



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TÜRKİYE’DE HALK ARASINDA YARA İYİLEŞTİRİCİ
OLARAK KULLANILAN BAZI EUPHORBIA L.
TÜRLERİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK
ARAŞTIRMALAR**

Serkan ÖZBİLGİN

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

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

2015- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’DE HALK ARASINDA YARA İYİLEŞTİRİCİ
OLARAK KULLANILAN BAZI EUPHORBIA L.
TÜRLERİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK
ARAŞTIRMALAR**

Serkan ÖZBİLGİN

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

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

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü’nün
13L3336004 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2015**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "TÜRKİYE'DE HALK ARASINDA YARA İYİLEŞTİRİCİ OLARAK KULLANILAN BAZI *EUPHORBIA* L. TÜRLERİ ÜZERİNDE FARMAKOĞNOZİK ARAŞTIRMALAR" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Serkan ÖZBİLGİN

Tarih: 06.11.2015

İmza:

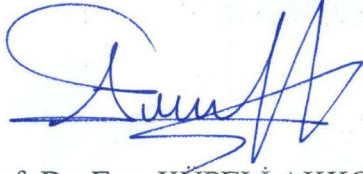


Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalında
Serkan ÖZBİLGİN tarafından hazırlanan
“TÜRKİYE’DE HALK ARASINDA YARA İYİLEŞTİRİCİ OLARAK
KULLANILAN BAZI *EUPHORBIA* L. TÜRLERİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile
KABUL edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06.11.2015



Prof. Dr. Gülçin SALTAN İŞCAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Betül SEVER YILMAZ
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Ömür DEMİREZER
Hacettepe Üniversitesi



Prof. Dr. M. Levent ALTUN
Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Botanik Özellikler	8
1.1.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri	8
1.1.2. Euphorbiaceae (Sütleğengiller) Familyasının Botanik Özellikleri	8
1.1.3. <i>Euphorbia</i> L. Cinsinin Botanik Özellikleri	8
1.1.4. Çalışma Konusu Olarak Seçilen Türlerin Tayin Anahtarı	9
1.2. <i>Euphorbia</i> L. Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	11
1.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	11
1.2.1.1. Terpenik Bileşikler	11
1.2.1.1.1. Seskiterpen Yapısındaki Bileşikler	11
1.2.1.1.2. Diterpen Yapısındaki Bileşikler	14
1.2.1.1.3. Triterpen Yapısındaki Bileşikler	34
1.2.1.1.4. Steroller	45
1.2.1.2. Flavonoidler	51
1.2.1.3. Fenolik Bileşikler	60
1.2.1.4. Uçucu Bileşikler	64
1.2.1.5. Diğer Bileşikler	66
1.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	70
1.2.2.1. Antiinflamatuar Aktivite	70
1.2.2.2. Antioksidan Aktivite	72
1.2.2.3. Analjezik Aktivite	75
1.2.2.4. Hepatoprotektif Aktivite	76
1.2.2.5. Antikanser Aktivite	78
1.2.2.6. Antimikrobiyal Aktivite	81
1.2.2.7. Antialerjik Aktivite	83
1.2.2.8. Antiproliferatif Aktivite	84
1.2.2.9. Antikonvülzan Aktivite	84
1.2.2.10. Antiviral Aktivite	85
1.2.2.11. Mollusisidal Aktivite	87
1.2.2.12. Yara İyi Edici Aktivite	88
1.2.2.13. Diğer Aktiviteler	89
1.2.3. Klinik Çalışmalar	91
1.2.4. Toksisite Çalışmaları	92

1.3. Enflamasyon	95
1.4. Yara	96
1.4.1. Yara Tipleri	97
1.4.1.1. Akut Yaralar	97
1.4.1.2. Kronik Yaralar	98
1.4.2. Yara İyileşmesi ile İlgili Genel Bilgiler	98
1.4.2.1. Yara İyileşme Evreleri	98
1.4.2.1.1. Hemostaz ve Enflamasyon Evresi	99
1.4.2.1.2. Proliferasyon Evresi	100
1.4.2.1.3. Maturasyon ve Remodeling Evresi	101
1.4.2.2. Yara İyileşmesinin Tipleri	102
1.4.2.2.1. Birincil (Primer) Yara İyileşmesi	102
1.4.2.2.2. İkincil (Sekonder) Yara İyileşmesi	102
1.4.2.2.3. Tersiyer (Gecikmiş Primer) Yara İyileşmesi	103
1.4.2.3. Yara İyileşmesine Etki Eden Faktörler	103
1.4.2.4. Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Faktörler	105
1.4.2.4.1. Antimikrobiyal Aktivite	105
1.4.2.4.2. Antioksidan Aktivite	105
1.4.2.4.3. Antienflamatuvar Aktivite	105
1.4.2.4.4. Analjezik Aktivite	106
1.5. Yara İyileşmesinin Değerlendirilmesi	106
1.5.1. <i>In Vitro</i> Çalışmalar	106
1.5.2. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	106
1.6. Antienflamatuvar Etkinin Değerlendirilmesi	107
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. Gereç	108
2.1.1. Bitkisel Materyal	108
2.1.2. Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Gereçler	114
2.2. Yöntem	117
2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	117
2.2.1.1. Ekstraksiyon Çalışmaları	117
2.2.1.1.1. Ön Tarama Çalışmaları: Hekzan, Etil Asetat ve Metanol Ekstrelerinin Hazırlanması	117
2.2.1.1.2. Total Hekzan, Etil Asetat ve Metanol Ekstrelerinin Hazırlanması	118
2.2.1.2. Kromatografik Çalışmalar	118
2.2.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi	118
2.2.1.2.2. Kolon Kromatografisi	121
2.2.1.2.2.1. Açık Kolonun Hazırlanması	121
2.2.1.2.2.2. Metanollü Ekstrenin Kolona Uygulanması	121
2.2.1.2.2.3. Metanollü Ekstrenin Fraksiyonlandırılması	122
2.2.1.2.2.4. Sefadeks Kolonun Hazırlanması	123
2.2.1.2.2.5. Fraksiyonların Sefadeks Kolona Uygulanması	123
2.2.1.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analizleri	124
2.2.1.2.3.1. Standart Çözeltilerin ve Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	124
2.2.1.2.3.2. Numune Çözeltilerin Hazırlanması	125
2.2.1.2.3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analiz Koşulları	126
2.2.2. Analitik Yöntemin Validasyonu	126

2.2.2.1. Doğrusallık ve Aralık	126
2.2.2.2. Kesinlik	127
2.2.2.3. Teşhis Sınırı (LOD-Limit of Dedection)	127
2.2.2.4. Tayin Sınırı (LOQ-Limit of Quantification)	128
2.2.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini	128
2.2.3.1. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi	128
2.2.3.2. Kütle Spektroskopisi	129
2.2.3.3. UV Spektroskopisi	129
2.2.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	130
2.2.4.1. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Deney Hayvanları, Referans Maddeler ve Test Numunelerinin Hazırlanması	130
2.2.4.1.1. Deney Hayvanları	130
2.2.4.1.2. Biyolojik Aktivite Deneylerinde Kullanılan Referans Maddeler	130
2.2.4.1.3. Test Numunelerinin Hazırlanması	131
2.2.4.2. Yara İyileştirici Aktivite Tayini	131
2.2.4.2.1. <i>In Vivo</i> Deneyler	131
2.2.4.2.1.1. Çizgisel İnsizyon Yara Modeli	131
2.2.4.2.1.2. Dairesel Eksizyon Yara Modeli	132
2.2.4.2.2. Hidroksiprolin Tayini	132
2.2.4.2.3. Histopatolojik İncelemeler	133
2.2.4.2.4. <i>In Vitro</i> Deneyler	134
2.2.4.2.4.1. Hyaluronidaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi	134
2.2.4.2.4.2. Kolajenaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi	135
2.2.4.2.4.3. Elastaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi	135
2.2.4.3. Antienflamatuvar Aktivite Tayini	136
2.2.4.3.1. Asetik Asit Nedenli Kapiller Permeabilite Artışının İnhibisyonu (Whittle Yöntemi)	136
2.2.4.5. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	137
3. BULGULAR	
3.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular	138
3.1.1. Ekstraksiyon Çalışmalarına Ait Bulgular	138
3.1.1.1. Ön Tarama Çalışmaları ile İlgili Bulgular	138
3.1.1.2. Total Hekzan, Etil Asetat ve Metanol Ekstreleri ile İlgili Bulgular	139
3.1.2. Kromatografik Bulgular	140
3.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları	140
3.1.2.2. Kolon Kromatografisi Bulguları	148
3.1.2.2.1. Açık Kolon Kromatografisi Bulguları	148
3.1.2.2.2. Sefadeks Kolon Kromatografisi Bulguları	151
3.1.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Çalışmalarına Ait Bulgular	152
3.1.2.3.1. Standart Çözeltilerin ve Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ile İlgili Bulgular	152
3.1.2.3.2. Numune Çözeltilerin Hazırlanması ve Miktar Tayini ile İlgili Bulgular	154
3.2. Analitik Yöntemin Validasyonuna Ait Bulgular	156
3.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini Bulguları	157
3.3.1. EC-1 Bileşiğinin Yapı Tayini ile İlgili Bulgular	157

3.3.2. EC-2 Bileşiminin Yapı Tayini ile İlgili Bulgular	169
3.3.3. EC-3 Bileşiminin Yapı Tayini ile İlgili Bulgular	181
3.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	193
3.4.1. Yara İyileştirici Aktivite Tayini Bulguları	193
3.4.1.1. <i>In Vivo</i> Deneylere Ait Bulgular	193
3.4.1.1.1. İnsizyon, Eksizyon Yara Modeli ve Hidroksiprolin Tayini Bulguları	193
3.4.1.1.2. Histopatolojik İnceleme Bulguları	201
3.4.1.2. <i>In Vitro</i> Deneylere Ait Bulgular (Hyaluronidaz, Kolajenaz ve Elastaz Enzim İnhibisyonu)	204
3.4.2. Antienflamatuvar Aktivite Tayini Bulguları	205
4. TARTIŞMA	207
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	216
ÖZET	218
SUMMARY	219
KAYNAKLAR	220
EKLER	237
EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Raporu	237
ÖZGEÇMİŞ	238

ÖNSÖZ

Doğal kaynaklardan köken alan yeni ilaçların geliştirilmesi, genellikle bitkilerin geleneksel kullanımına dayanır. Bu sebeple, ilaç geliştirilmesinde, etnobotanik çalışmaların incelenmesi ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi son derece önemlidir. Yapılan etnobotanik ve etnofarmakolojik çalışmalar ışığında dünyada *Euphorbia* türlerinin halk arasında deri hastalıklarında, yaralarda, migrende ve bağırsak parazitlerinde tedavi edici olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. Türkiye’de de bazı *Euphorbia* türlerinin toprak üstü kısımları ve lateksleri yara iyileştirici, egzemada, mantar enfeksiyonlarında, yanıklarda, akrep ve yılan sokmalarında tedavi edici olarak halk arasında kullanılmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılan bazı *Euphorbia* türlerinin bu kullanımlarının doğruluğunun araştırılması, elde edilen bulgularla bilimsel temellere oturtulması ve literatüre katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama çalışmaları ile de etkiden sorumlu maddelerin tespiti, bu maddelerin saf olarak elde edilmesi ve yapı tayinlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir.

Tez çalışmamı yöneten, bilgi ve tecrübesiyle her zaman bana destek olan, hüznümü ve sevincimi paylaşan danışmanım Sayın Prof. Dr. H. Gülçin SALTAN İŞCAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında biyolojik aktivite deneylerini birlikte yürüttüğümüz, bilgilerini benimle paylaşan, özverili çalışmalarıyla bana destek olan hocam Sayın Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL’a ve arkadaşım Sayın Doç. Dr. İpek SÜNTAR’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında ve doktora eğitimim boyunca bana her türlü yardımı sağlayan Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda yararlandığım Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarlarının işleyişine öncülük eden ve desteğiyle birçok araştırmacıya çalışma imkanı sağlayan Dekanımız Sayın Prof. Dr. Gülbin ÖZÇELİKAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Yapı tayini çalışmalarım süresince yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Hakan GÖKER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bitkisel materyalin tayin anahtarı çalışmaları sırasında yardımları için hocam Sayın Prof. Dr. Ayşegül KÖROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübesini benimle sonuna kadar paylaşan, izole edilen bileşiklerin yapı tayini çalışmalarını gerçekleştiren arkadaşım, hocam Sayın Doç. Dr. Özlem BAHADIR ACIKARA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteğini hep hissettiğim, ihtiyacım olan her anda yardımına koşan çalışma arkadaşım Dr. Ecz. Burçin ERGENE ÖZ'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının başından sonuna kadar her anında yanımda olan, sabrı ve desteğiyle bana güç veren en büyük destekcim biricik eşim Uzm. Ecz. Nalan Deniz ÖZBİLGİN'e minnettarım.

Sevgi ve güvenleriyle bana destek olan, üzüntümü ve sevincimi benimle paylaşan, hep arkamda duran canım annem, babam, birtanecik kardeşim ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AEF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
AST	Aspartat aminotransferaz
ATCC	American Type Culture Collection
BAYF	Biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama
β	Beta
BHT	Butillenmiş hidroksitoluen
BSS	Bağıl standart sapma
CCl_4	Karbontetraklorür
ChC	<i>Clostridium histolyticum</i> kolajenaz
CHCl_3	Kloroform
cm	Santimetre
CMC	Karboksimetilselüloz
COSY	Correlation spectroscopy
COX	Siklooksijenaz
CUFH	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
DAD	Diode array dedector
dak	Dakika
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EC_{50}	The term half maximal effective concentration (maksimum etki görülen konsantrasyonun yarısı)
EtOAc	Etil asetat
FALGPA	<i>N</i> -[3-(2-furil) akrilolil]-Leu-Gly-Pro-Ala
FEER	Fecal egg count reducing (fekal yumurta sayısında azalma)
FID	Flame ionisation dedector (alev iyonizasyon dedektör)

FRAP	Ferric reducing antioxidant power (demir indirgeyici antioksidan güç)
FTC	Demir tiyosiyonat
γ	Gama
GC	Gaz kromatografisi
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
HE	Hemotoksilen-eozin
HIV	Human immunodeficiency virus
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HNE	Human neutrophil elastase (insan nötrofil elastaz)
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration (<i>in vitro</i> testlerde %50 inhibisyon oluşturan konsantrasyon)
IL	İnterlökin
İTK	İnce tabaka kromatografisi
KK	Kolon kromatografisi
LC	Liquid chromatography (sıvı kromatografisi)
LD ₅₀	The half maximal lethal concentration (testlerde deneklerin %50'sini öldüren konsantrasyon)
LOD	Limit of detection (teşhis edilebilir en düşük limit - teşhis sınırı)
LOQ	Limit of quantification (hesaplanabilir en düşük limit - tayin sınırı)
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molar
MAAPVN	<i>N</i> -(metoksisukkinil)-Ala-Ala-Pro-Val 4-nitroanilid
MeOD	Dötero metanol
MeOH	Metanol
μ L	Mikrolitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimol

MIC	Minimum inhibitory concentration (minimum inhibitör konsantrasyonu)
MS	Mass spectroscopy (kütle spektroskopisi)
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NO	Nitrik oksit
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
OBSK	Orta basınçlı sıvı kromatografisi
OSH	Ortalama standart hata
PDGF	Platelet-derived growth factor (platelet kaynaklı büyüme faktörü)
ppm	Milyonda bir kısım
R _f	Retention factor (retansiyon faktörü)
R _t	Retention time (retansiyon zamanı)
RC ₅₀	Radikal süpürücü maksimum konsantrasyonun yarısı
°C	Santigrat derece
TAC	Total antioksidan kapasite
TGF	Tumor growth factor (tümör büyüme faktörü)
TNF	Tumor necrosis factor (tümör nekroz faktörü)
TOCSY	Total correlation spectroscopy
TPA	12-O-tetradekanilforbol-13-asetat
UV	Ultraviyole
VLC	Vacuum liquid chromatography (vakum sıvı kromatografisi)
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
XTT	Sodyum 3'-[(fenilamino-karbonil)-3,4 tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	<i>Euphorbia</i> türlerinden izole edilen bazı seskiterpenik bileşikler	12
Şekil 1.2.	<i>Euphorbia</i> türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler	18
Şekil 1.3.	<i>Euphorbia</i> türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler	36
Şekil 1.4.	<i>Euphorbia</i> türlerinden izole edilen bazı steroller	46
Şekil 1.5.	<i>Euphorbia</i> türlerinden izole edilen bazı flavonoidler	53
Şekil 1.6.	<i>Euphorbia</i> türlerinden izole edilen bazı fenolik bileşikler	61
Şekil 1.7.	<i>Euphorbia</i> türlerinde bulunan bazı uçucu bileşikler	65
Şekil 1.8.	<i>Euphorbia</i> türlerinde bulunan bazı diğer bileşikler	66
Şekil 2.1	<i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.	109
Şekil 2.2.	<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	110
Şekil 2.3.	<i>Euphorbia characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> (Hoppe ex Koch) Smith	111
Şekil 2.4.	<i>Euphorbia virgata</i> Waldst. & Kit.	112
Şekil 2.5.	<i>Euphorbia seguieriana</i> subsp. <i>seguieriana</i> Necker.	113
Şekil 2.6.	Kolon kromatografisi çalışmasına ait bir resim	122
Şekil 3.1.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> total metanol ekstresinin hazırlanışı	139
Şekil 3.2.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> metanollü ekstresinin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması çalışmasında kullanılan çözücü sistemlerinin bulunması için yapılan İTK çalışmalarına ait kromatogramlar	140
Şekil 3.3.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen 6.-23. fraksiyonların İTK kromatogramları	143
Şekil 3.4.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen 23.-41. fraksiyonların İTK kromatogramları	144
Şekil 3.5.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen 30.-49. fraksiyonların İTK kromatogramları	145

Şekil 3.6.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen ve biyolojik aktivite tayini için birleştirilen [1-7]=MEOH-1; [8-12]=MEOH-2; [13-17]=MEOH-3; [18-23]=MEOH-4; [24-30]=MEOH-5; [31-33]=MEOH-6; [(34-41)+(42-48)+(49-52)+(53-64)]=MEOH-7 fraksiyonlarının İTK kromatogramları	146
Şekil 3.7.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen 9. fraksiyonun sefadeks kolon ile alt fraksiyonlarına ayrılarak saf maddelerin eldesini gösteren İTK kromatogramları	147
Şekil 3.8.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> metanollü ekstresinden izole edilen bileşikler ve izolasyon şeması	150
Şekil 3.9.	EC-1 bileşiği için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemi	153
Şekil 3.10.	EC-2 bileşiği için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemi	153
Şekil 3.11.	EC-3 bileşiği için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemi	153
Şekil 3.12.	İzole edilen saf maddelerin YPSK kromatogramı	155
Şekil 3.13.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> total ekstresinin YPSK kromatogramı	155
Şekil 3.14.	İzole edilen saf maddelerin 254 nm dalga boyundaki UV spektrumları	156
Şekil 3.15.	EC-1 bileşiğinin izolasyon şeması	157
Şekil 3.16.	EC-1 bileşiğinin yapı tayini bulguları	158
Şekil 3.17.	EC-1 bileşiğinin ES MS spektrumu	160
Şekil 3.18.	EC-1 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	161
Şekil 3.19.	EC-1 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	162
Şekil 3.20.	EC-1 bileşiğinin DEPT spektrumu	163
Şekil 3.21.	EC-1 bileşiğinin HMBC spektrumu	164
Şekil 3.22.	EC-1 bileşiğinin HSQC spektrumu	165
Şekil 3.23.	EC-1 bileşiğinin NOESY spektrumu	166
Şekil 3.24.	EC-1 bileşiğinin COSY spektrumu	167
Şekil 3.25.	EC-1 bileşiğinin TOCSY spektrumu	168
Şekil 3.26.	EC-2 bileşiğinin izolasyon şeması	169

Şekil 3.27.	EC-2 bileşiğinin yapı tayini bulguları	170
Şekil 3.28.	EC-2 bileşiğinin ES MS spektrumu	172
Şekil 3.29.	EC-2 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	173
Şekil 3.30.	EC-2 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	174
Şekil 3.31.	EC-2 bileşiğinin DEPT spektrumu	175
Şekil 3.32.	EC-2 bileşiğinin HMBC spektrumu	176
Şekil 3.33.	EC-2 bileşiğinin HSQC spektrumu	177
Şekil 3.34.	EC-2 bileşiğinin NOESY spektrumu	178
Şekil 3.35.	EC-2 bileşiğinin COSY spektrumu	179
Şekil 3.36.	EC-2 bileşiğinin TOCSY spektrumu	180
Şekil 3.37.	EC-3 bileşiğinin izolasyon şeması	181
Şekil 3.38.	EC-3 bileşiğinin yapı tayini bulguları	182
Şekil 3.39.	EC-3 bileşiğinin ES MS spektrumu	184
Şekil 3.40.	EC-3 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	185
Şekil 3.41.	EC-3 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu	186
Şekil 3.42.	EC-3 bileşiğinin DEPT spektrumu	187
Şekil 3.43.	EC-3 bileşiğinin HMBC spektrumu	188
Şekil 3.44.	EC-3 bileşiğinin HSQC spektrumu	189
Şekil 3.45.	EC-3 bileşiğinin NOESY spektrumu	190
Şekil 3.46.	EC-3 bileşiğinin COSY spektrumu	191
Şekil 3.47.	EC-3 bileşiğinin TOCSY spektrumu	192
Şekil 3.48.	Test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının hematoksilin-eozin ile boyanmasının ardından ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	203

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Türkiye’de halk arasında kullanılan bazı <i>Euphorbia</i> türleri ve kullanım amaçları	5
Çizelge 2.1.	Bitkisel materyalin toplandığı lokaliteler	108
Çizelge 2.2.	Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri	115
Çizelge 2.3.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> ’nin metanollü ekstresinin kolon kromatografisi elüsyonunda kullanılan çözücü karışımı tespiti için denenen ve toplanan fraksiyonların İTK analizlerinde plaklardaki lekelerin takibini yapmak ve ayrımını gözlemlemek için kullanılan İTK çözücü sistemleri	120
Çizelge 2.4.	YPSK analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi	126
Çizelge 3.1.	<i>Euphorbia</i> türlerinden yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktivite açısından aktif tür/türlerin tespiti amacıyla ön tarama çalışmaları için hazırlanan ekstrelerin miktarları	138
Çizelge 3.2.	Kolon kromatografisinde elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü oranları	148
Çizelge 3.3.	<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> ’deki EC-1, EC-2 ve EC-3 miktarları	154
Çizelge 3.4.	Analitik yöntem validasyonuna ait bulgular	156
Çizelge 3.5.	EC-1 bileşiğinin ^1H ve ^{13}C NMR bulguları	158
Çizelge 3.6.	EC-2 bileşiğinin ^1H ve ^{13}C NMR bulguları	170
Çizelge 3.7.	EC-3 bileşiğinin ^1H ve ^{13}C NMR bulguları	182
Çizelge 3.8.	<i>Euphorbia</i> türlerinden hazırlanan test numunelerinin insizyon yara modeli üzerindeki etkileri	194
Çizelge 3.9.	<i>Euphorbia</i> türlerinden hazırlanan test numunelerinin eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri	196

Çizelge 3.10.	Birleştirilen fraksiyonlardan hazırlanan test numunelerinin insizyon yara modeli üzerindeki etkileri	199
Çizelge 3.11.	Birleştirilen fraksiyonlardan hazırlanan test numunelerinin eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri	200
Çizelge 3.12.	Test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları	202
Çizelge 3.13.	İzole edilen bileşiklerin hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzim inhibisyonu üzerindeki etkileri	204
Çizelge 3.14.	<i>Euphorbia</i> türlerinden hazırlanan test numunelerinin Whittle yöntemi üzerindeki etkileri	205
Çizelge 3.15.	Birleştirilen fraksiyonlardan hazırlanan test numunelerinin Whittle yöntemi üzerindeki etkileri	206

1. GİRİŞ

Geçmişten günümüze kadar pek çok hastalığın tedavisinde ve hastalıktan korunmada insanlar doğal kaynakları kullanmışlar ve tedavilerinin büyük çoğunluğunda bitkilerden yararlanmışlardır (Uğulu ve ark., 2009). Hastalıklardan korunmada ve hastalıkların tedavisinde ilk başvurulacak kaynak bitkilerdir. Dünya genelinde geleneksel ve modern tedavide en az 50000 bitki türünün kullanıldığı bilinmektedir (Dey ve ark., 2008 ve Polat ve Satıl, 2012). Son yıllarda gelişen teknolojiyle beraber bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar artmış ve halk arasında kullanımlarının doğruluğu araştırma konusu haline gelmiştir. Bu amaçla günümüzde pek çok etnobotanik ve etnofarmakolojik çalışma yapılmaktadır (Kültür, 2007).

Etnobotanik çalışmalara imkan sağlayan en önemli faktör, Türkiye'nin doğal bitki örtüsü zenginliği ve geleneksel toplum yapısıdır (Uğulu ve ark., 2009). Türkiye'nin coğrafi konumu, floristik ve iklimsel özellikleri 10000'in üzerinde bitki türünün ülkemizde yaşamasına olanak sağlamaktadır. Bunlardan yaklaşık %30'u endemiktir (Baytop, 1999). Bu sayede pek çok tıbbi bitki de halk arasında kullanılmakta ve bu bitkiler üzerinde bilimsel araştırma yapma şansı doğmaktadır.

Doğal kaynaklardan köken alan yeni ilaçların geliştirilmesi, genellikle bitkilerin geleneksel kullanımına dayanır. Bu sebeple, ilaç geliştirilmesinde, etnobotanik çalışmaların incelenmesi ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi son derece önemlidir. Halk arasında ilaç olarak kullanılan bitkilerin etkilerinin araştırılması, söz konusu bitkilerin halk arasındaki kullanımının bilimsel çalışmalarla doğrulanmasını sağlamaktadır (Agelet ve Valles, 2003 ve Kültür, 2007).

Yeni ilaçların keşfinde bitkiler dünyada çok değerli birer kaynaktır. Ülkelerin geleneksel bilgi birikimi ve zengin floraları bu amaç için araştırılmaktadır. Etnobotanik ve etnofarmakolojik çalışmaların sayısı ve önemi artmasına karşın dünyada doğal yaşam alanları ve bitki örtüsü hızla yok olmakta, etnobotanik ve etnofarmakolojik çalışma alanları daralmaktadır. Şehirleşme ve göç ile beraber

modern ilaçlara erişimin kolaylaşması da geleneksel halk ilaçlarına olan ilgi ve önemin azalmasına sebep olmaktadır. Bu durum doğal kaynaklı ilaç hammaddelerinin keşfinde zorluk yarattığı gibi sentetik kökenli ilaçların sayısının her geçen gün artmasına neden olmaktadır (Yeşilada, 2005).

Bitkisel ürünlerin piyasadaki öneminin artması, halkın tedavi ve koruyucu amaçla bu ürünlere yönelmesi bilimsel olarak oldukça değerli olan bu bilgileri, ekonomik açıdan da önemli kılmış, halk sağlığı açısından da bitkiler üzerinde yapılan bilimsel çalışmaların artırılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Türkiye’de bitkilerin geleneksel tedavide kullanımı bu topraklarda yaşamış çok eski kültürlerle dayanmaktadır. Osmanlı İmparatorluğu dönemindeki tarihi kayıtlarda çok sayıda bitki yer almaktadır. Anadolu medeniyetlerinin oluşturduğu kültür birikimi geleneksel tedavide de gelişimi sağlamıştır. Ülkemiz topraklarında yaşamış olan Yunanlılar, Romalılar, Moğollar ve Türklerin gelenek ve görenekleri geleneksel tedavi ve halk ilaçları alanındaki bu birikimi nesilden nesile aktarmıştır (Yeşilada, 2005). Cumhuriyet’in ilanından sonra da hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkilerin isimlendirilmesinde ve etkilerinin tespitinde hızlı gelişmeler yaşanmıştır. Son yıllarda etnobotanik ve etnofarmakolojik çalışmaların ve dokümantasyonun artmasıyla geleneksel tedavide kullanılan bitkilerin potansiyelinin farkına varılmış ve üzerinde önemle durulmuştur (Polat ve Satıl, 2012).

Euphorbia L. cinsi, Euphorbiaceae (Sütlegengiller) ailesinin en büyük üyesidir. Tek yıllık bitkilerden çok yıllık ağaçlara kadar 2000’in üzerinde türü tespit edilmiştir (Shi ve ark., 2008). Hemen hemen tüm türler lateks taşımaktadır. Tüm dünyada yetişen *Euphorbia* cinsinin önemli bir kısmı Güney Afrika ve Güney Amerika’da yayılış göstermekle beraber, Akdeniz ülkelerinde de yetişmektedir (Rahman ve Akter, 2013). Türkiye’de doğal olarak yetişen 94 *Euphorbia* türü tespit edilmiştir. Bunlardan 13’ü endemiktir (Davis, 1982).

Yapılan etnobotanik ve etnofarmakolojik çalışmalarda, dünyada *Euphorbia* türlerinin halk arasında deri hastalıklarında, yaralarda, migrende, romatizmada tedavi edici olarak ve bağırsak parazitlerine karşı kullanıldığı bildirilmiştir (Tang ve ark., 2012). Afrika’da *Euphorbia heterophylla* L. yaprakları, kökleri ve lateksi antikanser amaçla (Ajose, 2007), *Euphorbia balsamifera* Ait. kökleri, *Euphorbia sudanica* A. Chev kökleri ve lateksi (Inngjerdingen ve ark., 2004), *Euphorbia clavarioides* Boiss. kökleri yaraların tedavisinde halk arasında kullanılmaktadır (Shale ve ark., 1999).

Hindistan’da *Euphorbia neriifolia* L. ve *Euphorbia caducifolia* Haines. lateksinin enflamasyonda, yaraların tedavisinde, ateş düşürücü olarak ve *Euphorbia prostrata* Ait.’in romatizma tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Goyal ve ark., 2011; Nagori ve Solanki, 2011 ve Namsa ve ark., 2009). Lübnan’da *Euphorbia falcata* L., *Euphorbia pilulifera* L., *Euphorbia peplis* L., *Euphorbia resinifera* Berg. ve *Euphorbia thamnoides* Boiss.’in yine romatizma tedavisinde halk arasında süt ve zeytin yağı ile karıştırılarak haricen kullanıldığı tespit edilmiştir (Marc ve ark., 2008).

Avustralya’da *Euphorbia drummondii* Boiss. romatizma tedavisinde, dizanteride ve kurt düşürücü olarak, *Euphorbia australis* Boiss. deri hastalıkları ile kanserde ve süt artırıcı olarak kullanılmaktadır (Li ve ark., 2003). Yine Avustralya’da *Euphorbia peplus* L.’nin de çeşitli kanserlerin tedavisinde halk arasında kullanıldığı bildirilmiştir (Ramsay ve ark., 2011).

Arjantin’de *Euphorbia portulacoides* L. dermatolojik rahatsızlıklarda (Estomba ve ark., 2006); Avrupa’da ise *Euphorbia helioscopia* L. kökleri, *E. peplus* yaprakları ve sapları deri hastalıkları ve yaraların tedavisinde halk arasında kullanılmaktadır (Brussell, 2004).

Çin’de de pek çok *Euphorbia* türü geleneksel tedavide kullanılmaktadır. Çin geleneksel tedavi kitabı olan ‘Dictionary of Chinese Traditional Drugs’ isimli kaynakta 32 *Euphorbia* türünün hastalıkların tedavisinde kullanıldığı kayıtlıdır. Bu

türlerden biri *Euphorbia kansui* L. ödem giderici ve kanserde halk arasında kullanılmakta olan en eski bitkilerden biridir. Çin’de ‘Gan Sui’ olarak isimlendirilir ve ‘*kansui*’ adı da buradan gelmektedir (Peng ve ark., 2012).

Güney Asya’da *Euphorbia hirta* L., *Euphorbia thymifolia* L. ve *Euphorbia tirucalli* L.’nin halk arasında astım ve öksürük tedavisinde, dizanteride, özellikle çocuklarda olmak üzere bağırsak kurtlarını düşürmede kullanıldığı bildirilmiştir. Bu amaçla türlerin lateksleri, infüzyon ve dekoksasyonları tercih edilmektedir (Rahman ve Akter, 2013). Bazı *Euphorbia* türlerinin İran’da pürgatif amaçla kullanıldığı da bildirilmiştir (Jassbi, 2006).

Türkiye’de *Euphorbia* türlerinin benzer amaçlarla kullanıldığı tespit edilmiştir. Türkiye’de halk arasında kullanımı olan bazı *Euphorbia* türlerinin Latince isimleri, yerel adları, kullanılan kısımları ve kullanım amaçları Çizelge 1.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Türkiye’de halk arasında kullanılan bazı *Euphorbia* türleri ve kullanım amaçları

Bilimsel adı	Yerel Adı	Kullanılan Kısım	Kullanım Amacı	Kaynak
<i>Euphorbia characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> (Hoppe ex W.Koch) A. R. Smith	Sütleğen	Lateks	Yara iyi edici	Tümen ve ark., 2006
<i>E. helioscopia</i> L.	Sütleğen	Lateks	Yara iyi edici	Demirci ve Özhatay, 2011
<i>Euphorbia myrsinites</i> L.	Sütleğen	Lateks	Kurt düşürücü	Ezer ve Avcı, 2004 ve Polat ve Satıl, 2012
<i>Euphorbia rigida</i> Bieb.	Sütleğen	Lateks	Kurt düşürücü, Hemoroit tedavisi, Yara iyi edici, Siğil tedavisi	Ezer ve Avcı, 2004; Ezer ve Mumcu Arısan, 2006 ve Gürhan ve Ezer, 2004;
<i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.	Sütlüceot, Sütleğen, Sütlüot	Lateks	Hemoroit tedavisi, Siğil tedavisi, Yara iyi edici, Yılan, akrep sokmalarında, Diş ağrısında ağrı kesici, Egzema, Mantar enfeksiyonlarının tedavisi	Altundağ ve Öztürk, 2011; Çakılcıoğlu ve ark., 2011; Gürhan ve Ezer, 2004; Oral, 2007; Yeşil, 2007 ve Yeşilada ve ark., 1995
<i>Euphorbia seguieriana</i> subsp. <i>seguieriana</i> Necker	Tasmaot Sütlüot	Lateks	Sıtmada ateş düşürücü, Antienflamatuvar, Yara iyi edici	Altundağ ve Öztürk, 2011 ve Yeşilada ve ark., 1999
<i>Euphorbia apios</i> L.	Sürgen otu	Kök	Laksatif	Polat ve Satıl, 2012
<i>Euphorbia stricta</i> L.	Sütleğen	Lateks	Diş ağrısında ağrı kesici	Kargioğlu ve ark., 2008
<i>Euphorbia agraria</i> Bieb.	Süt otu	Lateks	Yara iyi edici	Altundağ ve Öztürk, 2011 ve Sezik ve ark., 1997
<i>Euphorbia armena</i> Prokh.	Sütlübiyan	Lateks	Yara iyi edici, Kabızlıkta	Altundağ ve Öztürk, 2011
<i>Euphorbia falcata</i> L. subsp. <i>falcata</i> var. <i>falcata</i>	Sütleğen	Lateks	Egzema, Mantar enfeksiyonlarının tedavisi	Altundağ ve Öztürk, 2011
<i>Euphorbia heteradena</i> Jaub. & Spach.	Sütleğen	Lateks	Kabızlıkta	Altundağ ve Öztürk, 2011
<i>Euphorbia virgata</i> Waldst. & Kit.	Sütcan, Sütlücan	Çiçek	Egzema	Altundağ ve Öztürk, 2011 ve Sezik ve ark., 1997
<i>Euphorbia coniosperma</i> Boiss. & Buhse	Sütleğen, Sütlük	Lateks, Toprak üstü	Yılan, akrep sokmalarında, Siğil tedavisi	Sezik ve ark., 2001
<i>Euphorbia anacampseros</i> Boiss. var. <i>anacampseros</i>	Sütligen	Lateks	Yara iyi edici	Honda ve ark., 1996
<i>Euphorbia aleppica</i> L.	Sütlüot	Toprak üstü	Yara iyi edici	Honda ve ark., 1996 ve Yeşilada ve ark., 1995
<i>Euphorbia</i> sp.	Keringan	Lateks	Kabızlıkta	Tabata ve ark., 1994

Euphorbia cinsi, yüksek dozda deride tahriş edici etkileri bulunan ve tümör oluşumuna sebep olabilen diterpen yapısında bileşikler içerir (Öksüz ve ark., 1998). En önemli etken madde grubunu oluşturan diterpenoitler taksonomik açıdan da önemlidir. Yapılan çalışmalarda diterpenoitlerin farklı halka sistemlerini kapsadığı tespit edilmiştir. Jatrofan, latiran, mirsinan (Sulyok ve ark., 2011), tiglian, ingenan, dafnan (Jassbi, 2006), paralian, pepluan, segetan (Shi ve ark., 2008) önemli diterpenik halka sistemleridir. Fitokimyasal çalışmalar sonucunda *Euphorbia* türlerinin farklı kısımlarından (yaprak, toprak üstü kısım, lateks, kök, tohum vb.) seskiterpen yapısında bileşikler olan öfanginol, klovandiol, öforbiozit A, B (Shi ve ark., 2008), triterpen yapısında bileşikler olan lupeol, lupeol asetat, betulin, β -amirin ve bitkisel steroller (Patil ve ark., 2009), flavonoidlerden rutin, kemferol, mirsetin, kersetin ve diğer flavonoid glikozitleri (Noori ve ark., 2009), uçucu bileşiklerden terpinen, linalol, terpineol, karyofillen, humulen ve germakren (Fokialakis ve ark., 2003) izole edilmiştir.

