6 \pm 1,47
Hex-VarH	9,5 \pm 1,38
EtOAc-VarH	11,5 \pm 1,86
MeOH-VarH	8,3 \pm 1,76
Hex-VarK	10,1 \pm 1,12
EtOAc-VarK	13,4 \pm 1,75
MeOH-VarK	12,1 \pm 1,34
Madecassol [®]	45,3 \pm 0,49***

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

OSH: Ortalama Standart Hata

Aktivite deneylerinin değerlendirilmesinin ardından, sonuçlara göre en yüksek aktiviteyi gösteren EtOAc-SK ekstresi fraksiyonlandı ve elde edilen fraksiyonlar, yara iyileştirici aktivite deneylerinde test edildi. Fraksiyonlara ait yara iyileştirici aktivite bulguları Çizelge 3.11-3.13’de verilmiştir.

Çizgisel insizyon yara modelinde E5 fraksiyonunun yara geriliminde %33,4 artış sağladığı ve en aktif fraksiyon olarak öne çıktığı görüldü (Çizelge 3.11). Benzer sonuç, %51,4 kontraksiyon ile dairesel eksizyon yara modelinde de ortaya çıktı (Çizelge 3.12).

Hidroksiprolin düzeyi tayini sonuçlarına bakıldığında, yine E5 fraksiyonunun sağladığı hidroksiprolin düzeyi 30,9 µg/mg olarak bulundu (Çizelge 3.13).

Fraksiyonların yara iyileştirici aktivitesinin değerlendirildiği üç deney modelinde de birbiri ile paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 3.11. EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının çizgisel insizyon yara modelindeki etkileri

Materyal	Yara gerilme kuvveti ± OSH	Yara gerilimindeki % artış
Baz merhem	14,42 ± 1,38	10,8
Negatif kontrol	13,02 ± 1,49	-
E1	14,59 ± 1,35	1,2
E2	16,68 ± 1,21	15,7
E3	16,09 ± 1,39	11,6
E4	18,43 ± 1,01	27,8
E5	19,24 ± 0,91	33,4*
E6	16,19 ± 1,29	12,3
Madecassol®	22,18 ± 0,75	53,8***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; OSH: Ortalama Standart Hata

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

Çizelge 3.12. EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının dairesel eksizyon yara modelindeki etkileri

Materyal	Yara Alanı (mm ²) ± OSH (% Kontraksiyon)							
	Gün	0	2	4	6	8	10	12
Baz merhem		19,35±1,97	17,22±2,02 (4,5)	15,18±2,04 (7,1)	11,44±2,13 (9,4)	7,57±1,38 (12,7)	4,37±1,10 (10,8)	3,17±0,71 (3,7)
Negatif kontrol		20,12±1,65	18,03±2,05	16,25±2,48	12,51±1,86	8,67±1,42	4,90±1,15	3,29±0,75
E1		21,27±1,99	17,62±2,23 -	15,19±2,17 -	11,99±2,12 -	7,81±1,47 -	4,81±1,20 -	2,77±0,82 (3,5)
E2		21,62±2,09	17,36±2,40 -	15,39±2,02 -	11,78±1,91 -	7,96±1,77 -	4,13±1,04 (5,5)	2,78±0,48 (12,3)
E3		19,91±2,17	17,30±2,28 -	15,41±1,89 -	11,11±1,63 (2,9)	7,27±1,26 (3,9)	3,99±0,61 (8,7)	2,65±0,42 (16,4)
E4		19,71±1,88	17,35±2,21 -	15,35±1,92 -	10,82±1,38 (5,4)	6,32±1,19 (16,5)	3,34±0,79 (23,6)	2,04±0,69 (35,6)*
E5		19,49±1,62	16,81±2,32 (2,4)	14,07±1,98 (7,3)	9,96±1,72 (12,9)	5,89±0,95 (22,2)	2,81±0,62 (35,7)*	1,54±0,28 (51,4)**
E6		19,80±2,20	17,61±2,47 -	15,27±1,79 -	11,76±1,27 -	7,59±0,92 -	3,97±0,78 (9,2)	2,75±0,48 (13,2)
Madecassol®		19,82±1,89	16,15±2,01 (6,2)	11,91±1,69 (21,5)	7,27±1,14 (36,5)*	4,19±0,67 (44,6)**	1,13±0,31 (74,1)**	0,00±0,00 (100,0)***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; OSH: Ortalama Standart Hata

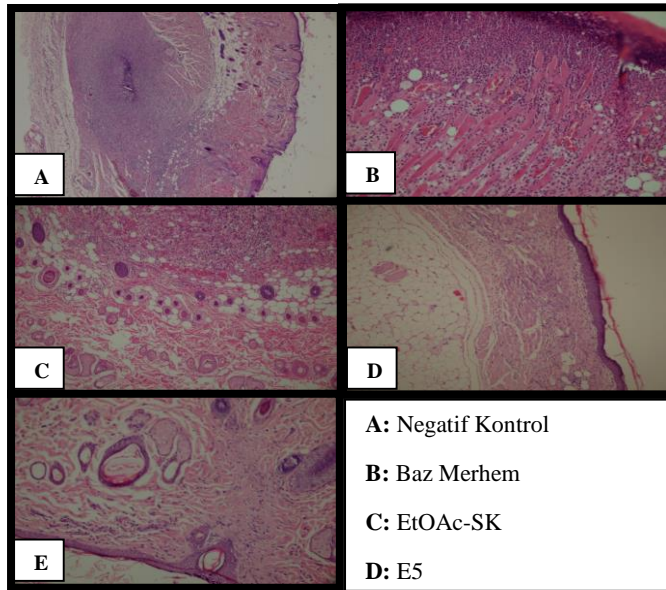
Yüzde kontraksiyon: Baz merhem sonuçları negatif kontrol grubuyla; Fraksiyon ve referans merhem grupları baz merhem grubuyla karşılaştırılarak değerlendirildi

Çizelge 3.13. EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının hidroksprolin düzeyi üzerine etkileri

Materyal	Hidroksiprolin ($\mu\text{g}/\text{mg}$) \pm OSH
Baz merhem	7,2 \pm 1,18
Negatif kontrol	6,3 \pm 1,10
E1	2,1 \pm 0,98
E2	9,6 \pm 1,01
E3	20,4 \pm 1,11
E4	26,1 \pm 1,02
E5	30,9 \pm 0,72*
E6	13,2 \pm 1,13
Madecassol [®]	47,7 \pm 0,57***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001 OSH: Ortalama Standart Hata

Yara iyileştirici aktivitesi görülen ve etkili bileşiklerinin izolasyonu hedeflenen, *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresi (EtOAc-SK) ve bu ekstrenin aktif bulunan fraksiyonu E5 ile tedavi edilen dokular üzerinde gerçekleştirilen histopatolojik incelemelere dair bulgular Şekil 3.83 ve Çizelge 3.14’te verilmiştir. Sonuçlara göre; referans merhem Madecassol[®], EtOAc-SK ekstresi ve E5 fraksiyonu ile tedavi edilen yara dokularında, dermal bütünlüğün büyük ölçüde sağlandığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.83. Test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının hematoxilen-eozin ile boyanması ardından ışık mikroskobu altındaki görünümü

Çizelge 3.14. Test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları

Gruplar	Yara İyileşme Süreci								İyileşme fazları		
	S	U	RE	FP	CD	MN	PM	NV	EF	PF	RF
Baz Merhem	++/+++	++/+++	-	++/+++	+	++	+++	++	++/+++	++	-
Negatif Kontrol	+++	+++	-	++/+++	+	++	+++	++	+++	++	-
EtOAc-SK	++	+	+ / ++	+++	+++	++/+++	+	++	++	++/+++	+ / ++
E5	++	-	++	++/+++	++/+++	++	+ / ++	++	++/+++	++/+++	++
Madecassol®	+	-	+++	++	+++	++	+ / ++	++	+	++	++

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

3.2.2. Antienflamatuvar Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

O. spinosa subsp. *leiosperma* (S), *O. variegata* (Var), *O. viscosa* subsp. *brevifolia* (V) ve *O. natrix* subsp. *natrix* (N) kök (K) ve toprak üstü (H) kısımlarının *n*-hekzan (Hex), etil asetat (EtOAc) ve metanol (MeOH) ekstrelerinin antienflamatuvar aktivitesinin araştırılmasına dair bulgular Çizelge 3.15-3.17’de verilmiştir.

Asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışının inhibisyonuna dayanan Whittle Yöntemi’nde, *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin (EtOAc-SK) ve *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan metanol ekstresinin (MeOH-SK) aktiviteleri dikkat çekici bulunmuştur. MeOH-SK ekstresinin kapiller permeabilite artışı üzerindeki inhibisyon değeri %35,4 bulunurken; EtOAc-SK ekstresinin %40,4 inhibisyon değeri ile en yüksek antienflamatuvar aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 3.15).

Ekstrelerin farelerde karragenin-nedenli arka ayak ödemi üzerindeki etkilerine bakıldığında; *O. natrix* subsp. *natrix* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin (EtOAc-NK) 360. dakikada ölçülen inhibisyon değeri %30,4 bulunmuştur. *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin (EtOAc-SK) 180. dakikada %21,2; 270. dakikada %24,5 ve 360. dakikada %27,2 inhibisyon sağladığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.16).

Ekstrelerin TPA-nedenli kulak ödemi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.17).

Antienflamatuvar aktivite deneylerinde elde edilen sonuçların, yara iyileştirici aktivite sonuçlarıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Deney sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde; biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama işlemine EtOAc-SK ekstresi ile devam etmenin uygun olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.15. *Ononis* türlerinden hazırlanan ekstrelerin asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışını inhibe edici etkisi

Materyal	Doz (mg/kg)	Evans blue konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) \pm OSH	İnhibisyon (%)
Kontrol		12,01 \pm 1,14	
Hex-NH	100	11,86 \pm 0,96	1,2
EtOAc-NH	100	11,39 \pm 0,83	5,2
MeOH-NH	100	11,91 \pm 0,87	0,8
Hex-NK	100	12,93 \pm 1,14	-
EtOAc-NK	100	9,42 \pm 0,76	21,6
MeOH-NK	100	9,16 \pm 0,69	23,7
Hex-SH	100	13,74 \pm 1,08	-
EtOAc-SH	100	12,78 \pm 1,17	-
MeOH-SH	100	10,02 \pm 0,86	16,6
Hex-SK	100	13,11 \pm 1,19	-
EtOAc-SK	100	7,16 \pm 0,75	40,4**
MeOH-SK	100	7,76 \pm 0,68	35,4*
Hex-VH	100	12,26 \pm 1,21	-
EtOAc-VH	100	11,98 \pm 1,16	0,2
MeOH-VH	100	12,30 \pm 1,08	-
Hex-VK	100	13,26 \pm 1,50	-
EtOAc-VK	100	12,89 \pm 1,26	-
MeOH-VK	100	10,36 \pm 1,03	13,8
Hex-VarH	100	14,18 \pm 1,85	-
EtOAc-VarH	100	12,66 \pm 1,36	-
MeOH-VarH	100	13,10 \pm 1,26	-
Hex-VarK	100	14,08 \pm 1,92	-
EtOAc-VarK	100	13,15 \pm 1,33	-
MeOH-VarK	100	12,05 \pm 1,11	-
Indomethacin	10	5,78 \pm 0,24	51,9***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; OSH: Ortalama Standart Hata

Çizelge 3.16. *Ononis* türlerinden hazırlanan ekstrelerin farelerde karragenin-nedenli arka ayak ödemi üzerine etkileri

Materyal	Doz (mg/kg)	Şişme kalınlığı (x 10 ⁻² mm)±OSH (% İnhibisyon)			
		90 dk	180 dk	270 dk	360 dk
Kontrol		47,3 ±2,7	50,1±3,3	53,9±3,1	60,2±3,4
Hex-NH	100	47,6±3,5 -	51,5±2,5 -	52,6±3,3 (2,4)	59,3±2,7 (1,5)
EtOAc-NH	100	48,5±3,1 -	51,5±4,2 -	54,2±3,8 -	62,6±4,7 -
MeOH-NH	100	47,0±3,1 (0,6)	42,7±3,3 (14,8)	49,3±3,2 (8,5)	56,8±3,8 (5,6)
Hex-NK	100	45,4±3,6 (4,0)	52,5±3,5 -	49,7±2,8 (7,8)	59,2±3,1 (1,7)
EtOAc-NK	100	45,1±2,9 (4,7)	41,6±3,6 (16,9)	38,4±3,0 (28,8)	41,9±3,1 (30,4)*
MeOH-NK	100	46,8±3,0 (1,1)	44,8±3,0 (10,6)	42,9±2,3 (20,4)	49,7±3,6 (17,4)
Hex-SH	100	49,5±3,1 -	52,4±3,5 -	54,8±3,7 -	61,5±3,9 -
EtOAc-SH	100	44,3±2,5 (6,3)	49,3±3,3 (1,6)	54,1±3,9 -	57,8±3,2 (3,9)
MeOH-SH	100	44,9±2,7 (5,1)	46,0±3,5 (8,2)	53,0±3,4 (1,7)	62,8±3,9 (4,1)
Hex-SK	100	46,9±3,2 (0,8)	50,3±4,8 -	55,6±3,7 -	59,8±4,1 (0,6)
EtOAc-SK	100	45,1±3,2 (4,7)	39,5±2,4 (21,2)*	40,7±3,0 (24,5)*	43,8±3,1 (27,2)*
MeOH-SK	100	45,7±3,0 (3,4)	41,2±3,1 (17,8)	47,3±3,3 (12,2)	56,7±3,5 (5,8)
Hex-VH	100	47,4±2,8 -	45,9±3,3 (8,3)	50,6±3,6 (6,1)	59,5±3,8 (1,2)
EtOAc-VH	100	48,1±2,9 -	51,3±4,4 -	55,7±4,4 -	62,2±4,3 -
MeOH-VH	100	46,2±3,3 (2,3)	52,5±3,6 -	54,7±3,9 -	62,7±4,5 -
Hex-VK	100	50,1±4,6 -	51,8±3,4 -	55,2±3,8 -	61,8±3,9 -
EtOAc-VK	100	49,5±4,1 -	50,7±3,2 -	55,7±3,4 -	57,4±3,8 (4,7)
MeOH-VK	100	47,5±3,9 -	51,2±3,9 -	54,9±3,6 -	56,6±4,1 (5,9)

Hex-VarH	100	49,3±3,8 -	52,1±2,9 -	57,2±3,1 -	60,5±4,4 -
EtOAc-VarH	100	50,1±3,9 -	51,5±3,8 -	55,0±3,3 -	60,3±4,0 -
MeOH-VarH	100	48,2±3,4 -	51,7±3,7 -	56,6±3,9 -	61,2±3,7 -
Hex-VarK	100	48,8±3,6 -	53,6±3,6 -	56,1±3,8 -	61,4±4,3 -
EtOAc-VarK	100	49,0±2,8 -	49,5±3,8 (1,2)	49,5±3,4 (8,2)	57,6±3,7 (4,3)
MeOH-VarK	100	49,8±3,9 -	50,5±2,9 -	54,2±3,7 -	64,1±3,9 -
İndometazin	10	30,2±2,4 (36,2)**	30,5±2,1 (39,1)***	37,6±2,1 (30,2)**	36,8±1,9 (38,9)***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; OSH: Ortalama Standart Hata

Çizelge 3.17. *Ononis* türlerinden hazırlanan ekstrelerin farelerde TPA-nedenli kulak ödemi üzerine etkileri

Materyal	Doz (mg/kulak)	Şişme kalınlığı (µm) ± OSH	% İnhibisyon	Ödem ağırlığı (mg) ± OSH	% İnhibisyon
Kontrol		370,4 ± 22,8		28,4 ± 3,1	
Hex-NH	0,5	345,7 ± 20,6	6,7	27,8 ± 3,4	2,1
EtOAc-NH	0,5	339,2 ± 25,6	8,4	26,5 ± 3,8	6,7
MeOH-NH	0,5	347,8 ± 22,9	6,1	26,8 ± 2,6	5,6
Hex-NK	0,5	386,4 ± 31,2	-	29,2 ± 3,6	-
EtOAc-NK	0,5	331,7 ± 26,6	10,4	24,7 ± 2,9	13,0
MeOH-NK	0,5	322,3 ± 21,8	12,9	23,5 ± 3,3	17,3
Hex-SH	0,5	375,6 ± 30,4	-	31,2 ± 3,0	-
EtOAc-SH	0,5	379,1 ± 31,5	-	30,7 ± 3,2	-
MeOH-SH	0,5	372,4 ± 23,6	-	29,9 ± 2,6	-
Hex-SK	0,5	384,6 ± 25,9	-	30,1 ± 3,8	-
EtOAc-SK	0,5	328,5 ± 23,7	11,3	22,4 ± 2,9	21,1

MeOH-SK	0,5	330,4± 24,5	10,8	23,6 ± 2,2	16,9
Hex-VH	0,5	371,8± 29,6	-	27,9± 3,2	1,8
EtOAc-VH	0,5	388,9 ± 26,9	-	29,6 ± 3,1	-
MeOH-VH	0,5	372,7 ± 29,4	-	30,3 ± 3,4	-
Hex-VK	0,5	377,4 ±29,6	-	31,4 ± 3,6	-
EtOAc-VK	0,5	374,8± 27,9	-	29,0 ± 3,2	-
MeOH-VK	0,5	389,3± 26,7	-	33,7 ± 3,8	-
Hex-VarH	0,5	362,4 ± 28,0	2,2	25,6 ± 3,1	9,9
EtOAc-VarH	0,5	368,9 ±29,3	0,4	27,1 ± 3,6	4,6
MeOH-VarH	0,5	379,1± 25,2	-	28,5 ± 3,5	-
Hex-VarK	0,5	366,5 ± 28,9	1,1	31,7 ± 3,3	-
EtOAc-VarK	0,5	352,7 ±27,7	4,8	29,8 ± 2,9	-
MeOH-VarK	0,5	348,4± 25,3	5,9	28,1 ± 3,6	1,1
İndometazin	0,5	137,1 ± 17,2	62,9***	12,4 ± 2,4	56,3***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; OSH: Ortalama Standart Hata

O. spinosa subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin (EtOAc-SK) fraksiyonlanmasıyla elde edilen E5 fraksiyonunun antienflematuvar aktivitesinin araştırılmasına dair bulgular Çizelge 3.18-3.21’de verilmiştir.

EtOAc-SK ekstresinden elde edilen fraksiyonların asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışında sağladıkları inhibisyonun değerlendirildiği Whittle Yöntemi sonuçlarına göre; E4 fraksiyonu %30,2; E5 fraksiyonu ise %40,3 inhibisyon sağlamıştır. Bu deney modelinde de yara iyileştirici aktivite ile benzer şekilde E5 fraksiyonunun en yüksek inhibisyonu yaptığı görülmüştür. (Çizelge 3.18).

Fraksiyonların farelerde karragenin-nedenli arka ayak ödemi üzerindeki etkilerine bakıldığında, E5 fraksiyonunun, 270. dakikada %28,1 ve 360. dakikada %32,2 inhibisyon sağladığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.19).

Fraksiyonların TPA-nedenli kulak ödemi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.20).

Fraksiyonların antienflamatuvar aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, sonuçların yara iyileştirici aktivite sonuçları ile paralellik gösterdiği ve her iki aktivitenin sonuçlarına göre de E5 fraksiyonunun en yüksek aktivite gösterdiği, dolayısıyla saflaştırma işlemine bu fraksiyon ile devam etmenin uygun olduğu görülmüştür.

Akut enflamasyon üzerine etkinin tayin edildiği deney modellerinin sonuçları değerlendirildikten sonra, aktif bulunan ekstre ve fraksiyonların kronik enflamasyon üzerine etkinliği FCA-nedenli artrit modeli ile araştırılmıştır. Deney sonucunda, bu modelde çalışılan ekstre ve fraksiyonların belirgin aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 3.21).

Çizelge 3.18. EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışını inhibe edici etkisi

Materyal	Doz (mg/kg)	Evans blue konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) \pm OSH	İnhibisyon (%)
Kontrol		14,48 \pm 2,21	
E1	100	14,61 \pm 2,15	-
E2	100	14,07 \pm 1,91	2,8
E3	100	12,64 \pm 1,75	12,7
E4	100	10,11 \pm 1,61	30,2*
E5	100	8,64 \pm 1,13	40,3**
E6	100	15,32 \pm 1,89	-
Indomethasin	10	7,34 \pm 1,02	49,3***

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; OSH: Ortalama Standart Hata

Çizelge 3.19. EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının farelerde karragenin-nedenli arka ayak ödemi üzerine etkileri

Materyal	Doz (mg/kg)	Şişme kalınlığı (x 10 ⁻² mm)±OSH (% İnhibisyon)			
		90 dk	180 dk	270 dk	360 dk
Kontrol		46,1 ±3,9	48,2±3,3	50,5±3,8	57,4±3,5
E1	100	48,5±3,2 -	50,6±3,8 -	52,4±4,1 -	58,0±4,2 -
E2	100	49,8±3,3 -	45,8±3,6 (4,9)	46,3±3,7 (8,3)	59,5±3,9 -
E3	100	42,6±3,1 (7,5)	49,5±3,2 -	48,7±3,8 (3,6)	59,1±4,2 -
E4	100	45,2±2,8 (1,9)	43,5±2,9 (9,8)	40,7±3,1 (19,4)	43,6±3,5 (24,0)
E5	100	40,8±2,6 (11,5)	39,4,5±3,1 (18,3)	36,3±2,9 (28,1)*	38,9±2,8 (32,2)*
E6	100	47,7±3,7 -	49,9±3,7 -	52,7±4,1 -	59,6±4,4 -
İndometazin	10	33,6±2,7 (27,1)*	32,2±2,5 (33,2)**	36,3±3,0 (28,1)*	35,6±2,1 (37,9)***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; OSH: Ortalama Standart Hata

Çizelge 3.20. EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının farelerde TPA-nedenli kulak ödemi üzerine etkileri

Materyal	Doz (mg/kulak)	Şişme kalınlığı (µm) ± OSH	% İnhibisyon	Ödem ağırlığı (mg) ± OSH	% İnhibisyon
Kontrol		365,1 ± 26,8		31,6 ± 3,9	
E1	0,5	366,8 ± 27,9	-	32,8 ± 3,4	-
E2	0,5	372,1 ± 26,7	-	35,5 ± 3,7	-
E3	0,5	378,2 ± 29,2	-	29,3 ± 3,8	7,3
E4	0,5	311,6 ± 21,4	14,7	25,6 ± 2,8	18,9
E5	0,5	302,8 ± 22,6	17,1	24,5 ± 3,7	22,5
E6	0,5	367,5 ± 24,8	-	32,3 ± 3,1	-
İndometazin	0,5	183,7 ± 18,1	49,7***	9,6 ± 2,0	69,6***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; OSH: Ortalama Standart Hata

Çizelge 3.21. *Ononis* türlerinden hazırlanan ekstre ve fraksiyonların FCA-nedenli artrit modelindeki etkileri

Gün	Materyal; Şişme kalınlığı± OSH (İnhibisyon %)				
	Kontrol	EtOAc-NK (100 mg/kg)	EtOAc-SK (100 mg/kg)	E5 (100 mg/kg)	İndometazin (10 mg/kg)
3	311,1 ± 21,04	314,5 ± 29,6 -	319,2 ± 20,6 -	318,4 ± 21,3 -	204,3 ± 16,5 (34,3)**
4	361,9 ± 30,4	387,1 ± 20,3 -	328,1 ± 18,4 (9,3)	363,0 ± 19,6 -	231,4 ± 10,3 (36,1)***
5	324,6 ± 22,8	324,9 ± 19,8 -	304,8 ± 18,7 (6,1)	326,9 ± 18,8 -	222,4 ± 14,4 (31,5)**
6	311,6 ± 21,3	309,8 ± 19,0 (0,6)	290,6 ± 16,4 (6,7)	315,8 ± 23,2 -	207,4 ± 9,2 (33,4)***
7	281,5 ± 21,7	280,7 ± 19,8 (0,3)	275,4 ± 20,8 (2,2)	304,7 ± 18,3 -	191,6 ± 15,6 (31,9)***
8	258,4 ± 20,6	251,6 ± 18,5 (2,6)	249,3 ± 19,4 (3,5)	291,6 ± 20,7 -	188,7 ± 16,3 (26,9)**
9	250,8 ± 19,9	244,3 ± 17,6 (2,6)	237,5 ± 19,9 (5,3)	263,8 ± 18,2 -	172,4 ± 15,4 (31,3)***
10	224,7 ± 18,9	231,9 ± 19,1 -	230,5 ± 19,7 -	236,5 ± 18,6 -	170,6 ± 16,1 (24,1)
11	200,1 ± 15,8	207,3 ± 20,7 -	225,4 ± 19,3 -	245,6 ± 19,0 -	169,2 ± 16,6 (15,4)
12	227,4 ± 17,1	232,7 ± 18,8 -	231,4 ± 22,8 -	251,6 ± 18,2 -	181,5 ± 16,4 (20,2)
13	237,6 ± 14,9	248,6 ± 19,2 -	244,1 ± 25,2 -	267,6 ± 23,4 -	185,6 ± 14,7 (21,9)
14	249,7 ± 19,0	251,0 ± 20,8 -	247,0 ± 21,6 (1,1)	275,4 ± 20,3 -	199,1 ± 15,3 (20,3)
21	306,1 ± 21,8	257,1 ± 19,6 (16,0)	255,4 ± 20,5 (16,6)	295,5 ± 18,9 (3,5)	202,6 ± 17,3 (33,8)***

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

3.2.3. Antioksidan Aktivite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

O. spinosa subsp. *leiosperma* (S), *O. variegata* (Var), *O. viscosa* subsp. *brevifolia* (V) ve *O. natrix* subsp. *natrix* (N) kök (K) ve toprak üstü (H) kısımlarının *n*-hekzan (Hex), etil asetat (EtOAc) ve metanol (MeOH) ekstrlerinin ve *in vivo* çalışmalarda yüksek aktivite gösteren *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin (EtOAc-SK) fraksiyonlarının antioksidan aktivitelerinin araştırılmasına dair bulgular Çizelge 3.22’de verilmiştir. Deney sonuçları değerlendirildiğinde, ekstre ve fraksiyonların antioksidan aktiviteleri çok dikkat çekici olmamakla birlikte, yara iyileştirici aktivite test sonuçlarıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.22. *Ononis* türlerinden hazırlanan ekstrelerin ve EtOAc-SK ekstresinin fraksiyonlarının antioksidan etkileri

Materyal	DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	ABTS IC ₅₀ (µg/ml)	İndirgenme gücündeki artış (%)	OH-radikal inhibisyonu IC ₅₀ (µg/ml)
Hex-NH	222,31	256,29	26,33	205,42
EtOAc-NH	81,24	96,23	31,47	88,60
MeOH-NH	62,76	69,81	39,94	78,16
Hex-NK	186,91	221,13	17,38	195,67
EtOAc-NK	55,41	63,44	31,84	61,19
MeOH-NK	93,47	99,16	19,81	91,75
Hex-SH	205,77	221,17	15,32	196,56
EtOAc-SH	138,48	121,14	20,91	131,92
MeOH-SH	117,29	127,25	19,57	110,31
Hex-SK	243,36	233,32	13,29	240,47
EtOAc-SK	42,17	41,65	39,13	45,55
MeOH-SK	58,78	63,51	30,88	51,19
Hex-VH	324,05	308,89	12,60	319,95
EtOAc-VH	121,15	138,91	22,74	167,87
MeOH-VH	128,46	145,02	21,08	130,51
Hex-VK	145,71	157,66	18,35	137,32
EtOAc-VK	101,14	109,47	17,32	95,54

MeOH-VK	94,90	99,38	28,56	96,27
Hex-VarH	308,83	348,41	16,81	284,64
EtOAc-VarH	116,49	107,18	19,20	107,66
MeOH-VarH	103,16	157,83	25,37	100,35
Hex-VarK	245,51	249,57	17,85	226,40
EtOAc-VarK	133,18	148,88	20,96	138,88
MeOH-VarK	95,32	99,71	22,05	103,12
E1	98,61	102,30	21,51	91,93
E2	113,26	131,40	17,34	133,34
E3	81,36	95,44	18,19	96,99
E4	87,75	92,71	16,48	89,01
E5	48,17	62,82	31,08	44,36
E6	104,28	116,29	15,49	115,61
Askorbik asit	4,21	8,62	67,81	5,57

3.2.4. İzole Edilen Bileşiklerin Enzim İnhibisyonu Deneylerine İlişkin Bulgular

O. spinosa subsp. *leiosperma* köklerinden hazırlanmış olan etil asetat ekstresinin (EtOAc-SK) fraksiyonlanmasıyla elde edilen ve aktivitesi yüksek bulunan E5 fraksiyonundan saflaştırma ve izolasyon çalışmaları sonrasında izole edilen beş bileşiğin yapılarının tayininden sonra, hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmıştır. İzole edilen bileşiklerin enzim inhibisyonu üzerindeki etkileri Çizelge 3.23'te gösterilmiştir.