Euphorbia türlerinin taşıdığı etkili bileşiklerden diterpen yapısındaki maddeler çeşitli yapılara sahip olup, çok sayıda farklı biyolojik etki gösterirler. Yapılan çalışmalarla makrosiklik yapıdaki diterpenlerin sitotoksik, antikanser, antimikrobiyal ve antienflamatuvar aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Demirkıran ve ark., 2011). Buna ek olarak ateş düşürücü ve ağrı kesici olarak etki gösterdikleri görülmüş, bazı bileşiklerin de insektisit etkili olduğu tespit edilmiştir (Jassbi, 2006 ve Shi ve ark., 2008).

Türkiye’de yetişen *Euphorbia* türleri üzerinde yapılan çalışmaların daha çok etnobotanik ve fitokimyasal çalışmalar olduğu görülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda bu bitkilerin çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiş; ancak bu kullanımlara temel oluşturan kimyasal bileşiklere yönelik yeterli çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile, bitkinin halk arasında kullanımı kimyasal bileşikleri açısından bilimsel temellere oturtulacak ve etkiden sorumlu bileşikler elde edilecektir. Böylece, bu konu üzerinde yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak, bitkilerin halk arasındaki kullanımının temel dayanağı bilimsel olarak araştırılmış olacaktır.

Mevcut çalışmalarda kullanılan *Euphorbia* türleri genellikle çalışmanın yapıldığı bölgede yetişen türler ile sınırlı kalmıştır. Bu nedenle Türkiye’de halk arasında kullanımı olan ve bilimsel çalışmalarla desteklenmeyi bekleyen, üzerinde sınırlı aktivite çalışması olan ya da henüz çalışılmamış türler çalışma konumuz olarak seçilmiştir.

Bu alışmada, Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılan ve üzerinde yeterli çalışma bulunmayan bitkiler arasından *E. macroclada*, *E. seguieriana* subsp. *seguieriana*, *E. characias* subsp. *wulfenii*, *E. virgata* ve *E. helioscopia* türleri seçilmiş ve bu materyallerden hazırlanan ekstrelerin yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktiviteleri test edilerek halk arasında kullanımlarının doğruluğunun bilimsel olarak araştırılması hedeflenmiştir. Söz konusu beş bitki türünden farklı polaritede ekstreler hazırlanarak biyolojik aktivitenin en yüksek olduğu tür tespit edildikten sonra biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ile en aktif fraksiyon/fraksiyonlardan kromatografik tekniklerle etkiden sorumlu bileşikleri izole etmek, saflaştırmak, UV (ultraviyole), NMR (nükleer manyetik rezonans) ve MS (ktle spektroskopisi) gibi spektral yöntemlerle yapılarının aydınlatılması ve aktiviteden sorumlu bileşik/bileşiklerin *in vivo* ve *in vitro* yöntemler kullanılarak etki şekillerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

1.1. Botanik Özellikler

1.1.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri

Alem	: Plantae
Bölüm	: Spermatophyta
Alt Bölüm	: Angiospermae
Sınıf	: Magnoliopsida
Alt Sınıf	: Rosidae
Takım	: Euphorbiales
Familya	: Euphorbiaceae
Alt Familya	: Euphorbioideae
Cins	: <i>Euphorbia</i> L.

1.1.2. Euphorbiaceae (Sütleğengiller) Familyasının Botanik Özellikleri

Tropik ve ılıman bölgelerde yetişen çalı veya ağaç formunda bitkiler, bazıları sukkulent, çoğunluğu monoik, bazıları dioik, çoğu beyaz renkli lateks taşır. Yaprakları basit, parçalı, pul veya diken biçiminde, çiçekleri aktinomorf, pentamer, bazen çok indirgenmiş, ovaryum üç karpelden meydana gelmiş, üç gözlü, meyve her birinde bir tohum bulunan üç gözlü kapsül, olgunlaştığında üç kokus halinde ayrılır. Bu nedenle bu taksonlara ‘Tricoccae’ de denir (Tanker ve ark., 2014).

1.1.3. *Euphorbia* L. Cinsinin Botanik Özellikleri

Euphorbia türleri monoik, tek yıllık veya çok yıllık olan çoğunlukla çalimsı veya ağaç formunda bitkilerdir. Çoğu lateks taşır. Gövde yaprakları genellikle alternan, nadiren opozit, dekusat veya vertisillat dizilişli, stipulalı veya stipula yok (Davis, 1982 ve Rahman ve Akter, 2013).

Çiçek durumu siatyum; dişi çiçek bir ovaryumlu ve ortada, erkek çiçekler ise beş tane olup birer stamenden ibaret ve dişi çiçeğin etrafında bulunur (Rahman ve Akter, 2013 ve Tanker ve ark., 2014).

Çiçekler indirgenmiş, her çiçeğin tabanı iki brakteli, dişi çiçeğin ovaryumu üç gözlü ve her gözde bir ovül bulunur. Stilus üç tane olup stigmalar bifid, meyve tipi şizokarp, tohumlar genellikle karunkulalıdır (Davis, 1982).

1.1.4. Çalışma Konusu Olarak Seçilen Türlerin Tayin Anahtarı

Türkiye’de yetişen *Euphorbia* cinsi dokuz grup altında toplanmıştır. Çalışılan türlerden; *E. helioscopia* C grubu, *E. sequieriana* ve *E. macroclada* G grubu, *E. virgata* H grubu, *E. characias* subsp. *wulfenii* I grubu altında yer almaktadır. ‘Flora of Turkey and The East Aegean Islands’ isimli eserdeki tayin anahtarına sadık kalınarak sadece çalışılan türlerin tayin anahtarı açıklanmıştır (Davis, 1982).

C GRUBU

1. Tohumlar çok çeşitli desenlerde ya da yontulmuş gibi
9. Meyveler pürüzsüz
12. Ana gövde uzun, yalancı umbellalar buna uygun olarak daha küçük
13. Yapraklar serrulat ya da adi serrat
14. Tohumlar ağsı ya da enine hafif pürüzlü
15. Karunkul yassı ya da tohumlar altta karunkulalı
16. Karunkul yassı

39. *helioscopia*

G GRUBU

1. Bitki tüysüz, buğulu papilli ya da çok küçük hirtellus
2. Genç yaprak kenarları düz
3. Salgı tüyleri trunkat, boynuzsuz
4. Karunkul yarı küremsi ya da konik şekilde, karın tarafında çıkıntısız
5. Gövde yaprakları lineerden oblong-lineer'e doğru, akut ya da subakut

74. *seguieriana*

3. Salgı tüyleri boynuzlu
7. Tohumlar oyuklu yapıda ve pürüzsüz
9. Bitki dik, gövde 70 cm'ye kadar uzar, salgı tüyleri sarı, yeşil ya da kahverengi
10. Bitki buğulu papillalı, siatyum lobları çevresi tüylü

66. *macroclada*

H GRUBU

1. Gövde yaprakları yuvarlak, kuneat ya da tabanda attenuat
2. Gövde yaprakları genellikle 3 mm'den daha geniş
3. Gövde yaprakları lineer, lanseolat ya da trullat, yaprak genişliği 2,7 cm'den az
4. Bitki rizomsuz, meyve 4-5 mm çapında
5. Gövde yaprakları lineerden lineer lanseolata doğru, genişliği 1,5 cm'den az

78. *virgata*

I GRUBU

1. Meyveler tüylü
2. Gövde yaprakları mat ve yukarıda tüylü
3. Gövde yaprakları ilk yıl 4-11 cm
4. Gövde yaprakları ilk yıl ve ikinci yılda hemen hemen eşit

89. *characias* subsp. *wulfenii*

1.2. *Euphorbia* L. Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

1.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

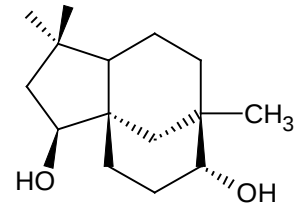
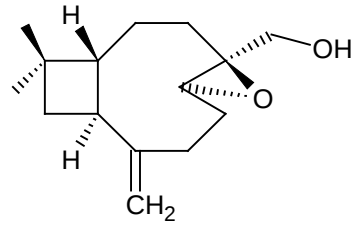
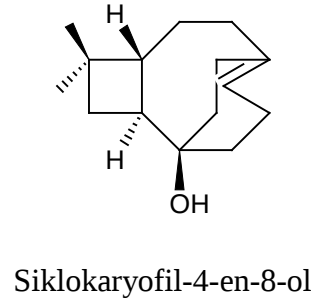
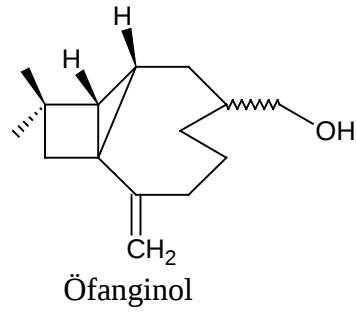
1.2.1.1. Terpenik Bileşikler

1.2.1.1.1. Seskiterpen Yapısındaki Bileşikler

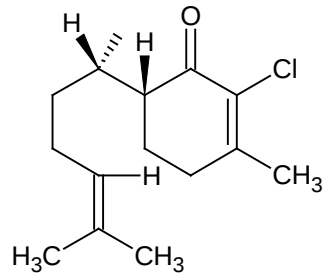
Euphorbia cinsi, diterpen yapısında bileşikler ile karakterize olan bir cinstir. *Euphorbia* cinsinden seskiterpen yapısında bileşikler ilk kez 1997 yılında *E. wangii* türünden izole edilmiştir. Tüm bitkiden hazırlanan asetonlu ekstre silika kolon kromatografisine uygulanmış ve çalışma sonunda karyofillen, siklokaryofil-4-en-8-ol, öfanginol, 14-hidroksi-4 β ,5 α -epoksi-4,5-dihidrokarýofillen ve klovandiol seskiterpenleri izole edilmiştir (Shi ve ark., 1997).

Yapılan bir başka çalışmada *Euphorbia chrysocoma* H. Lev. & Vaniot'dan hazırlanan %95'lik etanolü ekstre petrol eteri, etil asetat ve *n*-butanol ile fraksiyonlanmıştır. Petrol eterli fraksiyonun silika kolona uygulanmasıyla (6*R*)-2-kloro-6-[(1*S*)-1,5-dimetilhekzan-4-en-1-il]-3-metilsiklohekzan-2-en-1-on isimli seskiterpen ilk kez izole edilmiştir (Shi ve ark., 2005).

Euphorbia humifusa Willd.'dan antihepatit etkili iki karyofillen tipte seskiterpen bileşik olan humifusan A ve humifusan B izole edilmiştir (Tian ve ark., 2011). *Euphorbia* türlerinden izole edilen seskiterpen yapısında bazı bileşikler Şekil 1.1'de gösterilmektedir.

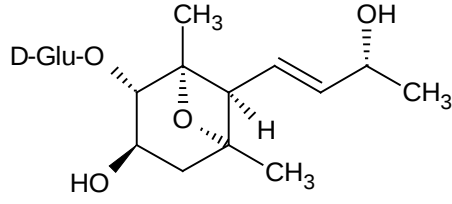


(Shi ve ark., 1997)

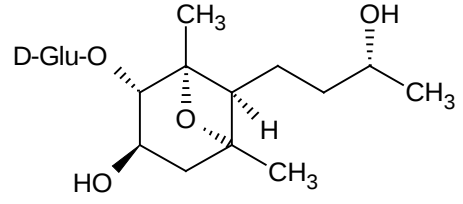


(Shi ve ark., 2005)

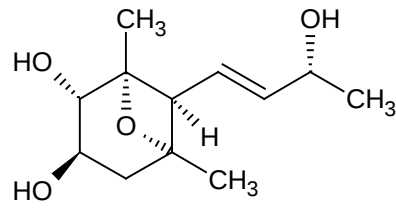
Şekil 1.1. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı seskiterpenik bileşikler



Öforbiozit A

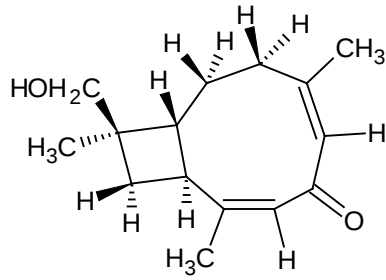


Öforbiozit B

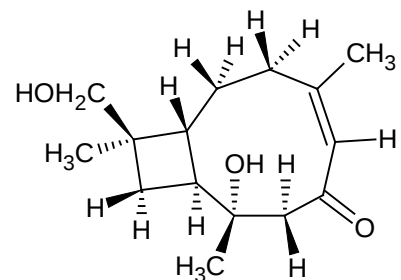


Deglukozil Öforbiozit A

(Shi ve ark., 2008)



Humifusan A



Humifusan B

(Tian ve ark., 2011)

Şekil 1.1. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı seskiterpenik bileşikler

1.2.1.1.2. Diterpen Yapısındaki Bileşikler

Türkiye’den toplanan *E. aleppica*’dan asetonlu, *Euphorbia paralias* L.’den de metanollü ekstreler hazırlanmış *n*-hekzan ve kloroform ile sıvı partisyon yapılmıştır. Kloroformlu fazlar silika jel kolon kromatografisi tekniği ile fraksiyonlanmış, fraksiyonlardan da maddeler preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılmıştır. *E. aleppica*’dan diterpen yapısında aleppikatin A ve aleppikatin B *E. paralias*’tan iki yeni diterpen olan paralinon A ve paralinon B ilk kez izole edilmiştir (Öksüz ve ark., 1996 ve Öksüz ve ark., 1997).

Peng ve ark. (2012), *E. kansui*’den hazırlanan %95 etanollü ekstreyi silika jel kolona uygulayarak diterpen yapısında bileşikler izole etmişlerdir. Bu bileşiklerin kimyasal yapıları 5-*O*-benzoil-3 β -hidroksi-20-deoksigenol, 3-*O*-benzoil-3 β -hidroksi-20-deoksigenol, 4-*O*-asetil-5-*O*-benzoil-3 β -hidroksi-20-deoksigenol olarak aydınlatılmıştır.

Euphorbia fischeriana Steud ve *Euphorbia ebracteolata* Hayata köklerinden Soxhlet ekstraksiyonu ile %95’lik etanollü ekstreler hazırlanmıştır. Ekstreler petrol eteri, kloroform ve etil asetat ile sıvı partisyona tabi tutularak polaritelerine göre fraksiyonlanmıştır. *E. fischeriana* petrol eteri fazından jolkinolit B; 17-hidroksijolkinolit A; 17-hidroksijolkinolit B; ent-(3 α ,5 β ,8 α ,9 β ,10 α ,12 α)-3-hidroksiatis-16-en-14-on; ent-kauran-3-okso-16 α ,17-diol; ent-16 β -H-3-oksokauran-17-ol; 12-deoksiforbaldehit-13-hekzadekanoat ve neriifolin, kloroform fazından jolkinolit A izole edilirken, *E. ebracteolata* petrol eteri fazından 11 β -hidroksi-ent-abieta-8(14),13(15)-dien-16,12 β -olit; 3 β ,19-dihidroksi-(1)10,15-rosadien-2-on; yueksiandajisu D; yueksiandajisu F; hugorosenol; antiquorin, kloroform fazından da yueksiandajisu E izole edilmiştir (Liang ve ark., 2014).

Kurutulmuş *Euphorbia dendroides* L.’nin %60 etanollü ekstresi hekzan ile muamele edilmiş ve kurutulan hekzan ekstresi silika flash kromatografisi metodu ile fraksiyonlanmıştır. Ardından preparatif ince tabaka kromatografisi ile temizlenen

fraksiyonlardan YPSK (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile son madde izolasyonu tamamlanmıştır. İlk kez izole edilen yedi diterpen yapısında molekül ‘Öfodendrofan A, B, C, D, E, F’ ve ‘öfodendrian A’ olarak isimlendirilmiştir (Aljancic ve ark., 2011).

Euphorbia semiperfoliata Viv.’den hazırlanan asetonlu ekstre etil asetat ile muamale edilmiş, elde edilen etil asetat ekstresi kurutulduktan sonra silika jel kolona uygulanmıştır. Çalışma sonunda makrosiklik diterpen yapısında bileşikler izole edilmiştir (Appendino ve ark., 1998).

E. characias subsp. *characias*’tan hazırlanan asetonlu ekstre etil asetat ile partisyona tabi tutulmuş ve elde edilen etil asetat ekstresi kurutulduktan sonra silika jel kolon kromatografisi uygulanmıştır. Polisiklik diterpenlerden ent-2-hidroksi-atis-1,16(17)-dien-3,14-dion; 8 α , 14-dihidro-7-okso-jolkinolit E; 3 β ,15,16-triasetoksipimara-8(14)-en ve 3 β ,15,16-triasetoksipimara-8(14)-en-2-on bileşikleri ilk kez bu çalışma ile izole edilmiştir (Appendino ve ark., 2000).

Yapılan bir çalışmada *Euphorbia cauducifolia* L.’den hazırlanan %95’lik etanollü ekstre kurutulup asetonla çözüldükten sonra tekrar kurutulup %10’luk metanolde çözülmüştür. Ardından dietil eter ve etil asetat ile partisyona tabi tutularak fraksiyonlara ayrılmıştır. Her iki ekstre grubu da petrol eteri:metanol:su (15:10:10,5) karışımı ile partisyona tabi tutulmuştur. Hidrofilik fraksiyonlardan 3-O-angeloil-17-O-palmitoilingenol; 3-O-palmitoil-5-O-angeloilingenol; 5-O-angeloil-17-O-palmitoilingenol; 3-O-angeloil-5-O-palmitoilingenol; 17-O-(2Z,4E,6Z)-2,4,6-tetradekatrienoil-20-O-palmitoilingenol; 5-O-angeloil-17-O-benzoilingenol; 5-O-angeloil-17,20-diasetoksiingenol; 3-O-angeloil-17-O-benzoil-20-asetoksiingenol; 3-asetoksi-5-O-angeloil-17-O-benzoilingenol; 5-O-angeloil-3,17,20-triasetoksiingenol diterpenleri izole edilmiştir. Bu bileşiklerin iritan ve karsinojenik olduğu bildirilmiştir (Baloch ve Baloch, 2010).

Barile ve Lanzotti (2007), yaptıkları bir çalışmada *E. paralias*'tan üç tanesi ilk kez izole edilen toplam yedi diterpen izole etmişlerdir. Yapı tayini çalışmalarında bir ve iki boyutlu NMR spektroskopisi yöntemlerinden yararlanmışlardır. İlk kez izole ettikleri bileşikler pre-segetanin A, segetanin A ve segetanin B olarak isimlendirilmiştir. Aynı bitki ile yapılan benzer bir çalışmada, *E. paralias*'tan etil asetatlı ekstre hazırlanmış, OBSK (orta basınçlı sıvı kromatografisi) ve YPSK yöntemleri ile diterpen yapısında bileşikler izole edilmiştir. Pepluanon, paralianon ve pepluen isimli diterpenik bileşikler bu çalışma ile ilk kez izole edilmiştir (Barile ve ark., 2007).

Yapılan bir başka çalışmada *Euphorbia lunulata* Bge.'den %90'lık etanol ile ekstre hazırlanmış, çözücü uzaklaştırıldıktan sonra kuru ekstre suda çözölmüştür. Sırasıyla petrol eteri, etil asetat ve *n*-butanol ile sıvı-sıvı partisyona yapılmıştır. Petrol eteri fazından silika jel kolon kromatografisi ile öfornin ve öfoskopin B; etil asetat fazından silika jel kolon kromatografisi ile öfornin N ve ilk kez 14 α ,15 β -diasetoksi-3 α ,7 β -dibenzoiloksi-9-okso-2 β H,13 α H-jatrofa-5E,11E-dien ve sefadeks kolon ile de ilk kez ent-3 α -formilabieta-8(14),13(15)-dien-16,12 β -olit bileşikleri izole edilmiştir (Liu ve ark., 2014).

Euphorbia amygdaloides L.'nin köklerini ve lateksini de içeren tüm kısımlarından etil asetatlı ekstre hazırlanarak su ile partisyona yapılmıştır. Temizlenen etil asetatlı ekstre OBSK tekniği ile fraksiyonlanmıştır. İlk kez izole edilen ve bitki ile karakterize olan on iki diterpen yapısında bileşiğe Amigdaloidinler adı verilmiştir. Amigdaloidin A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L bitkiden izole edilen Amigdaloidinlerdir (Corea ve ark., 2005).

Kurutulmuş *Euphorbia nematocypha* Hand.-Mazz. köklerinden %70'lik asetonlu ekstre hazırlanmıştır. Kurutulan ekstre suda çözöldükten sonra kloroform ve su ile partisyona tabi tutulmuştur. Kloroform fazı silika jel kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. Sekiz yeni diterpen yapısında molekül ilk kez bu çalışma ile izole edilmiştir (He ve ark., 2008).

Euphorbia sororia Schrenk meyvelerinden hazırlanan metanollü ekstre petrol eteri ile partisyona tabi tutulmuştur. Petrol eterli fraksiyon silika kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılarak altı diterpen yapısında yeni bileşik izole edilmiştir. $2\alpha,7\alpha$ -diizobutiroiloksi- 3α -nikotinoiloksi- $5\beta,8\alpha,9\alpha,15\beta$ -tetraasetoksijatrofa-6(17), $11E$ -dien-14-on; 2α -izobutiroiloksi- 3α -nikotinoiloksi- $5\beta,7\alpha,8\alpha,9\alpha,15\beta$ -pentaasetoksijatropa-6(17), $11E$ -dien-14-on; 17-hidroksimirsinol; 3α -benzoiloksi- $2\alpha,7\alpha$ -diizobutiroiloksi $5\beta,8\alpha,9\alpha,15\beta$ -tetraasetoksijatrofa-6(17), $11E$ -dien-14-on; 3α -benzoiloksi- $5\beta,14\beta$ -dihidroksi- 2α -izobutiroiloksi- $7\alpha,8\alpha,9\alpha,15\beta$ -tetraasetoksijatrofa-6(17), $11E$ -dien; 14β -benzoiloksi- $2\alpha,7\beta$ -diizobutiroiloksi- 15α -hidroksi- $3\beta,5\alpha,8\alpha,9\alpha$ -tetraasetoksijatrofa-6(17), $11E$ -dien bu çalışma ile ilk kez izole edilen diterpenlerdir (Huang ve Aisa, 2010).

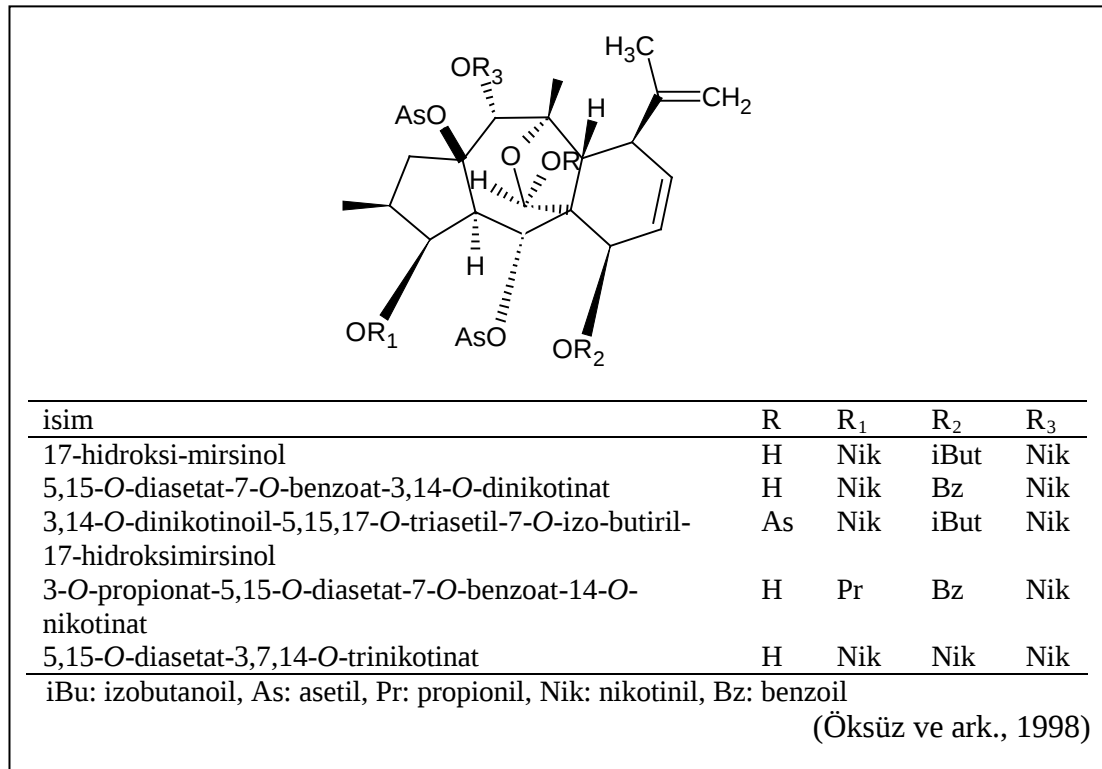
Yapılan bir başka çalışmada *Euphorbia royleana* Boiss.'den on yeni diterpen izole edilmiştir. *E. royleana*'nın toprak üstü kısımlarından %70 aseton ile hazırlanan ekstre kurutulduktan sonra suda çözülerek etil asetat ile partisyona tabi tutulmuştur. Etil asetatlı ekstre VLC (vakum sıvı kromatografisi) ile fraksiyonlandıktan sonra silika jel kolona uygulanmıştır. Çalışma sonunda 12-*O*-asetilingol-3,8-ditiglat; 8,12-*O*-diasetilingol-3,7-ditiglat; 12-*O*-asetil-7-*O*-benzoilingol-3,8-ditiglat; 8,12-*O*-diasetilingol-3,7-dibenzoat; 3,8,12-*O*-triasetilingol-7-benzoat; 12-*O*-asetil-8-*O*-benzoilingol-3-tiglat; 12-*O*-asetilingol-3,8-dibenzoat; 12-*O*-asetil-3-*O*-benzoilingol-8-tiglat; 12-*O*-asetil-2-epi-ingol-3,8-dibenzoat ve 12-*O*-asetil-3-*O*-benzoil-2-epi-ingol-8-tiglat isimli bileşikler izole edilmiştir. Aynı çalışmada izole edilen bileşiklerin anti-anjiyogenik etkileri test edilmiştir ve bu bileşiklerin biyolojik olarak aktif oldukları bildirilmiştir (Li ve ark., 2009).

Yapılan bir başka çalışmada *E. helioscopia*'dan hazırlanan %95 etanollü ekstre, etil asetat ile muamele edilmiş ve elde edilen etil asetatlı ekstre silika jel kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. Ardından sefadeks kolon ve semi-preparatif YPSK ile saflaştırılan bileşiklerin yapıları tayin edilmiş ve sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda izole edilen $7\beta,9\alpha,14\beta$ -triasetoksi- 3β -benzoiloksi- $12\beta,15\beta$ -epoksi- 11β -hidroksijatrofa-5*E*-en; 14β -asetoksi- 3β -benzoiloksi- $7\beta,9\alpha,15\beta$ -

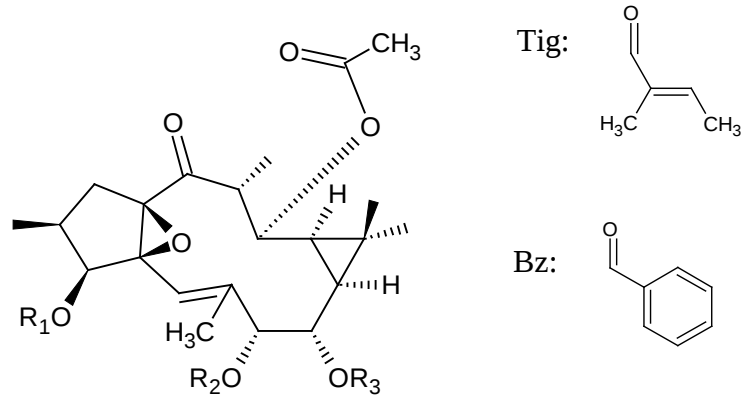
trihidroksijatrofa-5*E*-11*E*-dien; 7 β ,9 α ,14 β -triasetoksi-3 β -benzoiloksi-15 β ,17-dihidroksijatrofa-5*E*,11*E*-dien ve 14 α ,15 β -diasetoksi-3 β ,7 β -dibenzoiloksi-17-hidroksi-9-okso-2 β H,13 β H-jatrofa-5*E*,11*E*-dien bileşikleri sitotoksik aktivite yönünden etkili bulunmuştur (Lu ve ark., 2008a).

Euphorbia esula L.'den %95'lik etanolle hazırlanan ekstre kurutulup petrol eteri ve etil asetat ile partisyona tabi tutulmuştur. Petrol eterli ekstre önce silika jel kolona sonra sefadeks kolona uygulanarak fraksiyonlara ayrılmıştır. Çalışma sonunda on altı yeni diterpen ilk kez izole edilmiştir (Lu ve ark., 2008b).

Euphorbia türlerinden izole edilen diterpen yapısında bazı bileşikler Şekil 1.2'de gösterilmektedir.

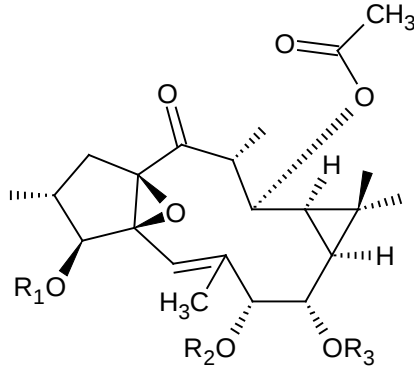


Şekil 1.2. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



isim	R ₁	R ₂	R ₃
12- <i>O</i> -asetilingol 3,8-ditiglat	Tig	H	Tig
8,12- <i>O</i> -diasetilingol 3,7-ditiglat	Tig	Tig	As
12- <i>O</i> -asetil-7- <i>O</i> -benzoilingol 3,8-ditiglat	Tig	Bz	Tig
8,12- <i>O</i> -diasetilingol 3,7-dibenzoat	Bz	Bz	As
3,8,12- <i>O</i> -triasetilingol 7-benzoat	As	Bz	As
12- <i>O</i> -asetil-8- <i>O</i> -benzoilingol 3-tiglat	Tig	H	Bz
12- <i>O</i> -asetilingol 3,8-dibenzoat	Bz	H	Bz
12- <i>O</i> -asetil-3- <i>O</i> -benzoilingol 8-tiglat	Bz	H	Tig

As: asetil, Tig: tiglian, Bz: benzoil

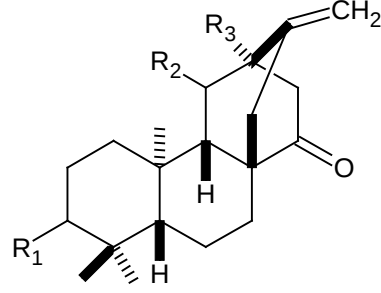


isim	R ₁	R ₂	R ₃
12- <i>O</i> -asetil-2-epi-ingol 3,8-dibenzoat	Bz	H	Bz
12- <i>O</i> -asetil-3- <i>O</i> -benzoil-2-epi-ingol 8-tiglat	Bz	H	Tig

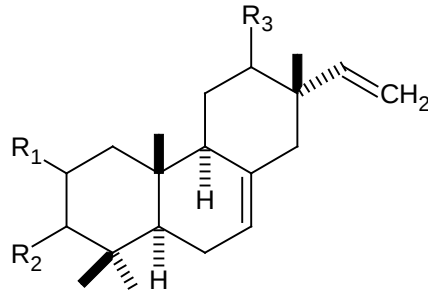
Tig: tiglian, Bz: benzoil

(Li ve ark., 2009)

Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



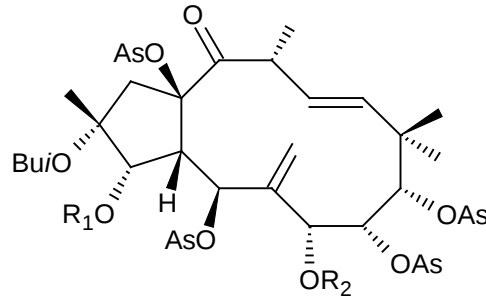
isim	R ₁	R ₂	R ₃
ent-(5 β ,8 α ,9 β ,10 α ,11 α ,12 α)-11-hidroksiatis-16-en-3,14-dion	=O	α -OH	H
ent-(5 β ,8 α ,9 β ,10 α ,11 α ,12 α)-3,14-dioksoatis-16-en-11-il asetat	=O	α -OAs	H
ent-(5 β ,8 α ,9 β ,10 α ,12 α)-12-hidroksiatis-16-en-3,14-dion	=O	H	α -OH
ent-(3 α ,5 β ,8 α ,9 β ,10 α ,11 α ,12 α)-3,11-dihidroksiatis-16-en-14-on	α -OH	α -OH	H
ent-(3 α ,5 β ,8 α ,9 β ,10 α ,12 α)-3-hidroksiatis-16-en-14-on	α -OH	H	H



isim	R ₁	R ₂	R ₃
(3 β ,13 α)-3-hidroksipimara-7,15-dien-2,12-dion	=O	β -OH	=O
(3 β ,12 α ,13 α)-3,12-dihidroksipimara-7,15-dien-2-on	=O	β -OH	α -OH
(12 α ,13 α)-12-hidroksipimara-7,15-dien-3-on	H	=O	α -OH

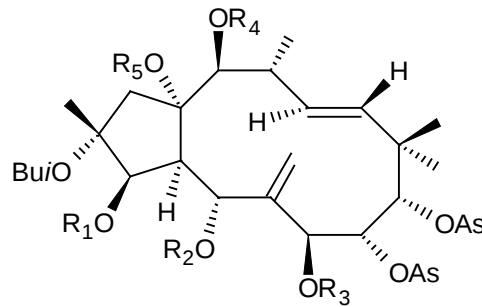
(He ve ark., 2008)

Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler

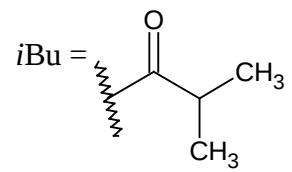
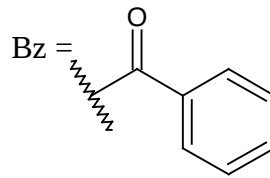
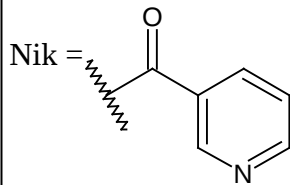


isim	R ₁	R ₂
2 α ,7 α -diizobutiroiloksi-3 α -nikotinoiloksi-5 β ,8 α ,9 α ,15 β -tetraasetoksijatropa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on	Nik	As
2 α -izobutiroiloksi-3 α -nikotinoiloksi-5 β ,7 α ,8 α ,9 α ,15 β -pentaasetoksijatropa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on	Nik	iBu
3 α -benzoiloksi-2 α ,7 α -diizobutiroiloksi-5 β ,8 α ,9 α ,15 β -tetraasetoksijatropa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on	Bz	iBu
3 α -benzoiloksi-2 α -izobutiroiloksi-5 β ,7 α ,8 α ,9 α ,15 β -pentaasetoksijatropa-6(17),11 <i>E</i> -dien-14-on	Bz	As

iBu: izobutanoil, As: asetil, Nik: nikotinil, Bz: benzoil

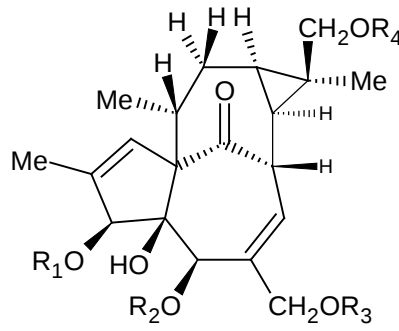


isim	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
3 α -benzoiloksi-5 β ,14 β -dihidroksi-2 α -izobutiroiloksi-7 α ,8 α ,9 α ,15 β -tetraasetoksijatropa-6(17),11 <i>E</i> -dien	Bz	H	As	H	As
14 β -benzoiloksi-2 α ,7 β -diizobutiroiloksi-15 α -hidroksi-3 β ,5 α ,8 α ,9 α -tetraasetoksijatropa-6(17),11 <i>E</i> -dien	As	As	iBu	Bz	H