İzole edilen bileşiklerin enzim inhibisyonu üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde ononin bileşiğinin, hyaluronidaz enzimini %31,66; elastaz enzimini %41,75; sativanon-7-*O*-glukozitin hyaluronidaz enzimini %45,58 ve elastaz enzimini %46,88 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.

Çizelge 3.23. İzole edilen bileşiklerin hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz inhibisyonu bulguları

Materyal	Konsantrasyon (µg/ml)	% Hyaluronidaz Inhibisyonu ± OSH	% Kolajenaz Inhibisyonu ± OSH	% Elastaz Inhibisyonu ± OSH
Trifolirhizin	50	21,66 ± 1,87	25,08 ± 1,99	16,44 ± 1,27
	100	28,45 ± 1,96	27,84 ± 0,72	21,53 ± 1,66
Ononin	50	21,38 ± 2,01	17,64 ± 1,39	25,44 ± 1,29
	100	31,66 ± 0,93*	20,41 ± 1,69	41,75 ± 1,03*
Medikarpin-3-O-glukozit	50	19,36 ± 1,75	15,44 ± 1,39	16,74 ± 1,85
	100	22,08 ± 1,81	23,06 ± 1,50	22,74 ± 1,40
Onogenin-7-O-glukozit	50	18,96 ± 1,47	15,88 ± 1,67	16,88 ± 1,97
	100	25,87 ± 2,37	22,81 ± 1,70	20,47 ± 1,56
Sativanon-7-O-glukozit	50	26,28 ± 1,61	24,67 ± 1,92	21,62 ± 1,45
	100	45,58 ± 0,78**	28,49 ± 1,33	46,88 ± 1,04*
Tannik asit	100	88,32 ± 0,83***	-	-
Epigallokateşin gallat	100	-	41,18 ± 1,24**	84,63 ± 1,97***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001 OSH: Ortalama Standart Hata

4. TARTIŞMA

Bitkisel droglar ve preparatlar, çok eski devirlerden beri tıbbi amaçlarla kullanılmakla birlikte; etkili bileşikleri ve etki mekanizmaları hakkındaki araştırmalar ancak 14. yüzyılın ortalarında başlamıştır. Türkiye’de de özellikle 1970’li yıllardan itibaren bitkiler üzerinde kimyasal araştırmalar hız kazanmış, takip eden yıllarda da etkili bileşiklerin yapılarının aydınlatılması düzeyine erişilmiştir (Baytop, 1999).

Geçmişte geleneksel kullanımı olan bitkilerden elde edilen pek çok bileşik bugün ilaç etken maddesi olarak modern tıpta yerini almıştır. Terapötik değere sahip çeşitli bileşikleri yapılarında barındıran tıbbi bitkilerin, halk arasında, sistemik veya lokal etkileri nedeniyle, dahilen veya haricen yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Al-Bakri ve Afifi, 2007).

Ülkemiz, topografik yapısı ve farklı iklimlerin yaşanması sebebiyle, topraklarında yetişen bitki çeşitliliği bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir (Babalık ve Fakir, 2010). Yapılan etnobotanik çalışmalar özellikle kırsal kesimde yaşayan insanların beslenme, tedavi veya korunma amacıyla bitkilerden faydalandığını ve bitkilerin geleneksel kullanımına dair bilgileri nesilden nesile aktardığını göstermektedir. Son yıllarda bitkisel ürünlerin piyasada önemli yer edinmiş olması, bilimsel olarak oldukça değerli olan bu bilgileri, ekonomik açıdan da önemli hale getirmektedir.

İlaç etken maddesi keşfinde, halk arasında ilaç olarak kullanılan bitkilerden yola çıkarak yapılan bilimsel çalışmalar doğru materyal seçiminde zaman kazanılmasını ve halk arasındaki kullanımın bilimsel temellere oturtulmasını sağlamaktadır.

Günümüzde yaygın olarak yapılan cerrahi girişimler sonrasında yaranın iyileşme süreci komplikasyonların önlenmesi bakımından oldukça önemlidir (Özler ve ark., 2007). Yara iyileşmesi; travmalar, cerrahi girişimler ve benzer sebeplerle bozulan doku bütünlüğünün korunması için ortaya çıkan iyi organize olmuş bir tamir sürecidir.

Çeşitli faktörlerin etkisiyle bu organizasyonda meydana gelen aksaklıklar, iyileşme sürecini uzatır veya kronik hale getirir. İyileşmeyen yaralar hem hasta hem de doktor açısından önemli bir sorun oluşturur. İyileşmenin bozulduğu yaralar her yıl binlerce insanı etkilemekte ve yüklü sağlık harcamalarına sebep olmaktadır (Özler ve ark. 2009).

Tez konusu olarak seçtiğimiz *Ononis* cinsi ülkemizde halk arasında diüretik, antiseptik, antimikrobiyal ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır (Erdemgil ve ark., 2002; Şöhretoğlu, 2011). Halk arasında kullanımlarına bakılarak ve üzerinde yetersiz çalışma bulunması göz önüne alınarak seçilen dört *Ononis* türünün yara iyileştirici aktivitesinin ve bu aktiviteden sorumlu bileşiklerin araştırılması bu tez çalışmasının temel amacını oluşturmaktadır. Bu çalışmada, seçilen türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan farklı polaritedeki ekstraktlardan hareketle biyoaktiviteyle yönlendirilmiş fraksiyonlama tekniği kullanılarak etkili bileşiklerin izolasyonu hedeflenmiş ve bu amaç doğrultusunda, önce ekstraktların, sonra da yüksek aktivite gösteren fraksiyonların yara iyileştirici aktiviteleri yanında, yara iyileşme mekanizmasında önemli bir basamağı oluşturan enflamasyonun önlenmesi üzerine etkileri de araştırılmıştır.

Bu çalışma kapsamında yapılan biyoaktivite çalışmalarında; yara iyileşmesinin önemli göstergelerinden biri olan yara yüzey alanı değişimleri ve yara gerilme kuvveti değerlendirilmiştir. Ekstre ve fraksiyonların yara iyileştirici aktivitesinin değerlendirilmesinde, sıçanlarda test numunelerinin kolajen oluşumu ve sağlamlığı üzerine etkilerinin incelendiği çizgisel insizyon yara modeli ile; farelerde yara alanlarındaki küçülmenin takibi yoluyla test numunelerinin yara kontraksiyonu ve epitel oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı dairesel eksizyon deney modelleri kullanılmıştır (Lodhi ve ark., 2006). Ayrıca ekstre ve fraksiyonların; yara iyileşmesinde önemli bir protein olan kolajenin yapısındaki temel aminoasitlerden olan ve kolajen sentezinde bir değerlendirme kriteri sayılan hidroksiprolinin yara bölgesindeki miktarına etkisi bakımından da yara iyileştirici aktivitenin değerlendirilmesi yapılmıştır (Rasik ve ark., 1999).

Dokularda meydana gelen hasara karşı vücudun yanıtı, enflamasyon ile başlar. Enflamasyon süreci, doku hasarına sebep olan etkenden korunma sağlanması, etkenin ortadan kaldırılması ve iyileşmenin başlaması için gereklidir; ancak enflamasyonun kronikleşmesi durumunda, doku hasarı artar ve iyileşme olumsuz etkilenir (Özler ve ark., 2009; Ashley ve ark., 2012). Ekstrelerin yara bölgesinde gelişen enflamasyona olan etkisinin, yara iyileşme sürecini değiştirecek bir faktör olması sebebiyle, ekstre/fraksiyonların antienflamatuvar aktiviteleri de araştırılmıştır. Bu amaçla; öncelikli olarak, enflamasyona bağlı damar geçirgenliğindeki artış ve bölgeye makrofaj göçü üzerinde test maddelerinin inhibe edici etkilerinin araştırıldığı Whittle Yöntemi kullanılmıştır (Özbek ve Öztürk, 2003).

Bununla beraber karragenin-nedenli arka ayak ödemi testi ile TPA-nedenli kulak ödemi testi de ekstre ve fraksiyonların antienflamatuvar etkisinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Karragenin ile oluşturulan enflamasyon iki fazlı bir süreç olup, ilk fazda (90-180 dakika) enflamasyon histamin, serotonin gibi maddelere bağlı olarak oluşur. İkinci fazda ise (270-360 dakika) enflamasyon gelişiminden prostoglandinler, proteazlar ve lizozomlar gibi araşidonik asit metabolitleri sorumludur. TPA ise geç gelişen ve uzun süren bir enflamasyona sebep olur. TPA-nedenli enflamasyonun kesin mekanizması bilinmemekle birlikte, temel olarak, lipoksijenazlar tarafından sentezlenen lökotrienlere bağlı olduğu düşünülmektedir (Deliorman Orhan ve ark., 2007).

Çalışmamızda, akut modellerde aktivite gözlenen ekstre ve fraksiyonların, FCA ile romatoid artrit benzeri kronik enflamasyon oluşturulan sıçanlar üzerinde, antienflamatuvar etkisine de bakılmıştır.

Yara bölgesinde reaktif oksijen türlerinin bulunması oksidatif strese, bunun sonucunda da sitotoksitate ve yara iyileşmesinde gecikmeye sebep olur. Bu sebeple, bölgeden reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması, özellikle kronik yaralarda büyük önem taşımaktadır (Shetty ve ark., 2008). Yara iyileşmesinin enflamasyon evresinde meydana gelen fagositoz sırasında serbest radikaller ortaya çıkar ve bu radikaller doku hücrelerine zarar verir (Özler ve ark., 2007). Antioksidan aktivitenin yara iyileşmesi

sürecindeki önemi sebebiyle, bu çalışmada; DPPH ve ABTS⁺ serbest radikallerini süpürücü etki tayini, indirgenme gücünün belirlenmesi ve spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasına dayanan yöntemler ile ekstre ve fraksiyonların antioksidan aktiviteleri de araştırılmıştır.

Çalışma konusu olarak seçilen *O. spinosa* subsp. *leiosperma*, *O. variegata*, *O. viscosa* subsp. *brevifolia* ve *O. natrix* subsp. *natrix* türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından ayrı ayrı, aşamalı olarak *n*-hekzan, etil asetat ve metanol ile hazırlanan ekstrelerinden biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama tekniği uygulanarak etkili bileşiklerin izolasyonu yapılmıştır.

Ekstrelerin yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktivite testlerinin sonuçları değerlendirilerek, en yüksek aktivitenin gözleendiği *O. spinosa* subsp. *leiosperma* türünün köklerinin etil asetat ekstresi ile çalışmaya devam edilmiştir. Söz konusu ekstre, çizgisel insizyon yara modelinde, %42,6 oranında yara gerilme kuvveti oluşturarak diğer ekstrelerden daha yüksek aktivite göstermiştir (Çizelge 3.8). Çizgisel insizyon yara modeli ile paralel olarak, dairesel eksizyon yara modelinde de, en aktif ekstre, *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinin etil asetat ekstresi olduğu tespit edilmiştir. Bu ekstrenin uygulandığı grupta, deneyin 12. gününde yara alanında %60,1 oranında küçülme gözlenmiştir (Çizelge 3.9). Bu ekstrenin, hidroksiprolin tayini deneyi sonucunda hidroksiprolin düzeyi 41,3 µg/mg olarak ölçülmüş ve bu değer, bu testte de diğer ekstrelerden daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.10).

Ekstrelerin antienflamatuvar aktivite sonuçları da, yara iyileştirici aktivite ile tutarlı bulunmuştur. *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinin etil asetat ekstresinin en yüksek aktiviteyi göstererek, 100 mg/kg dozda, asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışını %40,4 oranında inhibe ettiği görülmüştür (Çizelge 3.15). Karragenin-nedenli arka ayak ödemi modelinde, 100 mg/kg dozda uygulanan *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinin etil asetat ekstresinin 180. dakikada %21,2; 270. dakikada %24,5 ve 360. dakikada %27,2 oranında inhibisyon sağladığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.16).

Biyolojik aktivite testlerinin sonuçlarına göre en yüksek etki gözlenen *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinin etil asetat ekstresinden aktif bileşiklerin izolasyonu amacıyla ekstre kolon kromatografisine tabi tutulmuş ve elde edilen altı fraksiyonun biyolojik aktiviteleri test edilmiştir. Aktivite sonuçları değerlendirilerek, saflaştırma ve izolasyon işlemine E5 fraksiyonu ile devam edilmesine karar verilmiştir. E5 fraksiyonu, çizgisel insizyon yara modelinde, %33,4 oranında yara gerilme kuvveti oluşturmuş (Çizelge 3.11), dairesel eksizyon yara modelinde bu fraksiyonun uygulandığı grupta, yara alanında %51,4 oranında küçülme tespit edilmiştir (Çizelge 3.12). Bu fraksiyonun hidrokspirolin düzeyinin tayininde elde edilen sonuç (30,9 µg/mg) da, diğer deney modellerinde olduğu gibi, E5 fraksiyonunun yara iyileştirici aktivitesinin, diğer fraksiyonlardan daha yüksek olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.13). Fraksiyonların antienflamatuvar aktivite tayinlerinden elde edilen sonuç da, yara iyileştirici aktivite testlerinin sonuçları ile aynı doğrultuda bulunmuştur. E5 fraksiyonunun, 100 mg/kg dozda, asetik asit-nedenli kapiller permeabilite artışını %40,3 oranında inhibe ettiği görülmüştür (Çizelge 3.18). Karragenin-nedenli arka ayak ödemi modelinde en yüksek aktiviteyi 270. dakikada %28,1; 360. dakikada %32,2 inhibisyonla E5 fraksiyonunun (100 mg/kg) sergilediği gözlenmiştir (Çizelge 3.19). Bu modelde enflamasyonun ikinci fazında görülen aktivite, antienflamatuvar aktivitenin araşidonik asit metabolitlerinin inhibisyonu üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir. Aktivitenin hangi yoldan hareketle görüldüğünün daha kesin olarak saptanması amacıyla *in vitro* enzim deneylerinin yapılmasına karar verilmiştir.

TPA-nedenli kulak ödemi modelinde, *Ononis* türlerinden elde edilen ekstre ve fraksiyonların aktivite göstermemesi (Çizelge 3.17, 3.20), antienflamatuvar etkinin lökotrien sentezi inhibisyonu yoluyla olmadığını göstermiştir. Araşidonik asit yolağı üzerinden meydana gelen enflamasyonun inhibisyonunun gözlemlendiği testlerin sonuçları, ekstre/fraksiyonların prostoglandin yolağı üzerinden aktivite gösterdiği fikrini desteklemektedir.

Akut modellerle yapılan deneylerde aktivitesi yüksek bulunan ekstre ve fraksiyonlar; *O. natrix* subsp. *natrix* köklerinin etil asetat ekstresi, *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinin etil asetat ekstresi ve bu ekstrenin fraksiyonu olan E5 fraksiyonunun, FCA-

nedenli artrit modeli ile çalışıldığında aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 3.21). Bu sonuçlar doğrultusunda, akut modellerde antienflamatuvar etkinliği bulunan bu ekstrelerin kronik enflamasyonda etkili olmadığı görülmüştür.

Tüm histopatolojik bulgular birlikte değerlendirildiğinde, yara iyileşme sürecindeki fazların deneysel gruplar arasında farklı derecelerde olduğu gözlenmiştir. Referans merhem Madecassol[®], *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinin etil asetat ekstresi ve bu ekstreden elde edilen E5 fraksiyonu ile tedavi edilen yara dokularının, diğer test numuneleri ile tedavi edilen gruplara kıyasla epidermal ve dermal re-modelizasyon bakımından en düzgün iyileşmeyi gösteren gruplar olduğu belirlenmiş ve dermal bütünlüğün büyük ölçüde sağlandığı tespit edilmiştir. İyileşmenin orta derecede görüldüğü diğer çalışma gruplarında re-epitelizasyonun kısmen tamamlandığı gözlenmiş, dermal bölgelerde makrofajlar ve fibroblastların ağırlıkta olduğu hücresel yapılar tespit edilmiştir. Negatif kontrol grubunda ve baz merhem uygulanan grupta geniş bir ülser bölgesi ile beraber yara kabuğunun varlığı tespit edilmiş, iyileşmenin tamamlanmadığı ve sürecin enflamasyon fazında kaldığı belirlenmiştir. Elde edilen histopatolojik bulgular çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon deney modellerinde elde edilen bulgular ile paralellik göstermektedir (Şekil 3.83, Çizelge 3.14).

Antioksidan aktivitenin de *in vitro* olarak araştırıldığı çalışmada; ekstre ve fraksiyonların dikkat çekici antioksidan aktivite göstermediği, ancak genel tabloya bakıldığında, sonuçların yara iyileştirici aktivite sonuçları ile paralellik gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 3.22).

Fraksiyonlar arasında en yüksek aktivite gösteren E5, çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırılmıştır. İzole edilen bileşiklerin yapıları MS, ¹H- ¹³C-NMR yanında 2D-NMR (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC) teknikleri yardımıyla tayin edilmiştir. Trifolirhizin, ononin, medikarpin-3-*O*-glukozit, onogenin-7-*O*-glukozit ve sativanon-7-*O*-glukozit olduğu belirlenen bileşiklerin *in vitro* yara iyileştirici aktiviteleri, dokudaki temel proteinlerden hyaluronik asit, kolajen ve elastinin yıkımında rol oynayan metalloproteinazlar olan hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimlerinin inhibisyonuna bakılarak değerlendirilmiştir. Ekstrasellüler matriks

kolajen, elastin ve fibronektin gibi metalloproteinlerin meydana getirdiği bir yapıdan oluşur. Kolajen hücreler için bir destek oluşturan temel yapısal proteindir. Elastin deri elastikiyetini ve direncini, hyaluronik asit ise su tutulmasını sağlayarak derinin yumuşaklığını ve nemlenmesini sağlar. Metalloproteinazların salımı ise bu proteinlerin, dolayısıyla ekstrasellüler matriksin degradasyonunda anahtar basamağı oluşturur (Tregove ve ark., 1999; Sahasrabudhe ve Deodhar, 2010).

İzole edilen beş bileşiğin yaptıkları enzim inhibisyonu değerlendirildiğinde, ononin ve sativanon-7-*O*-glukozitin, 100 µg/ml dozda, hyaluronidaz ve elastaz enzimlerini inhibe ettiği görülmüştür. Deney sonuçlarına göre; ononin bileşiği %31,66 oranında hyaluronidaz inhibisyonu, %41,75 oranında elastaz inhibisyonu yaparken, sativanon-7-*O*-glukozit için hyaluronidaz ve elastaz inhibisyon yüzdeleri sırasıyla %45,58 ve %46,88 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.23).

Fabaceae familyasında sık rastlanan izoflavonoit yapısındaki bileşikler, bitkilerin savunma mekanizmasında rol almanın yanısıra, insan sağlığı için de önemli bileşiklerdir (Jasinski ve ark., 2009). Yapılan çalışmalar; izoflavonoit türevi bileşiklerin kardiyovasküler rahatsızlıklarda, osteoporoz gelişiminin önlenmesinde, kanserden korunmada ve menopoz semptomlarının giderilmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği bilinmektedir. İzoflavonoitler, doğada aktif formlarının yanında, glikozit formunda da bulunmaktadır. Glikozit yapısındaki bu maddeler, gastrointestinal kanalda bakteriler tarafından metabolize edilerek aktif aglikon yapısına dönüştürülür ve bu şekilde absorbe edilirler (Sharma ve Ramawat, 2013).

Çalışmamızda izole edilen bileşikler, izoflavon yapısında olup trifolirhizin ve medikarpin-3-*O*-glukozit pterokarpan türevi bileşiklerdir (Şekil 3.42, 3.52, 3.63, 3.82). Bu bileşikler ile yapılan biyoaktivite çalışmalarında, heterozit haldeki bu bileşiklerin veya aglikonlarının çeşitli aktiviteler sergilediği görülmüştür.

Sophora flavescens köklerinden izole edilen trifolirhizinin gastroprotektif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bileşiğin *Helicobacter pylori*'ye karşı antibakteriyel aktivite

gösterdiği ve gastrik sekresyon ile asit üretimini azalttığı tespit edilmiştir (Kang ve ark., 2006). *Sophora* türlerinden izole edilen trifolirhizinin *in vitro* antiinflamatuvar aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, fare makrofajlarında, proenflamatuvar sitokinlerden TNF- α 'nın ve COX-2'nin lipopolisakkarit-nedenli uyarımını inhibe ettiği görülmüştür (Zhou ve ark., 2009). Bileşiğin, farelerde, solunum yolunda asetil kolin nedenli düz kas kontraksiyonunu da inhibe ettiği tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2013). *S. flavescens*'ten izole edilen trifolirhizinin melanin sentezi inhibisyonu yaptığı görülmüştür (Hyun, 2008). Yapılan çalışmalarda, trifolirhizinin ve aglikonu olan maakiainin *in vitro* antitümör aktivitesi de dikkat çekici bulunmuştur (Ko ve ark., 2000; Aratanechemuge ve ark., 2004; Zhou ve ark., 2009). Maakiainin antifungal aktivite gösterdiği de tespit edilmiştir (Yagi ve ark., 1989). *O. vaginalis* köklerinden izole edilen trifolirhizin ve maakiainin sıçanlardaki östrojenik aktivitesine bakıldığı bir çalışmada, trifolirhizinin uterusu önemli ölçüde ağırlık artışına sebep olduğu görülmüştür (Abdel-Kader, 2010).

Glutamat-nedenli hücre hasarına karşı koruyucu etkinin incelenmesi yoluyla nöroprotektif etkinin araştırıldığı bir çalışmada, ononin ve aglikonu formononetinin süperoksit dizmutaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı, hasarlı hücrelerde laktat dehidrojenaz salımını ise inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bileşiklerin hücre dışı ortamda DPPH radikal süpürücü aktivitelerinin düşük bulunması, endojen antioksidanları arttırarak ve hücre membran yapısını stabilize ederek glutamat-nedenli hücre hasarını engellediğini düşündürmektedir (Yu ve ark., 2005). Östrojenik etkisi olduğu bilinen *Trifolium pratense*'nin bu etkisinden sorumlu izoflavonoidler arasında majör olarak formononetin de bulunmaktadır (Piersen, 2003). Avusturya'da üretilen ve *T. pratense* ekstresi içeren preparatta; biokanin A, daidzein ve genistein yanında, %5,46 formononetin bulunmaktadır. Bu preparatla, menopoza sonrası dönemdeki kadınlarda yapılan plasebo kontrollü klinik bir çalışmada, testosteron düzeyinde orta derecede azalma gözlenirken, ürünün endometriyal kalınlıkta belirgin azalma sağladığı gözlenmiştir (Beck ve ark., 2005; Imhof ve ark., 2006). *In vivo* östrojenik aktivitesi araştırılan *T. pratense*'den izole edilen formononetinin doz bağımlı olmaksızın östrojenik etki göstermesinin yanında, *in vitro* antioksidan aktivitesi olduğu tespit edilmiştir (Mu ve ark., 2009). Farklı *Trifolium*

türlerinin yara iyileştirici aktivitesi ve izoflavon içeriklerinin araştırıldığı bir çalışmada, çalışılan türler arasında aktivitesi gözlenen *T. canescens* ve *T. pratense* var. *pratense*'nin total izoflavon içeriğinin de yüksek bulunması, ekstredeki izoflavon içeriğinin yara iyileştirici aktivite bakımından önemli olduğunu düşündürmektedir. Çalışmada, miktar tayini yapılan ve ekstrede majör olarak bulunan izoflavonlar arasında formononetinin de bulunduğu tespit edilmiştir (Renda ve ark., 2013). Formononetinin yara iyileşmesine etkisinin ortaya konduğu bir çalışmada, bu bileşiğin Egr-1 aktivasyonu sağlayarak anjiyogenik etki gösterdiği ve endotel hücrelerinde ERK fosforilasyonunu sağlayarak yara iyileşmesini desteklediği görülmüştür (Huh ve ark., 2011). *Astragalus membranaceus*'tan izole edilen formononetinin, diyabet tedavisi açısından önemli olan reseptörlerden, dislipideminin önlenmesinde görevli reseptör PPAR α ve glisemik dengenin sağlanmasında görevli reseptör PPAR γ aktivasyonu yaptığı tespit edilmiştir (Shen ve ark., 2006). Hücrelerde apoptozu sağlayan aril hidrokarbon reseptör aktivasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada, formononetin bileşiğinin aktif bulunması, bileşiğin kanserden korunma amacıyla veya kanser tedavisinde değerlendirilebileceğini düşündürmüştür (Medjakovic ve Jungbauer, 2008).

Ononinin *E. coli* suşuna karşı antibakteriyel aktivitesine bakıldığı bir çalışmada, bileşiğin çok düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Wu ve ark., 2013). *Medicago truncatula*'nın metabolizmasının araştırıldığı bir çalışmada, patojen bir mantar olan *Phoma medicaginis* ile enfekte olmuş yapraklarda, medikarpin ve bunun prekürsörü olan ononin miktarında artış tespit edilmiştir. Çalışmada, enfekte olmamış yapraklarda bu bileşiklerin miktarının daha düşük olması, bitkinin bu maddeleri enfeksiyona karşı antimikrobiyal olarak, savunma amacıyla ürettiğini düşündürmektedir (Jasinski ve ark., 2009). *Medicago sativa* hücre kültürünün, fitopatojenik bir mantar olan *Colletotrichum lindemuthianum* hücre duvarı ekstrelerine maruz kaldığında kültürde medikarpin ve medikarpin-3-*O*-glikozit-6''-*O*-malonat düzeyinin artmış olması, bu bileşiğin bitkilerde antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu göstermiştir (Dalkin ve ark., 1990; Kessmann ve ark., 1990).