(Huang ve Aisa, 2010)

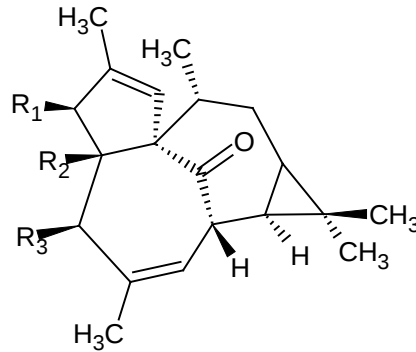
Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



no.	isim	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	3- <i>O</i> -angeloil-17- <i>O</i> -palmitoilingenol	Ang	H	H	Palm
2	3- <i>O</i> -palmitoil-5- <i>O</i> -angeloilingenol	Palm	Ang	H	H
3	5- <i>O</i> -angeloil-17- <i>O</i> -palmitoilingenol	H	Ang	H	Palm
4	3- <i>O</i> -angeloil-5- <i>O</i> -palmitoilingenol	Ang	Palm	H	H
5	17- <i>O</i> -(2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-2,4,6-tetradekatrienoil-20- <i>O</i> -palmitoilingenol	H	H	Palm	Tetradek
6	5- <i>O</i> -angeloil-17- <i>O</i> -benzoilingenol	H	Ang	H	Bz
7	5- <i>O</i> -angeloil-17,20-diasetoksiingenol	H	Ang	As	As
8	3- <i>O</i> -angeloil-17- <i>O</i> -benzoil-20-asetoksiingenol	Ang	H	As	Bz
9	3-asetoksi-5- <i>O</i> -angeloil-17- <i>O</i> -benzoilingenol	As	Ang	H	Bz
10	5- <i>O</i> -angeloil-3,17,20-triasetoksiingenol	As	Ang	As	As

As = Asetil; Ang = Angeloil; Bz = Benzoil; Palm = Palmitoil;
Tetradek = -(2*Z*,4*E*,6*Z*)-(2,4,6)-Tetradekatrienoil

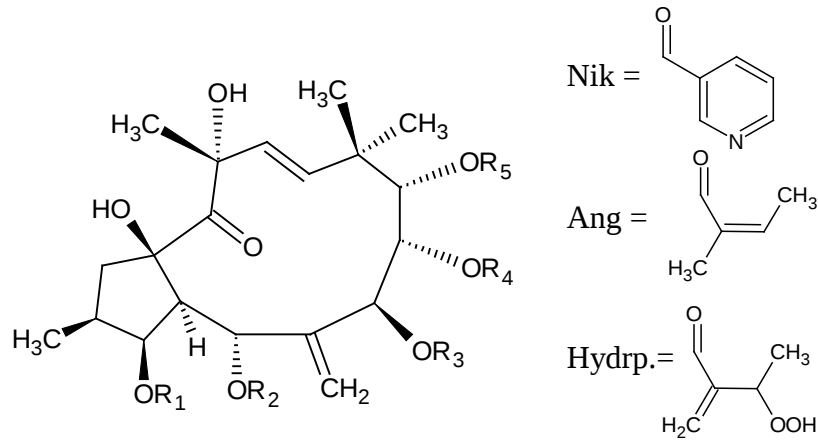
(Baloch ve Baloch, 2010)



isim	R ₁	R ₂	R ₃
5- <i>O</i> -benzoil-3β-hidroksi-20-deoksigenol	OH	OH	OBz
3- <i>O</i> -benzoil-3β-hidroksi-20-deoksigenol	OBz	OH	OH
4- <i>O</i> -asetil-5- <i>O</i> -benzoil-3β-hidroksi-20-deoksigenol	OH	OAs	OBz

(Peng ve ark., 2012)

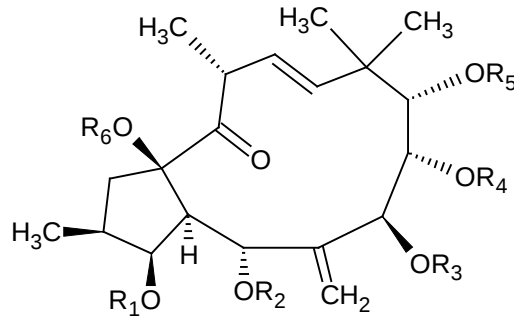
Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



İsim	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Amigdaloidin A	As	As	Ang	Ang	Nik
Amigdaloidin B	Ang	H	Ang	As	Nik
Amigdaloidin C	Hydrp.	H	Ang	As	Nik
Amigdaloidin D	Ang	H	Ang	As	As
Amigdaloidin E	Ang	H	Hydrp.	As	As
Amigdaloidin G	Ang	As	H	Hydrp.	As
Amigdaloidin H	Hydrp.	As	H	Ang	As
Amigdaloidin I	As	Hydrp.	H	Ang	As
Amigdaloidin J	Hydrp.	As	Ang	H	As
Amigdaloidin K	As	Hydrp.	Ang	H	As
Amigdaloidin L	Ang	As	Hydrp.	H	As

As: asetil, Nik: nikotinil, Ang: angeloil

(Corea ve ark., 2005)

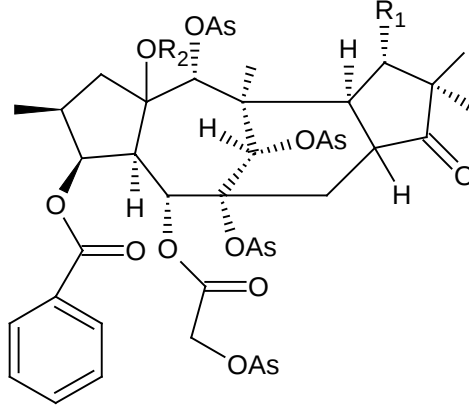


İsim	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Öfodendrofan A	Pr	As	iBu	As	Nik	H
Öfodendrofan B	iBu	As	iBu	As	Nik	H
Öfodendrofan C	Pr	As	iBu	As	Nik	As
Öfodendrofan D	iBu	As	As	Bz	As	H
Öfodendrofan E	Pr	As	iBu	Bz	As	H

iBu: izobutanoil, As:asetil, Pr: propionil, Nik: nikotinil, Bz: benzoil

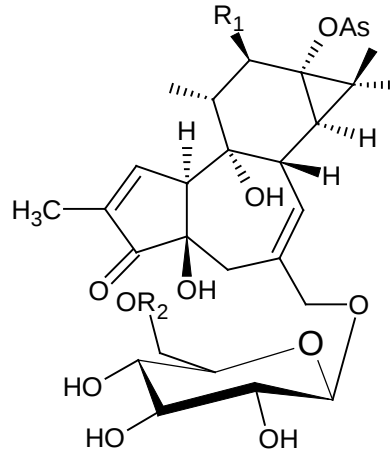
(Aljancic ve ark., 2011)

Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



İsim	R ₁	R ₂
Paralinson A	H	H
Paralinson B	OAs	H

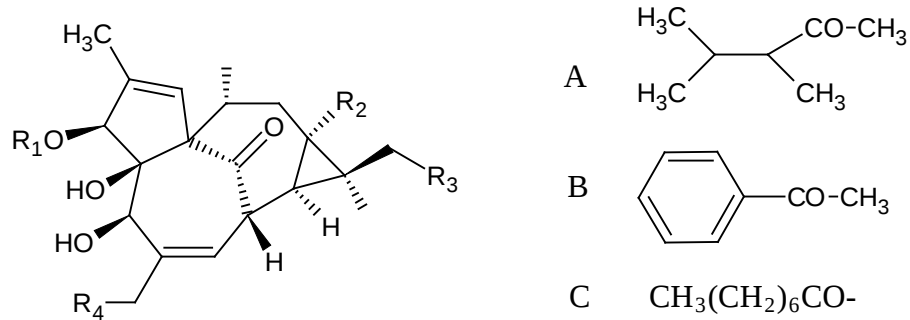
(Öksüz ve ark., 1997)



isim	R ₁	R ₂
Fiserozit A	H	H
Fiserozit B	H	Galloil
Fiserozit C	OH	H

(Pan ve ark., 2011)

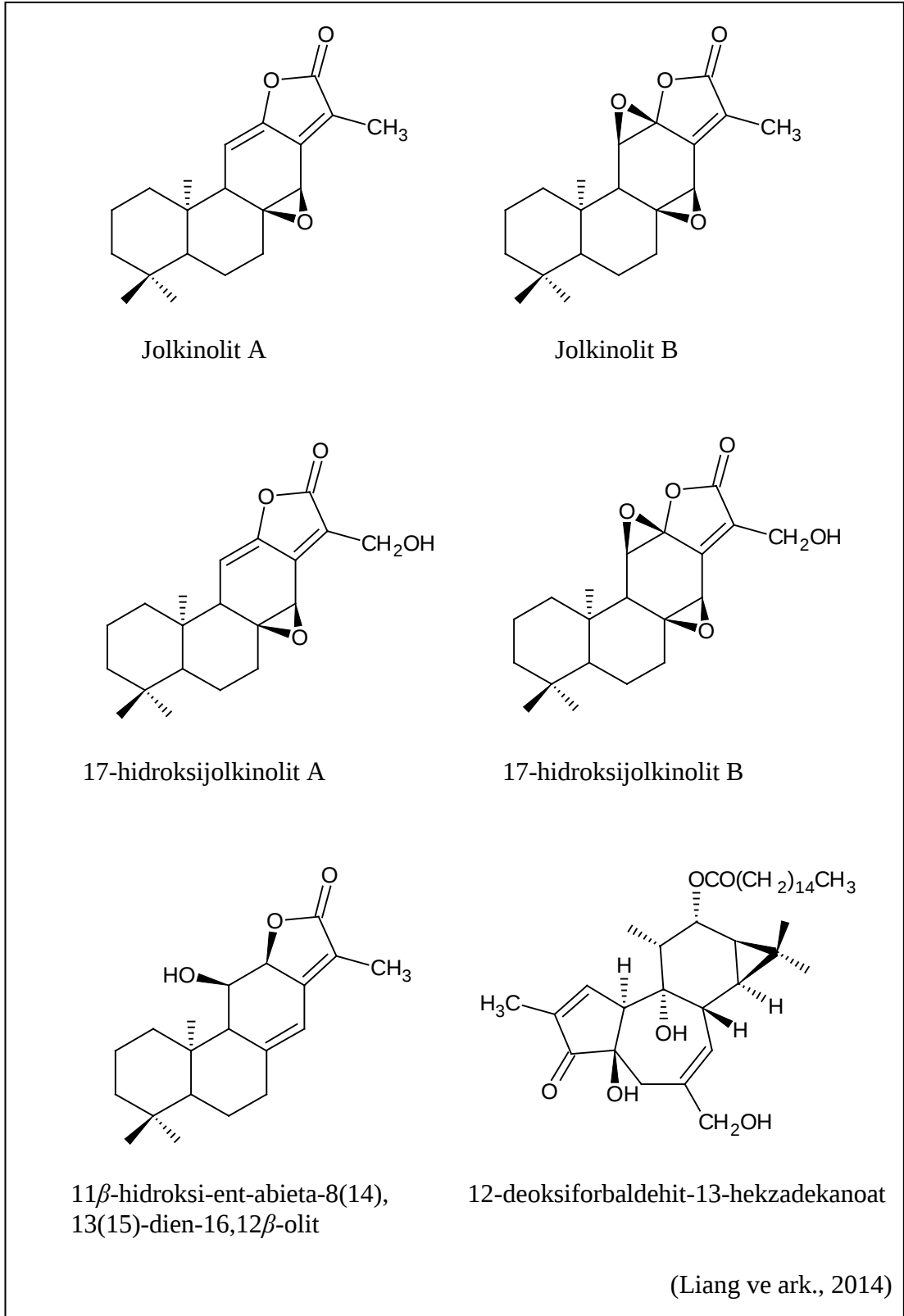
Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



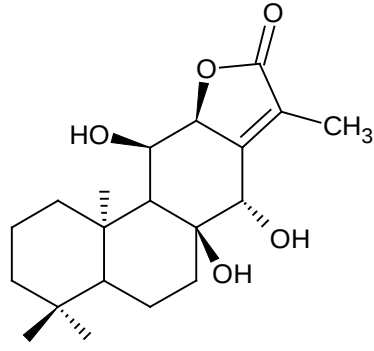
İsim	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
17-benzoiloksi-3-O-(2,3-dimetilbutanoil)-20-deoksiingenol	A	H	OB	H
17-benzoiloksi-3-O-(2,3-dimetilbutanoil)-13-(2,3-dimetilbutanoiloksi)-20-deoksiingenol	A	OA	OB	H
17-benzoiloksi-3-O-(2,3-dimetilbutanoil)-13-(2,3-dimetilbutanoiloksi)ingenol	A	OA	OB	OH
17-benzoiloksi-20-O-(2,3-dimetilbutanoil)-13-(2,3-dimetilbutanoiloksi)ingenol	H	OA	OB	OA
17-benzoiloksi-13-oktanoiloksiingenol	H	OC	OB	OH
3-O-benzoil-17-benzoiloksi-13-oktanoiloksiingenol	B	OC	OB	OH
20-O-benzoil-17-benzoiloksi-13-oktanoiloksiingenol	H	OC	OB	OB
3-O-benzoil-17-benzoiloksi-13-oktanoiloksi-20-deoksiingenol	B	OC	OB	H
17-benzoiloksi-3-O-(2,3-dimetilbutanoil)-13-oktanoiloksiingenol	A	OC	OB	OH
17-benzoiloksi-20-O-(2,3-dimetilbutanoil)-13-oktanoiloksiingenol	H	OC	OB	OA
3-O-benzoil-13,17-dibenzoiloksiingenol	B	OB	OB	OH
13,17-dibenzoiloksi-3-O-(2,3-dimetilbutanoil)ingenol	A	OB	OB	OH
3-O-benzoil-17-benzoiloksi-13-(2,3-dimetilbutanoiloksi)ingenol	B	OA	OB	OH
13,17-dibenzoiloksi-3-O-(2,3-dimetilbutanoil)-20-deoksiingenol	A	OB	OB	H
3-O-benzoil-13-oktanoiloksiingenol	B	OC	H	OH
3-O-(2,3-dimetilbutanoil)-13-oktanoiloksiingenol	A	OC	H	OH

(Lu ve ark., 2008b)

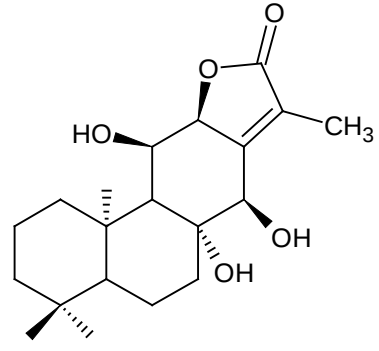
Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



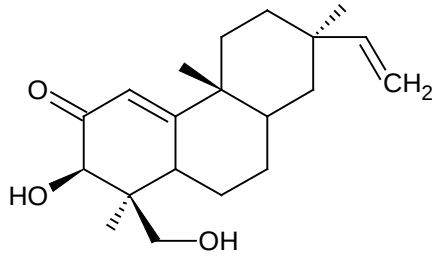
Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



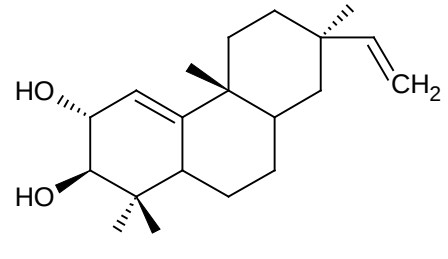
Yueksiandajisu D



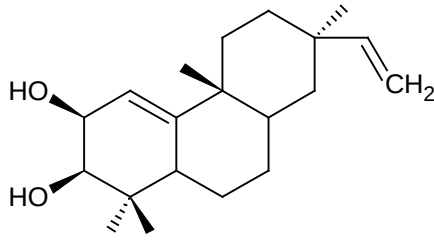
Yueksiandajisu E



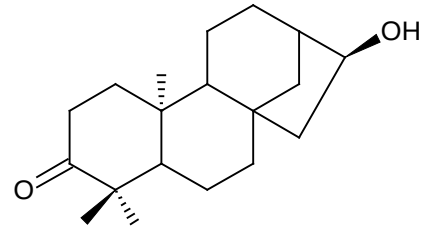
3β,19-dihidroksi-1(10),15-rosadien-2-on



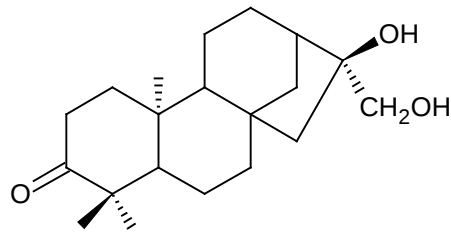
Yueksiandajisu F



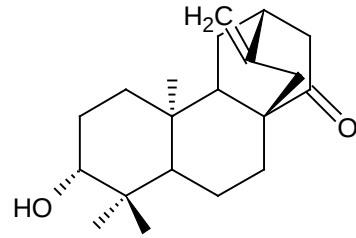
Hugorosenol



ent-kauran-3-okso-16α,17-diol



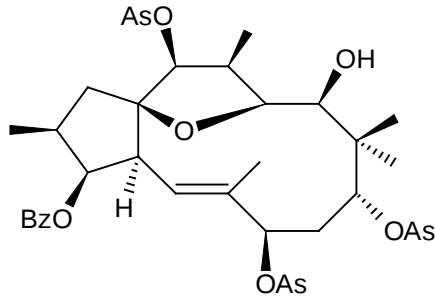
ent-16β-H-3-oksokauran-17-ol



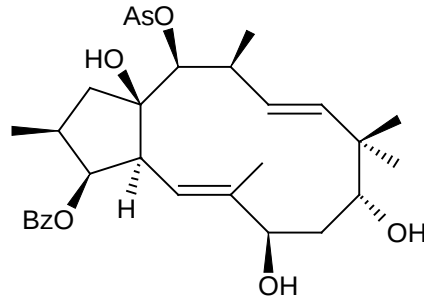
ent-(3α,5β,8α,9β,10α,12α)-3-hidroksiatis-16-en-14-on

(Liang ve ark., 2014)

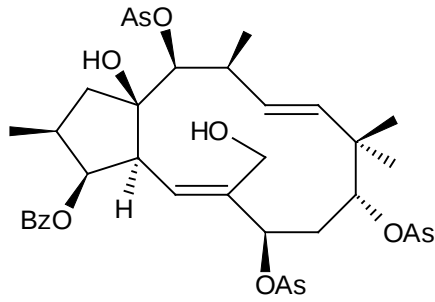
Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



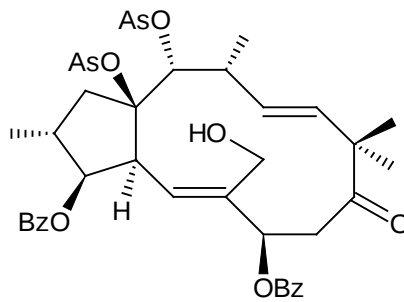
7 β ,9 α ,14 β -triasetoksi-3 β -benzoiloksi-12 β ,15 β -epoksi-11 β -hidroksijatrofa-5E-en



14 β -asetoksi-3 β -benzoiloksi-7 β ,9 α ,15 β -trihidroksijatrofa-5E,11E-dien



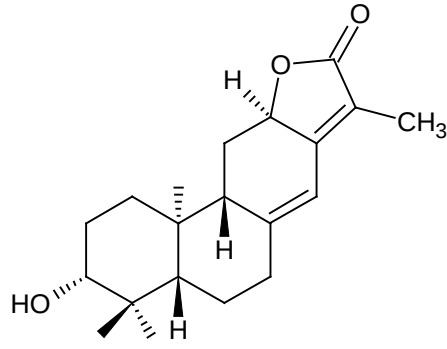
7 β ,9 α ,14 β -triasetoksi-3 β -benzoiloksi-15 β ,17-dihidroksijatrofa-5E,11E-dien



14 α ,15 β -diasetoksi-3 β ,7 β -dibenzoiloksi-17-hidroksi-9-okso-2 β H,13 β H-jatrofa-5E,11E-dien

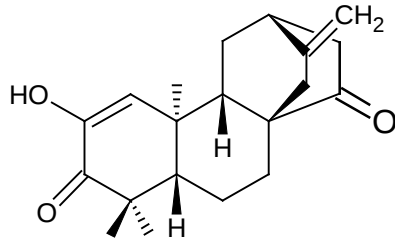
(Lu ve ark., 2008a)

Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler

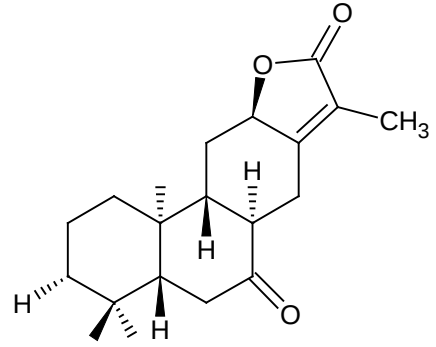


Helioskopinol A

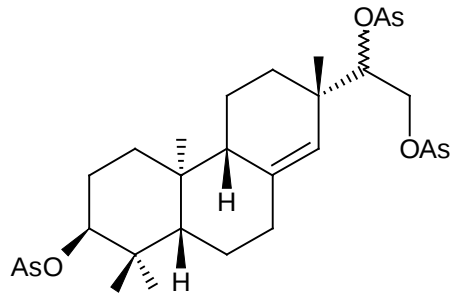
(Lu ve ark., 2008a)



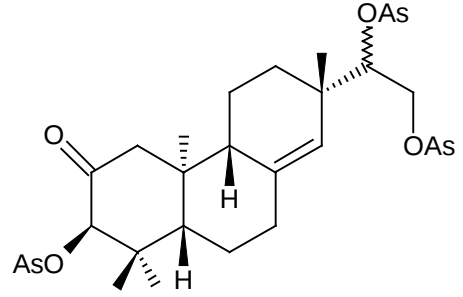
ent-2-hidroksi-atis-1,16(17)-dien-3,14-dion



8 α ,14-dihidro-7-okso-jolkinolit E



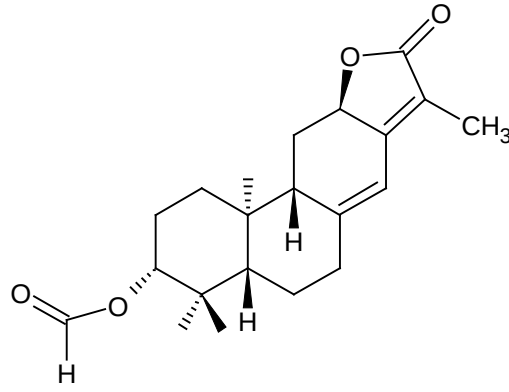
3 β ,15,16-triasetoksipimara-8(14)-en



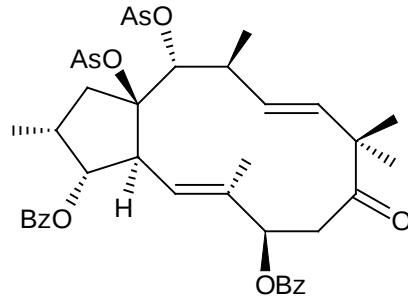
3 β ,15,16-triasetoksipimara-8(14)-en-2-on

(Appendino ve ark., 2000)

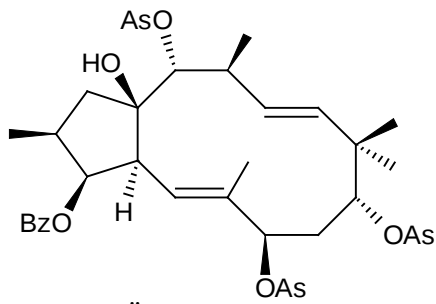
Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



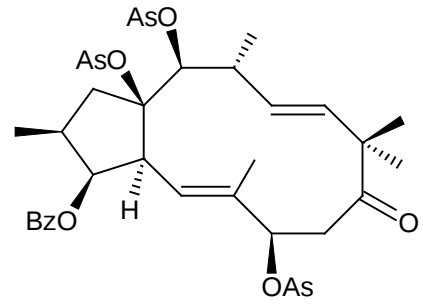
ent-3 α -formilabieta-8(14),13(15)-dien-16,12 β -olit



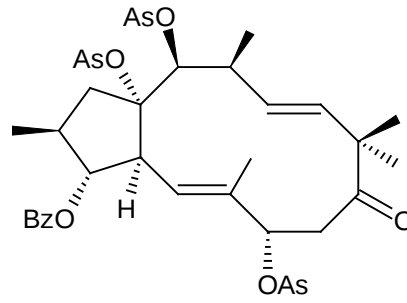
14 α ,15 β -diasetoksi-3 α ,7 β -dibenzoiloksi-9-okso-2 β H,13 α H-jatrofa-5E,11E-dien



Öfornin



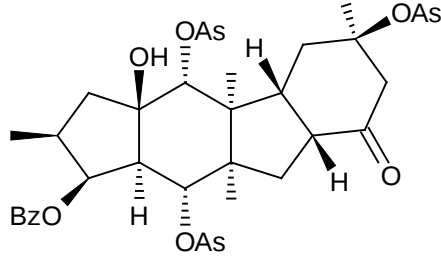
Öfornin N



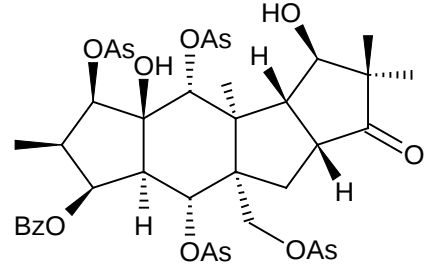
Öfoskopin B

(Liu ve ark., 2014)

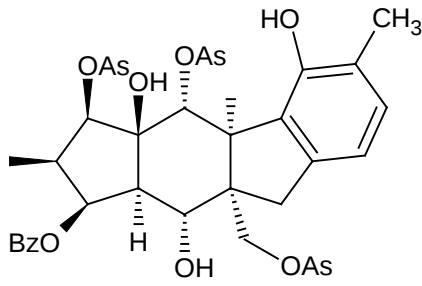
Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



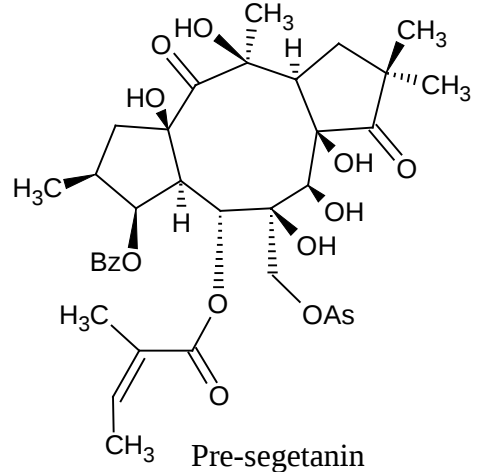
Pepluanon



Paralianon

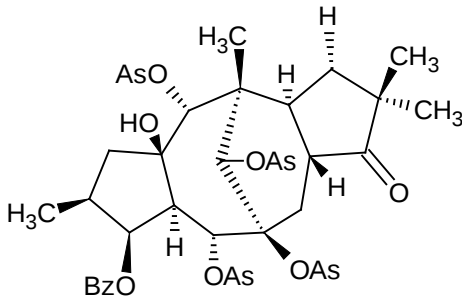


Pepluen

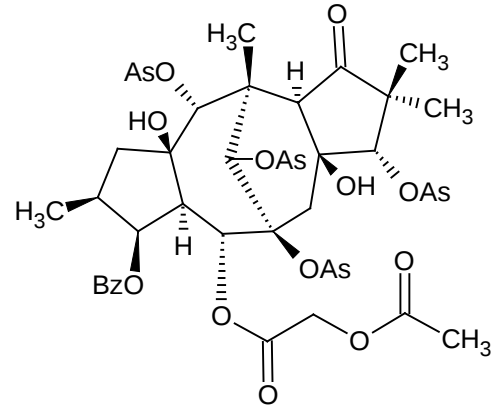


Pre-segetanin

(Barile ve ark., 2007)



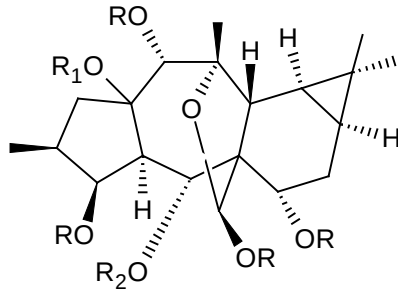
Segetanin A



Segetanin B

(Barile ve Lanzotti, 2007)

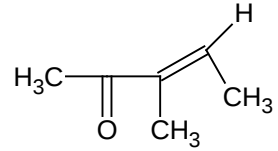
Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



Aleppikatin A:

$R = R_1 = \text{OAs}$

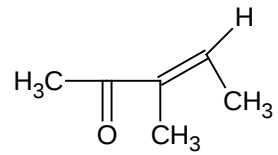
$R_2 =$



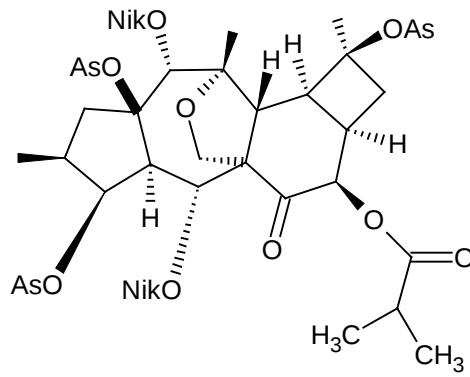
Aleppikatin B:

$R = \text{OAs}$

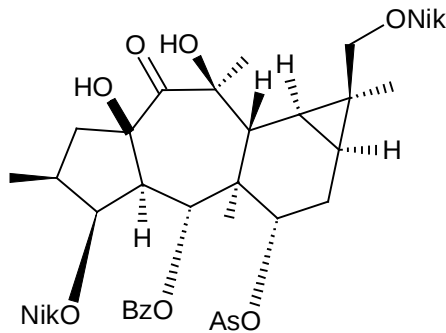
$R_1 = R_2 =$



(Öksüz ve ark., 1996)



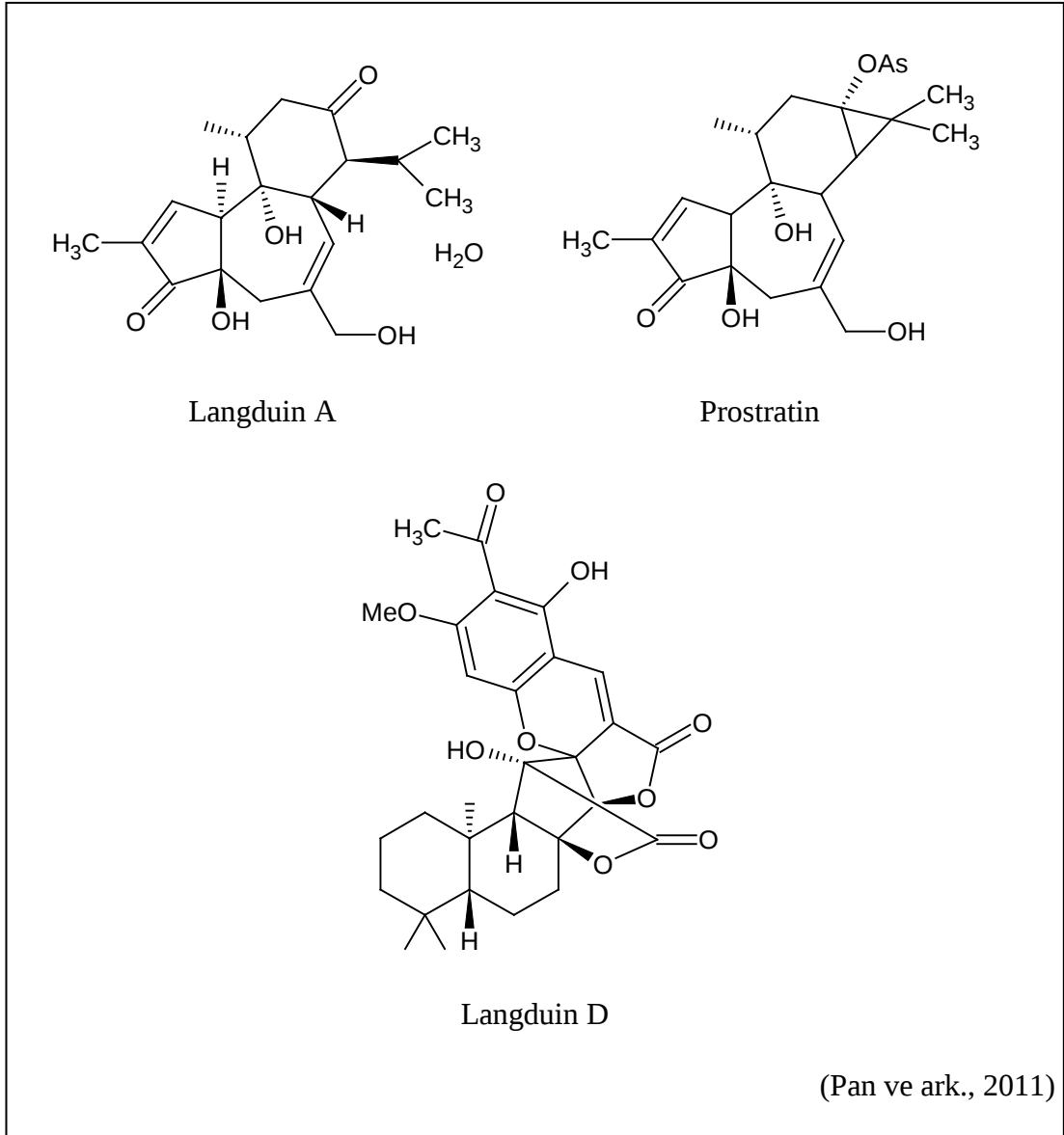
5,14-O-dinikotinoil-8-O-izo-butiril-3,10,15-O-triasetil-siklomirsinol



7-O-asetil-5-O-benzoil-13,15-dihidroksi-3,18-O-dinikotinoil-14-okso-latiran

(Öksüz ve ark., 1998)

Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler



Şekil 1.2. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı diterpenik bileşikler

1.2.1.1.3. Triterpen Yapısındaki Bileşikler

E. kansui'den hazırlanan %95'lik etanollü ekstreden silika kolon kromatografisi tekniği ile triterpenik yapıda bileşikler izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları öfol, α -amirin, β -amirin, oleanolik asit ve ursolik asit olarak aydınlatılmıştır (Peng ve ark., 2012). Aynı tür ile yapılan benzer bir çalışmada, *E. kansui*'den %95'lik etanol ile hazırlanan ekstre petrol eteri ile muamele edilmiştir. Petrol eterli fraksiyondan çözücü uzaklaştırılarak elde edilen ekstre silika ve sefadeks kolonlara uygulanarak kansuinon ve kansenon isimli iki triterpenik bileşik izole edilmiştir (Guo ve ark., 2010). Aynı bitkinin köklerinden hazırlanan %60 etanollü ekstreden ilk kez izole edilen beş yeni triterpenik bileşik kansenon, kansenonol, 11-okso-kansenonol, kansenol ve epi-kansenon olarak bildirilmiştir (Wang ve ark., 2003).

E. fischeriana ve *E. ebracteolata* köklerinden Soxhlet ekstraksiyonu ile %95'lik etanollü ekstraterler hazırlanmıştır. Ekstreler petrol eteri, kloroform ve etil asetat ile sıvı partisyona tabi tutularak polaritelerine göre bileşikler gruplandırılmıştır. *E. fischeriana* petrol eteri fazından dört adet triterpenik bileşik izole edilmiştir. Lupeol, luteon, lupeol asetat ve β -amirin asetat izole edilen triterpenik bileşiklerdir. *E. ebracteolata* petrol eterli ekstresinden ise sadece β -amirin asetat izole edilmiştir (Liang ve ark., 2014).