Sativanon-7-*O*-glukozit, daha önce izole edilmemiş olmakla birlikte, aglikonu olan ve

Dalbergia odorifera'dan izole edilen sativanon, biyoaktivite çalışmalarında, lipopolisakkarit ile aktive edilmiş makrofajlarda TNF- α salımını inhibe ederek *in vitro* antienflamatuvar aktivite göstermiştir (Wang ve ark., 2013). Makrofajlarda lipopolisakkarit ile indüklenen NO salımının inhibisyonunun araştırıldığı bir çalışmada ise, bu bileşik aktif bulunmamıştır (Lee ve ark., 2014). *D. odorifera*'nın majör bileşiklerinden olan sativanonun insan keratinosit hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek antioksidan aktivite gösterdiği ve farelerle yapılan çalışmada UV maruziyeti nedenli cilt yaşlanmasını inhibe ettiği saptanmıştır (Ham ve ark., 2015a). Ayrıca bu bileşiğin insan dermal fibroblastlarında tip 1 kolajen, elastin ve TGF- β 1 protein seviyelerinde artış sağladığı da tespit edilmiştir (Ham ve ark., 2015b). *D. parviflora*'dan izole edilen sativanon ve onogeninin östrojenik aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, bu bileşiklerin insan meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı görülmüştür (Umehara ve ark., 2006).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma ile, seçilen dört tür arasından, *O. spinosa* subsp. *leiosperma*'nın köklerinden biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama tekniği ile beş bileşik izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapı tayinleri sonucunda, trifolirhizin, ononin, medikarpin-3-*O*-glukozit, onogenin-7-*O*-glukozit ve sativanon-7-*O*-glukozit oldukları tespit edilmiştir. Hazırlanan ekstrelerin, fraksiyonların ve izole edilen bileşiklerin metalloproteinaz enzimlerini inhibisyonlarına bakılarak yara iyileştirici aktiviteleri tayin edilmiş ve bunun sonucunda, izole edilen ononin ile sativanon-7-*O*-glukozitin hyaluronidaz ve elastaz enzim inhibisyonu yaptığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinin yaraların iyileştirilmesi amacıyla kullanılmasının bilimsel olarak doğru olduğunu kanıtlamıştır. Yapılan çalışmalarda, fraksiyonların aktivitesinin ekstrenin aktivitesi ile kıyaslandığında, az da olsa düştüğü görülmüştür. Bu durum, bitkinin aktivitesinin, içerdiği bileşiklerin sinerjik etkisinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Bu tür ile yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde, bitkinin yara iyileştirici etkisi bakımından, aktivite yönlendirmeli olarak, ekstreten aktif bileşiklerin izolasyonuna kadar gidilen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

İlerleyen çalışmalarda, aktivitesi kanıtlanmış olan bu bitkiden standardize ekstre hazırlanmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Bu doğrultuda, ekstrenin gösterdiği aktivitenin mekanizmasının aydınlatılması yolunda çalışmaların sürdürülmesi önem taşımaktadır.

ÖZET

Türkiye’de Yetişen Bazı *Ononis* L. Türlerinin Taşıdığı Yara İyileştirici ve Antienflamatuvar Etkili Bileşiklerin Araştırılması

Bu çalışmada, ülkemizde 18 türü yetişmekte olan ve bazı türleri halk arasında tedavi amaçlı kullanılan *Ononis* cinsine ait 4 tür seçilmiş ve seçilen türlerden biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yöntemi ile kullanılarak etkili bileşiklerin izolasyonu hedeflenmiştir.

Bu amaç doğrultusunda, araştırma konusu olarak seçilen, *Ononis spinosa* L. subsp. *leiosperma* (Boiss.) Sirj., *Ononis variegata* L., *Ononis viscosa* L. subsp. *brevifolia* (DC) Nym. ve *Ononis natrix* L. subsp. *natrix* L. türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan *n*-hekzan, etil asetat ve metanol ekstralarının yara iyileştirici, antienflamatuvar ve antioksidan etki çalışmaları yapıldı. Yara iyileştirici aktivite tayini için çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon yara modelleri kullanıldı ve hidroksiprolin tayini yapıldı. Antienflamatuvar aktivite tayini için akut enflamasyon modellerinden Whittle yöntemi, karragenin-nedenli arka ayak ödemi ve TPA-nedenli kulak ödemi modelleri yanında, kronik enflamasyon modellerinden FCA-nedenli artrit modeli kullanıldı. Hazırlanan ekstralar arasında, aktivitesi en yüksek olan *O. spinosa* subsp. *leiosperma* köklerinin etil asetat ekstresi, kolon kromatografisi ile fraksiyonlandı ve bu fraksiyonların aktivite tayini sonuçları değerlendirilerek, aktif fraksiyonla izolasyon ve saflaştırma işlemlerine devam edildi.

Kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi kromatografik yöntemlerden yararlanılarak, aktivite tayini sonrası saflaştırılmasına karar verilen fraksiyon saflaştırıldı ve etkili bileşikleri elde edildi. İzole edilen beş bileşiğin yapıları, spektroskopik yöntemler yardımıyla, trifolirhizin, ononin, medikarpin-3-*O*-glukozit, onogenin-7-*O*-glukozit ve sativanon-7-*O*-glukozit olarak belirlendi. Bu bileşiklerin yaptıkları hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzim inhibisyonuna bakılarak yara iyileştirici aktivitelerinin değerlendirilmesi sonucunda ononin ve sativanon-7-*O*-glukozitin hyaluronidaz ve elastaz enzimlerini inhibe ettiği tespit edildi.

Çalışmada, seçilen 4 *Ononis* türünün kök ve toprak üstü kısımlarının farklı polaritedeki ekstralardan hareketle, aktivitesi en yüksek ekstre/fraksiyonlar takip edildi ve ileri saflaştırma ve izolasyon aşamasına geçildi. Aktivite yönlendirmeli olarak yapılan fraksiyonlama sonrasında elde edilen bileşikler arasından iki bileşiğin (ononin ve sativanon-7-*O*-glukozit) aktivite gösterdiği tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Antienflamatuvar aktivite, biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama, Fabaceae, *Ononis*, yara iyileştirici aktivite

SUMMARY

Investigation of wound healing and anti-inflammatory compounds from some *Ononis* L. species growing in Turkey

In this study, 4 species of the genus *Ononis*, which is represented by 18 species in Turkey and is used as folk medicine, were selected and it is aimed to isolate bioactive compounds by using bioactivity guided fractionation.

For this purpose; extracts were prepared from the roots and aerial parts of the selected species, namely *Ononis spinosa* L. subsp. *leiosperma* (Boiss.) Sirj., *Ononis variegata* L., *Ononis viscosa* L. subsp. *brevifolia* (DC) Nym. ve *Ononis natrix* L. subsp. *natrix* L. by using *n*-hexane, ethylacetate and methanol. Wound healing, anti-inflammatory and antioxidant activities of the extracts were investigated. Linear incision and circular excision wound models and hydroxypyroline estimation assay were conducted for the investigation of wound healing activity. Acute inflammation models *i.e.* Whittle Method, carrageenan-induced hind paw edema and TPA-induced ear edema models as well as a chronic inflammation model *i.e.* FCA-induced arthritis model were used for the assessment of anti-inflammatory activity. The ethylacetate extract of the roots of *O. spinosa* subsp. *leiosperma* was found to possess the best activity among all the extracts. The extract was fractionated by using column chromatography technique and the fractions were obtained. The fraction which would be subjected to further purification and isolation process was selected according to the bioactivity test results of the fractions.

Chromatographic techniques such as, column chromatography, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography were conducted to purify the fraction and obtain the bioactive compounds. Five compounds were isolated and the chemical structures were investigated by using spectroscopic techniques. These five compounds were found to be trifolirhizin, ononin, medicarpin-3-*O*-glucoside, onogenin-7-*O*-glucoside ve sativanone-7-*O*-glucoside. Wound healing activities of isolated compounds were evaluated according to the inhibition of hyaluronidase, collagenase and elastase enzymes. Ononin and sativanone-7-*O*-glucoside were found to have inhibitory activity on hyaluronidase and elastase enzymes.

Starting with the extracts of roots and aerial parts of 4 different *Ononis* species, the extract/fractions which were found to possess the best activity were subjected to further purification and isolation processes. Among the compounds isolated through bioactivity guided fractionation technique, two of them (ononin and sativanone-7-*O*-glycoside) were found to possess activity.

Key Words: Anti-inflammatory activity, bioactivity guided fractionation, Fabaceae, *Ononis*, wound healing activity

KAYNAKLAR

- ABDEL-KADER, M.S. (1997). Two new norphenylpropanoid glucosides and hemipholin from the flowers of *Ononis vaginalis*. *J. Braz. Chem. Soc.* **8**(6): 637-639.
- ABDEL-KADER, M.S. (2001). Phenolic constituents of *Ononis vaginalis* roots. *Planta Med.* **67**: 388-390.
- ABDEL-KADER, M.S. (2004). Two isoflavonoid glucoside derivatives from *Ononis serrata* growing in Egypt. *Nat. Prod. Sci.* **10**(6): 321-324.
- ABDEL-KADER, M.S. (2010). Preliminary pharmacological study of the pterocarpan mackian and trifolirhizin isolated from the roots of *Ononis vaginalis*. *Pak. J. Pharm. Sci.* **23**(2): 182-187.
- ABDOU-KARAM, M., SHIER, W.T. (1990). A simplified plaque reduction assay for antiviral agents from plants. Demonstration of frequent occurrence of antiviral activity in higher plants. *J. Nat. Prod.* **53**(2): 340-344.
- AGELET, A., VALLES, J. (2003). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **84**: 211-227.
- AKTAŞ AYTEPE, H. (2007). Bencik Dağı (Yatağan-Muğla) Florası. *Ekoloji* **16**(63): 41-61.
- AL-BAKRI, A.G., AFIFI, F.U. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J. Microbiol. Meth.* **68**: 19-25.
- ALBAYRAK, S., SAĞDIÇ, O., AKSOY, A. (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Univ. Fen Bilim. Ens. Derg.* **26**(4): 401-409.
- AL-KHALIL, S. (1995a). N-Arachidylanthranilic acid, a new derivative from *Ononis natrix*. *J. Nat. Prod.* **58**(5): 760-763.
- AL-KHALIL, S. (1995b). A survey of plants used in Jordanian traditional medicine. *Int. J. Pharmacogn.* **33**(4): 317-323.
- AL-QUDAH, A.M., AL-GHOUL, A.M., TRAWENH, I.B., AL-JABER, H.I., AL SHBOUL, T.M., ABU ZARGA, M.H., ABUORABI, S.T. (2014). Antioxidant activity and chemical composition of essential oils from Jordanian *Ononis natrix* L. and *Ononis sicula* Guss. *TBAP* **4**(1): 52-61.
- AL-QURA'N, A. (2008). Taxonomical and pharmacological survey of therapeutic plants in Jordan. *J. Nat. Prod.* **1**: 10-26.

- ALTANLAR, N., SALTAN ÇİTOĞLU, G., SEVER YILMAZ, B. (2006). Antilisterial activity of some plants used in folk medicine. *Pharm. Biol.* **44**(2): 91-94.
- ALTINYAY, Ç. (2014). Türkiye’de Yetişen Bazı *Alnus* Miller Taksonları Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara.
- AMER, M.E., ABDEL-KADER, M.S., MAHMOUD, Z.F., ABDEL SALAM, N.A., YANG S.S., MABRY, T.J. (1989). Flavonoids of *Ononis vaginalis* Vahl. *Symb. Rev. Latinoam. Quim.* **20**(3-4): 152-153.
- AMER, M.E. (2001a). 9-O-methyl spinonin, a novel glucoside from *Ononis serrata*. *Alex. J. Pharm. Sci.* **15**(1): 47-49.
- AMER, M.E. (2001b). Flavonoids from *Ononis serrata* growing in Egypt. *Alex. J. Pharm. Sci.* **15**(2): 99-102.
- AMER, M.E., KASSEM, F.F., ABDEL-KADER, M.S. (2004). Rare 2-phenoxychromones from *Ononis serrata* growing in Egypt. *Nat. Prod. Sci.* **10**(1): 1-3.
- ARATANEHEMUGE, Y., HIBASAMI, H., KATSUZAKI, H., IMAI, K., KOMIYA, T. (2004). Induction of apoptosis by maackiain and trifolirhizin (maackiain glycoside) isolated from sanzukon (*Sophora subprostrate* Chen et T. Chen) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncol. Rep.* **12**: 1183-1188.
- ASHLEY, N.T., WEIL, Z.M., NELSON, R.J. (2012). Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **43**: 385-406.
- ASIMGİL A. (2009). Şifalı Bitkiler. 19. Baskı. İstanbul: Timaş Yayınları.
- BABALIK, A.A., FAKİR, H. (2010). Plant species diversity in Isparta region rangelands. *J. Anim. Vet. Adv.* **9**(22): 2788-2796.
- BALDEMİR, A. (2010). Türkiye’de Yetişen Endemik *Ononis* L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Botanik Yönünden Araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik Anabilim Dalı.
- BARRANTES, E., GUINEA, M. (2003). Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Sciences* **72**: 843-50.
- BARRERO, A.F., SACHEZ, J.F., BARRON, A., RODRIGUEZ, I. (1989a). Resorcinol derivatives and other components of *Ononis speciosa*. *Phytochemistry* **28**(1): 161-164.
- BARRERO, A.F., SACHEZ, J.F., BARRON, A., CORRALES, F., RODRIGUEZ, I. (1989b). Specionin and speciosides A and B: nem aromatic lactones from *Ononis speciosa*. *J. Nat. Prod.* **52**(6): 1334-1337.
- BARRERO, A.F., SANCHEZ, J.F., RODRIGUEZ, I. (1990). *N*- Δ docosenoylanthranilic acid and alkyl resorcinols from and alkyl resorcinols from *Ononis natrix* subsp. *hispanica*.

- Phytochemistry* **29**(6): 1967-1969.
- BARRERO, A.F., SANCHEZ, J.F., REYES, F., RODRIGUEZ, I. (1991). Resorcinol derivatives from *Ononis viscosa*. *Phytochemistry* **30**(2): 641-643.
- BARRERO, A.F., SANCHEZ, J.F., RODRIGUEZ, I. (1993). Use of alkenylresorcinols from *Ononis speciosa* as synthetic precursors of compounds with potential biological activity. *J. Nat. Prod.* **56**(10): 1737-1746.
- BARRERO, A., CABRERA, E., RODRIGUEZ, I., FERNANDEZ-GALLEGU, E.M. (1994a). Resorcinol derivatives and other components from *Ononis viscosa* subsp. *brevifolia*. *Phytochemistry* **36**(1): 189-194.
- BARRERO, A., CABRERA, E., RODRIGUEZ, I., PLANELLES, F. (1994b). Alkylresorcinols and isocoumarins from *Ononis pubescens*. *Phytochemistry* **35**(2): 493-498.
- BARRERO, A.F., HERRADOR, M.M., ARTEAGA, P., RODRIGUEZ-GARCIA, I. GARCIA-MORENO, M. (1997). Resorcinol derivatives and flavonoids of *Ononis natrix* subspecies *ramosissima*. *J. Nat. Prod.* **60**(2): 65-68.
- BARRERO, A.F., CABRERA, E., RODRIGUEZ GARCIA, I. (1998). Pterocarpanes from *Ononis viscosa* subsp. *brevifolia*. *Phytochemistry* **48**(1): 187-190.
- BARTON, D.H.R., OVERTON, K.H. (1955). Triterpenoids. Part. XX. The constitution and stereochemistry of a novel tetracyclic triterpenoid. *J. Chem. Soc.* 2639-2652.
- BARTON, G.M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.* **118**(2): 413-420.
- BAYTOP, T. (1999). Türkiye'de Bitkilerle Tedavi. Geçmişte ve Bugün. İlaveli 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, p.: 251.
- BECK, V., ROHR, U., JUNGBAUER, A. (2005). Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *J. Steroid Biochem.* **94**: 499-518.
- BEG, S., SWAIN, S., HASAN, H., BARKAT, M.A., HUSSAIN, M.S. (2011). Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. *Pharmacogn. Rev.* **5**(10): 120-137.
- BERNHARDT, M., SHAKER, K.H., ELGAMAL, M.H.A., SEIFERT, K. (2000). The new bishomoflavone ononin and its glucoside from *Ononis vaginalis*. *Z. Naturforsch.* **55c**: 516-519.
- BENABDERAHMANE, W., MEZRAG, A., BOUHEROUM, M., BENAYACHE, M., MOSSET, P. (2014). The chemical investigation of the chloroformic extract of *Ononis angustissima* Lam. Var. species. *Der Pharmacia Lettre* **6**(3): 88-91.
- BENEDEC, D., VLASE, L., ONIGA, I., TOIU, A., TAMAS, M., TIPERCIUC, B. (2012). Isoflavonoids from *Glycyrrhiza* sp. and *Ononis spinosa*. *Farmacia* **60**(5): 615-620.

- BLUMENTHAL, M. (ed.) (1998). The Complete German Commission E Monographs Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Austin, Texas: American Botanical Council.
- BREMNER, P., RIVERA, D., CALZADO, M.A., OBON, C., INOCENCIO, C., BECKWITH, C., FIEBICH, B.L., E. MUNOZ, HEINRICH, M. (2009). Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *J. Ethnopharmacol.* **124**: 295-305.
- BOTTA, B., GACS-BAITZ, E., VINCIGUERRA, V., DELLE MONACHE, G. (2003). Three isoflavanones with cannabinoid-like moieties from *Desmodium canum*. *Phytochemistry* **64**: 599-602.
- BOUHEROUM, M., ZAITER, L., BENAYACHE, S., BENAYACHE, F., BERMEJO, J.B., LEON, F., GARCIA, V. (2009). Four flavonoids from the aerial part of *Ononis angustissima* species. *Chem. Nat. Compd.* **45**(6): 874-875.
- CANEDO, L.M., DEL CORRAL, J.M.M., SAN FELICIANO, A. (1997). 5-ALKYLRESORCINOLS FROM *Ononis nartix*. *Phytochemistry* **44**(8): 1559-1563.
- ÇAKILCIOĞLU, U., TÜRKÖĞLU, I. (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **132**: 165-175.
- ÇOBAN, T., SALTAN ÇİTOĞLU, G., SEVER, B., İŞCAN, M. (2003). Antioxidant activities of plants used in traditional medicine in Turkey. *Pharm. Biol.* **41**(8): 608-613.
- DALKIN, K., EDWARDS, R., EDINGTON, B., DIXON, R.A. (1990). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) I. Induction of phenylpropanoid biosynthesis and hydrolytic enzymes in elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiol.* **92**: 440-446.
- DANNHARDT, G., SCHNEIDER, G., SCHWELL, B. (1992). Identification and 5-lipoxygenase inhibiting potency of medicarpin isolated from roots of *Ononis spinosa* L. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **2**(4): 161-162.
- DARUHAZI, A.E., SZARKA, S., HETHELYI, E., SIMANDI, B., GYURJAN, I., LASZLO, M., SZOKE, E., LEMBERKOVICS, E. (2008). GC-MS identification and GC-FID quantitation of terpenoids in *Ononis spinosa* Radix. *Chromatographia* **68**: 71-76.
- DAVIS, P.H. (ed.) (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3. Edinburgh: Edinburgh University Press, p.: 373.
- DEĞİM, Z., ÇELEBİ, N., SAYAN, H., BABÜL, A., ERDOĞAN, D., TAKE, G. (2002). An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. *Amino Acids* **22**: 187-198.
- DELİORMAN ORHAN, D., HARTEVİOĞLU, A., KÜPELİ, E., YEŞİLADA, E. (2007). *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *J. Ethnopharmacol.* **112**: 394-400.

- DOĞAN, Y., BASLAR, S., CELİK, A., MERT, H.H., ÖZTURK, M. (2004). A study of the roadside plants of West Anatolia, Turkey. *Nat. Croat.* **13**(1): 63-80.
- ECEVİT GENÇ, G., ÖZHATAY, N. (2006). An ethnobotanical study in Çatalca (European part of Istanbul) II. *Turk. J. Pharm. Sci.* **3**(2): 73-89.
- ELAMRANI, A., BENAİSSA, M. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Ononis natrix* from Morocco. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **13**(4): 477-488.
- ERDEMGİL, F.Z., KURKCUOĞLU, M., BASER, K.H.C. (2002). Composition of the essential oil of *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Chem. Nat. Compd.* **38**(6): 565-567.
- ERDOĞAN-ORHAN, İ., SEVER-YILMAZ, B., ALTUN, M.L., SALTAN, G. (2010). Radical quenching activity, ferric-reducing antioxidant power and ferrous ion-chelating capacity of 16 *Ballota* species and their total phenol and flavonoid contents. *J. Med. Food* **13**(6): 1537-1543.
- ESCOP Monographs The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. (2003). İkinci Baskı. New York: Thieme.
- FUJISE, Y., TODA, T., ITO, S. (1965). Isolation of trifolirhizin from *Ononis spinosa* L. *Chem. Pharm. Bull.* **13**(1): 93-95.
- GEORGIEVA, S., CHANEV, C., ARPADJAN, S. (2008). GC-MS and AAS in fractionation analysis of herbal supplement. *Eurasian J. Anal. Chem.* **3**(1): 44-54.
- GONZALEZ-TEJERO, M.R., CASARES-PORCEL, M., SANCHEZ-ROJAS, C.P., RAMIRO-GUTIERREZ, J.M., MOLERO-MESA, J., PIERONI, A., GIUSTI, M.E., CENSORI, E., DE PASQUALE, C., DELLA, A., PARASKEVA-HADIJCHAMBI, D., HADIJCHAMBI, A., HOUMANI, Z., EL-DEMERDASH, M., EL-ZAYAT, M., HMAMOUCHE, M., ELJOHRIG, S. (2008). Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the result of the project Rubia. *J. Ethnopharmacol.* **116**: 341-357.
- GÖKALP ÖZKORKMAZ, E., ÖZAY, Y. (2009). Yara iyileşmesinde kullanılan bazı bitkiler. *Derleme Dergisi* **2**(2): 63-67.
- HALL, J. (2011). Textbook of Medicinal Physiology. 12nd Ed. United Kingdom: Elsevier, p.: 428.
- HAM, S.A., HWANG, J.S., KANG, E.S., YOO, T., LIM, H.H., LEE, W.J., PAEK, K.S., SEO, H.G. (2015a). Ethanol extract of *Dalbergia odorifera* protects skin keratinocytes against ultraviolet B-induced photoaging by suppressing production of reactive oxygen species. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **79**(5): 760-766.
- HAM, S.A., KANG, E.S., YOO, T., LIM, H.H., LEE, W.J., HWANG, J.S., PAEK, K.S., SEO, H.G. (2015b). *Dalbergia odorifera* extract ameliorates UVB-induced wrinkle formation by modulating expression of extracellular matrix proteins. *DDR* **76**: 48-56.
- HUDAIB, M., MOHAMMAD, M., BUSTANJI, Y., TAYYEM, R., YOUSEF, M., ABUIRJEIE, M., ABURJAI, T. (2008). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Jordan, Mujib

- Nature Reserve and surrounding area. *J. Ethnopharmacol.* **120**: 63-71.
- HUH, J.E., NAM, D.W., BAEK, Y.H., KANG, J.W., PARK, D.S., CHOI, D.Y., LEE, J.D. (2011). Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *Int. Immunopharmacol.* **11**: 46-54.
- HYUN, S.K., LEE, W.H., JEONG, D.M., KIM, Y., CHOI, J.S. (2008). Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **31**(1): 154-158.
- IMHOF, M., GOCAN, A., REITHMAYR, F., LIPOVAC, M., SCHIMITZEK, C., CHEDRAUI, P., HUBER, J. (2006). Effects of a red clover extract (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in postmenopausal women. *Maturitas* **55**: 76-81.
- INGHAM, J.L. (1982). Phytoalexin production by *Ononis* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **10**(3): 233-237.
- JARIC, S., POPOVIC, Z., MACUKANOVIC-JOCIC, M., DJURDJEVIC, L., MIJATOVIC, M., KARADZIC, B., MITROVIC, M., PAVLOVIC, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J. Ethnopharmacol.* **111**: 160-175.
- JASINSKI, M., KACHLICKI, P., RODZIEWICZ, P., FIGLEROWICZ, M., STOBIECKI, M. (2009). Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago trunculata* leaves during infection with fungal pathogen *Phoma medicaginis*. *Plant Psicol. Bioch.* **47**: 847-853.
- JIMENEZ-GONZALES, L., ALVAREZ-CORRAL, M., MUNOZ-DORADO, M., RODRIGUEZ-GARCIA, I. (2008). Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochem. Rev.* **7**: 125-154.
- KANG, M.H., LEE, J.H., CHO, S.Y., CHOI, J.S., KIM, Y.S., KANG, S.S., JEONG, C.S. (2006). Antigastric and anti *Helicobacter pylori* of trifolirhizin from *Sophora Radix*. *Koren J. Pharmacog.* **37**: 266-271.
- KARAMAN, S., KOCABAŞ, Y.Z. (2001). Traditional medicinal plants of K. Maraş (Turkey). *The Sciences* **1**(3): 125-128.
- KARAMANOĞLU, K. (1974). Türkiye Bitkileri, Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Bitkilerin Sinonimleriyle Birlikte Yetiştigi yerler ve Genel Yayılma Alanları. Cilt 1. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, p.: 795-804.
- KARGIOĞLU, M., CENKÇİ, S., SERTESER, A., KONUK, M., VURAL, G. (2010). Traditional uses of wild plants in the Middle Aegean region of Turkey. *Hum. Ecol.* **38**: 429-450.
- KASAHARA, Y., HIKINO, H., TSURUFUJI, S., WATANABE, M., OHUHI, K. (1985). Antiinflammatory actions of ephedrine in acute inflammations. *Planta Med.* **51**: 325-331.

- KASSEM, F.F. (2007). Flavonoid derivatives from *Ononis sicular* Guss. Growing in Egypt. *Alex. J. Pharm. Sci.* **21**(1):13-17.
- KAYA, E., VAROL, Ö., AKTAŞ AYTEPE, H. (2008). Urban flora of Muğla (Muğla, Turkey). *Fl. Medit.* **18**: 127-148.
- KESSMANN, H., EDWARDS, R., GENO, P.W., DIXON, R.A. (1990). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) V. Constitutive and elicitor-induced accumulation of isoflavonoid conjugates in cell suspension cultures. *Plant Physiol.* **94**: 227-232.
- KHALEELIAH, W.M.H. (2001). Screening for Anticancer Activity of Platinian Plants. An-Najah National University, Faculty of Graduate Studies, Biological Sciences Master Thesis, Plastine.
- KHALLOUKI, F., YOUNOS, C., SOULIMANI, R., BESSIERE, J.M. (2002). Chemical composition of the essential oil of *Ononis natrix* L. Fabaceae. *J. Essent. Oil. Res.* **14**: 431-432.
- KHOUNI, L., LONG, C., HABA, H., MOLINIER, N., BENKHALED, M. (2014). Anthranilic acid derivatives and other components from *Ononis pusilla*. *Nat. Prod. Commun.* **9**(8): 1159-1162.
- KIRMIZIGÜL, S., GÖREN, N., YANG, S.W., CORDELL, G.A., BOZOK-JOHANSSON, C. (1997). Spinonin, a novel glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *leiosperma*. *J. Nat. Prod.* **60**: 378-381.
- KLEJDUS, B., VACEK, J., BENESOVA, L., KOPECKY, J., LAPCIK, O., KUBAN, V. (2007). Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**: 2277-2285.
- KLEJDUS, B., VACEK, J., LOJKOVA, L., BENESOVA, L., KUBAN, V. (2008). Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. *J. Chromatogr. A* **1195**: 52-59.
- KO, W.G., KANG, T.H., KIM, N.Y., LEE, S.J., KIM, Y.C., KO, G.I., RYU, S.Y., LEE, B.H. (2000). Lavandulyflavonoids: a new class of *in vitro* apoptogenic agents from *Sophora flavescens*. *Toxicol. In Vitro* **14**: 429-433.
- KOVALEV, V.N., SPIRIDONOV, V.N., BORISOV, M.I., KOVALEV, I.P., GORDIENKO, V.G., KOLESNIKOV, D.D. (1975). Phenolic compounds of *Ononis arvensis* the structure of onogenin. *Chem. Nat. Compd.* **11**(3): 367-369.
- KURALAY, F., ÇAVDAR, Z. (2006). İnflamatuvar mediyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg.* **16**(3): 143-152.
- KÜLTÜR, Ş. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **111**: 341-364.
- KÜPELİ, E. (2000). *Berberis crataegina* DC. Bitkisinin Romatizma Tedavisindeki Etkisi Üzerinde Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı.