Akihisa ve ark. (2002), yaptıkları bir çalışmada *Euphorbia antiquorum* L. lateksinden antiviral etkili triterpenler izole etmişlerdir. Bitkiden elde edilen lateksi suda çözüp hekzan ve etil asetat ile partisyona tabi tutmuşlar, ardından etil asetat fraksiyonundan elde edilen ekstreyi silika kolona uygulamışlardır. Araştırmacılar çalışma sonunda öfol, eupha-7,9(11),24-trien-3 β -ol (antiquol C); 19-abeo-8 α ,9 β ,10 α -eupha-5,24-dien-3 β -ol (antiquol B); 24-metiltirucalla-8,24(24')-dien-3 β -ol (öforbol); lemmafilla-7,21-dien-3 β -ol; izohelianol ve kamelliol C adında triterpenik bileşikler izole etmişlerdir.

Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut.'un köklerinden hazırlanan kloroformlu ekstre önce silika jel kolon ardından semi-preparatif YPSK ile kromatografik ayırma tabi tutularak on üç triterpenik bileşik izole edilmiştir. Bu bileşikler 3 β -hidroksitarakser-14-en-28-oik asit; β -sitosteril-3 β -glukopiranozit-6'-O-palmitat; multiflorenil asetat; multiflorenil palmitat; peplusol; 24-metilen sikloartenol; lanosterol; öferol; butirospermol; sikloartenol; obtusifoliol; sikloökalenol ve β -sitosterol olarak tayin edilmiştir (Haba ve ark., 2007).

Ilyas ve ark. (1998), *E. neriifolia* lateksinden hazırlanan asetonlu ekstreyi silika jel kolon ile fraksiyonlarına ayırarak sikloartenol ve neriifolion adında iki triterpen izole etmişlerdir. Sikloartenol ilk kez bu çalışma ile izole edilmiştir.

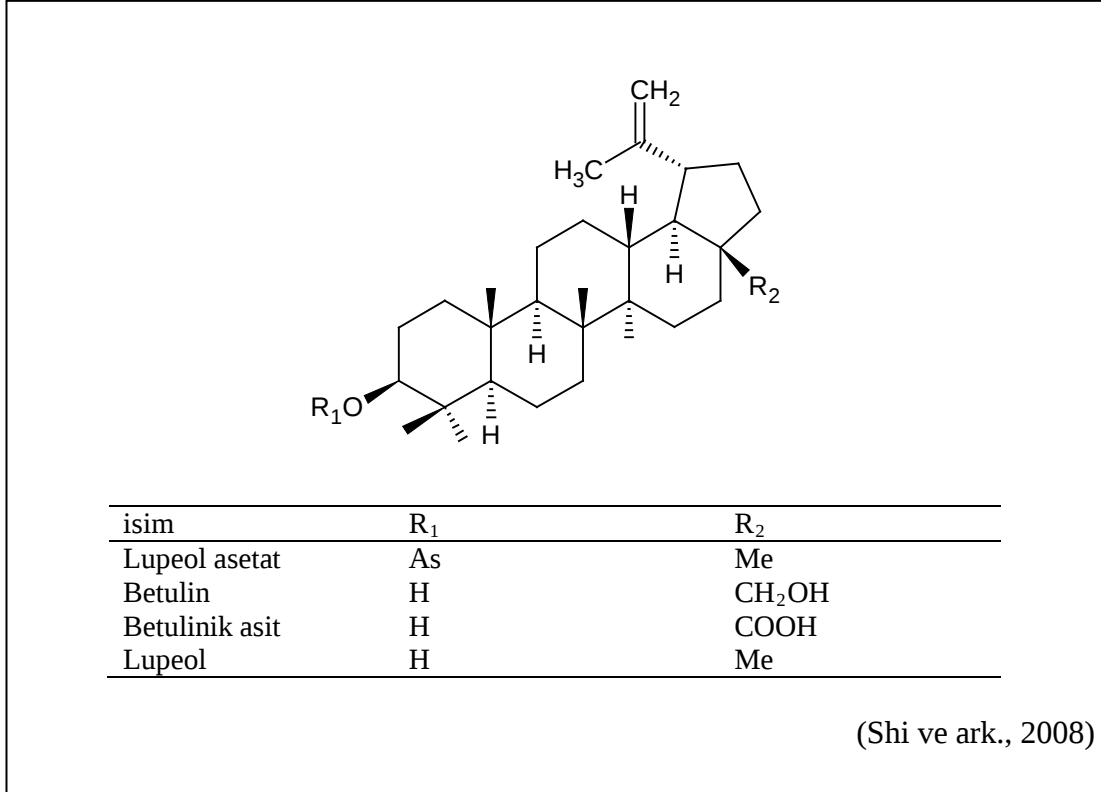
Euphorbia stygiana Watson'un yapraklarından ve sap kısımlarından hazırlanan asetonlu ekstralar silika jel kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. Yapraklardan madeiranil asetat, izomadeiranil asetat, lupenil asetat ve tarakseril asetat; sap kısımlarından da madeiranon, izomadeiranon, lupenon ve tarakseron izole edilmiştir. Madeiranil asetat ve izomadeiranil asetat ilk kez bu çalışma ile izole edilen bileşiklerdir (Lima ve ark., 2003).

Toz edilen kurutulmuş *E. humifusa* %95 etanol ile perkolasyon metoduyla tüketilmiştir. Elde edilen ekstre kurutulduktan sonra etil asetat ile muamele edilmiş ve etil asetatlı ekstre silika jel kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. İlk kez izole edilen dört triterpenik bileşik (3 β)-3-hidroksi-24-metilenlanost-8-en-7,11-dion; (3 β)-3-hidroksilanosta-8,24-dien-7,11-dion; (3 β ,7 α)-3,7-dihidroksilanosta-8,24-dien-11-on; (3 β ,11 β)-3,11-dihidroksilanosta-8,24-dien-7-on olarak adlandırılmıştır (Lu ve ark., 2007).

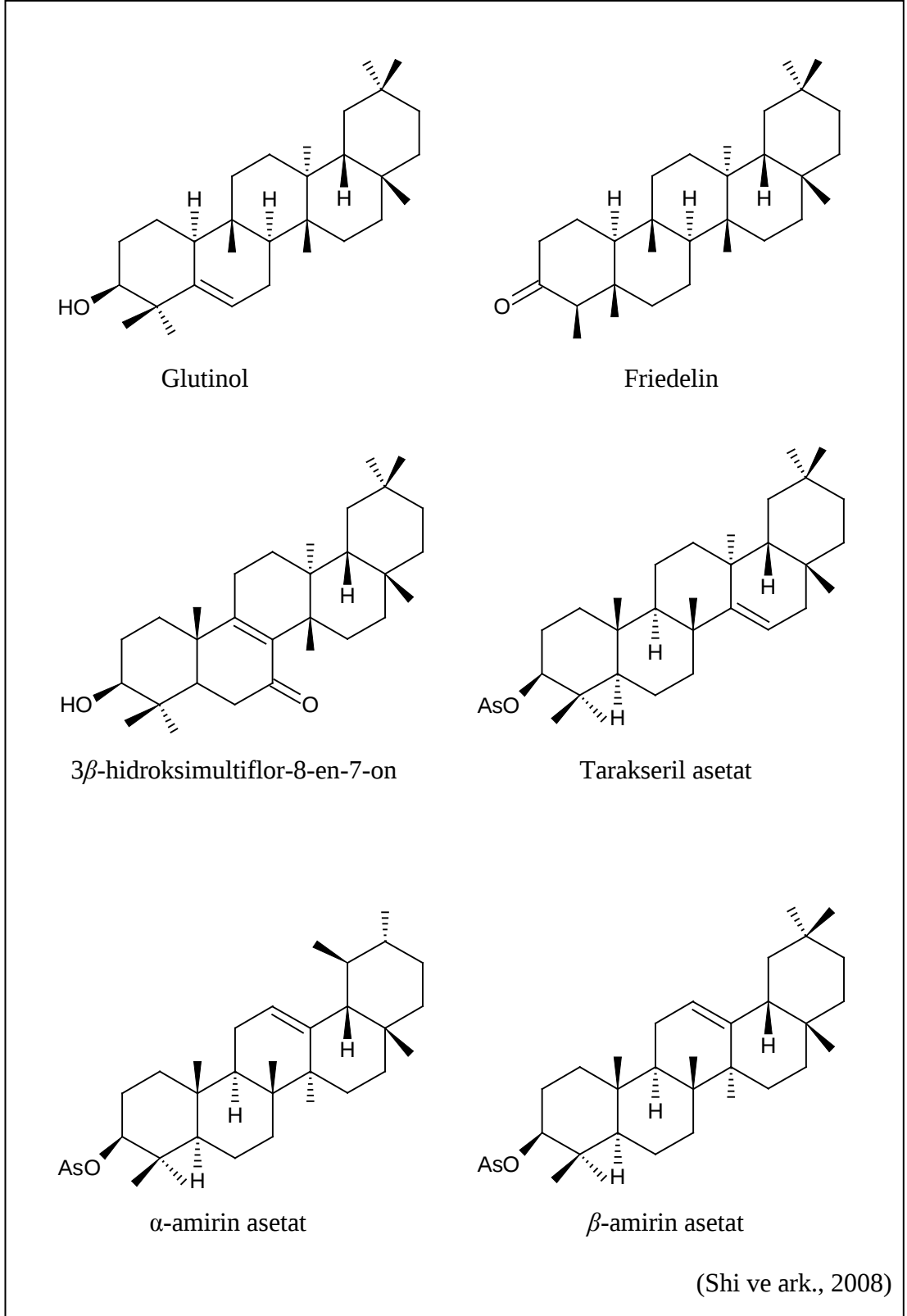
E. hirta'nın sap, yaprak ve köklerinden diklorometan ile ekstralar hazırlanmıştır. Bitkinin sap ve yapraklarından tarakseron, sikloartenol, lupeol, 25-hidroperoksisikloart-23-en-3 β -ol, 24-hidroperoksisikloart-25-en-3 β -ol; köklerinden de sikloartan, lupeol, α -amirin ve β -amirin izole edilmiştir. 25-hidroperoksisikloart-

23-en-3 β -ol ve 24-hidroperoksisikloart-25-en-3 β -ol ilk kez bu çalışma ile izole edilmiştir (Ragasa ve Cornelio, 2013).

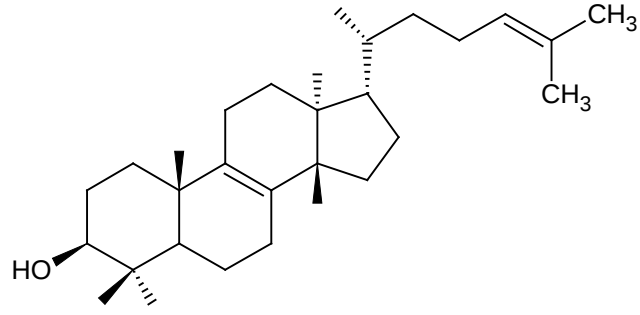
Euphorbia türlerinden izole edilen triterpen yapısında bazı bileşikler Şekil 1.3'te gösterilmektedir.



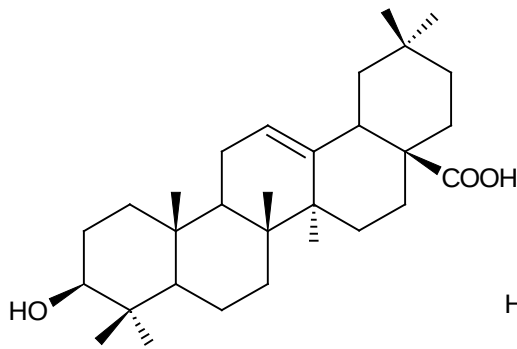
Şekil 1.3. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler



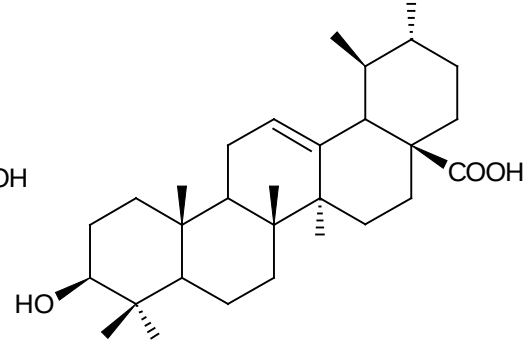
Şekil 1.3. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler



Öfol

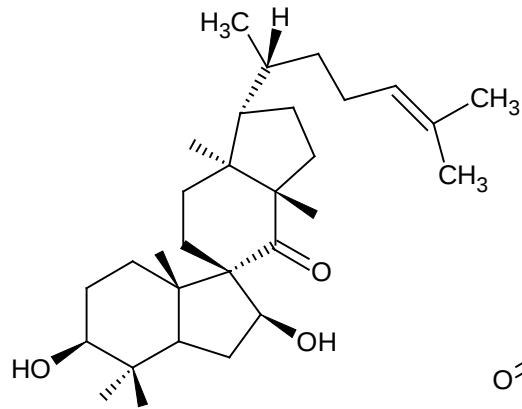


Oleanolik asit



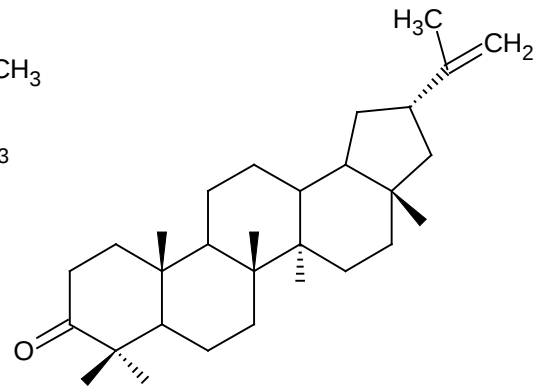
Ursolik asit

(Peng ve ark., 2012)



Kansuinon

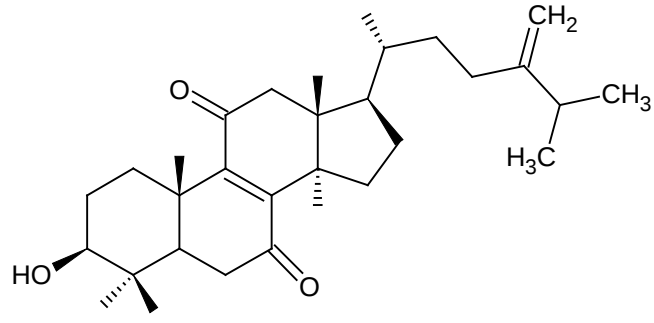
(Guo ve ark., 2010)



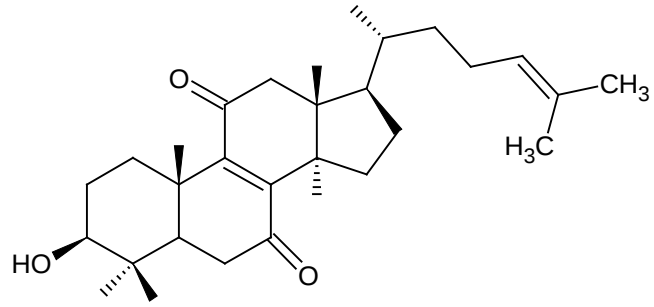
Luteon

(Liang ve ark., 2014)

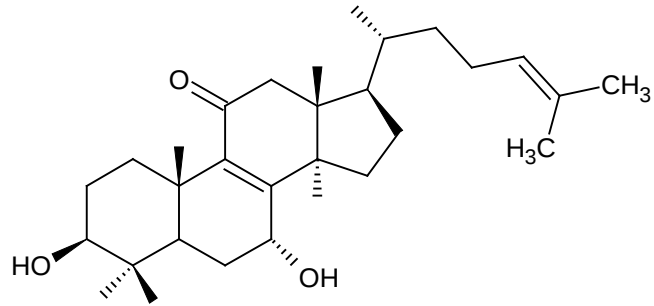
Şekil 1.3. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler



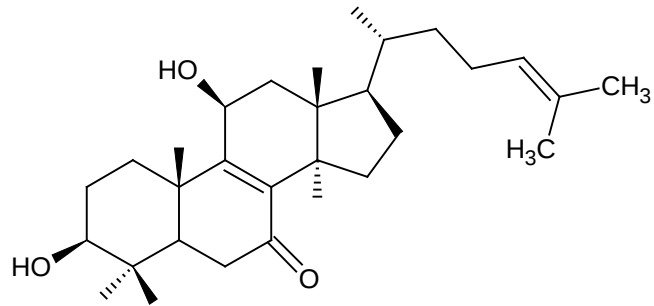
(3 β)-3-hidroksi-24-metilenlanost-8-en-7,11-dion



(3 β)-3-hidroksilanosta-8,24-dien-7,11-dion



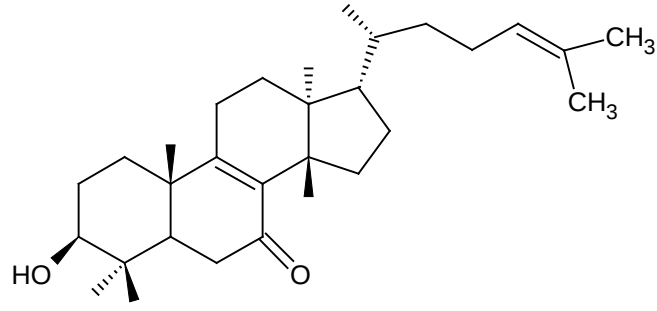
(3 β ,7 α)-3,7-dihidroksilanosta-8,24-dien-11-on



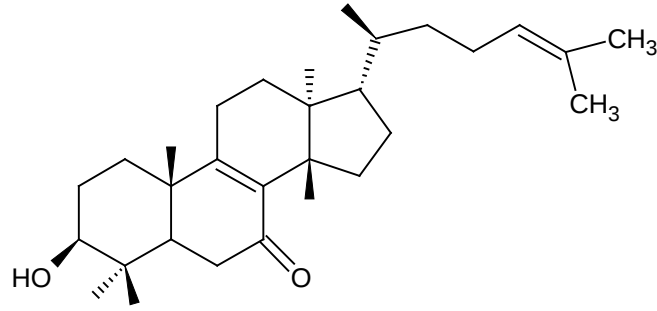
(3 β ,11 β)-3,11-dihidroksilanosta-8,24-dien-7-on

(Lu ve ark., 2007)

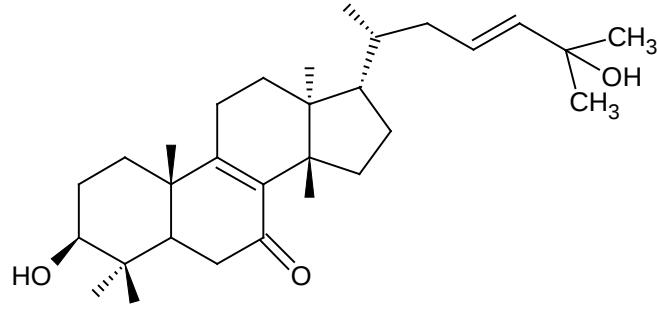
Şekil 1.3. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler



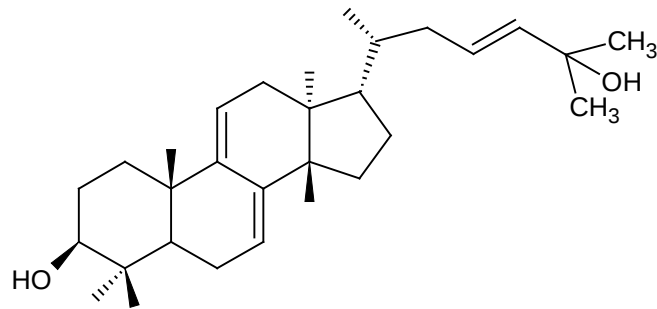
Kansanon



Epi-kansanon



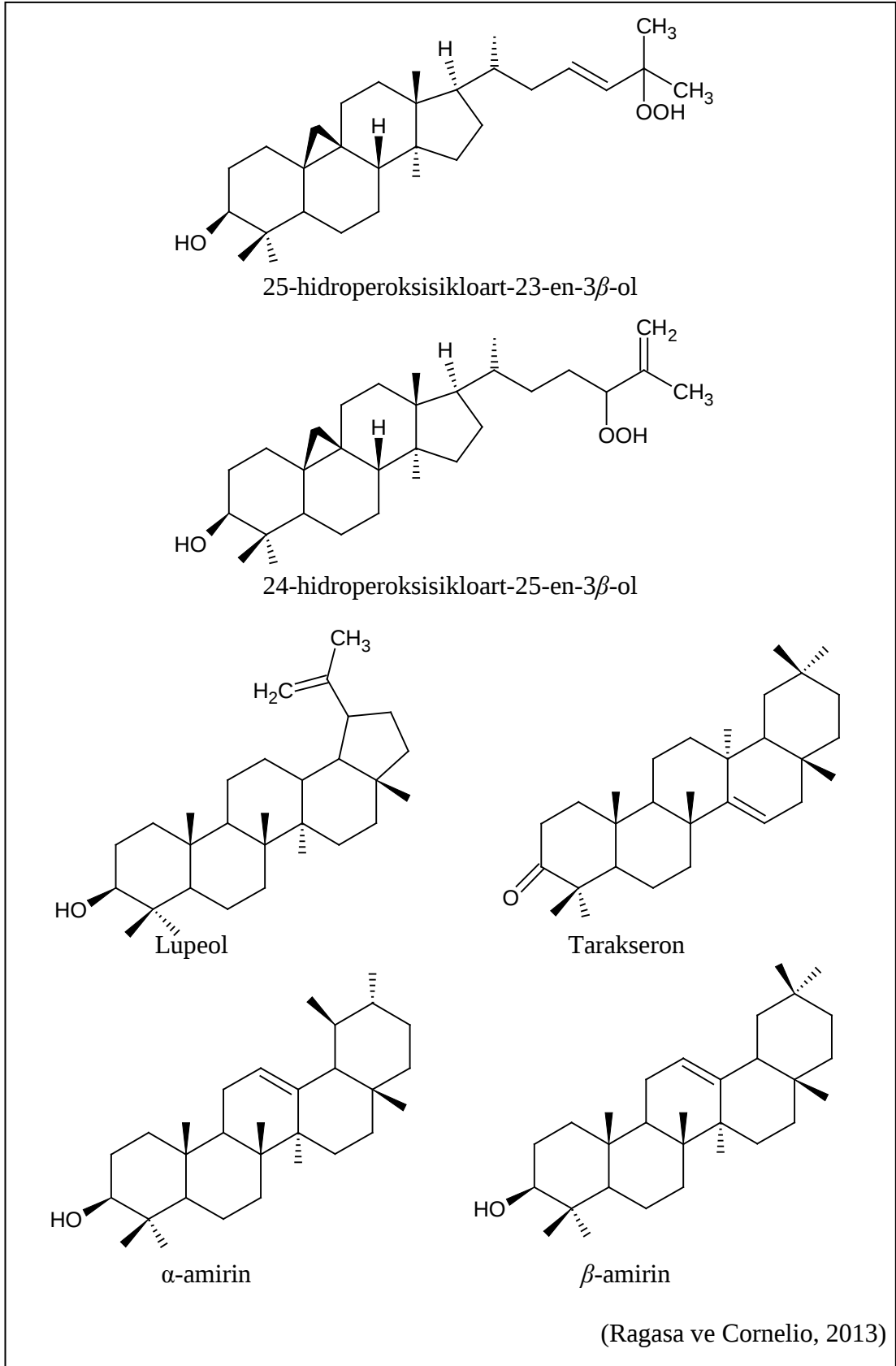
Kansanonol



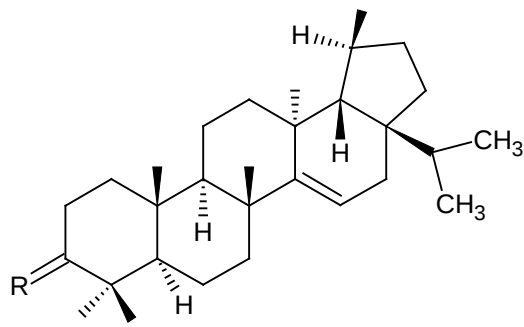
Kansanol

(Wang ve ark., 2003)

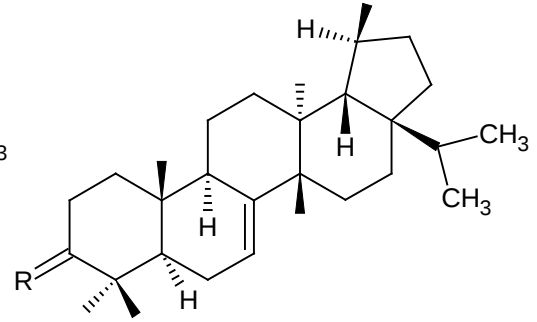
Şekil 1.3. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler



Şekil 1.3. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler

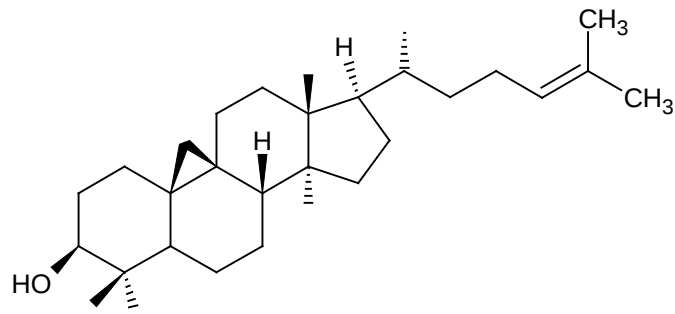


R = α -H, β -OAs
Madeiranil asetat

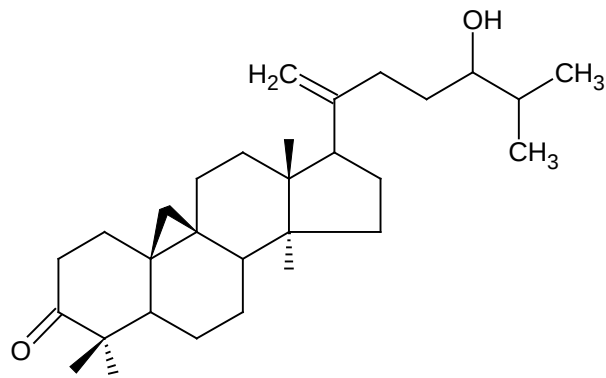


R = α -H, β -OAs
İzomadeiranil asetat

(Lima ve ark., 2003)



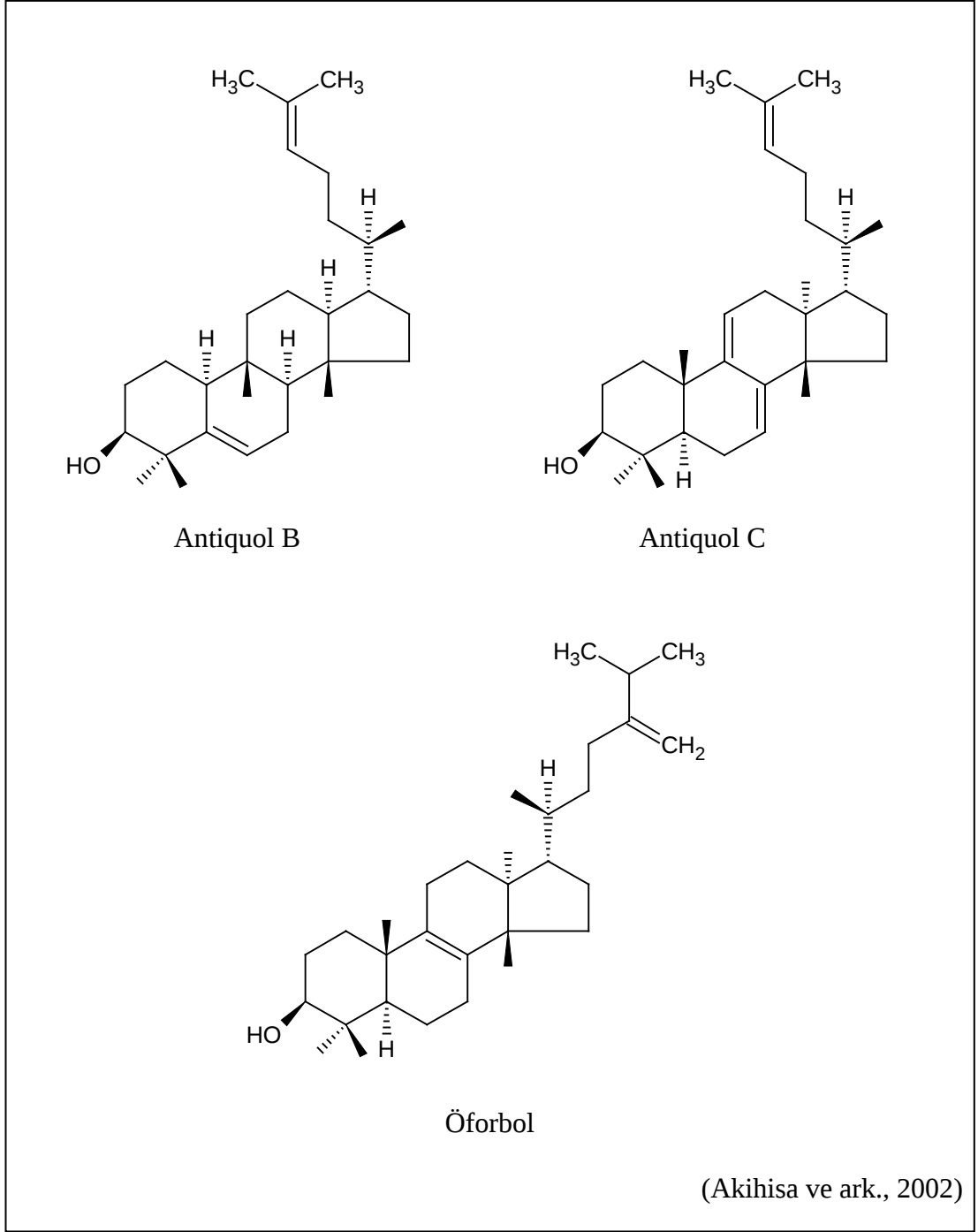
Sikloartenol



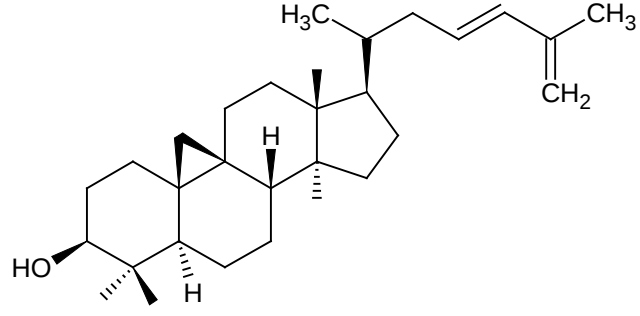
Neriifolion

(İlyas ve ark., 1998)

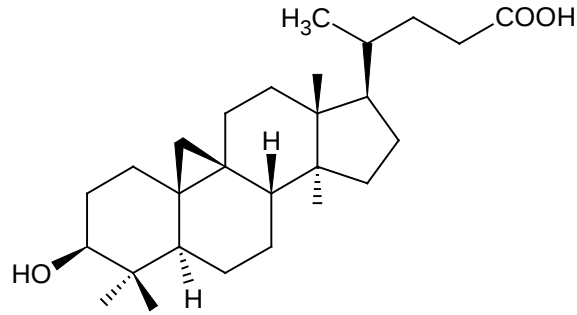
Şekil 1.3. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler



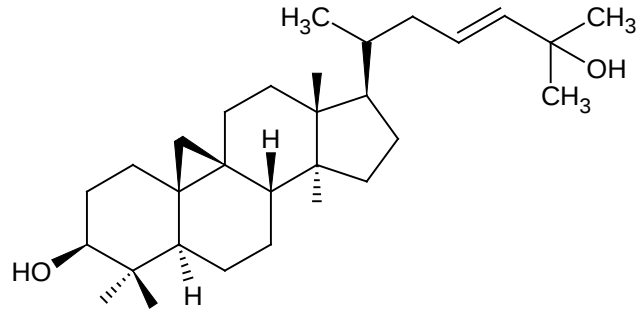
Şekil 1.3. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler



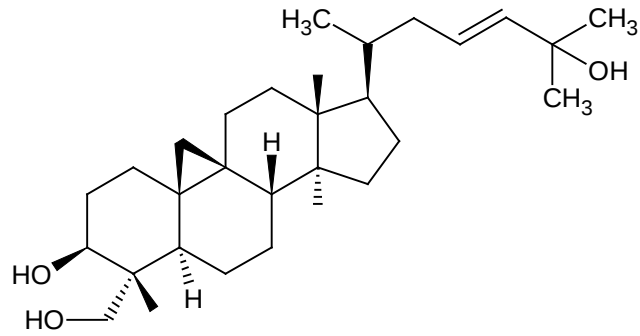
Sikloarta-23,25-dien-3 β -ol



25,26,27-trinor-3 α -hidroksisikloartan-24-oik asit



Sikloart-23-en-3 β ,25-diol



Sikloart-23-en-3 β ,25,28-triol

(Liu ve ark., 2014)

Şekil 1.3. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı triterpenik bileşikler

1.2.1.1.4. Steroller

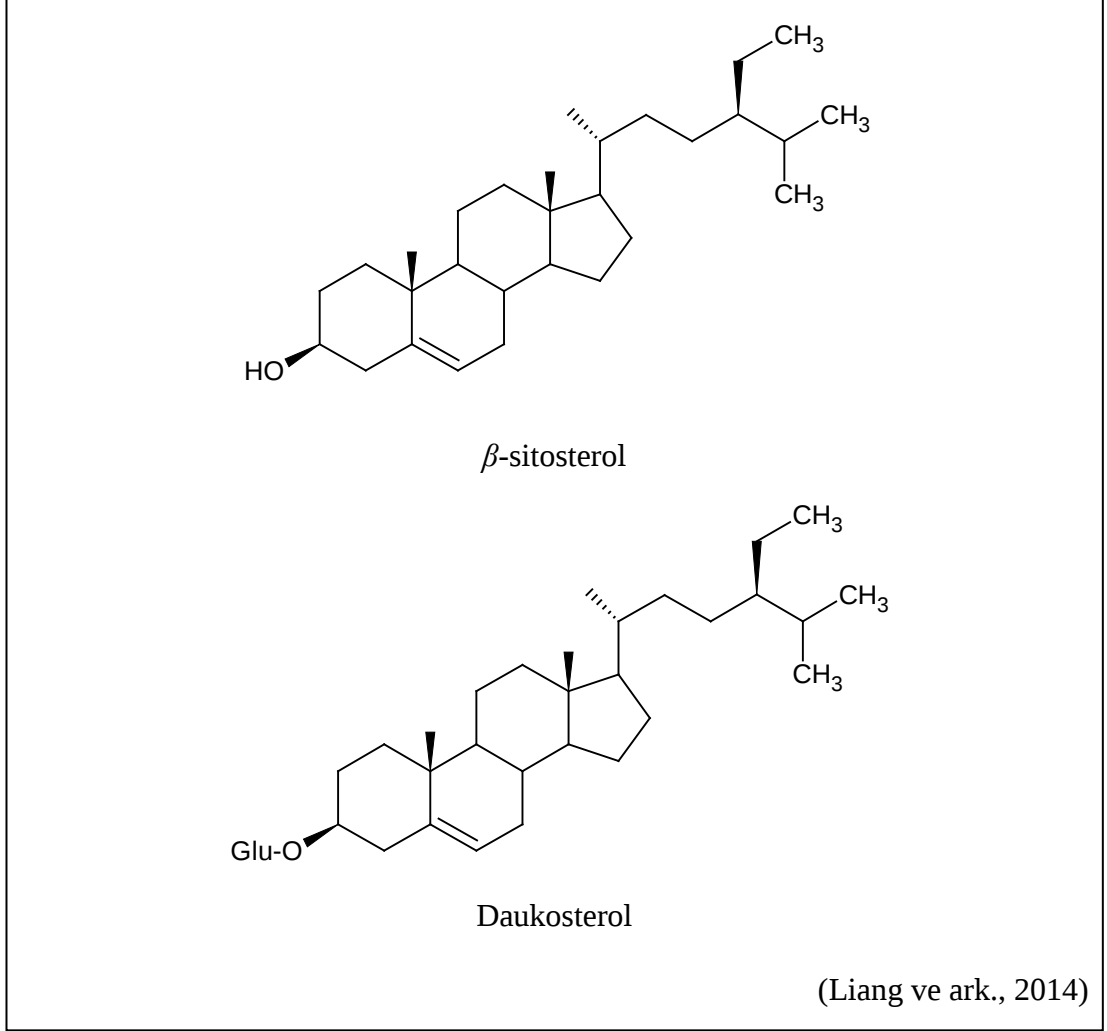
Bitkisel sterollere *Euphorbia* türlerinde de rastlanmaktadır. *E. characias*, *E. dendroides*, *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii* L. ve *E. semiperfoliata* türlerinde yapılan çalışmalarda, tohumların kolesterol, β -sitosterol, kampesterol ve lanosterol içerdiği tespit edilmiştir (Bruni ve ark., 2004).