- KÜPELİ AKKOL, E., SÜNTAR, İ., KELEŞ, H., YEŞİLADA, E. (2011). The potential role of female flowers inflorescence of *Typha domingensis* Pers. in wound management. *J. Ethnopharmacol.* **133**: 1027-1032.
- LEE, K.K., CHOI, J.D. (1999). The effects of *Areca catechu* L. extracts on anti-aging. *Int. J. Cosmetic Sci.* **21**: 285-284.
- LEE, J.W., LEE, C., JIN, Q., LEE, M.S., KIM, Y., HONG, J.T., LEE, M.K., HWANG, B.Y. (2014). Chemical constituents from *Belamcanda chinensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *Arch. Pharm., Res.* DOI 10.1007/s12272-014-0529-8.
- LEPORATTI, M.L., IVANCHEVA, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J. Ethnopharmacol.* **87**: 123-142.
- LI, J., CHEN, J., KIRSNER, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* **25**: 9-18.
- LODHI, S., PAWAR, R.S., JAIN, A.P., SINGHAI, A.K. (2006). Wound healing potential of *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. in rats. *J. Ethnopharmacol.* **108**: 204-210.
- LV, Q., YANG, Y., ZHAO, Y., GU, D., HE, D., YILI, A., MA, Q., CHENG, Z., GAO, Y., AISA, H.A., ITO, Y. (2009). Comparative study on separation and purification of isoflavones from the seeds and sprouts of chickpea by high-speed countercurrent chromatography. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **32**(19): 2879-2892.
- MAHASNEH, A.M., EL-OQLAH, A. (1999). Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine in Jordan. *J. Ethnopharmacol.* **64**: 271-276.
- MAMEDOV, N., GARDNER, Z., CRAKER, L.E. (2005). Medicinal plants used in Russia and Central Asia for the treatment of selected skin conditions. *J. Herbs Spices Med. Plants* **11**(1): 191-222.
- MEDJAKOVIC, S., JUNBAUER, A. (2008). Red clover isoflavones biochanin A and formononetin are potent ligands of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Steroid Biochem.* **108**: 171-177.
- MELZIG, M.F., LOSER, B., CIESIELSKI, S. (2001). Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie* **56**: 967-70.
- MENKE, N.B., WARD, K.R., WITTEN, T.M., BONCHEV, D.G., DIEGELMANN, R.F. (2007). Impaired wound healing. *Clin. Dermatol.* **25**: 19-25.
- MENKOVIC, N., SAVIKIN, K., TASIC, S., ZDUNIC, G., STESEVIC, D., MILOSAVLJEVIC, S., VINCEK, D. (2011). Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J. Ethnopharmacol.* **133**(1): 97-107.
- MEZRAG, A., BOUHEROUM, M., BEGHIDJA, N., KHALFAOUI, A., ZAITER, L., BENAYACHE, S., BENAYACHE, F. (2013). More flavonoids from the ethyl acetate extract

- of *Ononis angustissima* species. *Chem. Nat. Compd.* **49**(4): 749-750.
- MHAMDI, B., ABBASI, F., ABDELLY, C. (2015). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal *Ononis natrix* growing wild in Tunisia. *Nat. Prod. Res.: Formerly Nat. Prod. Lett.* **29**(12): 1157-1160.
- MU, H., BAI, Y.H., WANG, S.T., ZHU, Z.M., ZHANG, Y.W. (2009). Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). *Phytomedicine* **16**: 314-319.
- OCAK, A., TOKUR, S. (2000). The flora of Gülümbe Dağı (Bilecik-Turkey). *Turk. J. Bot.* **24**: 121-141.
- ÖZBEK, H., ÖZTÜRK, A. (2003). Antienflamatuvar etkinliğin ölçülmesinde kullanılan yöntemler. *Van Tıp Derg.* **10**(1): 23-28.
- ÖZLER, M., TOPAL, T., KORKMAZ, A. (2007). Yara iyileşmesinin fizyolojik süreci. *Sendrom Ağustos 2007*: 43-49.
- ÖZLER, M., ÖZKAN, C., ERDOĞAN, E., TOPAL, T., SADIR, S., UYSAL, B., ŞÜKRÜ, Ö., KORKMAZ, A. (2009). Kronik yara iyileşmesi modelinde topikal nikotinamid ve asetil sisteinin etkileri. *Ulusal Cerrahi Derg.* **25**(4): 165-169.
- PARK, J.A., KIM, H.J., JIN, C., LEE, K.T., LEE, Y.S. (2013). A new pterocarpan, (-)-maackiain sulfate, from the roots of *Sophora subprostrata*. *Arch. Pharm. Res.* **26**(12): 1009-1013.
- PASCUAL-VILLALOBOS, M., ROBLEDO, A. (1999). Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. *Biochem. Syst. Ecol.* **27**: 1-10.
- PATTANAYAK, S.P., MITRA, MAZUMDER, P., SUNITA, P. (2011). Total phenolic content and *in vitro* antioxidant activities of *Dendrophthoe falcata* (L.f.) Ettingsh. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **3**(3): 1392-1406.
- PAULI, G.F. (2000). Comprehensive spectroscopic investigation of α -onoserin. *Planta Med.* **66**: 299-302.
- PDR for Herbal Medicines, 3rd ed., Thomson Healthcare Inc., Montvale, NJ (2004).
- PIERSEN, C.E. (2003). Phytoestrogens in botanical dietary supplements: Implications for cancer. *Integr. Cancer Ther.* **2**(2): 120-138.
- RASIK, A.M., RAGHUBIR, R., GUPTA, A., SHUKLA, A., DUBEY, M.P., SRIVASTAVA, S., JAIN, H.K., KULSHRESTHA, D.K. (1999). Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in guinea pigs. *J. Ethnopharmacol.* **68**: 261-266.
- RENDA, G., YALÇIN, F.N., NEMUTLU, E., KÜPELİ AKKOL, E., SÜNTAR, İ., KELEŞ, H., İNA, H., ÇALIŞ, İ., ERSÖZ, T. (2013). Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium* L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients. *J. Ethnopharmacol.* **148**: 423-432.

- REYES-BETANCORT, J.A., SCHOLZ, S. (2008). *Ononis catalinae* (Fabaceae), a new species from Canary Islands. *Ann. Bot. Fennici* **45**: 215-219.
- ROTE, N.S., HUETHER, S.E. (2010). Innate immunity: Inflammation, *Patophysiology The Biological Basis for Disease in Adults and Children*, Chapter 6, 6th edition, McCance, K.L., Huether, S.E., Brashers, V.L., Rote, N.S. (ed.). USA: Mosby Elsevier, p.: 183-216.
- ROWAN, M.G., DEAN, P.D.G. (1972). α -onoserin and sterol content of twelve species of *Ononis*. *Phytochemistry* **11**: 3263-3265.
- RUNJAIC-ANTIC, D., PAVKOV, S., LEVIC, J. (2010). Herbs in a sustainable animal nutrition. *Biotechnol. Anim. Husb.* **36**(3-4): 203-214.
- SADAF, F., SALEEM, R., AHMED, M., AHMAD, S.I., NAVAJD-UL, Z. (2006). Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in guinea pigs. *J. Ethnopharmacol.* **107**: 161-163.
- SAEED, A. (2003). Stereoselective synthesis of (3R)-3,4-dihydro-6,8-dimethoxy-3-undecyl-1H-[2]benzopyran-1-one and derivatives, metabolites from *Ononis natrix*. *Helv. Chim. Acta* **86**: 377-383.
- SAHASRABUDHE, A., DEODHAR, M. (2010). Anti-hyaluronidase, Anti-elastase Activity of *Garcinia indica*. *Int. J. Bot.* **6**(3): 299-303.
- SALTAN ÇİTOĞLU, G., ALTANLAR, N. (2003). Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. *J. Fac. Pharm. Ankara* **32**(3): 159-163.
- SAN FELICIANO, A., BARRERO, A.F., MEDARDE, M., DEL CORRAL, J.M.M., CALLE, M.V. (1983). An isocoumarin and other phenolic components of *Ononis natrix*. *Phytochemistry* **22**(9): 2031-2033.
- SAN FELICIANO, A., DEL CORRAL, J.M.M., CANEDO, L.M., MEDARDE, M. (1990). 3,4-dihydroisocoumarins from *Ononis natrix*. *Phytochemistry* **29**(3): 945-948.
- SASSI, A.B., HARZALLAH-SKHIRI, F., AOUNI, M. (2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharm. Biol.* **45**(5): 421-428.
- SEVER YILMAZ, B., ÖZBEK, H., SALTAN ÇİTOĞLU, G., UĞRAŞ, S., BAYRAM, I., ERDOĞAN, E. (2006). Analgesic and hepatotoxic effects of *Ononis spinosa* L. *Phytother. Res.* **20**: 500-503.
- SHAKER, K.H., DOCKENDORFF, K., BERNHARDT, M., SEIFERT, K. (2004). A new triterpenoid saponin from *Ononis spinosa* and two new flavonoid glycosides from *Ononis vaginalis*. *Z. Naturforsch.* **59b**: 124-128.
- SHARMA, V., RAMAWAT, K.G. (2013). Isoflavonoids, Natural Products, Ramawat, K.G. (ed.), Merillon, J.M. (ed.). Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 1849-1865.

- SHEN, P., LIU, M.H., NG, T.Y., CHAN, Y.H., YONG, E.L. (2006). Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPAR α , PPAR γ , and adipocyte differentiation *in vitro*. *J. Nutr.* **136**: 899-905.
- SHETTY S., UDUPA S., UDUPA L. (2008). Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of *Ocimum sanctum* Linn in rats, *eCAM* **5**(1): 95–101.
- SINGHAL, M., PAUL, A., SINGH, P.H., DUBEY, S.K., GAUR K. (2011). Evaluation of reducing power assay of chalcone semicarbazones. *J.Chem. Pharm. Res.* **3**(3): 639-645.
- SOURI, E., AMIN, G., DEHMOBED-SHARIFABADI, A., NAZIFI, A., FARSAM, H. (2004). Antioxidative Activity of sixty plants from Iran. *Iran. J. Pharm. Res.* **3**: 55-59.
- SUGUNA, L., SINGH, S., SIVAKUMAR, P., SAMPATH, P., CHANDRAKASAN, G. (2002). Influence of *Terminalia chebula* on dermal wound healing in rats. *Phytother. Res.* **16**: 227-231.
- SÜNTAR, İ., TATLI, İ., KÜPELİ AKKOL, E., KELEŞ, H., KAHRAMAN, Ç., AKDEMİR, Z. (2010). An ethnopharmacological study on *Verbascum* species: From conventional wound healing use to scientific verification. *J. Ethnopharmacol.* **132**: 408-413.
- SÜNTAR, İ. (2011). Türkiye’de Halk Arasında Yara İyileştirici Amaçla Kullanılan Bazı Bitkilerin Aktiviteleri Üzerinde Araştırmalar. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara.
- SÜNTAR, İ., BALDEMİR, A., COŞKUN, M., KELEŞ, H., KÜPELİ AKKOL, E. (2011). Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *J. Ethnopharmacol.* **135**: 63-70.
- ŞÖHRETOĞLU, D. (2011). *Ononis spinosa* Kayışkiran, FFD Monografıları Tedavide Kullanılan Bitkiler, Demirezer, Ö. (ed.). Ankara: NM Medikal & Nobel Tıp Kitap Sarayı, p.: 451-460.
- TALIB, W.H., MAHASNEH, A.M. (2010a). Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules* **15**: 1811-1824.
- TALIB, W.H., MAHASNEH, A.M. (2010b). Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci. Pharm.* **78**: 33-45.
- TALIB, W.H., MAHASNEH, A.M. (2012). Combination of *Ononis hirta* and *Bifidobacterium longum* decreases syngeneic mouse mammary tumor burden. *J. Canc. Res. Ther.* **8**(3): 417-424.
- TAWAHA, K., ALALI, F.Q., GHARAIBEH, M., MOHAMMAD, M., EL-ELIMAT, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* **104**: 1372-1378.

- TRENGOVE, N.J., STACEY, M.C., MACAULEY, S., BENNET, N., GIBSON, J., BURSLEM, F., MURPHY, G., SCHULTZ, G. (1999). Analysis of the acute and chronic wound environments: The role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep. Reg.* **7**: 442-452.
- TSANUO, M.K., HASSANALI, A., HOOPER, A.M., KHAN, Z., KABERIA, F., PISKETT, J.A., WADHAMS, L.J. (2003). Isoflavanones from the allelopathic aqueous root exudates of *Desmodium uncinatum*. *Phytochemistry* **64**: 265-273.
- TSUNODA, Y., OKAWA, M., KINJO, J., IKEDA, T., NOHARA, T. (2008). Studies on the constituents of *Gueldenstaedtia multiflora*. *Chem. Pharm. Bull.* **56**(8): 1138-1142.
- UGULU, I., BASLAR, S., YOREK, N., DOGAN, Y. (2009). The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province, Turkey. *J. Med. Plants Res.* **3**(5): 345-367.
- UMEHARA, K., NEMOTO, K., TERADA, E., MATSUSHITA, A., KIMIJIMA, K., MONTHAKANTIRAT, O., DE-EKNAMKUL, W., MIYASE, T., DEGAWA, M., NOGUCHI, H. (2006). Estrogenic compounds from the medicinal plant, *Dalbergia parviflora*. *Yakugaku Zasshi* **126**: 120-123.
- VALYOVA, M., HADJIMITOVA, V., STOYANOV, S., GANEVA, Y., TRAYKOV, T., PETKOV, I. (2008). Radical scavenger and antioksidant activities of extracts and fractions from Bulgarian *Ononis spinosa* L. and GC-MS analysis of ethanol extract. *The Internet Journal of Alternative Medicine* **7**(2).
- WANG, J., JIANG, W., WANG, Y. (2013). Anti-inflammation of flavonoid compounds from *Dalbergia odorifera* T. Chen in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 macrophages. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* **29**(7): 681-684.
- WOESSNER JB. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**: 440-447.
- WOLLENWEBER, E., DORR, M., RIVERA, D., ROITMAN, J.N. (2003). Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean *Ononis* species. *Z. Naturforsch.* **58c**: 771-775.
- WU, T., HE, M., ZANG, X., ZHOU, Y., QUI, T., PAN, S., XU, X. (2013). A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**: 2751-2756.
- YAGI, A., FUKUNAGA, M., OKUZAKO, N., MIFUCHI, I., KAWAMOTO, F. (1989). Antifungal substances from *Sophora flavescens*. *Shoyakugaku Zasshi* **43**(4): 343-347.
- YANG, N., LIANG, B., SRIVASTAVA, K., ZENG, J., ZHAN, J., BROWN, L.V., SAMPSON, H., GOLDFARB, J., EMALA, C., LI, X.M. (2013). The *Sophora flavescens* flavonoid compound trifolirhizin inhibits acetylcholine induced airway smooth muscle contraction. **95**: 259-267.

- YEŞİLADA E, KÜPELİ E. (2007). *Clematis vitalba* L. aerial parts exhibit potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects. *J. Ethnopharmacol.* **110**: 504-515.
- YOUCEF, M., CHALARD, P., FIGUEREDO, G., MARCHIONI, E., BENAYACHE, F., BENAYACHE, S. (2014). Chemical composition of the essential oil of *Ononis angustissima* (Lam.) Batt. Et Trab. *RJPBCS* **5**(5): 1307-1310.
- YU, D., DUAN, Y., BAO, Y., WEI, C., AN, L. (2005). Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *J. Ethnopharmacol.* **98**: 89-94.
- ZHAO, M., DUAN, J.A., CHE, C.T. (2007). Isoflavanones and their *O*-glycosides from *Desmodium styracifolium*. *Phytochemistry*, **68**:1471-1479.
- ZHAO, S., ZHANG, L., GAO, P., SHAO, Z. (2009). Isolation and characterisation of the isoflavones from sprouted chickpea seeds. *Food Chem.* **114**: 869-873.
- ZHAO, X., MEI, W., GONG, M., ZUO, W., BAI, H., DAI, H. (2011). Antibacterial activity of the flavonoids from *Dalbergia odorifera* on *Ralstonia solanacearum*. *Molecules* **16**: 9775-9782.
- ZHOU, H., LUTTERODT, H., CHENG, Z., YU, L. (2009). Anti-inflammatory and antiproliferative activities of trifolirhizin, a flavonoid from *Sophora flavescens* Roots. *J. Agric. Food. Chem.* **57**: 4580-4585.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Burçin
Soyadı : ERGENE ÖZ
Doğum yeri ve tarihi : Kadıköy-12.02.1985
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Evli
İletişim Adresi :Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi
Anabilim Dalı
Telefonu : 0 312 2033039

II- Eğitimi

2007-2009 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı
(Yüksek Lisans Eğitimi)
2003-2007 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans Eğitimi)
2000-2003 Ankara Fen Lisesi (Lise Eğitimi)
1996-2000 Konya Meram Anadolu Lisesi (Ortaokul Eğitimi)
1991-1996 Konya Gündoğdu Koleji (İlkokul Eğitimi)

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

III- Ünvanları

2009-Bilim Uzmanı

2007-Eczacı

IV- Mesleki Deneyimleri

2009-2015 Araştırma Görevlisi
(A.Ü. Eczacılık Fak. Farmakognozi ABD)

V- Bilimsel İlgi Alanlar

1- SCI kapsamında yer alan yayınlar

1. ILHAN, M., ERGENE, B., SÜNTAR, I., OZBİLGİN, S., SALTAN ÇİTOĞLU, G., DEMİREL, M.A., KELEŞ, H., ALTUN L., KÜPELİ AKKOL, E. (2014). Preclinical evaluation of antiurolithiatic activity of *Viburnum opulus* L. on sodium oxalate-induced urolithiasis rat model. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 01/2014; 2014:578103. DOI: 10.1155/2014/578103
2. BAHADIR-ACIKARA, Ö., KÜPELİ-AKKOL, E., SÜNTAR, İ., ERGENE, B., SALTAN-ÇİTOĞLU, G., ÇOBAN, T. (2014). Assessment of anti-inflammatory and free radical scavenger activities of selected *Scorzonera* species and determination of active components. *IJPP* 6(1): 59-65.
3. SEVER YILMAZ, B., ALTUN, M.L., ORHAN ERDOĞAN, İ., ERGENE, B., SALTAN, G. (2013). Enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Viburnum tinus* L. relevant to its neuroprotective potential. *Food Chem.* 141: 582-588.
4. SÜNTAR, İ., BAHADIR ACIKARA, Ö., SALTAN ÇİTOĞLU, G., KELEŞ, H., ERGENE, B., KÜPELİ AKKOL, E. (2012). *In vivo* and *in vitro* evaluation of the therapeutic potential of some Turkish *Scorzonera* species as wound healing agent. *Curr. Pharm. Des.* 18(10): 1421-1433.
5. KÜPELİ AKKOL, E.,BAHADIR ACIKARA, Ö., SÜNTAR, İ., EGENE, B., ÇİTOĞLU, G. (2012). Ethnopharmacological evaluation of some *Scorzonera* species: *in vivo* anti-inflammatory and antinociceptive effects. *J. Ethnopharmacol.* 140(2): 261-270.
6. KÜPELİ AKKOL, E., BAHADIR ACIKARA, Ö., SÜNTAR, İ., SALTAN, G., ERGENE, B., KELEŞ, H. (2011). Enhancement of wound healing by topical

application of *Scorzonera* species: Determination of the constituents by HPLC with new validated reverse phase method *J. Ethnopharmacol.* **137**: 1018-1027.

2- SCI-Expanded kapsamında yer alan yayınlar

ERYILMAZ, M., ÖZBİLGİN, S., ERGENE, B., SEVER YILMAZ, B., ALTUN, M.L., SALTAN, G. (2013). Antimicrobial activity of Turkish *Viburnum* species. *Bangladesh J. Bot.* **42**(2): 355-360.

3- Uluslararası hakemli dergilerdeki yayınlar

BAHADIR ACIKARA, Ö., SALTAN ÇİTOĞLU, G., ERGENE, B., ÇOBAN, T. (2010). Antioxidant activity of some *Scorzonera* species. *Pharmacognosy Magazine* **6**(22).

SEVER YILMAZ, B., ERGENE, B., SALTAN ÇİTOĞLU, G. (2015). Determination of total *ortho*-dihydroxycinnamic acid derivatives and flavonoid contents of *Ballota* species growing in Turkey. *Turk. J. Pharm. Sci.* **12**(1): 67-74.

4- Ulusal hakemli dergilerdeki yayınlar

ERGENE, B., BAHADIR ACIKARA, Ö., BAKAR, F., SALTAN, G., NEBİOĞLU, S. (2010). Antioxidant activity and phytochemical analysis of *Alchemilla persica* Rothm. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University* **39**(2): 145.

5- Diğer yayınlar

1. ERGENE, B. (2011). Kırmızıbiber ve kapsaisin, *Modern Fitofarmakoterapi ve Doğal Farmasötikler* **1**(4): 40-48.

2. ERGENE, B., KONUKLUGİL, B. (2009). Denizler yeni ilaçların kapısı mı? *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi* **42**: 495.

6- Uluslararası kitap bölüm yazarlığı

BAHADIR ACIKARA, Ö., SALTAN ÇİTOĞLU, G., ÖZBİLGİN, S., ERGENE, B. (2012). Affinity chromatography and importance in drug discovery, *Column Chromatography*, Chapter 3, Martin, D. F., Martin B. B. (ed.). In Tech, p.: 59-97.

7- Uluslararası Poster Sunum Listesi

1. KÜPELİ AKKOL, E., DEMİREL, M. A., BAHADIR ACIKARA, Ö., SÜNTAR, İ., ERGENE, B., İLHAN, M., ÖZBİLGİN, S., SALTAN, G., KELEŞ, H., TEKİN, M. (2014). Investigations on the activity of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and *Alchemilla persica* Rothm. in the experimentally induced endometriosis model in rats and phytochemical characterization of the active extract. *9. Symposium on International Chromatography of Natural Products*, Polonya.
2. ERGENE, B., BAHADIR ACIKARA, Ö., KÜPELİ AKKOL, E., SÜNTAR, İ., SALTAN, H. G., ÇOBAN, T. (2013). Assessment of anti-inflammatory and free radical scavenger activities of selected *Scorzonera* species and determination of active components. *Workshop on Plant Products Chemistry International Symposium on Medicinal-Aromatic Plants*, İzmir, Türkiye.
3. ÖZBİLGİN, S., ALTUN, M.L., SEVER YILMAZ, B., ERGENE, B., SALTAN, H. G. (2012). HPLC method for the analysis of chlorogenic acid of *Viburnum tinus* L. and *Viburnum orientale* Pallas. *13th International Congress of The Society For Ethnopharmacology (ISE 13)*, Graz, Austria.
4. ALTUN, M.L., ORHAN, İ. E., SEVER YILMAZ, B., ERGENE, B., SALTAN, H. G. (2011). *In vitro* neuroprotective potential of the leaf, branch and fruit extracts of *Viburnum tinus* L. (laurustinus) via enzyme inhibition and antioxidant capacity. *The XV. International Congress Phytopharm*, St Petersburg, Russia.

8- Ulusal Poster Sunum Listesi

1. ŞABANOĞLU, S., KHAZNEH, E., SALTAN, G., TEKİN, M., ACIKARA-BAHADIR Ö., ERGENE, B. (2014). *Achillea sintenisii* Hub. Mor. türünün fenolik bileşiklerinin araştırılması. 21. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Kayseri, Türkiye.
2. SÜNTAR, İ., BAHADIR ACIKARA, Ö., SALTAN ÇİTOĞLU, G., ERGENE, B., KÜPELİ AKKOL, E. (2012). Türkiye'de yetişen bazı *Scorzonera* türlerinin yara iyileştirici etkileri üzerinde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar. 20. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Antalya.
3. BAHADIR ACIKARA, Ö., KÜPELİ AKKOL, E., SÜNTAR, İ., ERGENE, B., SALTAN, H. G. (2012). Bazı *Scorzonera* türlerinin antiinflamatuvar aktivitelerinin değerlendirilmesi. 20. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Antalya.
4. ÖZBİLGİN, S., ERYILMAZ, M., ERGENE B., SEVER YILMAZ, B., ALTUN, M.L., SALTAN, H. G. (2012). Türkiye'de yetişen *Viburnum* türlerinin antimikrobiyal aktivitesi. 20. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Antalya.
5. ALTUN, M.L., SEVER YILMAZ, B., ÖZBİLGİN, S., ERGENE, B., SALTAN, H. G. (2012). *Viburnum tinus* L. ve *Viburnum orientale* Pallas türlerinde YBSK yöntemi ile klorojenik asit miktar tayini. 20. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Antalya.
6. BAHADIR ACIKARA, Ö., SALTAN ÇİTOĞLU, G., ERGENE, B., ÇOBAN, T. (2010). Bazı *Scorzonera* türlerinin antioksidan etki potansiyelinin araştırılması. 19. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Mersin.

VI- Bilimsel Etkinlikleri

1- Ulusal Burslar

Ergene Burçin, TÜBİTAK Yurtiçi Yüksek Lisans Bursu, Eylül 2007- Ocak 2009
 Ergene Burçin, TÜBİTAK Yurtiçi Doktora Bursu, 2009-2013

2- Ulusal Projeler

1. Gülçin Saltan, Burçin Ergene, Türkiye’de Yetişen Bazı Ononis Türlerinin Taşıdığı Yara İyileştirici ve Anti-Enflamatuvar Etkili Bileşiklerin Araştırılması, Bilimsel Araştırmalar (BAP), Lisansüstü Tez Projesi, 2013-2015.
2. Gülçin Saltan, Özlem Bahadır Acıkara, Serkan Özbilgin, Burçin Ergene, Türkiye’de Yetişen Bazı Scorzonera L. Türlerinin Fenolik Bileşiklerinin Araştırılması, Bilimsel Araştırmalar (BAP) Projesi, 2013 (Devam ediyor).
3. Deniz Çayı (Zostera spp.) Ölü Yaprak Ekstraktının Patojen Bakterilere Karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Artemia naupliilerinin Bakteriyel Yükünü Azaltmada Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi, TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projesi, 2014 (Devam ediyor).
4. Güvenli ve etkili bitki çayı demleme makinesi yazılımının geliştirilmesi amacıyla çay olarak kullanılan bitkilerin etkinlik ve güvenilirliklerinin araştırılması, Ankara Üniversitesi, Ar-Ge Projesi, 2014 (Devam ediyor).

3- Seminer Sunumu

1. Kitin ve Kitozan (Yüksek Lisans Semineri), 2008
2. Endofitik Mantarlar (Doktora Semineri), 2010.
3. Bitkilerde DNA (Doktora Semineri), 2010

VII- Diğer Bilgiler

1- Sertifikalar

- Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası (ANKÜSEM), 2010.