E. fischeriana ve *E. ebracteolata* köklerinin %95'lik etanollü ekstresi Soxhlet ekstraksiyonu metoduyla hazırlanmıştır. Petrol eteri, kloroform ve etil asetat ile fraksiyonlanan ekstrelerin petrol eteri fazından β -sitosterol, etil asetat fazından da β -sterolün glikoziti olan daukosterol izole edilmiştir (Liang ve ark., 2014).

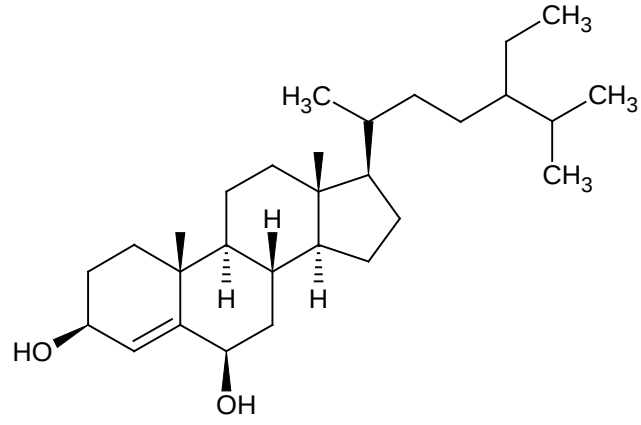
Fas bölgesine endemik bir tür olan *Euphorbia officinarum* Hook. F. & Coss.'dan lanostenol, lanosterol, 24-metilen lanostenol, 4 α ,14 α -dimetil-24-metilen-5 α -kolest-8-en-3 β -ol; 4 α ,14 α ,24(R)-trimetil-5 α -kolesta-8,25(27)-dien-3 β -ol; 4 α ,14 α -dimetil-5 α -kolesta-8,24-dien-3 β -ol; 4 α ,14 α -dimetil-5 α -kolest-8-en-3 β -ol ile yeni bileşikler olan 3 β ,7 α -dihidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergost-8-en-11-on ve 3 β ,7 β -dihidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergost-8-en-11-on sterollerini izole edilmiştir (Daoubi ve ark., 2004).

Terpenik yapıda bileşikler olan sterollerin farklı türevleri çeşitli *Euphorbia* türlerinden izole edilmiştir. *Euphorbia chamaesyce* L.'den 3 β -hidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-11-on; 3 β ,11 α -dihidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28) dien-7-on; 3 β ,7 α -dihidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-11-on; 3 β -hidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-7-on; 3 β -hidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-7,11-on; 4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-7,9(11),24(28)-trien-3 β -ol ve obtusifoliol, *E. boetica* Boiss.'den 5 α -stigmastan-3 β ,6 α -diol; 5 α -stigmastan-3 β ,5,6 β -triol, *E. geniculata* Ortega'dan genikulatozit F, *E. peplis*'den 3-(β -D-glukopiranoziloksi)-stigmast-5-en ve *E. officinarum*'dan (3S,4S,5R,7S,9R,14R)-3,7-dihidroksi-4,14-dimetil abeokolestan-8-on izole edilmiştir (Shi ve ark., 2008).

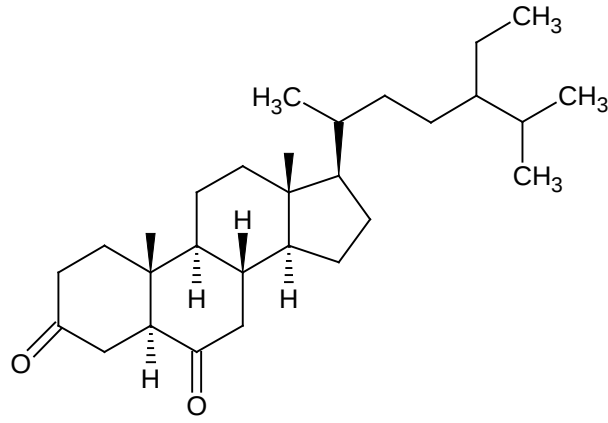
Euphorbia türlerinden izole edilen sterol yapısında bazı bileşikler Şekil 1.4'te gösterilmektedir.



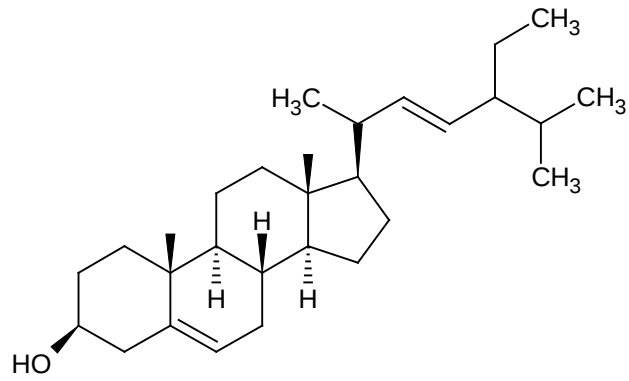
Şekil 1.4. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı steroller



Stigmast-4-en-3 β ,6 β -diol



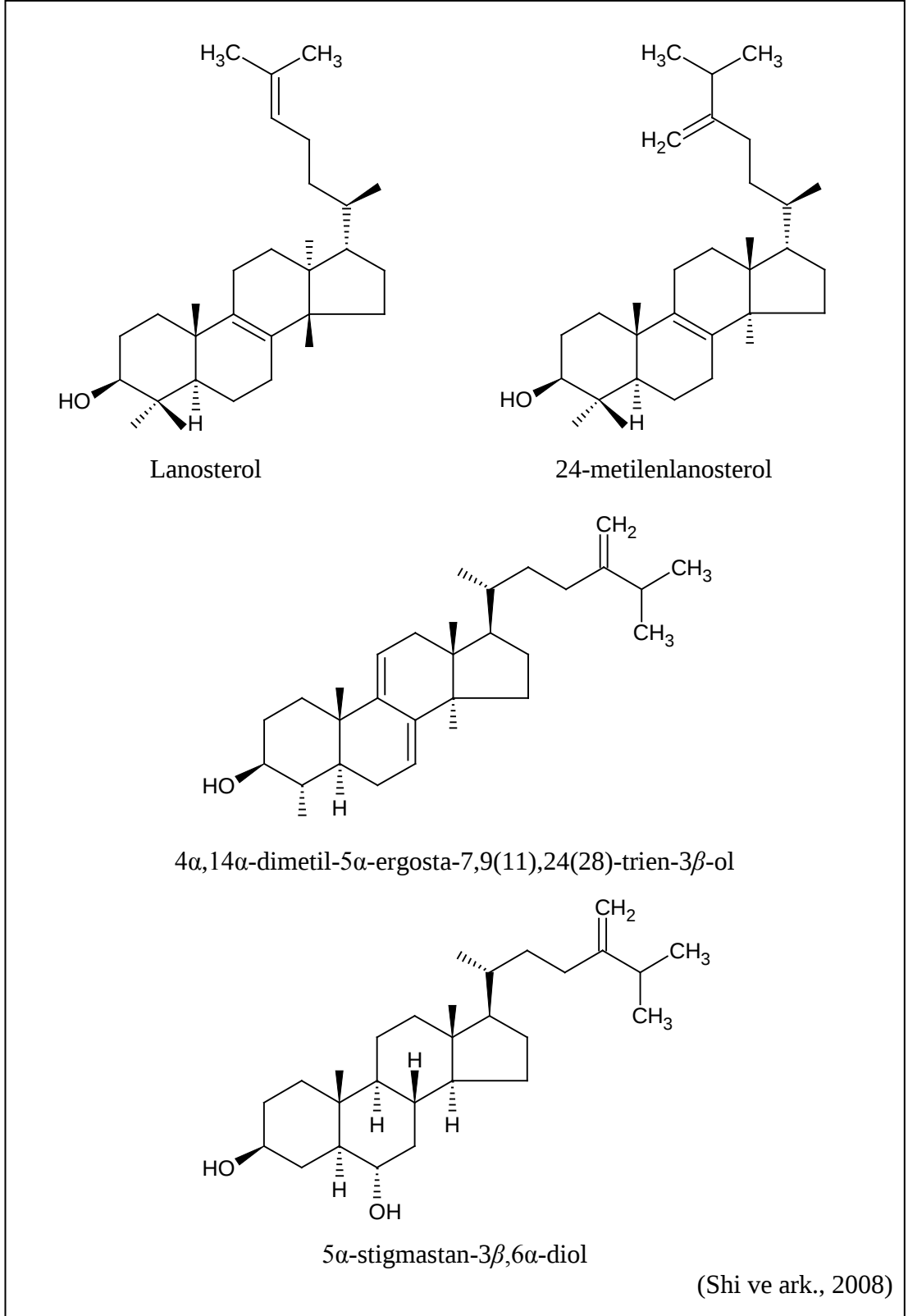
Stigmastan-3,6-dion



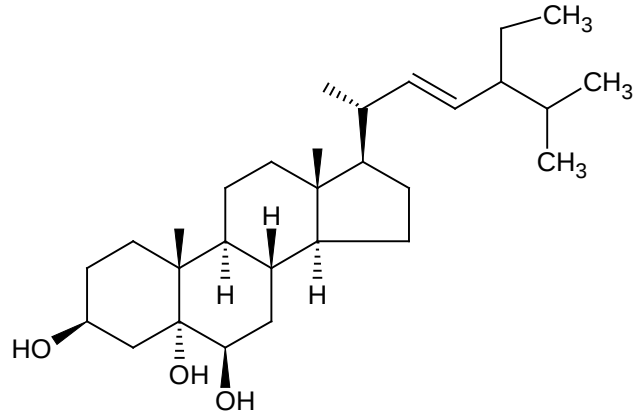
Stigmasterol

(Liu ve ark., 2014)

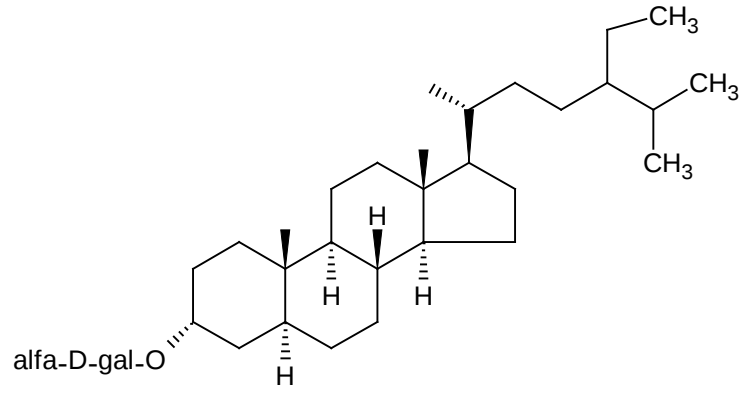
Şekil 1.4. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı steroller



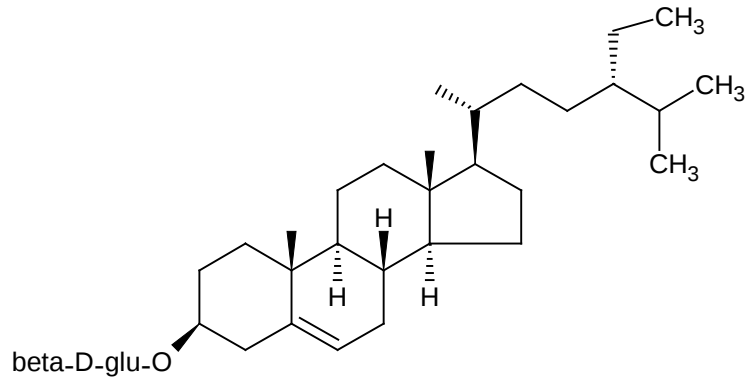
Şekil 1.4. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı steroller



5 α -stigmastan-3 β ,5,6 β -triol



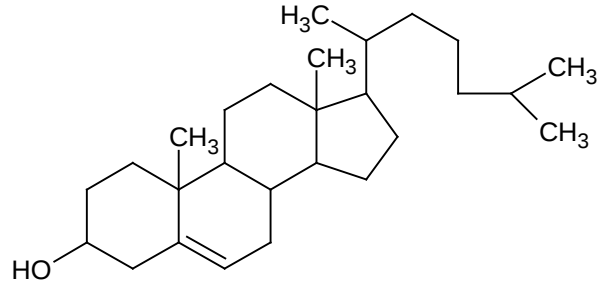
Genikulozitol F



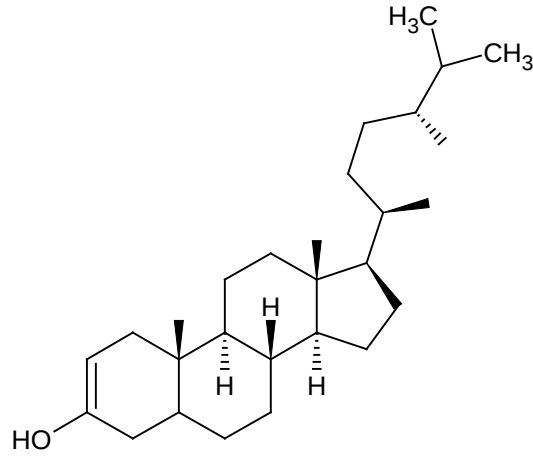
3-(β -D-glukopiranoziloksi)-stigmast-5-en

(Shi ve ark., 2008)

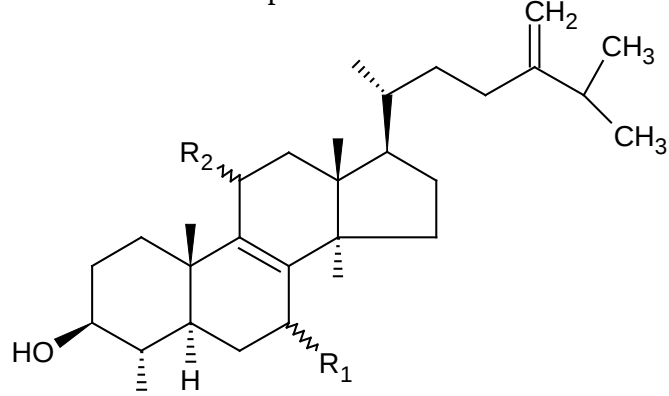
Şekil 1.4. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı steroller



Kolesterol



Kampesterol



İsim	R ₁	R ₂
3 β -hidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-11-on	H ₂	=O
3 β ,11 α -dihidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-7-on	=O	α -OH
3 β ,7 α -dihidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-11-on	α -OH	=O
3 β -hidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-7-on	=O	H ₂
3 β -hidroksi-4 α ,14 α -dimetil-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-7,11-on	=O	=O
Obtusifoliol	H ₂	H ₂

(Shi ve ark., 2008)

Şekil 1.4. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı steroller

1.2.1.2. Flavonoitler

Flavonoitler bitkiler aleminde oldukça yaygın olarak bulunan ve çok çeşitli fizyolojik etkileri olan maddelerdir. Bitkilerin meyve, sap, dal, yaprak, çiçek gibi pek çok organında bulunabilirler. Fitoterapide kullanılan bitkilerin pek çoğunda da flavonoitler etkiden sorumlu aktif bileşikler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarla flavonoitlerin çok çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu kanıtlanmıştır. Flavonoitler cins ve familyalara özgü kemotaksonomik çalışmalarda da önem arz etmektedir (Noori ve ark., 2009).

Yapılan bir çalışmada *E. ebracteolata*'nın toprak üstü kısımlarından %95'lik etanollü ekstre hazırlanmış ve sırasıyla petrol eteri, etil asetat ve *n*-butanol ile sıvı partisyona tabi tutulmuştur. Etil asetat fraksiyonundan kersetin-3-*O*-6''-(3-hidroksi-3-metilglutaril)- β -D-glukopiranozit, kemferol-3-*O*-2''-galloil- β -D-glukopiranozit, kemferol-3-*O*-rutinozit, kersetin-3-*O*- β -D-glukopiranozit ve rutin izole edilmiştir (Liu ve ark., 2004).

Yapılan bir başka çalışmada *E. lunulata*'dan hazırlanan %70'lik asetonlu ekstrenin etil asetat fraksiyonundan kersetin-3-*O*-(2'',3''-digalloil)- β -D-galaktopiranozit, kersetin-3-*O*-(2''-galloil)- β -D-galaktopiranozit, hiperin, kersetin ve gallik asit izole edilmiştir (Nishimura ve ark., 2005).

E. hirta'nın toprak üstü kısımlarından %85'lik etanol ile hazırlanan ekstre sıvı partiyon tekniği kullanılarak petrol eteri, diklorometan ve etil asetat ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Diklorometan fraksiyonundan sefadeks ve silika kolonlar yardımıyla skopoletin, skoparon, izoskopoletin, kersetin, izoramnetin, kemferol, luteolin ve gallik asit izole edilmiştir (Yi ve ark., 2012).

E. humifusa'dan %70'lik etanol ile hazırlanan ekstrenin çözücüsü uzaklaştırılarak suda çözülmüş, kloroform ile temizlenmiş ve kalan sulu fraksiyondan on üç tane flavon glikozidi izole edilmiştir. İzole edilen flavonoitlerin yapıları apigenin,

apigenin-7-*O*- β -D-glukopiranozit, apigenin-7-*O*-(6''-*O*-galloil)- β -D-glukopiranozit, apigenin-7-*O*- β -D-lutinozit, apigenin-7-*O*- β -D-apiofuranozil (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukopiranozit, luteolin-7-*O*-(6''-*O*-trans-feruloil)- β -D-glukopiranozit, luteolin-7-*O*-(6''-*O*-kumaroil)- β -D-glukopiranozit, luteolin, luteolin-7-*O*- β -D-glukopiranozit, kersetin, kersetin-3-*O*- α -L-ramnozil (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galaktozit, kersetin-3-*O*- β -D-glukopiranozit ve kersetin-3-*O*- β -D-galaktozit olarak aydınlatılmıştır (Tian ve ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada *Euphorbia maculata* L. ve *E. humifusa*'dan metanollü ekstraler hazırlanmıştır. Her iki türden de flavonoit yapısında bileşikler olan astragalin 2'',3''-*O*-digallat, astragalin 2''-*O*-gallat, izokersitrin-2''-*O*-gallat, kersitrin-2''-*O*-gallat, kersetin, hiperin, izokersitrin, rutin, izomirsitrin, nikotiflorin ve astragalin izole edilmiştir (Luyen ve ark., 2014a ve Luyen ve ark., 2014b).

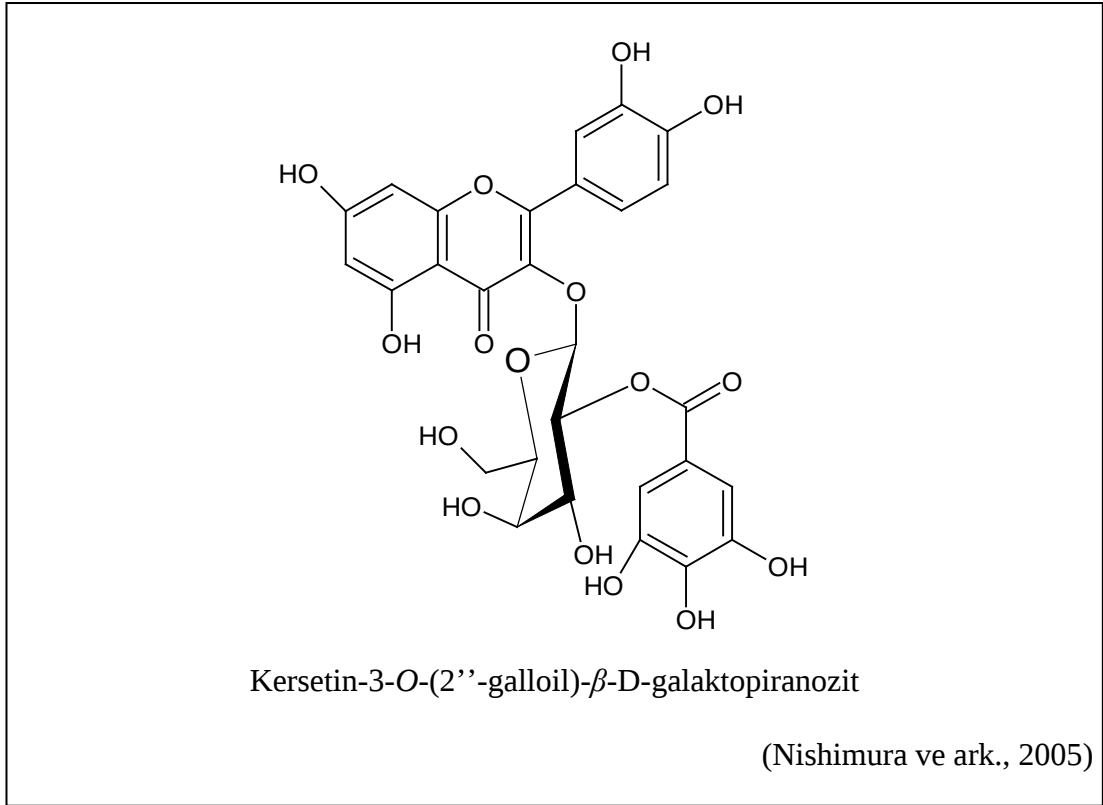
Yapılan bir diğer çalışmada *E. neriifolia*'nın yapraklarından hazırlanan %70 etanollü ekstreden hareketle silika kolon kromatografisi metoduyla 2-(3,4-dihidroksi-5-metoksifenil)-3,5-dihidroksi-6,7-dimetoksikroman-4-on (C₁₈H₁₈O₉) flavonoidi izole edilmiştir. Bu bileşik, araştırmacılar tarafından bu bitkiden ilk kez izole edilmiştir (Sharma ve Janmeda, 2014).

Peng ve ark. (2012), yaptıkları bir çalışmada *E. kansui*'den üç tane flavonoit izole etmişlerdir. 2',4'-dihidroksi-6'-metoksi-3-mentilkalkon; 2',4'-dihidroksi-6'-metoksi-3',5'-dimentilkalkon ve (2*S*)-7-hidroksi-5-metoksi-6,8-dimentilflavanon isimli bu flavonoitleri araştırmacılar Euphorbiaceae familyasından ilk kez izole etmişlerdir.

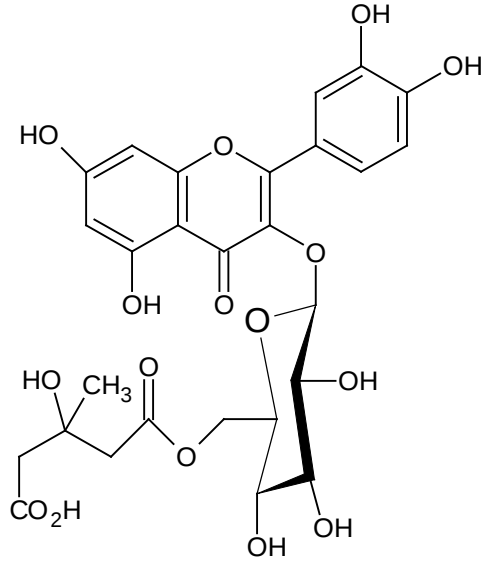
Ertaş ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada *E. macroclada* ve *Euphorbia gaillardotii* Boiss. & Blanche türlerinden metanollü ekstraler hazırlamış ve LC/MS (sıvı kromatografisi/kütle spektroskopisi) metodu ile bitkilerdeki flavonoitleri teşhis ve tayin etmişlerdir. *E. macroclada*'nın hiperozit, hesperidin, rutin, kersetin, naringenin, ramnetin, apigenin ve luteolin; *E. gaillardotii*'nin de rutin, hesperidin,

hiperozit, naringenin, luteolin, kemferol, apigenin ve ramnetin taşıdığını tespit etmişlerdir.

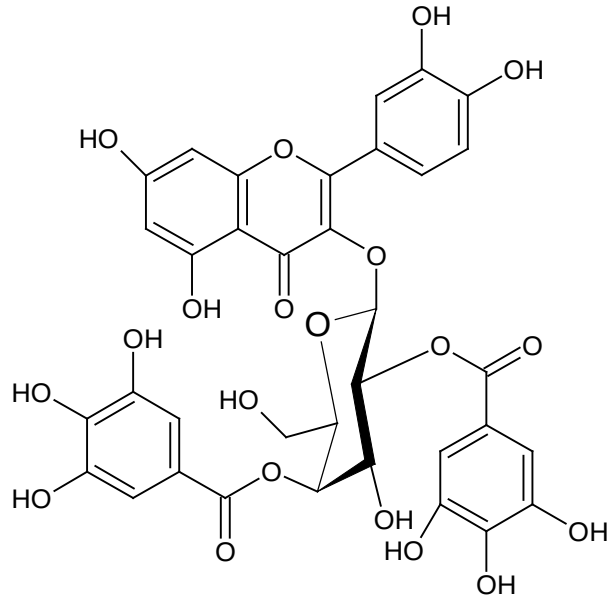
Euphorbia türlerinden izole edilen flavonoit yapısında bazı bileşikler Şekil 1.5'te gösterilmektedir.



Şekil 1.5. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı flavonoitler



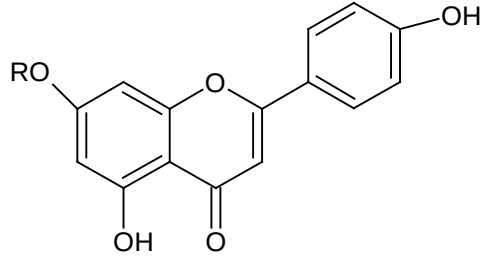
Kersetin-3-O-6'-(3-hidroksi-3-metilglutaril)- β -D-glukopiranozit



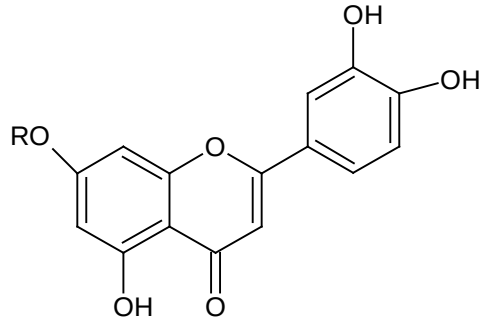
Kersetin-3-O-(2'',3''-digalloil)- β -D-galaktopiranozit

(Nishimura ve ark., 2005)

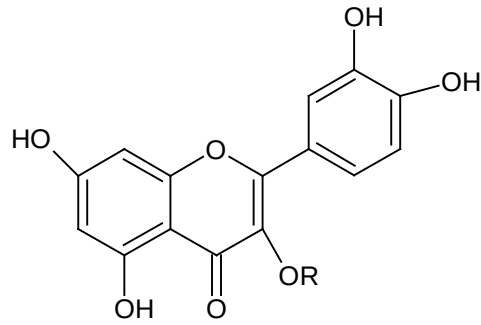
Şekil 1.5. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı flavonoitler



isim	R
Apigenin	H
Apigenin-7-O- β -D-glukopiranozit	Glu
Apigenin-7-O- β -D-lutinozit	Ram(1 $\rightarrow$ 6) Glu
Apigenin-7-O- β -D-apiofuranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukopiranozit	Api(1 $\rightarrow$ 2) Glu
Api: apigenin, Ram: ramnoz, Glu:glukoz	



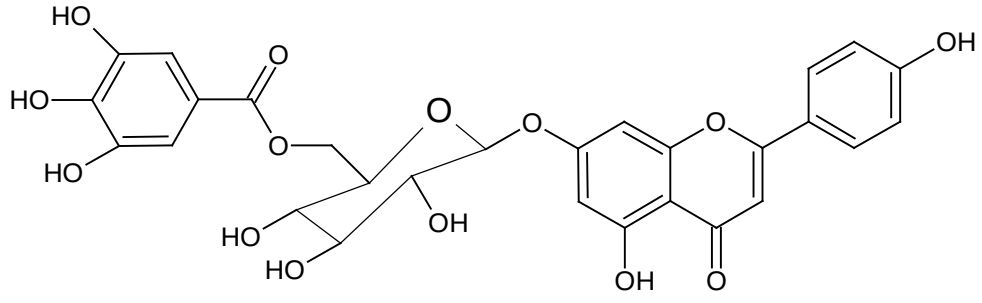
isim	R
Luteolin	H
Luteolin-7-O- β -D-glukopiranozit	Glu



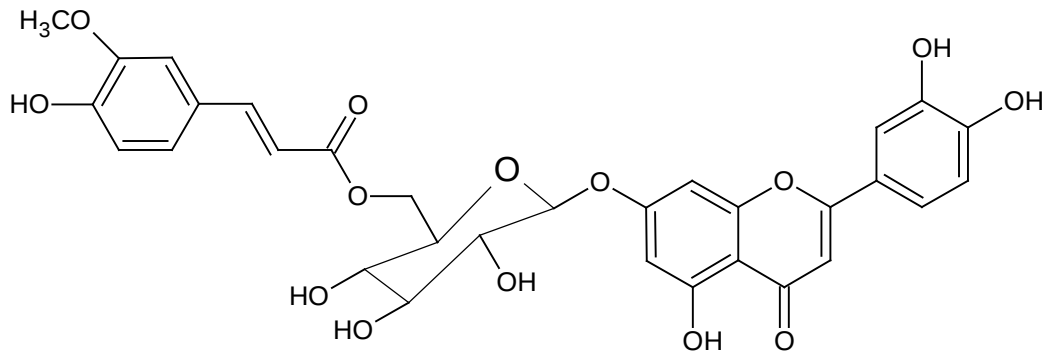
isim	R
Kersetin	H
Kersetin-3-O- α -L-ramnozil(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galaktozit	Ram (1 $\rightarrow$ 6)Gal
Kersetin-3-O- β -D-glukopiranozit	Glu
Kersetin-3-O- β -D-galaktozit	Gal
Ram: ramnoz; Gal: galaktoz	

(Tian ve ark., 2010)

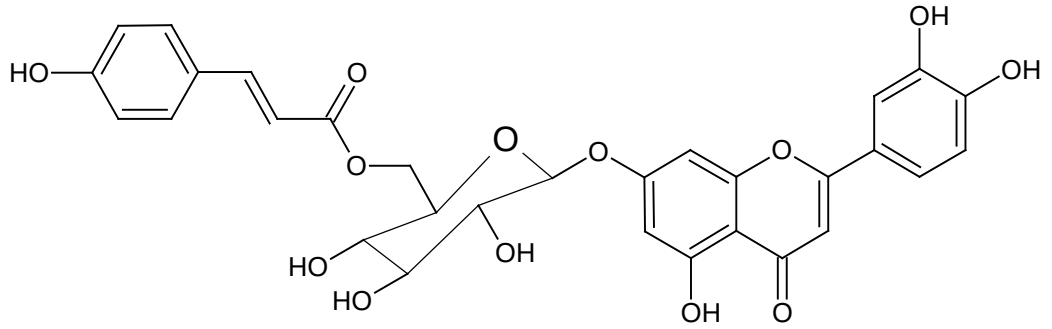
Şekil 1.5. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı flavonoitler



Apigenin-7-O-(6''-O-galloil)-β-D-glukopiranozit



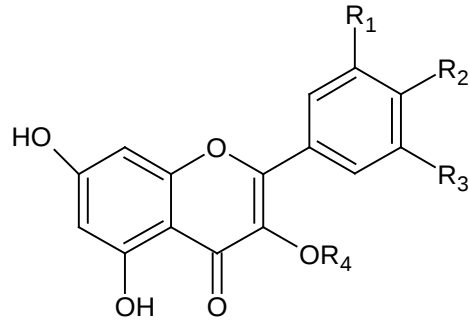
Luteolin-7-O-(6''-O-trans-feruloil)-β-D-glukopiranozit



Luteolin-7-O-(6''-O-kumaroil)-β-D-glukopiranozit

(Tian ve ark., 2010)

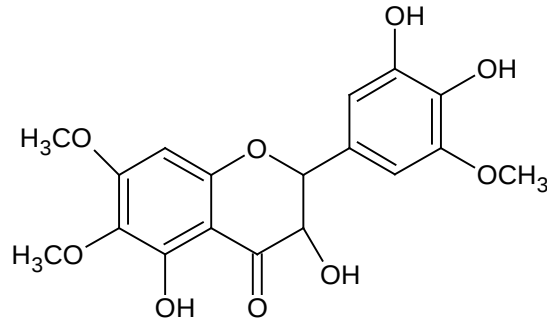
Şekil 1.5. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı flavonoitler



isim	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Astragalin 2'',3''-O-digallat	H	OH	H	DGGlu
Astragalin 2''-O-gallat	H	OH	H	GGlu
İzokersitrin 2''-O-gallat	OH	OH	H	GGlu
Kersitrin 2''-O-gallat	OH	OH	H	GRam
İzokersitrin	OH	OH	H	Glu
Rutin	OH	OH	H	Rut
İzomirsitrin	OH	OH	OH	Glu
Nikotiflorin	H	OH	H	Rut
Astragalin	H	OH	H	Glu

Glu: glukozil; DGGlu: 2,3-digalloilglukozil; GGlu: 2-galloilglukozil; GRam: 2-galloilramnozil; Rut: rutinozil

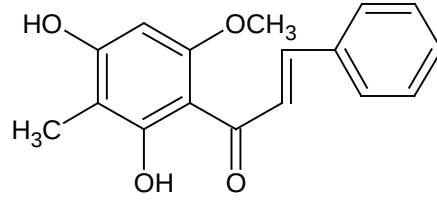
(Luyen ve ark., 2014a ve Luyen ve ark., 2014b)



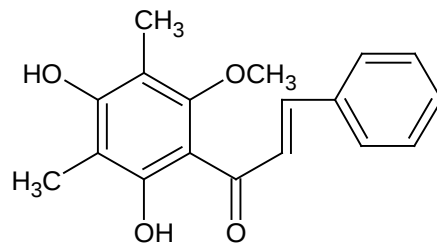
2-(3,4-dihidroksi-5-metoksifenil)-3,5-dihidroksi-6,7-dimetoksikroman-4-on

(Sharma ve Janmeda, 2014)

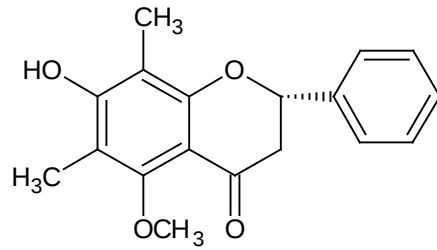
Şekil 1.5. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı flavonoidler



2',4'-dihidroksi-6'-metoksi-3'-mentilkalkon



2',4'-dihidroksi-6'-metoksi-3',5'-dimentilkalkon



(2S)-7-hidroksi-5-metoksi-6,8-dimentilflavanon

(Peng ve ark., 2012)

Şekil 1.5. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı flavonoitler

1.2.1.3. Fenolik Bileşikler

E. fischeriana ve *E. ebracteolata* köklerinin %95'lik etanollü ekstresi Soxhlet ekstraksiyonu metoduyla hazırlanmıştır. Petrol eteri, kloroform ve etil asetat ile fraksiyonlanan ekstrelerin etil asetat fazından 2,4-dihidroksi-6-metoksi-3-metilasetofenon, 2,4-dihidroksi-3-al-6-metoksiasetofenon, 3,3'-diasetil-4,4'-dimetoksi-2,2',6,6'-tetrahidroksidifenilmetan; etil asetat fazından da gallik asit ve 3,4,3'-tri-O-metil elajik asit gibi fenolik bileşikler izole edilmiştir (Liang ve ark., 2014).

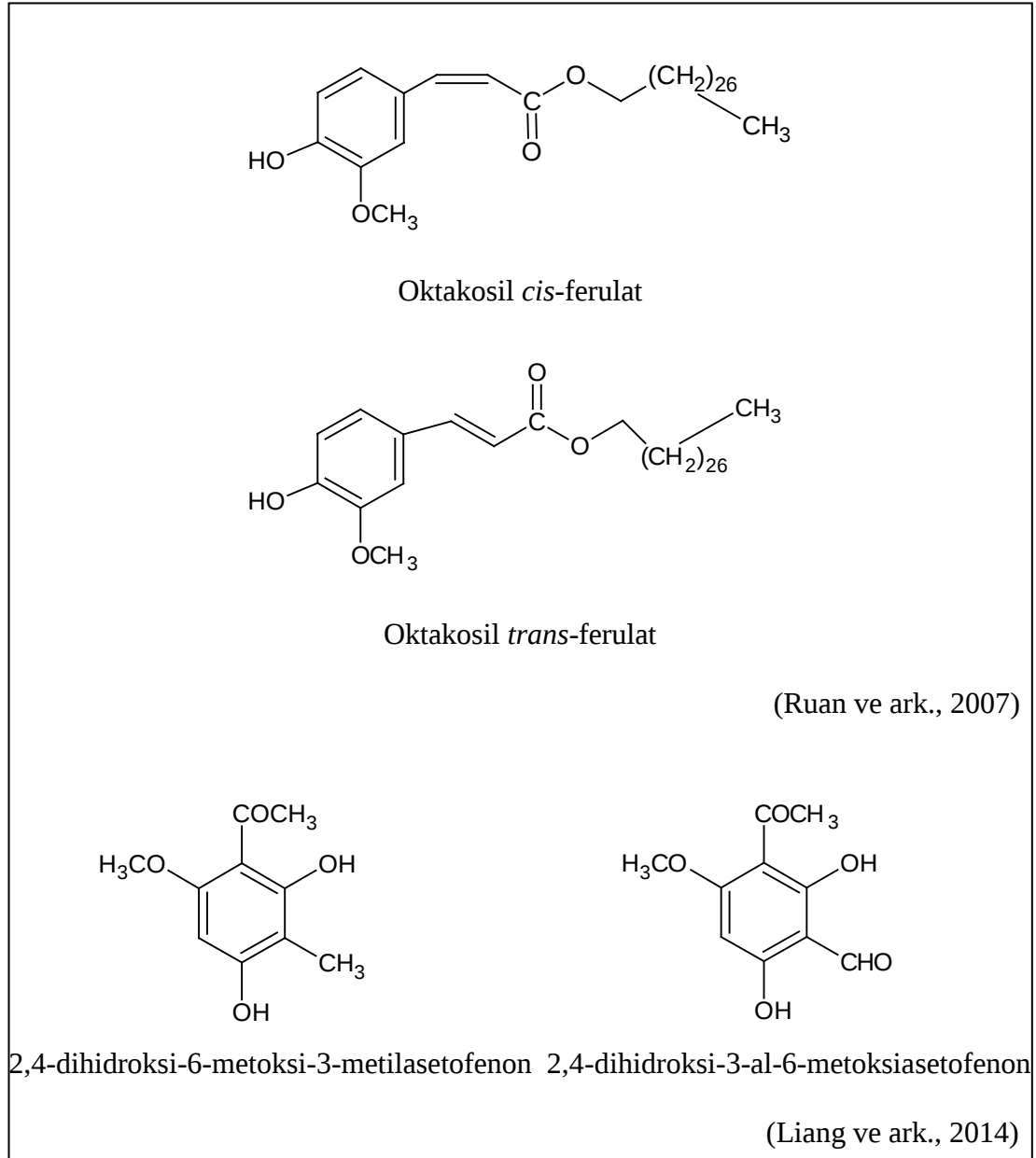
Yapılan bir çalışmada *E. humifusa*'dan hazırlanan metanollü ekstreden florizin, elajik asit ve metil gallat gibi fenolik bileşikler izole edilmiştir. Aynı araştırma grubu tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *E. maculata*'dan metanollü ekstre hazırlanmış, kloroform ve etil asetat ile fraksiyonlandırılmıştır. Kalan su fazından fenolik yapıda bileşikler olan prokateşik asit, elajik asit; etil asetat fazından ise yine fenolik yapıda florizin ve metil gallat bileşikleri izole edilmiştir (Luyen ve ark., 2014a ve Luyen ve ark., 2014b).

Yapılan bazı çalışmalarda *Euphorbia portulacoides* L.'den 2-hidroksi-4,6-dimetoksiasetofenon, 2,4,6-trimetoksiasetofenon, 2-hidroksi-4,6-dimetoksi-3-metilasetofenon, 2,4,6-trimetoksi-3-metilasetofenon; *Euphorbia quinquecostata* Volk.'tan 2,2'-dihidroksi-4,6-dimetoksi-3-metilasetofenon; *E. fischeriana*'dan 2,4-dihidroksi-6-metoksiasetofenon ve *E. ebracteolata*'dan 2-hidroksi-6-metoksi-3-metilasetofenon-4 β -glukopiranozit ve 1,1-bis (2,6-dihidroksi-3-asetil-4-metoksifenil) metan izole edilmiştir (Shi ve ark., 2008).

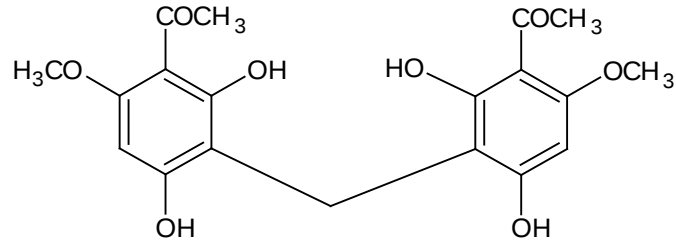
Yapılan bir diğer çalışmada *E. macroclada* ve *E. gaillardotii* türlerinden hazırlanan metanollü ekstrelerin taşıdığı fenolik maddeler LC/MS tekniği ile teşhis ve tayin edilmiştir. Hem *E. gaillardotii* hem de *E. macroclada*'nın içerdiği fenolik bileşikler kafeik asit, kinik asit, malik asit, akonitik asit, gallik asit, prokateşik asit, tannik asit

ve *p*-kumarik asit olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *E. macroclada*'nın klorojenik asit ve rosmarinik asit de içerdği görülmüştür (Ertaş ve ark., 2014).

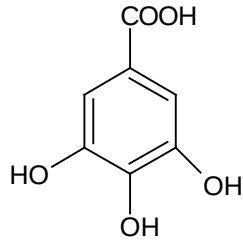
Euphorbia türlerinden izole edilen fenolik yapıda bazı bileşikler Şekil 1.6'da gösterilmektedir.



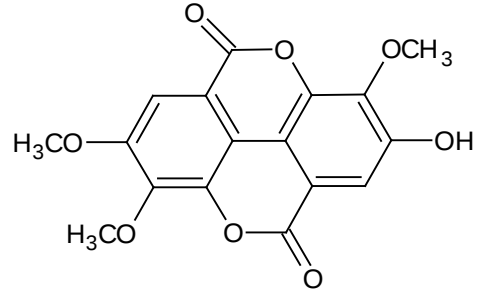
Şekil 1.6. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı fenolik bileşikler



3,3'-diasetil-4,4'-dimetoksi-2,2',6,6'-tetrahidroksidifenilmetan

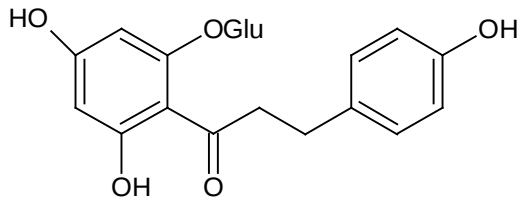


Gallik asit

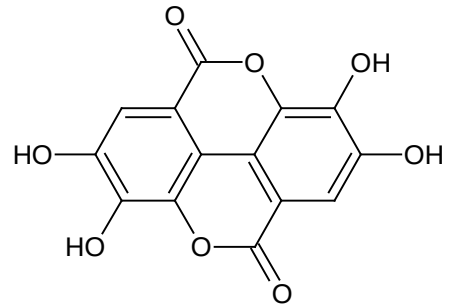


3,4,3'-tri-O-metilelajik asit

(Liang ve ark., 2014)



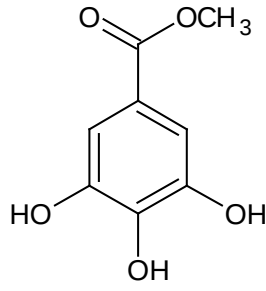
Florizin



Elajik asit

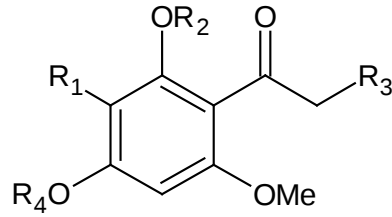
(Luyen ve ark., 2014b)

Şekil 1.6. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı fenolik bileşikler

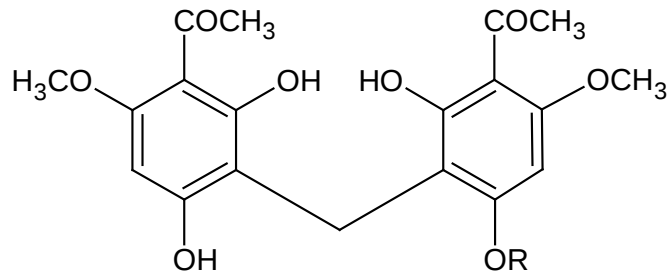


Metil gallat

(Luyen ve ark., 2014a)



İsim	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
2-hidroksi-4,6-dimetoksiasetofenon	H	H	H	Me
2,4,6-trimetoksiasetofenon	H	Me	H	Me
2-hidroksi-4,6-dimetoksi-3-metilasetofenon	Me	H	H	Me
2,4,6-trimetoksi-3-metilasetofenon	Me	Me	H	Me
2,2'-dihidroksi-4,6-dimetoksi-3-metilasetofenon	Me	H	OH	Me
2,4-dihidroksi-6-metoksiasetofenon	H	H	H	H
2,4-dihidroksi-6-metoksi-3-metilasetofenon	Me	H	H	H
2-hidroksi-6-metoksi-3-metilasetofenon-4-β-D-glukopiranozit	Me	H	H	Glu
Ebraktelatinozit C	Me	H	H	Glu



isim	R
1,1-bis (2,6-dihidroksi-3-asetil-4-metoksifenil) metan	H
Ebraktelatinozit B	Glu

(Shi ve ark., 2008)

Şekil 1.6. Devam. *Euphorbia* türlerinden izole edilen bazı fenolik bileşikler

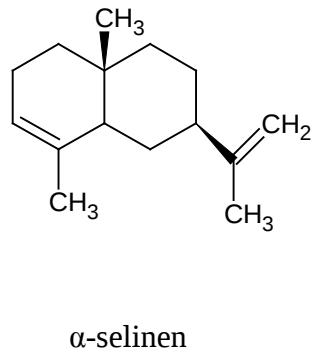
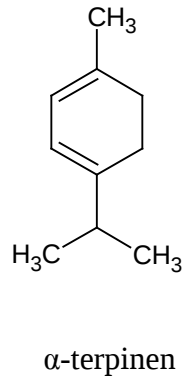
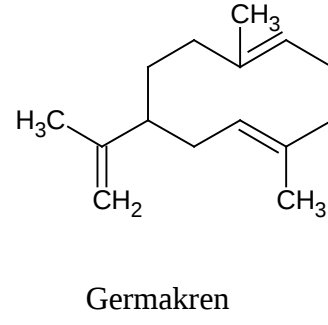
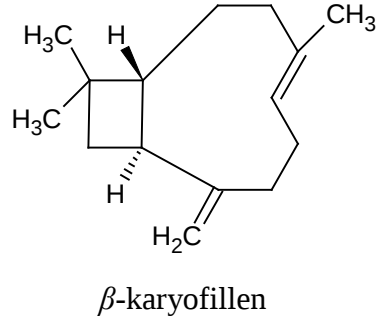
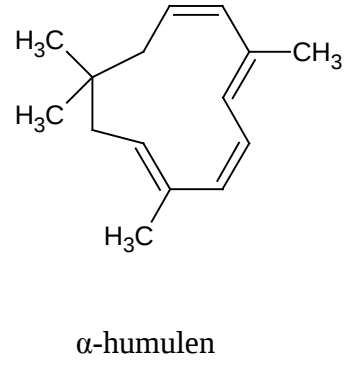
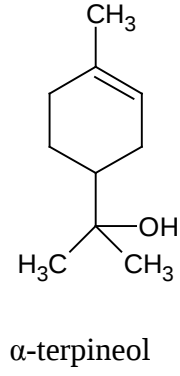
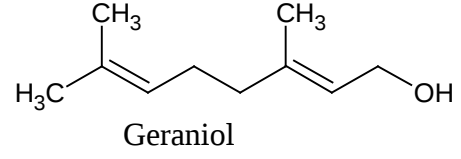
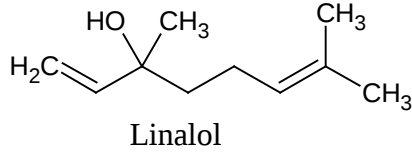
1.2.1.4. Uçucu Bileşikler

Ertaş ve ark. (2014), yaptıkları çalışma ile *E. macroclada* ve *E. gaillardotii* türlerinden su distilasyonu ile elde ettikleri uçucu yağları GC/MS (gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi) ve GC/FID (gaz kromatografisi/alev iyonizasyon dedektör) gibi kromatografik tekniklerle analiz etmişlerdir. Çalışma sonunda *E. macroclada*'nın hekzatriakontan, tetratetrakontan ve α -selinen; *E. gaillardotii*'nin de hekzatriakontan, araşidik asit ve furanon taşıdığını tespit etmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada *Euphorbia hebecarpa* Boiss. türünün toprak üstü kısımlarından Clevenger cihazı ile su distilasyonu metodu kullanılarak yağ elde edilmiş ve bu yağın GC/MS ve GC/FID ile analizi yapılmıştır. Çalışma sonunda *E. hebecarpa*'nın α -terpinen; 1,8-sineol; borneol; terpinen-4-ol; α -terpineol; nerol; geraniol; β -karyofillen; karyofillen oksit; bisabolen ve α -bisabolol uçucu bileşiklerini taşıdığı tespit edilmiştir (Akhgar ve ark., 2014).

Euphorbia türlerinin uçucu bileşiklerinin araştırıldığı bir başka çalışmada *Euphorbia acanthothamnus* Heldr. & Sart. ex Boiss., *Euphorbia apios* L., *E. characias*, *E. dendroides*, *E. helioscopia* ve *E. rigida* türlerinin toprak üstü kısımlarından su distilasyonu ile uçucu yağ karışımı elde edilmiştir. Bu karışım GC/MS ile analiz edilerek bitkilerin taşıdığı uçucu bileşikler tespit edilmiştir. Aynı bileşikleri taşıyan farklı türler veya çok sayıda bileşik taşıyan türler çalışmada aydınlatılmıştır. Çalışma sonunda türlerin terpinen, linalol, 1-terpineol, 4-terpineol, α -terpineol, geraniol, β -karyofillen, α -humulen, germakren D, bisiklogermakren, α -farnesin, kadinen, dodekanoik asit, tetradekanoik asit, α -kadinol bileşiklerini taşıdığı tespit edilmiştir (Fokialakis ve ark., 2003).

Euphorbia türlerinde tespit edilen bazı uçucu bileşikler Şekil 1.7'de gösterilmektedir.



(Akhgar ve ark., 2014; Ertaş ve ark., 2014 ve Fokialakis ve ark., 2003)

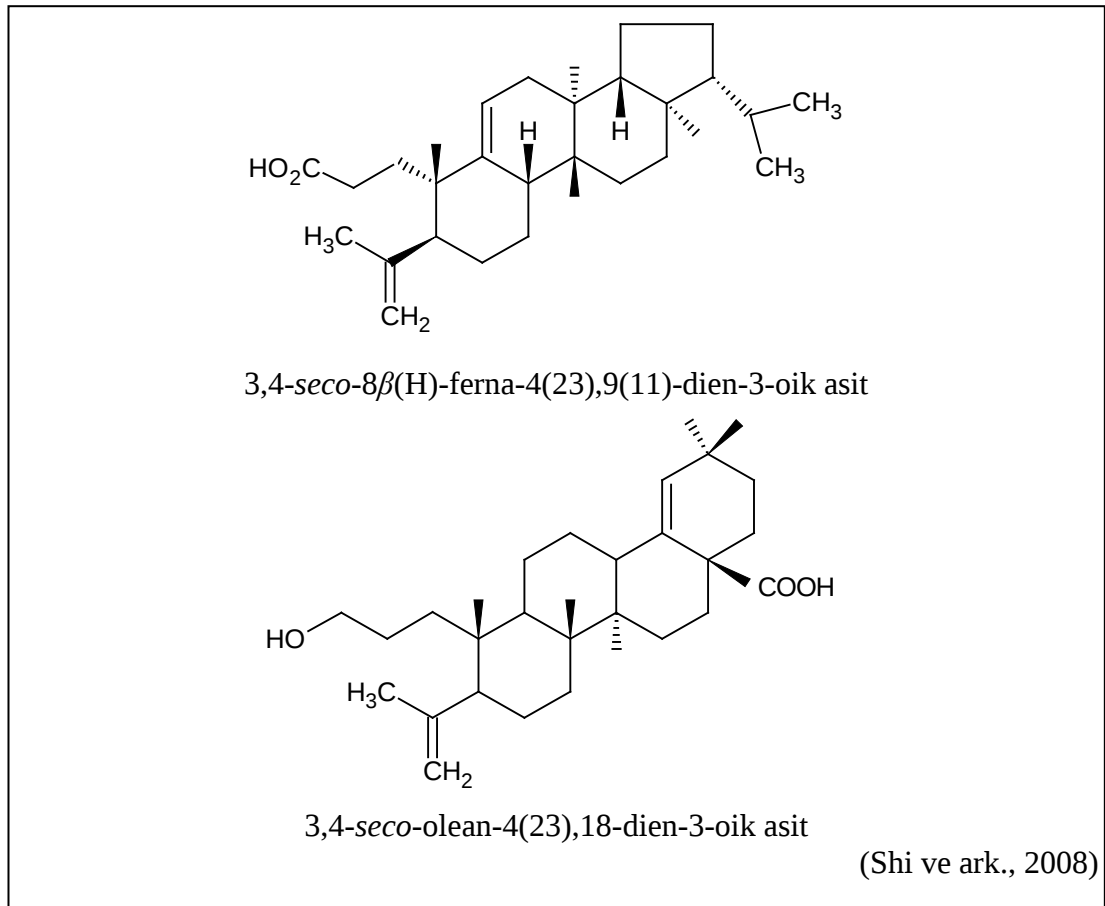
Şekil 1.7. *Euphorbia* türlerinde bulunan bazı uçucu bileşikler

1.2.1.5. Diğer Bileşikler

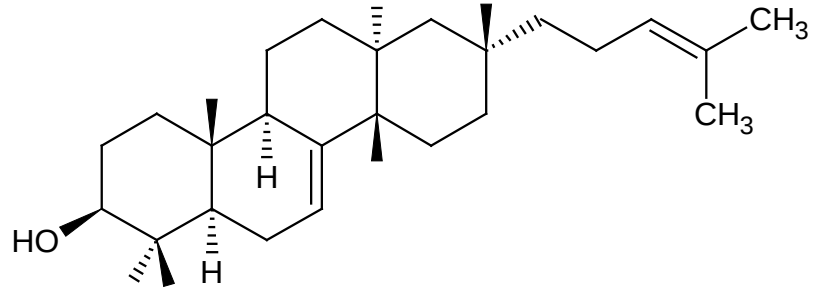
E. characias, *E. dendroides*, *E. pithyusa* subsp. *cupanii* ve *E. semiperfoliata* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda bu türlerin tohumlarının yağ asitleri taşıdığı tespit edilmiştir. Tohumlarda doymuş yağ asitlerinden miristik, palmitik, stearik ve araşidik asitler, doymamış yağ asitlerinden de oleik, linoleik ve linolenik asitler olduğu tespit edilmiştir (Bruni ve ark., 2004).

Yapılan bir başka çalışmada *E. macroclada* ve *E. gaillardotii*'nin petrol eterli ekstraktları üzerinde GC/MS analizleri gerçekleştirilmiş ve türlerin palmitik, oleik ve linoleik asit taşıdığı tespit edilmiştir (Ertaş ve ark., 2014).

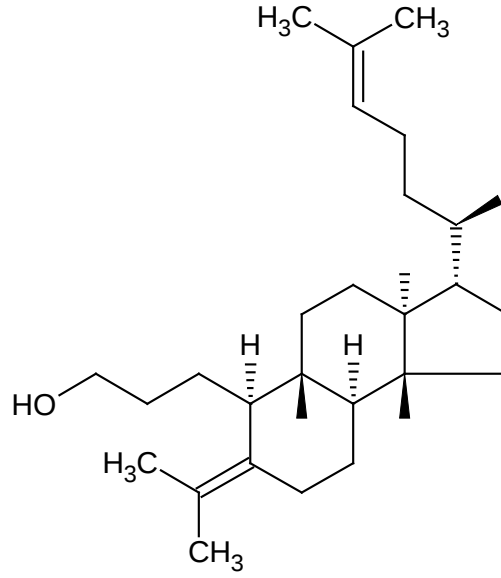
Euphorbia türlerinden izole edilen bazı diğer bileşikler Şekil 1.8'de gösterilmektedir.



Şekil 1.8. *Euphorbia* türlerinde bulunan bazı diğer bileşikler



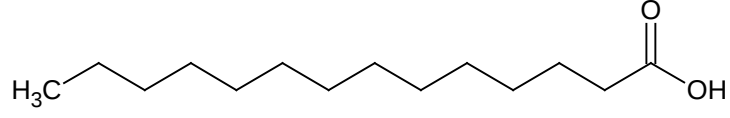
Lemmafilla-7,21-dien-3 β -ol



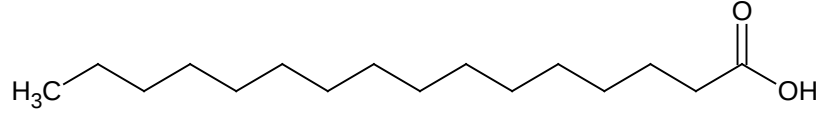
İzohelianol

(Shi ve ark., 2008)

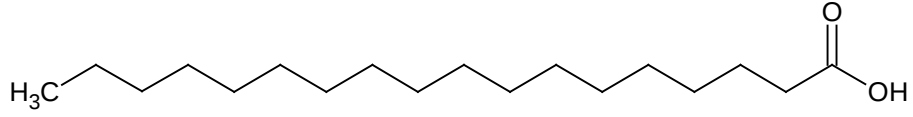
Şekil 1.8. Devam. *Euphorbia* türlerinde bulunan bazı diğer bileşikler



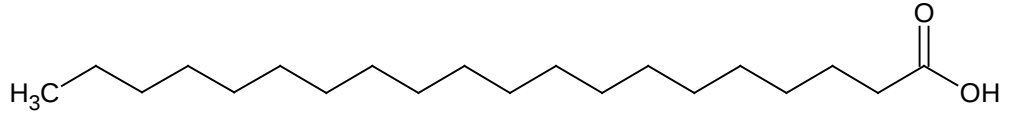
Miristik asit



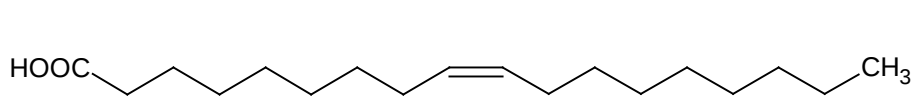
Palmitik asit



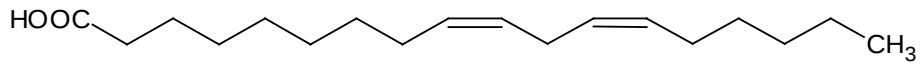
Stearik asit



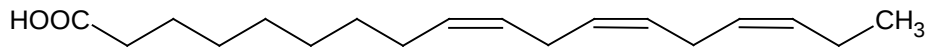
Araşidik asit



Oleik asit



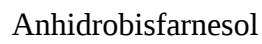
Linoleik asit



α-linolenik asit

(Bruni ve ark., 2004)

Şekil 1.8. Devam. *Euphorbia* türlerinde bulunan bazı diğer bileşikler



(Shi ve ark., 2008)

Şekil 1.8. Devam. *Euphorbia* türlerinde bulunan bazı diğer bileşikler

1.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

1.2.2.1. Antienflamatuvar Aktivite

E. royleana'nın antienflamatuvar aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin lateksi %85 etanol ile muamele edildikten sonra süzölmüş ve kalan bitkiden etil asetatlı ekstre hazırlanmıştır. Fare ve sıçanlarda uygulanan karragenin nedenli ödem testinde 200 mg/kg dozda sıçanlarda %35,93; farelerde %33,28 oranında anlamlı ölçüde ödem inhibisyonu görölmüştür (Bani ve ark., 1996). Aynı bitki üzerinde yapılan bir başka çalışmada, *E. royleana* lateksinin sulu ekstresi oral yolla 50-200 mg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda sıçanlara ve farelere verilmiş, akut ve kronik test modelleri kullanılarak antienflamatuvar aktivite araştırılmıştır. Karragenin ve dekstran nedenli ödem testinde ekstrenin ödemi doza bağımlı olarak anlamlı ölçüde düşürdüğü, en yüksek etkinin 200 mg/kg dozda göröldüğü tespit edilmiştir. Sıçanlarda formaldehit nedenli eklem enflamasyon testinde ekstre, anlamlı ölçüde inhibisyon göstermiştir. Lökosit göçlerinin ve eksuda hacminin azaldığı tespit edilmiş ve buna bağılı olarak antienflamatuvar etki göröldüğü saptanmıştır. Çalışma konsantrasyonlarında ekstrenin midede iyi tolere edildiğı ve hayvanlarda herhangi bir yan etki görölmediğı bildirilmiştir. Oral LD₅₀'nin 1500 mg/kg'dan fazla olduğı bulunmuştur (Bani ve ark., 2000).

Yapılan bir başka çalışmada *E. kansui* türünden hazırlanan diklorometan ekstrelerinden izole edilen triterpenik alkollerin ve sterol glukozitlerinin farelerde TPA (12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat) nedenli kulak ödem testinde enflamasyonu 0,2-1 mg/kulak dozda %50 oranında inhibe ettiğı tespit edilmiştir. En yüksek etkiyi 24-metilensikloartenol bileşığı göstermiştir (Yasukawa ve ark., 2000).

Karragenin nedenli ödemin inhibisyonu ile antienflamatuvar aktivitenin araştırıldığı bir çalışmada, *Euphorbia heyneana* Spreng.'den hazırlanan %70 etanollü ekstrenin aktivitesi 200, 400 ve 800 mg/kg dozlarda 6 saat boyunca test edilmiştir. Çalışma sonunda ekstrenin tüm konsantrasyon değerlerinde pençe ödeminin anlamlı ölçüde

inhibe ettiği tespit edilmiş, referans madde olarak kullanılan indometasinin 5 mg/kg dozda %50 inhibisyon yaptığı bu çalışmada en gl antienflamatuvar aktiviteyi ekstre 800 mg/kg dozda göstermiştir (Battu ve ark., 2011).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz enzimi tarafından sentezlenir ve enflamasyon oluşumunda önemli bir aracıdır. *E. hirta*'nın %95'lik etanollü ekstresinden izole edilen β -amirinin NO üretimini inhibe ederek antienflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir (Shih ve ark., 2010). *E. hirta*'nın farelerde *Mycobacterium tuberculosis* enjeksiyonu ile başlatılan eklem enflamasyonu modeli üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada adjuvan verililişinden 13 gün sonra pençe ödem miktarlarındaki değişiklikler incelenmiştir. *E. hirta*'dan hazırlanan ekstreler 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda farelere uygulanmış ve çalışma sonunda artan doza bağlı olarak pençe ödem miktarlarında anlamlı düşüş olduğu tespit edilmiştir (Ahmad ve ark., 2014). Aynı bitki üzerinde yapılan bir başka çalışmada, etanollü ekstrenin enflamasyonda rol oynayan NO sentezini inhibe ettiği ve bu mekanizma ile antienflamatuvar aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada lipopolisakkarit (LPS) etkisiyle tetiklenen ve NO üretimini sağlayan RAW 264,7 hücreleri kullanılmıştır. 25, 50, 100 ve 200 mg/mL konsantrasyonda *E. hirta* ekstresi ile bir saat inkübasyona bırakılan hücreler daha sonra 1 μ g/mL LPS ile 24 saat boyunca uyarılmıştır. Doz arttıķa ortamdaki nitril seviyesinin anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiş ve *E. hirta*'nın antienflamatuvar etkisi olduğu grlmştir (Sharma ve ark., 2014).

Nitrik oksit (NO) sentezini artıran makrofajların aktivasyonu enflamasyon oluşumunda anahtar rol oynayan siklooksijenaz 2 (COX-2) retimini tetikler. Yapılan bir çalışmada *Euphorbia lactea* Haw. lateksinden elde edilen tirukallolun farelerde TPA nedenli kulak ödem testinde sitotoksik etki göstermeden anlamlı ölçüde makrofaj üretimini inhibe ederek aşırı NO sentezini engellediği, kulak homojenatlarındaki ödemi azalttığı ve lökosit güçlerini inhibe ederek antienflamatuvar aktivite gösterdiği saptanmıştır (Fernandez-Arche ve ark., 2010).

E. helioscopia, *E. drummondii* ve *E. australis*'in etanollü ekstrelerinin 34-3400 µg/mL doz aralığında COX-1 enzimi üzerinde *in vitro* inhibitör etkileri araştırılmıştır. COX-1 inhibitörü olan referans maddelerden aspirinin IC₅₀ değerinin 241,15 µg/mL; indometasinin IC₅₀ değerinin 1,19 µg/mL olduğu çalışmada *E. helioscopia*'nın 3400 µg/mL konsantrasyonda %84 (IC₅₀=251,19); *E. drummondii*'nin 3400 µg/mL konsantrasyonda %73,29 (IC₅₀=316,22); *E. australis*'in 3400 µg/mL konsantrasyonda %73,21 (IC₅₀=467,73) oranında inhibisyon yaparak etki gösterdiği tespit edilmiştir (Li ve ark., 2003).

Yapılan bir başka çalışmada *E. helioscopia* yapraklarından ve lateksinden hazırlanan metanollü ekstrelerin karragenin nedenli pençe ödem inhibisyonu metodu kullanılarak antienflamatuvar aktiviteleri araştırılmıştır. Farelerin kullanıldığı çalışmada hayvanlar beşerli olarak sekiz gruba bölünmüştür. Birinci gruba distile su (1 mL/100 g); ikinci gruba indometasin (2 mg/kg); üçüncü, dördüncü ve beşinci gruba 100, 200, 300 mg/kg yaprak ekstresi; altıncı, yedinci ve sekizinci gruba da 100, 200, 300 mg/kg lateks ekstresi verilmiştir. Karragenin (%1; 0,05 mL) subkutan olarak yarım saat sonra enjekte edilmiştir. 1., 2., 3. ve 4. saatlerde ödem miktarı ölçülmüştür. En güçlü antienflamatuvar aktiviteyi 300 mg/kg dozdaki metanollü yaprak ekstresinin (%81,25) gösterdiği tespit edilmiştir (Saleem ve ark., 2015).

1.2.2.2. Antioksidan Aktivite

Yapılan bir çalışmada *E. macroclada*, *E. acanthothamnus* ve *E. rigida*'nın farklı polaritede çözücüler ile hazırlanan ekstrelerinin antioksidan aktivitesi test edilmiştir. β-karoten ağartma metodu, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve Ferrozin-Fe⁺² kompleks oluşumuna dayanan demir metal şelat aktivitesi metotlarının kullanıldığı çalışmada *E. acanthothamnus* etanollü ekstresi en yüksek DPPH radikal süpürücü aktiviteye sahipken, *E. macroclada* da BHT (bütillenmiş hidroksitoluen) ve α-tokoferolden daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Metal şelat oluşumu

testinde *E. acanthothamnus*'un tüm ekstreleri ve *E. macroclada*'nın petrol eterli ekstresi kersetin referansı ile yakın ölçüde aktivite göstermiştir (Barla ve ark., 2007).

E. hirta'nın yaprak, gövde, çiçek ve köklerinden hazırlanan metanollü ekstrelerin total fenol ve total flavonoit içeriği araştırılmış, DPPH metodu ile antioksidan aktivite ve siyanoferrat metodu ile de indirgeme gücü ölçülmüştür. Yaprak ekstresi %72,96 ile en yüksek DPPH süpürücü etki gösterirken; çiçek, kök ve gövde ekstreleri sırasıyla %52,45, %48,59 ve %44,42 oranında radikal süpürücü etki göstermiştir. Yine yaprak ekstresinin askorbik asit referansı ile benzer oranlarda demir indirgeyici aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek fenolik madde ve flavonoit miktarının yapraklarda olduğu, ardından azalan oranlarda sırasıyla çiçek, kök ve gövdede bulunduğu belirlenmiştir. Aktivite sonuçları ile fenolik madde miktarları ve flavonoit içerikleri paralellik göstermiştir (Basma ve ark., 2011). Benzer bir çalışmada, *E. hirta*'nın toprak üstü kısımlarından %95 etanol ile hazırlanan ekstrenin antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. DPPH radikalinin kullanıldığı çalışmada 0,5 mg/mL konsantrasyonda ekstrenin %61,19 oranında radikal süpürücü etki gösterdiği tespit edilmiştir. OH• radikali süpürücü etkisinin DPPH radikal süpürücü etkisinden daha düşük olduğu tespit edilen *E. hirta* ekstresi 25 mg/mL konsantrasyonda OH• radikali üzerinde %44,37 oranında süpürücü etki göstermiştir (Sharma ve ark., 2014).

Euphorbia petiolata Banks & Sol.'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstreden ters faz preparatif YPSK ile sekiz adet flavonoit glikoziti izole edilmiş ve bu bileşiklerin DPPH yöntemi ile radikal süpürücü aktivitesi araştırılmıştır. Maddelerin süpürücü etkisi DPPH'nin 517 nm dalga boyunda %50'sini süpürdükleri absorbans değeri ile ölçülmüştür. Referans madde olarak Trolox'un kullanıldığı çalışmada ($RC_{50}=10,4 \mu M$) izole edilen maddelerden altı tanesi mirsetin-3-O-glikozit ($RC_{50}=32,7 \mu M$), kemferol-3-O-(2-O-galloil)-glikozit ($RC_{50}=20,8 \mu M$), mirsetin-3-O-ramnozit ($RC_{50}=34,8 \mu M$), kersetin-3-O-glikozit ($RC_{50}=25,9 \mu M$), kersetin-3-O-ramnozit ($RC_{50}=37,9 \mu M$), kersetin-3-O-rutinozit ($RC_{50}=25,4 \mu M$) kuvvetli radikal süpürücü etki göstermiştir (Nazamiyeh ve ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada *E. helioscopia*'nın çiçek, yaprak ve gövdesinin antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Farklı bitki kısımlarından etanollü ve metanollü ekstraler hazırlanmıştır. Total fenol miktar tayini Folin-Ciocalteu reaktifi ile UV spektrofotometresi kullanılarak yapılmış, total flavonoit içeriği kersetin baz alınarak kolorimetrik metot ile ölçülmüş ve serbest radikal süpürücü aktivite ise DPPH metodu ile test edilmiştir. Metanollü ekstraler etanollü ekstrelerden daha aktif bulunurken, total flavonoit ve total fenolik madde miktarı açısından en zengin kısım çiçek, en fakir kısım ise gövde olarak tespit edilmiştir. Serbest radikal süpürücü etkiyi en fazla çiçekler, en az ise gövde göstermiştir (Maoulainine ve ark., 2012).

E. helioscopia'nın toprak üstü kısımlarından metanollü ekstre hazırlanmış ve serbest radikal süpürücü etkileri DPPH yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Test sonunda bitki ekstresinin EC₅₀ değeri 6,9 µg/mL olarak bulunmuş, maximum aktivitenin %60'ı 15 µg/mL dozda görülmüştür. Bu çalışmada referans madde olarak standardize yeşil çay ekstresi kullanılmış ve bu ekstrenin EC₅₀ değeri 4,6 µg/mL olarak bulunmuştur. Test edilen bitki ekstresinin aktivitesi, antioksidan aktivitesi kanıtlanmış referans ekstreye çok yakın olduğundan çalışma sonunda elde edilen bulgular önemli bir veri olarak kabul edilmektedir. Diğer araştırmacıların çalışmaları da bu bulguları destekler nitelikte veriler sunmakta ve söz konusu etkinin fenolik bileşikler ile flavonoitlerden kaynaklandığını göstermektedir (Cateni ve ark., 2014).

Bir başka çalışmada *E. helioscopia*'nın farklı kısımlarından farklı polaritede çözücüler kullanılarak ekstraler hazırlanmış ve beş farklı metot ile antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Yaprak, gövde ve lateksten petrol eterli, kloroformlu ve metanollü ekstraler hazırlanmış, hazırlanan bu ekstrelerin β -karoten-linoleik asit deneyi, DPPH metodu, demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP), total antioksidan kapasite (TAC), demir tiyosiyonat (FTC) deneyi metotları kullanılarak antioksidan aktiviteleri test edilmiştir. Lateksten ve yapraktan hazırlanan metanollü ekstraler sırasıyla en aktif bulunan gruplar olmuştur (Saleem ve ark., 2014a).

1.2.2.3. Analjezik Aktivite

Yapılan bir çalışmada *Euphorbia decipiens* Boiss. & Buhse.'nin kloroformlu ekstresinden analjezik etkili bir diterpen izole edilmiştir. Asetik asit nedenli kıvrınma testi metodunun kullanıldığı çalışmada her iki cinste albino farelere intraperitoneal yolla 5 mg/kg'dan başlanarak 20 mg/kg'a kadar artan dozda izole edilen bileşik verilmiştir. Aspirin ve ibuprofenin 100 mg/kg dozda sırasıyla %48,4 ve %44 oranında inhibisyon yaptığı tespit edilirken, izole saf maddenin 10 mg/kg dozda %46,3; 20 mg/kg dozda %74,1 oranında inhibisyon yaptığı gözlenmiştir (Ahmad ve ark., 2005).

Halk arasındaki kullanımından yola çıkılarak yapılan bir başka çalışmada *E. heterophylla* köklerinin hekzan, kloroform ve etil asetat ile hazırlanan ekstrelerinin ağrı kesici aktiviteleri test edilmiştir. Çalışmada 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozda ekstreler sıçanlara intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Sıcak tabaka metodunun kullanıldığı çalışma sonunda tüm ekstrelerin 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozda etkili olduğu görülmüş, ancak en yüksek etkiyi %56 ile 300 mg/kg dozda verilen kloroform ekstresi göstermiştir. Morfin referans madde olarak seçilmiş ve %89 inhibisyon yapmıştır (Vamsidhar ve ark., 2000).

E. helioscopia'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstrenin formalin testinde farelerde akut ve kronik ağrıları giderdiği gözlemlenmiştir. Deneyde Balb/C fareler kullanılmıştır. Farelere 20 µL %1,5 formalin enjekte edilerek ağrı reaksiyonu başlatılmıştır. Test numunelerinin etkisi 30 dakika boyunca gözlemlenmiştir. İlk beş dakikada (akut periyot) ve takip eden 25 dakika içinde 8 mg/fare dozda verilen alkollü ekstrenin kontrol grubuna karşı ağrı reaksiyonunu anlamlı ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Shirani ve ark., 2011).

E. royleana lateksinin %85 etanol ile ekstre edildikten sonra elde kalan posasından hazırlanan etil asetat fraksiyonunun analjezik aktivitesi araştırılmıştır. Oral LD₅₀'nin 2 g/kg'dan fazla olduğu çalışmada periferalde doza bağımlı aktivite görüldüğü tespit edilmiştir. Haffner'in kuyruk kaldırma testi, asetik asitli kıvrınma testi ve sıcak plaka

testlerinin kullanıldığı araştırmada ekstre hayvanlara oral yolla 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda (maximum doz 2000 mg/kg) uygulanmıştır. Çalışmada referans olarak asetilsalisilik asit kullanılmıştır. Kıvrınma testinde asetilsalisilik asit 100 mg/kg dozda %64 inhibisyon yaparken, 200 mg/kg dozda ekstre %32 inhibisyon yaparak diğer konsantrasyondaki ekstrelerden daha iyi sonuç vermiştir (Bani ve ark., 1997).

E. neriifolia'nın kurutulmuş yapraklarından %70 etanol ile hazırlanan ekstrenin analjezik aktivitesi araştırılmıştır. Sıcak plaka ve kuyruk kaldırma metotlarının kullanıldığı çalışmada, 400 mg/kg dozda ekstre oral yolla sıçanlara uygulanmıştır. Referans olarak indometasinin kullanıldığı çalışmada 120. ve 180. dakikalarda ekstrenin referans maddeden dahi daha fazla analjezik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Gaur ve ark., 2009).

1.2.2.4. Hepatoprotektif Aktivite

Euphorbia fusiformis Buch.-Ham. ex. D. Don.'un yumrularından hazırlanan etanollü ekstrenin karaciğer koruyucu aktivitesi araştırılmıştır. Wistar albino sıçanlara, öncelikle hazırlanan ekstreler oral yolla uygulanmış, ardından 1000 mg/kg dozda rifampisin ile karaciğer hasarı oluşturularak karaciğerde meydana gelen değişiklikler gözlenmiştir. Çalışma dört gruba 15 gün boyunca sürdürülmüştür. I. gruba 2 mL/kg dozda akasya sakızı, II. gruba aynı dozda akasya sakızı ve rifampisin, III. gruba standart ilaç olarak akasya sakızı içinde silimarin (100 mg/kg) ve rifampisin, IV. gruba akasya sakızı içinde *E. fusiformis*'ten hazırlanan etanollü kuru ekstre (250 mg/kg) ve rifampisin verilmiştir. Karaciğer hasarı enzimlerdeki, total bilirubin seviyesindeki ve karaciğer ağırlığındaki artış ile karakterize edilmiştir. Sonuçlar histopatolojik açıdan da değerlendirilmiştir. Ekstrenin uygulandığı gruptaki karaciğerin durumu standart ilaç olarak verilen silimarin grubu ile benzerlik göstermiştir. *E. fusiformis*'in uygulandığı grupta karaciğer hasarı oluşmamıştır. Bu etki araştırmacılar tarafından antioksidan etki mekanizması ile de açıklanmaktadır. Rifampisin karaciğerde biyotransformasyona uğrarken serbest radikaller açığa çıkmakta ve oksidatif stres meydana getirmektedir. *E. fusiformis*'in antioksidan etkisi

serbest radikal oluşumunu engellediğinden *E. fusiformis* karaciğer koruyucu olarak da etki etmiş olmaktadır. Araştırmacılar bu durumun *Euphorbia* türlerinde bulunan fenolik maddeler ve elajik asitten kaynaklandığını düşünmektedir (Anusuya ve ark., 2010).

Karaciğer hasarı oluşturmak amacıyla intraperitoneal yolla CCl₄ uygulamasından önce, sıçanlara farklı *Euphorbia* türlerinin çeşitli kısımlarından hazırlanan ekstreler farklı dozlarda uygulanarak söz konusu *Euphorbia* türlerinin karaciğer koruyucu aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmalarda ekstreler CCl₄ uygulanmadan önce hayvanlara verilmiş, ardından CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturularak enzim seviyelerinde artışa neden olunmuştur. Çalışmaların sonunda artan karaciğer enzim düzeylerindeki düşüş (normal değerlere yaklaşma) ve histopatolojik olarak karaciğer dokusundaki dejenerasyon ve iyileşme oranları belirlenerek, koruyucu aktivitenin etkinliği hakkında yorum yapılmıştır. Çalışma sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Ito ve ark. (1998), yaptıkları bir çalışmada karaciğer koruyucu aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ile *E. nematocypha*'nın etanollü ekstresinden 3,3'-di-*O*-metilelajik asit izole etmişlerdir. Bu bileşik antioksidan etki mekanizması üzerinden karaciğer koruyucu etki göstermiştir. Lipit peroksidasyonunu inhibe eden bileşik enzim seviyelerinde anlamlı düşüslere neden olmuştur.

Bigoniya ve Rana (2010), *E. neriifolia* yapraklarından %70 etanol ile hazırlanan ekstrenin koruyucu aktivitesini silimarin referansına (20 mg/kg dozda, %94,86) karşı 175 mg/kg dozda %85,23 olarak tespit etmişlerdir.

Dubey ve Mehta (2010), *E. hirta*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstrenin 100 mg/kg dozda karaciğer enzimlerini anlamlı ölçüde düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Tiwari ve ark. (2011), *E. hirta*'nın toprak üstü kısımlarından %50'lik metanol ile hazırlanan ekstrenin 125 ve 250 mg/kg dozda anlamlı ölçüde karaciğer koruyucu aktivitesi olduğunu belirlemişlerdir.

Jyothi ve ark. (2008a ve 2008b), *E. antiquorum*'un ve *E. tirucalli*'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan sulu ekstrelerinin 125 ve 250 mg/kg dozda anlamlı ölçüde karaciğer koruyucu aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzim düzeylerindeki düşüşün yanı sıra bilirubin, kolesterol, trigliserid ve lipit peroksidasyonunda da azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Singh ve ark. (2009), *E. thymifolia*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstrenin 100 mg/kg dozda karaciğer koruyucu aktivitesi olduğunu ve bu aktivitenin 50 mg/kg dozda silimarinin aktivitesi ile kıyaslanabilir ölçüde olduğunu tespit etmişlerdir.

1.2.2.5. Antikanser Aktivite

Euphorbia cheiradenia Boiss.& Hohen'in antikanser aktivitesi, lösemi hücre serisini de içeren insan tümör hücre serileri üzerinde araştırılmıştır. *E. cheiradenia*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstrenin hücre proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkisi ve apoptosis indükleyici etkisi, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) kolorimetrik yöntem kullanılarak test edilmiştir. Tümör hücre serilerindeki inhibisyon değerlendirilmiştir. *E. cheiradenia* metanollü ekstresinin Jurkat (insan lenfosit T hücre serisi) hücre serisi üzerindeki inhibisyon değeri $IC_{50}=12,5 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (Amirghofran ve ark., 2006).

Euphorbia cornigera Boiss.'ten izole edilen bileşiklerin antikanser aktivitesi insan KB hücreleri (ağız epitel hücre dizisi) üzerinde MTT yöntemi ile test edilmiş ve

köklerden izole edilen 13,20-didekanoilforbolün en güçlü sitotoksik etki ile 0,5 µg/mL IC₅₀ değerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Baloch ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada *E. helioscopia*'nın antikanser potansiyeli araştırılmıştır. Bitkiden %70 metanol ile hazırlanan ekstre partisionla fraksiyonlandırılmıştır. Etil asetat ekstresi, 200 µg/mL konsantrasyonda insan karaciğer tümör hücre serisi olan SMMC-7721 hattı üzerindeki proliferasyonu zaman ve doza bağımlı olarak inhibe edici etki göstermiştir. MTT yönteminin kullanıldığı çalışmada 200 µg/mL konsantrasyonda 72 saat sonunda G₁ fazında en yüksek inhibisyon (%90,02) tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2012). Yapılan bir başka çalışmada *E. helioscopia*'nın metanollü yaprak ve lateks ekstraktlarının Vero Cell Line modeli kullanılarak, hayatta kalan hücre sayısının hesaplanması yöntemiyle sitotoksik aktivitesi test edilmiştir. Hücre kültürleri Elisa plaklarında 37°C'de 48 saat inkübe edilmiş, ardından MTT solüsyonu ilave edilerek kolorimetrik olarak optik dansite 570 nm'de ölçülmüştür. Hayatta kalan hücre sayısının yüzdesi hesaplanarak sitotoksik aktivite bulunmuştur. Lateks en yüksek konsantrasyonda (1000 µg/mL) sitotoksik etki göstermezken, metanollü yaprak ekstresinin IC₅₀ değeri 5,27 µg/mL olarak bulunmuştur (Saleem ve ark., 2014b). *E. helioscopia* ile yapılan bir diğer çalışmada, *E. helioscopia*'da bulunan helioskopinolit A ve helioskopinolit B'nin insan tümör hücre serileri (MCF-7 göğüs adenokarsinomu), akciğer tümör hücre serileri (NCI-H460) ve merkezi sinir sistemi tümör hücre serileri (SF-268) üzerinde inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (Valente ve ark., 2004). Aynı tür ile yapılan bir başka çalışmada *E. helioscopia*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstreten izole edilen öfornin bileşiğinin sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. 1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyondaki üç öfornin çözeltisinin de dozla paralel olarak fare akciğer adenokarsinom hücre serilerinde (LA795) proliferasyonu inhibe ettiği gözlenmiştir (Chen ve ark., 2012).

Etnobotanik çalışmalarda yer alan dokuz *Euphorbia* türünün antikanser aktivitesi araştırılmıştır. İnsan karaciğer tümör hücre serilerinden Hep-2 hücre serisinin kullanıldığı çalışmada MTT kolorimetrik yöntemi ile proliferasyonun inhibisyonu

test edilmiştir. *Euphorbia grandidens* Haw., *Euphorbia grandicorni* Goebel. ve *E. lactea*'nın latekslerinden hazırlanan mutlak alkollü ekstratlar en yüksek inhibitör etkiyi göstermiştir. Türlerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 57 µg/mL, 89 µg/mL ve 89 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Whelan ve Ryan, 2003).

E. ebracteolata türünden izole edilen iki bileşiğin antikanser aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada etkiden sorumlu bileşikler %95'lik etanollü ekstrenin sıvı-sıvı partisiyonuyla hekzan fazından saflaştırılmıştır. Çalışmada HeLa-60, insan akciğer kanser hücresi (A-549), insan meme kanser hücresi (MCF-7) ve insan karaciğer kanser hücresi (SMMC-7541) ile pozitif standart olarak adriamisin kullanılmıştır. Sitotoksik aktivite MTT yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Yapıları sırasıyla 2,4-dihidroksi-6-metoksil-metilen-3-metilasetofenon ve 2,4-dihidroksi-6-metoksil-metilen-3-metilasetofenon-4-O-β-glukopiranozit olarak aydınlatılan bileşiklerden birincisi HeLa kanser hücreleri üzerinde selektif inhibitör etki gösterirken (IC₅₀=0,095 µg/mL), ikinci bileşik A-549 ve MCF-7 kanser hücreleri üzerinde selektif inhibitör etki (IC₅₀=0,879 µg/mL; 0,346 µg/mL) göstermiştir (Zhang ve ark., 2010).

E. hirta'nın etanollü ekstresinin antikanser aktivite potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada HL-60 (ilik kanser hücre serisi) kanser hücreleri *E. hirta* ekstresiyle (50, 100 ve 200 µg/mL) 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve hayatta kalan hücreler MTT yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar artan dozlarda kanserli hücrelerin ölüm sayısında artış olduğunu göstermiştir (Sharma ve ark., 2014).

E. kansui'den izole edilen oktadekanoik asit ekstresinin (başlıca bileşikler: oleik asit ve linoleik asittir) insan gastrik (SGC-7901), karaciğer karsinomu (BEL-7402) ve lösemi (HL-60) kanser hücre serileri üzerindeki antitümör aktivitesi araştırılmıştır. Tümör hücreleri üzerinde anlamlı ölçüde doza bağımlı antiproliferatif etki görülmüştür. Çalışma sonunda 3,2 µg/mL konsantrasyonda antitümör ajan olan 5-florourasil'e yakın ya da daha iyi etki tespit edilmiştir (Yu ve ark., 2008).

1.2.2.6. Antimikrobiyal Aktivite

Euphorbia segetalis L.'den izole edilen maddelerin ve bu maddelerin izolasyonu sırasında elde edilen fraksiyonların antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Bitki aseton ile ekstre edilmiş ve artan polaritede hekzan:etil asetat karışımı ile fraksiyonlanmıştır (A, 19:1; B, 12:1; C, 9:1; D, 7:1; E, 3:1; F, 1:1; G, 0:1). Antifungal aktivite tayini için *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* suşları, flukonazol referansı ve Broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Antibakteriyel aktivite ise *Staphylococcus aureus*'un kullanıldığı biyootografik agar metodu ile test edilmiştir. Antibakteriyel aktivitenin tayininde kullanılan Gram-negatif bakteriler *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, *Salmonella typhimurium* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; Gram-pozitif bakteri ise *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'tür. Antifungal ve antibakteriyel aktivitenin değerlendirilmesinde ekstrelerin ve izole edilen saf maddelerin MIC (minimum inhibitör konsantrasyonu) verileri kullanılmıştır. İzole edilen bileşiklerin *C. glabrata*'ya ve *C. neoformans*'a karşı anlamlı antifungal aktivite göstermediği; ancak *C.krusei*'de referans madde flukonazol ile aynı ölçüde inhibisyon yaptığı tespit edilmiştir (MIC=32-64 µg/mL). Saf maddelerin tek başlarına anlamlı antibakteriyel etki göstermediği; ancak aseton ekstresi ve G kodlu fraksiyonun *S. aureus*'a karşı kuvvetli inhibisyon yaptığı (MIC= 0,7 mg/mL), C ve D kodlu fraksiyonların da tüm suşlar üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği (MIC=0,7 mg/mL - 6 mg/mL) tespit edilmiştir (Madureira ve ark., 2003).

E. fusiformis'ten hazırlanan aseton, kloroform, etanol, metanol ve sulu ekstrelerin antibakteriyel etkisi sekiz bakteri kültürü üzerinde test edilmiştir. Gram-pozitif bakterilerden *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*; Gram-negatif bakterilerden *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* A ve *Salmonella typhi* B'nin kullanıldığı çalışmada disk difüzyon ve agar difüzyon metotları uygulanmış, en yüksek aktiviteyi metanol ekstresinin gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonrasında aseton ve kloroform ekstresi

aktif bulunurken, sulu ve etanollü ekstreler en az aktif bulunan ekstreler olmuştur (Natarajan ve ark., 2005).

E. fusiformis'in antifungal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans* suşları üzerinde bitkinin farklı kısımlarından hazırlanan aseton, kloroform, etanol, metanol ve sulu ekstrelerin etkisi agar difüzyon tekniği kullanılarak test edilmiştir. *C. albicans* üzerindeki en yüksek etkiyi 20 mm'lik inhibisyon zonu ile yapraklardan hazırlanan kloroform ekstresi göstermişken, *C. neoformans* üzerinde, en güçlü etkiyi 19 mm'lik inhibisyon zonu ile yapraklardan hazırlanan etanol ekstresi göstermiştir. Sulu ekstrenin her iki suş üzerinde de etkisiz olduğu görülmüştür (Natarajan ve ark., 2007).

Etnobotanik çalışma ile halk arasında antibakteriyel amaçla kullanımı olan *Euphorbia clavarioides* Boiss. köklerinin aktivitesi araştırılmıştır. Disk difüzyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada Gram-pozitif bakterilerden *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*; Gram-negatif bakterilerden *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* kullanılmıştır. *E. clavarioides*'in köklerinden hazırlanan hekzan, etanol ve sulu ekstrelerden hekzan ekstresi en güçlü antibakteriyel etki göstermiştir (Shale ve ark., 1999).

Agar difüzyon ve tüp dilüsyon metotlarının kullanıldığı bir çalışmada *E. hirta*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstrelerin antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Ampisilinin referans standart (40 µg/mL) olarak kullanıldığı çalışmada 25 mg/mL konsantrasyondaki ekstre çözeltisinden 40 µL her bir suşa uygulanmıştır. *E. hirta* etanollü ekstresi tüm suşlara karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. En etkili olduğu suşlar *P. aeruginosa* (inhibisyon zonu=23 mm [ampisilin zonu=16 mm], MIC=0,166 mg/mL); *E.coli* (inhibisyon zonu=21 mm [ampisilin zonu=17 mm], MIC=0,189 mg/mL); *P. vulgaris* (inhibisyon zonu=19 mm [ampisilin zonu=22 mm], MIC=0,200 mg/mL); *S. aureus* (inhibisyon zonu=19 mm

[ampisilin zonu=23 mm], MIC=0,216 mg/mL) olarak tespit edilmiştir (Sudhakar ve ark., 2006).

Yapılan bir çalışmada *E. helioscopia*'nın kurutulmuş toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstrelerin antimikrobiyal ve antifungal etkili oldukları tespit edilmiştir. Çalışmada sütleğenin antimikrobiyal aktivitesi dört bakteri ve iki mantara karşı test edilmiştir. 100, 200, 300, 400 ve 500 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan ekstreler, disk difüzyon tekniğinin kullanıldığı çalışmada *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas multocida*, *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine ve *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* mantarlarına karşı doza bağlı inhibitör etki göstermiştir (Lone ve ark., 2012).

1.2.2.7. Antialerjik Aktivite

E. hirta'dan hazırlanan %95 etanollü ekstrenin antihistaminik, antienflamatuvar ve immunosupresif etkili olduğu çeşitli hayvan modeli deneyleri ile tespit edilmiştir. *E. hirta* ekstresinin sıçan peritoneal mast hücrelerinde histamin salınımını artıran bir madde olan 'Bileşik 48/80'nin (*N*-metil-p-metoksifenetilamin+formaldehit) tetiklediği degranülasyonu inhibe ettiği, dekstran nedenli sıçan pençe ödemi testinde eozinofil birikimini ve eozinofil peroksidaz aktivitesini inhibe ettiği görülmüş ve astım modelinde bronkoalveolar lavaj sıvısındaki protein miktarını düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde *E. hirta*'nın erken ve geç alerjik reaksiyon fazlarını engelleme gücünün olduğu görülmüştür (Singh ve ark., 2006).

E. hirta'nın anti-anafilaktik etkisi araştırılmıştır. Akasya sakızı içindeki %2'lik *E. hirta* etanollü ekstresinin (100-1000 mg/kg arasında artan dozlarda) oral yolla uygulandığı sıçanlarda 'Bileşik 48/80 ile sistemik anafilaksi tablosu oluşturulmuştur. Ölümcül 8,8 mg/kg dozda maddenin intraperitoneal yolla verildiği hayvanlarda *E. hirta* ekstresinin pasif anafilaksi oluşumunu inhibe ettiği, sıçanların peritoneal mast hücrelerinde TNF- α (tümör nekroz faktör- α) ve IL-6 (interlökin-6) salınımının baskılandığı görülmüştür. Anafilaksi tablosunda %100 korumanın sağlandığı ekstre

dozu 750 mg/kg olarak bulunmuştur. Bu grupları referans madde olan setirizin 10 mg/kg dozda tedavi etmektedir. Pasif anafilaksi modelinde *E. hirta* ekstrelerinin 125, 250 ve 500 mg/kg dozda sırasıyla %45, %63 ve %75 oranında inhibisyon yaptığı tespit edilmiştir. Referans madde setirizin 10 mg/kg dozda %93 inhibisyon göstermektedir. 10, 30 ve 100 µg/mL konsantrasyonda *E. hirta* ekstresinin TNF- α 'yı sırasıyla %34, %55 ve %83 oranında, IL-6'yı da aynı konsantrasyonlarda sırasıyla %38, %63 ve % 89 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Yousouf ve ark., 2007).

Fareler ve kobaylar üzerinde bronşial kasılmayla tetiklenen trakeal kasılma kaynaklı astım modeli ile yapılan bir çalışmada, *E. helioscopia*'dan izole edilen polifenolik bileşiklerin deride anafilaktik yanıt benzeri oluşumları kapiller permeabilityyi azaltarak inhibe ettiği (lökotrien D-4 inhibitörü) görülmüştür (Park ve ark., 2001).

1.2.2.8. Antiproliferatif Aktivite

Geleneksel kullanımdan yola çıkan araştırmacılar *Euphorbia stenoclada* Baill. Bull. Mens. Soc. Linn.'nin etanolü ekstresinin insan solunum yolları düz kas hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada insan solunum yolları düz kas hücreleri üzerinde interlökin-1 β nedenli proliferasyonda inhibisyon tespit edilmiştir ($IC_{50}=0,73\pm0,08$ µg/mL). 20 µg/mL doza kadar toksik etki görülmemiştir. Halk arasında geleneksel tedavide astım ve akut bronşitte kullanılan bu türün kullanım amacının doğruluğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Chaabi ve ark., 2007).

1.2.2.9. Antikonvülzan Aktivite

Euphorbia pulcherrima Willd. ex. Klotzsch'nun farelerde antikonvülzan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada 250, 500 ve 1000 mg/kg dozda ekstreler oral yolla hayvanlara verilmiştir. Aktivitenin çalışıldığı test modelleri maksimum elektroşok kriz modeli ve fenetilentetrazol nedenli kriz modelidir. Her iki modelde de

E. pulcherrima'nın 250, 500 ve 1000 mg/kg dozda kasılmaların sıklığını 300 mg/kg dozda valproik asit referansına karşı anlamlı ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Singh, 2012).

1.2.2.10. Antiviral Aktivite

Yapılan bir çalışmada *Euphorbia laurifolia* Juss. ex. Lam. ve *E. lactea*'nın Jurkat-LAT-GFP hücreleri üzerindeki HIV-1 (human immunodeficiency virus) reaktivasyon aktivitesi ile antiviral etkisi araştırılmıştır. Jurkat-LAT-GFP hücreleri entegre halde bir adet tam boy HIV provirüsü içermektedir. Reaktivasyon, viral rezervlerin boşaltıldığı bir tedavi şeklidir. HIV-1 rezervleri CD4-T-hücreleri üzerinde uzun süre yaşarlar. Reaktivasyon ile bu CD4 hücrelerinde litik bir ölüm gerçekleşir. Bu sayede HIV-1 genomu replikasyon aşamasında inhibe edilmiş olur. Viral reaktivasyon GFP epifloresansının sitometrik taranması ile ölçülmektedir. Jurkat-LAT-GFP hücrelerine 12 saat boyunca 1 µg/mL *Euphorbia* lateks ekstraktları uygulanmıştır. *E. laurifolia*'nın %93,7 oranında HIV-1 antagonist, *E. lactea*'nın da %82,3 oranında HIV antagonist etki gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Çok etkili sonuçların bulunduğu bu çalışmada referans olarak forbol-12-miristat-13-asetat (1 µg/mL) kullanılmıştır (Avila ve ark., 2010).

E. officinarum'un metanollü ekstresinden izole edilen üç diterpen yapısında molekülün HIV-1 antagonist aktivitesi Jurkat-LTR-GFP enfekte hücreler üzerinde test edilmiştir. Hücrelere izole edilen ingol 7,8,12-triasetat-3-fenilasetat (1); ingol 7,8,12-triasetat-3-(4-metoksifenil) asetat (2); 8-metoksiingol 7,12-diasetat-3-fenilasetat (3) bileşikleriyle 10 ve 50 µM konsantrasyonda tedavi uygulanmıştır. 1 ve 2 numaralı bileşiklerin etki göstermediği çalışmada, 3 numaralı bileşiğin HIV-1-LTR aktivasyonunu, transaktivasyonda sinyalizasyon basamağında G₀/G₁ evresinde durdurduğu tespit edilmiştir (Daoubi ve ark., 2007).

Euphorbia jolkini Boiss.'ten izole edilen putranjivain A'nın *Herpes simplex-2* virüsüne (HSV-2) karşı antiviral aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada XTT (sodyum 3'-[(fenilamino-karbonil)-3,4 tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit) metodu ve HSV-2 suşu ile enfekte edilen 196-Vero hücreleri kullanılmıştır. Hücreler 96'lık plaklara ekilmiş ve 4 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler HSV-2 ile enfekte edilmiş ve farklı konsantrasyonlarda putranjivain ilave edilmiştir. 72 saat daha inkübe edilen hücrelere XTT reaktifi eklenerek plaklardaki çözeltilerin absorbans değerleri 690 nm'de ölçülmüştür. Referans madde olarak asiklovirin (5 µM) kullanıldığı çalışma sonunda putranjiavin A'nın 25 µM konsantrasyonda 24 saate kadar devam eden inkübasyonlarda virüs hücre girişini ve penetrasyonu %100 inhibe ettiği tespit edilmiştir (Cheng ve ark., 2004).

E. segetalis'ten izole edilen bileşiklerin HSV-1, HSV-2 ve Afrika domuz humması virüsüne karşı antiviral aktiviteleri test edilmiştir. Afrika yeşil maymun böbrek hücre serisinin (Vero Cell Line ATCC CCL81) kullanıldığı çalışmada hücreler enfekte edilerek inkübasyona bırakılmış, ardından izole edilen bileşikler uygulanmıştır. Asiklovir ve foskarnetin referans olarak kullanıldığı çalışmada lupenon 5 µg/mL konsantrasyonda HSV-1 ve HSV-2 virüsü üzerinde asiklovirden daha etkili, Afrika domuz humması virüsüne karşı ise foskarnet ile yarışmalı ölçüde etkili bulunmuştur (Madureira ve ark., 2003).

HSV-2 virüsüne karşı antiviral aktivitenin araştırıldığı bir başka çalışmada *E. thymifolia*'nın metanollü ekstresinden elde edilen etil asetatlı fraksiyonu ve buradan izole edilen 3-*O*-galloil-4,6-(*S*)-hekzahidroksidifenil-D-glukoz'un sırasıyla 4 µg/mL ve 0,5 µg/mL konsantrasyonlarda HSV-2 virüsünün infektivitesini direkt olarak inaktive ettiği tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2005).

Yapılan bir çalışmada *E. helioscopia*'nın kurutulmuş toz edilmiş toprak üstü kısımlarının etanollü ve metanollü ekstratlarının antiviral etkileri araştırılmıştır. Çalışmada *Bacillus* bakteriyofaj CP51 kullanılmış ve *Bacillus cereus* ATCC 10876

24 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra ekstrelerin MIC değerleri ölçülerek fajlar üzerindeki antiviral etkinlik test edilmiştir. Etanollü ekstrenin faj ve bakteri karışımı üzerine eklendiğinde, %50’den fazla inhibisyon yapan konsantrasyonu 0,5 mg/mL, metanollü ekstrenin MIC değeri de 1,25 mg/mL olarak ölçülmüştür. Her iki ekstre de anlamlı ölçüde fajlar üzerinde antiviral etkinlik göstermiştir. Aynı çalışmanın fitokimyasal kısmında ekstrelerin taşıdığı etken madde grupları flavonoidler ve tanenler olarak tespit edilmiştir. Antiviral etkinin bu bileşik gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Ramezani ve ark., 2008).

1.2.2.11. Mollusisidal Aktivite

Sıtımadan sonra dünyada en fazla görülen ve tropik bölgelerdeki en büyük ölüm sebeplerinden biri olan parazit hastalığı şistozomiazisin önlenmesi için arakonakçı olan yumuşakçaların yok edilmesinde *Euphorbia* türlerinden yararlanılmaktadır. Mollusisidal aktivitenin araştırıldığı bir çalışmada *E. paralias*’tan izole edilen dokuz tane diterpen yapısındaki bileşikten 5,8,14-triasetoksi-3-benzoiloksi-15-hidroksi-9-okso-paralian’ın en güçlü mollusisidal aktivite gösteren bileşik olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşik 15 µg/mL konsantrasyonda salyangozlar üzerinde %100 mortalite göstermiştir (Abdelgaleil ve ark., 2002).

Euphorbia conspicua N. E. Br. lateksinin *Biomphalaria glabrata* isimli bir tür salyangoz üzerindeki mollusisidal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkiden elde edilen lateksin metanollü ekstresi hazırlanmış ve bu ekstre hekzan ile partisyona tabi tutularak triterpenik fraksiyon elde edilmiştir. Kalan metanollü faz, hekzanlı faz ve lateksten hazırlanan metanollü ekstreler sırasıyla 0,1 µg/mL; 10,55 µg/mL ve 4,87 µg/mL konsantrasyonlarda yetişkin salyangozların %90’ını öldürmüştür. Yine bu ekstreler şistozomiazisin ara konakçılarından olan *Schistosoma mansoni*’nin larvaları üzerinde 100 µg/mL konsantrasyonlarda inhibitör etki göstermiştir (Santos ve ark., 2007).

Yapılan bir başka çalışmada *E. myrsinites*'in sap ve yapraklarından hazırlanan sulu ekstrelerin *Biomphalaria glabrata* üzerindeki mollusisidal aktivitesi araştırılmıştır. LC₅₀ değerlerinin sırasıyla 15,1 ppm ve 8,9 ppm olduğu çalışmada bir süre sonra ekstrelerin oda sıcaklığında stabilitesini kaybettiği ve 7 gün sonunda 20°C'de etkinin %50 azaldığı görülmüştür (Patel ve ark., 2011).

1.2.2.12. Yara İyi Edici Aktivite

Yapılan bir çalışmada *E. helioscopia*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ve sulu ekstrelerin yara iyi edici aktiviteleri araştırılmıştır. Bu amaçla, ekstrelerin %2 sodyum aljinat içeren jel içerisindeki %5'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır. Bu çalışma için Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Akut toksisite ve doz seçimi için çalışmalar yapılmış, LD₅₀ değeri 300 mg/kg olarak bulunmuş ve bu doğrultuda test için çalışma dozu 30 mg/kg olarak belirlenmiştir. Sıçanların sırt bölgelerinde eksizyon ve insizyon yaralar oluşturularak hazırlanan ekstreler günde bir kez uygulanmıştır. 15 günün sonunda yaralarda ölçülen epitelizeasyon anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Hem alkollü hem de sulu ekstrelerin yara iyi edici oldukları tespit edilmiştir (Jabeen ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada *E. neriifolia* yapraklarından hazırlanan etanollü ekstrenin yara iyileştirici aktivitesi araştırılmıştır. Eksizyon yara modeli ve ölü bölge yara modelinin kullanıldığı çalışmada yara granülasyon dokusundaki hidroksiprolin, protein katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin miktarları ölçülmüştür. Çalışma sonunda ekstrenin 200 ve 400 mg/kg dozlarda epitelizeasyonu anlamlı ölçüde artırdığı görülmüştür. Ekstrenin granülasyon dokusunda yine aynı dozlarda hidroksiprolin ve protein miktarını artırdığı, enzim aktivitesini yükselttiği ve süperoksit dismutaz aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiştir (Bigoniya ve Rana, 2007).

Yapılan bir başka çalışmada *E. caducifolia*'nın lateksinin halk arasındaki kullanımından yola çıkılarak yara iyileştirici aktivitesi araştırılmıştır. Lateksten hazırlanan 2,5; 5 ve 10 mg/mL konsantrasyondaki ekstreler, eksizyon ve insizyon

yara modelinin kullanıldığı çalışmada sıçanlara uygulanmıştır. Yara kontraksiyonu, yara gerilim kuvveti ölçülmüş ve hidroksiprolin enzim tayini yapılmıştır. Referans olarak gümüş sülfadiazin kullanılmış olup yara kontraksiyonunda en yüksek aktivite 10 mg/mL konsantrasyondaki ekstrede (12. günde %84,67); yara gerilim kuvvetinde en yüksek aktivite yine 10 mg/mL konsantrasyondaki ekstrede (gerilim kuvveti: 511, 83 g/cm²) görülmüştür. Hidroksiprolin miktarı kontrol grubuna göre 5 ve 10 mg/mL konsantrasyondaki ekstrelerde anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur (Goyal ve ark., 2012).

E. hirta ekstresinin yanık yaralar üzerindeki iyileştirici aktivitesi araştırılmıştır. Bitkiden %95'lik etanol ile ekstre hazırlanmış ve çözücü uzaklaştırılmıştır. Elde edilen kuru ekstre %2'lik olacak şekilde taşıyıcı krem ile formüle edilmiştir. Sıçanların derilerinde ısıtılmış pirinç ağırlıklar ile 10 saniye boyunca 2 cm'lik yanıklar oluşturulmuştur. Ekstre uygulanarak 16 gün boyunca her gün yara alanlarındaki küçülme gözlemlenmiştir. Referans olarak nitrofurazon merhemini kullanıldığı çalışmada 16. gün sonunda referans madde %94,67 oranında yara iyileşmesi sağlarken, *E. hirta* ekstresi %88 oranında iyileşme sağlayarak yüksek ölçüde aktivite göstermiştir (Jaiprakash ve ark., 2006).

1.2.2.13. Diğer Aktiviteler

Veteriner hekimler ile ortak yapılan bir çalışmada *E. hirta*'dan hazırlanan sulu ekstreler 400 mg/kg dozda 14 gün boyunca erkek sıçanlara oral yolla verilmiş ve üreme organları üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Kontrol grubuna sadece distile suyun verildiği çalışma sonunda hayvanlarda testis dejenerasyonu ve seminifer boruların çapında daralma olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar buradan hareketle *E. hirta*'nın tedavide kullanımı sırasında bu etkilerin dikkate alınması ve tedbirli davranılması gerektiğini vurgulamışlardır (Adedapo ve ark., 2003).

E. hirta'nın yapraklarından hazırlanan sulu ekstrelerin sıçanların bağırsak hareketleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 100, 300 ve 1000 mg/kg dozlarda oral yolla

uygulanan ekstrelerin doza bağımlı olarak dışkılamada azalmaya sebep olduğu ve hayvanlarda ishali engellediği tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında araştırmacılar halk arasında ishale karşı kullanılan *E. hirta*'nın bu kullanımını bilimsel olarak desteklediklerini belirtmişlerdir (Hore ve ark., 2006).

Yapılan bir çalışmada *E. royleana* lateksinden hazırlanan etil asetat fraksiyonunun bağışıklık sistemi üzerindeki çeşitli etkileri araştırılmıştır. Lateksten önce %85 etanol ile hazırlanan ekstreden etil asetat fraksiyonu çekilmiştir. Ekstre farelere oral yolla 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda uygulanmış, gecikmiş tip hipersensivite cevabındaki düşüş ve antikor üretme sirkülasyonunu ölçmek için antijen olarak koyun kırmızı kan hücreleri hayvanlara intraperitoneal yolla verilmiştir. Ekstrenin hipersensivite cevabını 50-200 mg/kg dozda %16,04-%44,44 oranında düşürdüğü tespit edilmiştir. Siklosporin referansı 5 mg/kg dozda %56,79 düşüş sağlamıştır. Ekstre antikor üretiminde de doz-cevap ilişkili olarak düşüşe neden olmuştur. Maksimum etki 100 mg/kg dozda %28,30 olarak görülmüştür. Siklosporin referansının antikor üretimini 5 mg/kg dozda %38,46 oranında düşürdüğü görülmüştür (Bani ve ark., 2005).

Euphorbia canariensis L.'den hazırlanmış metanollü ekstreden izole edilen ingol türevi bir madde, ingenol türevi iki madde ve jatrofan türevi bir maddenin vasküler sistem üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Tavşanlar üzerinde yapılan çalışmada bu dört maddenin de temel arterlerde ve karotid arterde kasılma yaparak dinlenme halinde kan basıncını yükselttiği tespit edilmiştir (Miranda ve ark., 1998).

Yapılan bir çalışmada *E. helioscopia*'dan diklorometan ile ekstre hazırlanmış, bu ekstreden saf madde izole edilmiş ve bu maddelerin vazodepresör etkileri araştırılmıştır. Wistar albino sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde 5,11-jatrofadien-3-benzoiloksi-7,9,14-triasetiloksi-15-ol bileşiğinin en güçlü vazodepresör etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir (42 mmHg). Kan basıncını efektif olarak düşük tuttuğu süre 45 dakika, etkinin süresi ise 70 dakika olarak ölçülmüştür (Barla ve ark., 2006). Koyun gastrointestinal sistemden alınmış canlı *Haemonchus contortus* kurtçukları

üzerinde yapılan bir çalışmada *E. helioscopia*'nın kurt düşürücü aktivitesi test edilmiştir. Doğal yollarla nematod (kancalı/iplik kurdu) enfeksiyonuna yakalanmış on iki adet 18-25 kg arasında değişen ağırlıklarda Kashmir Marino koyunu üzerinde yapılan bu çalışmada, fekal yumurta sayısında azalma (FECR) test yöntemi kullanılarak *E. helioscopia*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanmış sulu ve metanollü ekstreler 12,5; 25 ve 50 mg/mL konsantrasyonda doz yanıt ilişkili olarak kurtçuklar üzerinde önce paralizi göstermiş, maruziyetten 8 saat sonra da kurtçukların ölümüne sebep olmuştur. Metanollü ekstreler yumurta sayısında %86, sulu ekstreler ise %44,1 oranında inhibisyon yaparak etkili bulunmuştur (Lone ve ark., 2013).

1.2.3. Klinik Çalışmalar

Avustralya'da yapılan klinik bir çalışmada cildinde bazal hücre karsinomalı, skuamoz hücre karsinomalı ve intraepidermal karsinomalı lezyonu olan, konvansiyonel tedaviyi reddetmiş ya da tedavisi başarısız olmuş yaşları 44 ila 93 arasında değişen 36 gönüllüye üç günde bir kez 100-300 µL *E. peplus* lateksi 12 ay boyunca topikal yolla uygulanmıştır. Çalışma sonunda 28 hastada bir lezyon, 5 hastada iki lezyon, 2 hastada üç lezyon ve 1 hastada dört lezyon olmak üzere toplam 48 lezyon tedavi edilmiştir. Bazal hücre karsinomalı hastaların %57'sinden, intraepidermal karsinomalı hastaların %75'inden, skuamoz karsinomalı hastaların %50'sinden klinik cevap alınmıştır (Ramsay ve ark., 2011).

E. prostrata'nın hemoroidi tedavi edici etkisinin araştırıldığı klinik bir çalışmada, yaşları 21 ila 67 arasında değişen 63 erkek ve 57 kadından oluşan 120 gönüllüye 12 hafta boyunca günde bir kez *E. prostrata* içeren tablet (patentli ürün) verilmiştir. İlk haftanın sonunda 99 hastanın kanama şikayetlerinde azalma, rektum bölgesindeki şikayetlerde %90 oranında azalma olduğu görülmüştür. Hastalardan kabızlık şikayeti veya yan etki geri bildirimi yapan olmamıştır. Çalışma sonunda sadece 37 hastada kolonoskopik incelemelerde hemoroid kalıntılarına rastlanmıştır. Sonuç olarak

E. prostrata'nın hemoroit tedavisinde etkili ve iyi tolere edilebilen bir drog olduğu bildirilmiştir (Gupta, 2011).

Yine kanamalı hemoroidi olan hastalarda yapılan klinik bir başka çalışmada *E. prostrata*'nın kuru ekstresini içeren 100 mg'lık tabletler (patentli ürün) günde bir kez 1836 gönüllüden oluşan gruba 14 gün boyunca verilmiştir. 1304 erkek ve 512 kadından oluşan grubunun kanama, ağrı, şişkinlik gibi semptomlarının değerlendirildiği çalışma sonunda, sadece 71 hastada kanama (%3,9); 86 hastada ağrı (%4,7); 114 hastada şişkinlik şikayetlerinin devam ettiği grlmştir. Global değerlendirme skorları ile yapılan istatistiklerde 505 hastada tedavinin seyrinde olumlu ilerleme, 1153 hastada ılımlı olumlu ilerleme, 150 hastada zayıf ilerleme görülmüş, 17 hastada hiçbir gelişme görülmemiştir. 77 hasta yan etki belirtileri olarak yanma, gastrointestinal rahatsızlıklar ve bulantı şikayetinde bulunmuştur. Sonuç olarak *E. prostrata*'nın hemoroid tedavisinde özellikle ağrı, kanama ve gastrointestinal rahatsızlıklar gibi semptomların giderilmesinde oldukça etkili olduğu ve iyi tolere edilebildiği bildirilmiştir. Flavonoitlerin, tanenlerin ve fenolik asitlerin bu tedavide başrolü oynayan bileşikler olduğu düşünülmektedir (Bakhshi ve ark., 2008).

E. fischeriana türünün antikonvülzan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 72 epilepsi hastasına *E. fischeriana* alkali ekstresi verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde *E. fischeriana*'nın %78 oranında etki gösterdiği tespit edilmiştir. Epilepsi hastaları kriz nöbetlerinin azaldığını belirtmişlerdir. Tek kr çalışmada %59 oranında tedavi sağlanmıştır. Bunların %32'si plasebo etkisidir. *E. fischeriana*'nın anlamlı ölçüde epilepside tedavi sağladığı bildirilirken, çalışma sırasında herhangi bir yan etki bildirilmemiştir (Liu ve ark., 1994).

1.2.4. Toksisite alışmaları

Yapılan bir çalışmada *Euphorbia schimperiana* Scheele'nin toksik etkileri fareler üzerinde araştırılmıştır. Akut oral, akut dermal toksisite, deri ve göz iritasyon testleri

gerçekleştirilmiştir. *E. schimperiana*'dan hazırlanan metanollü ekstreler çalışmada test numunesi olarak kullanılmıştır. Akut oral toksisite testinde 5000 mg/kg doza kadar çıkılmış, 14 günlük test boyunca herhangi bir ölüm veya olumsuz klinik yanıt gözlenmemiştir. Bununla birlikte çalışma sonunda hayvanlara nekropski uygulanmış, plevra ve akciğerde kanama olduğu görülmüştür. Bu çalışmada akut oral LD₅₀ değeri 54 mg/kg, LD₉₀ değeri 81,8 mg/kg olarak bulunmuştur ve veriler ışığında bitkinin oral yoldan az oranda toksik olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada dermal iritasyona rastlanmamış, akut dermal testlerde 14 gün boyunca ölüm veya olumsuz klinik yanıt gözlenmemiştir. Nekropski incelemelerinde de herhangi bir toksik bulguya rastlanmamıştır. Akut dermal LD₅₀ değeri de 2 g/kg olarak bulunmuştur. Göz iritasyon testinde 0,2 g/L konsantrasyonda bitki ekstresi oküler dejenerasyona sebep olmuştur (Ahmed ve Al-Zanbagi, 2006).

E. helioscopia'nın toksisitesinin sıçanlar üzerinde araştırıldığı bir çalışmada etanollü bitki ekstresinin oral LD₅₀ değeri 1211,7 mg/kg vücut ağırlığı olarak hesaplanmıştır. Hayvanlarda iritasyon, ishal, tükürük salgısında artış ve huzursuzluk gibi sendromlar görülmüştür. Bazı hayvanlar 3 saat, bazıları ise 24 saatin sonunda ölmüştür. Nötrofil sayılarında anlamlı artış, lökosit sayılarında anlamlı düşüşler görülmüştür. Ayrıca biyokimyasal değişiklikler keratinin, üre, ürik asit, AST (aspartat aminotransferaz), kolesterol seviyelerinde anlamlı artışlar görülerek tespit edilmiştir. Alveollerde kanama, akciğerlerde nekroz görülmüştür. Çalışma sonunda *E. helioscopia*'nın toksik materyal olduğu ve oral yolla alımının riskli olabileceği bildirilmiştir (Al-Sultan ve ark., 2006).

E. helioscopia ve *E. nubica* N. E. Br.'nin toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bitkilerden hazırlanan metanollü ekstreler farelerin kulaklarına uygulanmış, ekstrelerin iritan etkiye ve kanser oluşumuna sebep olup olmayacakları araştırılmıştır. Ekstreler farelerin kulaklarına 2000 µg ve 5000 µg dozlarda 48 hafta boyunca uygulanmıştır. On ikinci haftadan itibaren kulaklarda tümör oluşmaya başladığı, 36. haftada hayvanların artık tümör taşıdığı tespit edilmiştir. Bu türlerden izole edilen diterpen yapısında saf maddelerin de aynı etkiye sebep olduğu görülmüştür (Zayed ve ark., 2001).

Çin’de karaciğer iltihaplarına karşı ve ödem giderici olarak kullanıldığı bildirilen *Euphorbia milii* Des Moul. lateksinin tümör oluşumunu tetikleyici etkisi fare sırt derisi üzerinde yapılan bir çalışmada araştırılmıştır. Tümör başlatıcı ajan olan dimetilbenzantrasen, 400 nmol’lük tek doz olarak dişi ve erkek farelerin sırt kısmına uygulanmış, 10 gün sonra da tümör oluşum testi başlatılmıştır. Pozitif kontrol olarak 5 nmol TPA, test numunesi olarak 20, 60 ve 200 µg/fare liyofilize lateks ve aseton (taşıyıcı kontrol) aynı şekilde farelerin sırt kısmına haftada 2 kez 20 hafta boyunca uygulanmıştır. TPA uygulanan grupta 11. haftada tümör oluşumu başlamışken, aseton ve lateks grubunda herhangi bir tümör oluşumuna rastlanmamıştır. Bu bulgular *E. milii* lateksinin tümöre neden olmadığını ortaya koymuştur (Delgado ve ark., 2003).

Halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılmasına rağmen *E. hirta*’nın potansiyel toksik etkili olabileceğini bildiren az sayıda çalışma mevcuttur. Ping ve ark. (2013), *E. hirta*’dan hazırlanan metanollü ekstraktların akut ve subkronik oral toksisitesini *in vivo* testler ile sıçanlar üzerinde araştırmışlardır. 5000 mg/kg ekstre tek doz olarak hayvanlara verilmiş, 14. gün sonunda herhangi bir ölüm ya da toksik etki görülmemiştir. Ekstrenin akut oral LD₅₀ değeri 5000 mg/kg’den fazla olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada 90 gün boyunca günde 50, 250 ve 1000 mg/kg *E. hirta* ekstresi oral yolla hayvanlara verilmiş ve yine toksik etki ya da hayvan ölümü görülmemiştir. Yem ve su tüketimi, vücut ağırlığı, hematolojik bulgular, organ ağırlıkları kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde değişmemiştir. Araştırmacılar çalışma sonunda *E. hirta* metanollü ekstresinin akut ve subkronik oral toksisiteye neden olmadığını bildirmişlerdir.

Yapılan birtakım çalışmalarda bazı *Euphorbia* türlerinin balıklar üzerinde de toksik etki gösterdiği ve balık ölümlerine sebep olduğu bildirilmiştir. Örneğin *Euphorbia kamerunica* Pax.’ın ve *E. tirucalli* lateksinin yüksek dozlarda tatlı su balıklarını ve yavrularını öldürdüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *Euphorbia* türlerinin halk arasında balık avlamada da kullanıldığı düşünüldüğünde bu kullanımın sebebini ortaya koymaktadır. Su habitatlarında yaşayan diğer canlıların da en az balıklar kadar etkilendiğini düşünen araştırmacılar *Euphorbia* türlerinin su

habitatları ile temasta olmaması gerektiğini bildirmişlerdir (Fai ve Fagade, 2005 ve Kumar ve ark., 2010).

1.3. Enflamasyon

Enflamasyon; bakteri, kimyasal maddeler, sıcaklık veya herhangi bir travma nedeniyle doku hasarı olduğunda, dokularda oluşan ani ve koruyucu bir yanıttır. Hasarlı dokudan çok sayıda madde açığa çıkar ve çevre dokularda da ikincil değişiklikler meydana gelir (Guyton ve Hall, 2014).

Enflamasyon yanıtın gerçekleşmesinde çok sayıda faktör yer almaktadır. Bunlar dolaşımdaki hücreler ve plazma proteinleri, çevre bağ dokusunun ekstraselüler matriksi ve hücreleridir. Dolaşımda yer alan ve kemik iliği tarafından üretilen hücreler polimorfonükleer lökositler (nötrofiller), eozinofiller, bazofiller, lenfositler, monositler ve trombositlerden oluşur. Dolaşımdaki proteinler ise karaciğer tarafından sentezlenen pıhtılaşma faktörleri, kininojenler ve kompleman içerikleridir. Bağ dokusu hücreleri ekstraselüler matriksi sentezleyen ve yarayı doldurmak üzere değişebilen fibroblastlardan meydana gelir. Ekstraselüler matriks fibröz yapıda proteinler olan kolajen ve elastinden oluşur. Bütün bunlar doku hasarı ve enflamasyonu gidererek onarımı sağlar ve dokunun normal fonksiyonlarını yeniden kazanması için birarada hareket ederler (Mitchell ve Cotran, 2003).

Enflamasyonun ilk sonuçlarından birisi hasarlı dokular ile sağlıklı dokular arasında fibrinojen pıhtısı ile duvar örülmesi işlemidir. Bu ilk yanıt ile bakterilerin, nekrotik doku veya toksik ürünlerin sağlıklı dokulara yayılması ve zararlı etkileri önlenerek vasküler ve hücrel olayların gerçekleşmesi için zaman kazanılmış olur (Guyton ve Hall, 2014).

Enflamasyon hasara neden olan olguyu ortadan kaldırmaya ve zedelenen dokuda iyileşmeye yol açacak bir seri vasküler ve hücrel olayları kapsar (Özoran ve

Çobanoğlu, 2007). Enflamasyonda oluşan vasküler ve hücreyel olaylar kimyasal medyatörlerden kaynaklanır. Enflamatuvar medyatörler enflamasyon ajanı tarafından tetiklenerek plazma veya hücrelerden açığa çıkarlar. Medyatörler tek tek ya da birbirlerini uyarak aynı anda veya zincirleme reaksiyonlar ile etki ederler. Enflamasyonun sonlanması, hasarı oluşturan etmenin ve medyatörlerin etkilerinin ortadan kaldırılmasına bağlıdır (Özoran ve Çobanoğlu, 2007).

Bazı durumlarda aşırı duyarlılık reaksiyonları nedeniyle enflamatuvar yanıt etkili biçimde artar ve enflamasyonun bir komplikasyonu olarak organların fonksiyonlarında bozulmalara, hatta organ yetmezliği ve ani ölümlere neden olabilir. Bu nedenle enflamasyonun sınırlanmasına ve organizma tarafından kontrollü biçimde inhibe edilerek sonlandırılmasına gereksinim vardır (Kuralay ve Çavdar, 2006).

1.4. Yara

Deri vücudumuzu saran en büyük organımızdır ve tüm vücut ağırlığımızın %16'sını oluşturur. Derinin görevi vücut etrafında bir bariyer oluşturarak onu dış etmenlerden korumaktır (Özler ve ark., 2007). Çeşitli faktörler nedeniyle deri bütünlüğünün bozulması, canlı dokunun anatomik, fonksiyonel yapı ve işleyişinin zarar görmesi 'yara' olarak tanımlanır (Mittal ve ark., 2013).

Yarayı oluşturan etmenler çeşitlidir. Bunlar travma, fiziksel ve kimyasal yanma, basınç, hayvan ısırığı ya da sokması, metabolik bozukluklar, diyabet ve beslenme bozuklukları olarak sayılabilir (Özkorkmaz ve Özay, 2009).

1.4.1. Yara Tipleri

1.4.1.1. Akut Yaralar

Akut yaralar laserasyon, delinme, yanma veya cerrahi insizyonlar ile oluşan yaralardır. Akut yaralara neden olan etmen geçici ve yaranın iyileşme süresi kısadır. Akut yaralar açık ve kapalı yaralar olmak üzere iki grup altında toplanır (Arslantaş, 2007; Li ve ark., 2007 ve Young ve McNaught, 2011).

Açık Yaralar: Bu tip yaralarda kan damar dışına ve hatta vücut dışına çıkar. Kan akımı gözle görülür haldedir (Mittal ve ark., 2013).

Açık yaralar yaralanmaya neden olan objelere göre sınıflandırılır (Arslantaş, 2007 ve Mittal ve ark., 2013).

İnsizyon: Keskin uçlu objelerin neden olduğu temiz yaralardır.

Laserasyon: Yumuşak dokularda kesici olmayan darbelerin neden olduğu deride ya da mukozadaki yırtıklardır.

Abrasyon: Pürüzlü yüzeylerin neden olduğu derinin en üst tabakasındaki (epidermis) yüzeysel yaralardır.

Dil yaralar: İğne, çivi gibi delici objelerin batmasıyla oluşan yaralardır.

Penetrasyon (kesici) yaralar: Bıçak ve benzeri kesici aletler ile oluşan deri bütünlüğünün bozulduğu yaralardır.

Ateşli silah yaraları: Ateşli silahlardan çıkan objelerin neden olduğu yaralardır. Giriş, çıkış veya her iki deliğin de olduğu yaralardır.

Kapalı Yaralar: Bu tip yaralarda kan damar dışına çıkar; ancak vücut dışına çıkmaz (Mittal ve ark., 2013). Deri bütünlüğünün bozulmadığı; ancak açık yaralardan daha tehlikeli olabilen yaralardır.

Kontüzyon: Kunt uçlu nesnelerin neden olduğu yaralardır. Bu tip yaralarda deri altındaki dokularda hasar meydana gelir.

Hematom: Damarlarda oluşan hasarlar nedeniyle deri altında kan birikimi ile karakterize yaralardır.

Ezilme: Dokuların çok büyük bir güce kısa süreli ya da daha az bir güce uzun süreli maruz kalmasıyla oluşan yaralardır (Arslantaş, 2007 ve Mittal ve ark., 2013).

1.4.1.2. Kronik Yaralar

Kronik yaralar daha çok bası, diyabet, ülserasyon gibi etmenlerle oluşan sürekli bir etmenin neden olduğu, kabul edilebilir bir sürede iyileşmeyen uzun süreli yaralardır. Kronik yaralarda sıklıkla enflamasyon aşamasında uzama olur. Bu da doku harabiyetini artırır. Bu tip yaralar genelde üç ay içinde iyileşmez ve tekrarlar (Arslantaş, 2007 ve Menke ve ark., 2007).

Yara iyileşmesini bozan ve kronikleşmesine sebep olan fizyolojik etmenlerden en önemlileri de iskemi ile dokularda kanlanmanın azalması ve buna bağlı olarak doku oksijenlenmesindeki yetersizliktir. Dokudaki oksijenlenmenin bozulmasıyla iyileşmenin en önemli basamağını oluşturan kolajen sentezi kesintiye uğrar ve bu durum sürecin uzamasına neden olur. Yine iskemi durumunda oluşan etkiler dokuda protein sentezinin azalmasına, lökosit infiltrasyonuna ve metalloproteinaz seviyesinde artışa neden olur. Bu patolojik değişiklikler bozulmuş ekstraselüler matriks yapımına ve uzamış enflamatuvar cevaba neden olarak iyileşme sürecini normal seyrinden çıkarır (Özler ve ark., 2009).

1.4.2. Yara İyileşmesi ile İlgili Genel Bilgiler

1.4.2.1. Yara İyileşme Evreleri

Yara iyileşmesi, hasar etmeni ile başlatılan sistematik, hücresel ve biyokimyasal olayların yeni dokuların oluşumu ve fizyolojik özelliklerin geri kazanımı ile

sonuçlanmasıdır. Yara iyileşmesinin temel prensibi doku hasarını en aza indirerek dokunun oksijenlenmesini, beslenmesini ve nemlenmesini sağlamaktır (Özkorkmaz ve Özyay, 2009).

Yara iyileşme sürecine farklı türde pek çok hücre katılır. Dokular içerisinde yer alan yapılar ve plazmadan köken alan hücreler de iyileşme sürecinde görev alır. Dokularda sentezlenen kolajen yaraya sağlamlığını verirken, integrin de hücreleri perçinler. Plazma hücreleri de damarlar yolu ile yaraya besin ve oksijen taşınması ile fagositik ürünlerin uzaklaştırılmasında görevlidir. Bu aşamalar farklı hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörlerinin kontrolü altında gerçekleşir (Özler ve ark., 2007).

Travmaya bağlı olarak doku bütünlüğünün bozulması, yara bölgesinin anatomik ve fonksiyonel özelliklerinin yeniden kazanılmasını sağlayacak fizyolojik olaylar serisini başlatır. Bu olaylar enflamasyon, fibroblastların oluşumu ve dokuların yenilenmesi basamaklarını kapsar. Yara iyileşmesi birbirinden kesin sınırlarla ayrılmayan hemostaz ve enflamasyon evresi, proliferasyon (çoğalma) evresi, olgunlaşma (maturasyon) ve yeniden şekillendirme (remodeling) evresi olmak üzere üç evrede incelenebilir (Özler ve ark., 2007).

1.4.2.1.1. Hemostaz ve Enflamasyon Evresi

Temel özellikleri vasküler permeabilite artışı, dolaşımdan yaraya hücre kemotaksisi, sitokinlerin ve büyüme hormonlarının açığa çıkması ve bunların aktivasyonu olan enflamasyon süreci, yara iyileşmesinin ilk ve temel basamaklarından biridir (Beldon, 2010).

Doku bütünlüğünün bozulmasıyla damarlardan çıkan trombositler deride bulunan kolajenle birleşerek pıhtılaşma faktörlerini harekete geçirirler (Li ve ark., 2007). Yara alanında oluşan pıhtı ve trombüs dış ortamla teması kesen bir bariyer oluşturur.

Bu bariyer daha fazla mikrobiyal kontaminasyon ve sıvı kaybı meydana gelmesini engelleyerek yara bölgesinde hemostaz (denge) sağlar ve enflamasyon süreci başlar (Gence, 2008).

Hemostaz sağlanırken vasküler geçirgenlikte artış ve prostaglandinlerle birlikte kemotaktik faktörlerin (komplemanlar, IL-1, TNF, TGF (tümör büyüme faktörü)) salınması sonucu yaraya çeşitli hücrelerin göçü gerçekleşir (Nursal ve ark., 1999). Yara bölgesine ilk gelen ve enflamasyonu başlatan lökositler nötrofillerdir. Nötrofiller bakterilerle savaşarak onları parçalayan hücrelerdir. Daha sonra yukarıda bahsedilen uyarı ve aktivasyon mekanizmaları ile yara bölgesine gelen monositler aktive olarak makrofajlara dönüşürler (Li ve ark., 2007). Lökositlerin görevini devralan makrofajlar fagositoz ile bakterileri, doku artıklarını ve yıkım ürünlerini yok ederler. Ayrıca aktive makrofajlar, açığa çıkan sitokinlerle uyarılan lenfositlerin salgıladıkları lenfokinler ile birlikte, yara alanında fibroblast migrasyonu, proliferasyonu ve kolajen sentezini uyararak proliferasyon evresine geçişte rol oynarlar (Gence, 2008 ve Parsak ve ark., 2007).

1.4.2.1.2. Proliferasyon Evresi

Yara bölgesindeki büyüme faktörleri birçok hücreyi etkileyerek, onları aktive ederler, proliferasyon ve sentez işlemlerini başlatırlar. Granülasyon dokusunu oluşturmak üzere hücre sayısı ve ekstraselüler matriks elemanlarında artış gözlenir (Özler ve ark., 2007).

Aktive olan makrofajlar ve trombositlerden salınan PDGF (platelet kaynaklı büyüme faktörü), TGF- β , TNF gibi sitokinler proliferasyon aşamasında ağırlıklı olarak rol oynayacak olan fibroblast ve endotel hücreleri aktive ederler (Nursal ve ark., 1999). Endotel hücrelerinin proliferasyonu anjiyogenezisi, yani yeni damar oluşumunu başlatır (Li ve ark., 2007). Çünkü epitelizasyon granülasyon oluşumuna, granülasyon oluşumu da yeni damar ağının oluşmasına bağlıdır. Yeni damarların oluşumu yara bölgesine daha fazla oksijen ve besin taşınmasını sağlayarak hipoksiyi engeller

(Parsak ve ark., 2007). Fibroblastların proliferasyonu da ekstraselüler matriks proteini olan kolajen ve bağ dokusu yapımını başlatır (Nursal ve ark., 1999).

Yara bölgesinde 48-72 saat sonra görülmeye başlayan fibroblastlar yara iyileşmesi için kritik öneme sahip olan kolajen üretimini yapar. Kolajen yapımı dokunun yeniden şekillenmesi (remodeling) için uygun hale gelmesini sağlayan en önemli basamaktır (Özler ve ark., 2007), ayrıca yara bölgesinde kolajen miktarının artması yara gerilim kuvvetini artırır. Yara geriliminin artması yaranın kapanmasında etkilidir ve yara iyileşmesinin de göstergesidir (Li ve ark., 2007).

Kolajen yapımıyla beraber anjiyogenezis, ardından gerçekleşen granülasyon dokusu oluşumu ve epitelizasyon tamamlanınca proliferasyon evresi sona erer (Parsak ve ark., 2007).

1.4.2.1.3. Maturasyon ve Remodeling Evresi

Olgunlaşma evresi olarak da isimlendirilen maturasyon, yara iyileşmesinin son ve en uzun evresidir. Kolajenaz yapımı ve yıkımı arasında yara oluşumundan yaklaşık üç hafta sonra bir denge oluşur. Böylece olgunlaşma evresi başlamış olur. Bu süreçte kolajen miktarında artış olmaksızın yara gerilim kuvvetinde artış görülür. Bunun nedeni kolajen liflerinin yeniden düzenlenmesidir (remodeling) (Gence, 2008). Bağ dokusu kolajen liflerinin yeniden düzenlenmesinde bir dizi oluşum süreci vardır. Yeni yarada bağ dokusunun ilk proteinleri fibrin ve fibrinonektindir. Daha sonra bu proteinlerin yerini ekstraselüler matriks yapımında yardımcı olacak glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar alır. Son olarak da yarada ağırlıklı bulunan kolajen yapımı başlar. Kolajen önce fibriller şeklindedir, kalınlıkları giderek artar ve gerilme çizgilerine göre yeniden düzenlenir (Nursal ve ark., 1999). Fibril yapıdaki ilk kolajenler tip III kolajen olarak adlandırılır ve zamanla normal deride görülen ve daha sıkı olan tip I kolajene dönüşerek yara gerilimini artırır (Li ve ark., 2007). Yara gerilimi 3-6 hafta sonra başlangıçtaki gücünün %80-95'ine ulaşsa da hiçbir zaman normal derinin gücüne erişemez (Parsak ve ark., 2007).

Remodeling fazı kolajenin fibroblastlar tarafından sentezi ile başlar, skar matürasyonu aylar, hatta yıllar boyunca devam eden dinamik bir süreç olarak işler (Gence, 2008).

1.4.2.2. Yara İyileşmesinin Tipleri

Yara iyileşmesi en basit tanımı ile yaraya neden olan etmenlerin oluşturduğu hasarın organizma tarafından onarılması için verilen yanıttır (Beldon, 2010). Yara iyileşmesi önce hasar bölgesine enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, daha sonra proliferasyonu ve matriks depolanması ve sonra da skar oluşumu ile özetlenebilir. Yara iyileşmesi primer, sekonder ve tersiyer (gecikmiş primer) iyileşme olarak gruplandırılabilir (Arslantaş, 2007).

1.4.2.2.1. Birincil (Primer) Yara İyileşmesi

Bütünlüğü bozulan deride yara kenarlarının bir araya getirilerek cerrahi dikiş, zımba veya bantlarla kapatılması ile gerçekleşen iyileşmedir (Enoch ve Leaper, 2007). Kolajen ve diğer matriks proteinlerinin sentezi ve depolanması, bağ doku oluşumu devam eder. Doku kaybı yoktur. İyileşme, ince bir skar dokusu ile enfeksiyon olmadan minimum ödemle gerçekleşir. Doku yaralanma olmadan önceki gücünün %85-90'ını geri kazanır (Parsak ve ark., 2007).

1.4.2.2.2. İkincil (Sekonder) Yara İyileşmesi

Kuvvetli travma, yanık ve cerrahi nedenlerle oluşan doku kaybı ile karakterize yaraların iyileşme tipidir (Enoch ve Leaper, 2007). Doku kaybı olduğundan granülasyon dokusunun oluşumu ve epitelizasyon daha uzun sürede gerçekleşir. Granülasyon dokusu yeni kapiller, prolifer fibroblastlar ve kolajen içerir. Normalde yara iyileşmesinde gerilme kuvvetini kolajen oluştururken, sekonder iyileşmede skar

dokusunun gerilme kuvvetini epitelizeasyon oluşturur. Sekonder iyileşmede sũreç yavaş işler ve epitelizeasyonun gelişmesi 4-8 haftayı bulabilir (Parsak ve ark., 2007).

1.4.2.2.3. Tersiyer (Gecikmiş Primer) Yara İyileşmesi

Doku hasarının geniş olduğu ve ciddi bakteri kontaminasyonu olan yaralardır. Bu tip yaralarda yara alanı hemen kapatılmaz. Yara yatağındaki enflamatuvar sũrece, bakteri konsantrasyonunu en aza indirmek için zaman tanınır. Daha sonra primer kapama uygulanarak, yara iyileşmesinin normal biyolojik sũreleri yaşanır (Arslantaş, 2007; Beldon, 2010 ve Parsak ve ark., 2007).

1.4.2.3. Yara İyileşmesine Etki Eden FaktȖrler

Beslenme:

Yara iyileşmesi, enerji ve besin gerektiren anabolizmanın yoğun olduğu bir sũretir. Kolajen sentezi için protein, yara geriliminin sağlanmasında çinko ve pıhtılaşma faktȖrlerini etkileyen K vitamini yara iyileşmesinde son derece Ȗnemlidir (Mittal ve ark., 2013 ve Ȗzkorkmaz ve Ȗzay, 2009).

Yara bȖlgesinde enfeksiyon:

Yaraların geç iyileşmesindeki en bȖyȖk faktȖr olarak gȖze çarpmaktadır. Yara bȖlgesinin mikrobiyal açıdan temiz olması (Ȗzellikle bakteriyel enfeksiyonlara karşı) enflamasyon aşamasının uzamasını engelleyeceğinden yaraların çabuk iyileşmesinde Ȗnemlidir (Robson, 1997).

Yara bölgesinde hipoksi:

Yara bölgesine yeterli miktarda oksijen taşınması yaranın iyileşmesi açısından gerekli bir durumdur. Bu da yara bölgesinin perfüzyonu ile sağlanır. Çeşitli durumlarda gerçekleşen vazokontrüksiyonlar yara bölgesine yeterince kan ve oksijen gitmesini engelleyerek yara iyileşmesini geciktirir (Mittal ve ark., 2013).

İlaçlar:

Antienflamatuvar ilaçlar kronik enflamasyon oluşumunu engellediği için yara iyileşmesini destekler. Bununla birlikte kemoterapötikler ve kanser tedavisinde kullanılan diğer ilaçların yara iyileşmesini geciktirdiği bilinmektedir (Mitchell ve Cotran, 2003 ve Mittal ve ark., 2013).

Yaşlanma:

Fibroblastların büyümesindeki yavaşlama ve kolajen yapımındaki azalmadan dolayı yaşlılarda yara iyileşmesi daha geç olmaktadır (Gosain ve Di-Pietro, 2004).

Diyabet:

Diyabetin neden olduğu vasküler problemler, nöropati ve iskemi oluşumu nedeniyle yara iyileşme sürecini olumsuz etkilemektedir. Diyabet hastalarında yaraların geç iyileşmesi yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra bazı karaciğer hastalıkları da yara iyileşmesi evrelerinde özellikle enflamasyon aşamasında gerekli bazı proteinlerin sentezinde veya metabolik faaliyetlerdeki bozukluklar nedeniyle yara iyileşmesinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (Falanga, 2005).

1.4.2.4. Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Faktörler

1.4.2.4.1. Antimikrobiyal Aktivite

Yara bölgesinde mikrobiyal kontaminasyonun artması yara iyileşmesini geciktirir. Enflamasyonun uzamasını ve doku hasarını engellemek için yara bölgesinin bakterilerden temizlenmesi gerekmektedir. Uygun antibakteriyel ajanlarla patojenlerin kontrol altında tutulması veya yok edilmesi yara iyileşmesinde yan rollerden birini üstlenmektedir (Mittal ve ark., 2013).

1.4.2.4.2. Antioksidan Aktivite

Yara bölgesinde serbest radikallerin birikmesi sonucu lipitler, proteinler, kolajen, proteoglikanlar ve hyaluronik asit parçalanmaktadır. Antioksidan ajanların yara bölgesinde serbest radikal oluşumunu inhibe edici etkileri doku hasarını önlemekte ve yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Mittal ve ark., 2013).

1.4.2.4.3. Antienflamatuvar Aktivite

Yara iyileşmesindeki akut enflamatuvar yanıt dokuların korunması ve tamiri için gereklidir. Bununla birlikte, uzamış ve kronikleşmiş enflamasyon ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezini inhibe ederek, yaranın kapanmasını engellemekte ve ağrıya neden olmaktadır. Bu nedenle antienflamatuvar aktivite yara iyileşmesi için istenen bir durumdur. Bu aktiviteye sahip ajanlar yara iyileşmesi aşamasında kronik enflamasyonu önlemek amacıyla hasta konforu açısından kullanılmaktadır (Mittal ve ark., 2013).

1.4.2.4.4. Analjezik Aktivite

Yara iyileşmesinde gerçekleşen enflamasyon ağrıya neden olur. Ağrı kesiciler semptomların giderilmesi için önemlidir. Ayrıca yara kapatma şekli ağrıyı engelleyecek ya da azaltacak şekilde olmalıdır (Mittal ve ark., 2013).

1.5. Yara İyileşmesinin Değerlendirilmesi

1.5.1. *In Vitro* Çalışmalar

Fibroblast, keratinosit ve endotel hücrelerin kullanıldığı hücre kültürü temelli çalışmalarda, yara iyileştirici aktivitesi test edilecek olan numunelerin, iyileşme sürecinde rol oynayan hyaluronik asit, kolajen ve elastini parçalayan hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri üzerindeki inhibitör etkisi değerlendirilir (Süntar, 2011).

1.5.2. *In Vivo* Çalışmalar

Fare ve sıçan gibi memeli hayvanlarda mekanik veya termal travma ile yaralar oluşturulur. Eksizyon yara modelinde yara iyileştirici aktivitesi test edilecek numune yaraya uygulanarak belirli zaman aralıklarıyla yara alanları fotoğraflanır ve yara kontraksiyonu hesaplanır. Yara alanındaki küçülme yara iyileşmesinin göstergesidir. İnsizyon yara modelinde kesi ile oluşturulmuş yaraların kenarları cerrahi dikiş işlemi ile birleştirilir. Yara iyileştirici aktivitesi test edilecek numune uygulanır. Belirlenen süre sonunda dikişler alındıktan sonra yara alanları çıkarılarak yara gerilme kuvveti tensiometre ile ölçülür. Yara gerilme kuvvetinin yüksek olması kolajen oluşumu nun ve yara sağlamlığının göstergesidir (Süntar, 2011).

Bağ dokusunun ana molekülü olan kolajenin yapımı, ekstraselüler matriksin anjiyogenezis ve doku şekillenmesi ile uygun hale gelmesini sağlayan temel basamaktır. Bu nedenle yara iyileşmesinin değerlendirilmesinde kolajen düzeyini belirlemek önem arz etmektedir. Dokudaki kolajen miktarını belirlemek için de başka proteinlerin yapısına çok az giren, çoğunlukla kolajenin yapısında bol miktarda bulunan hidroksiprolin düzeyinin belirlenmesi sık kullanılan bir yöntemdir (Özler ve ark., 2010).

1.6. Antienflamatuvar Etkinin Değerlendirilmesi

Antienflamatuvar etkinin değerlendirilmesi amacıyla deney hayvanlarına enflamasyona neden olan bir ajan verilerek enflamasyon oluşturulur. Ardından test edilecek numune verilerek, enflamasyonun ne ölçüde giderildiği tespit edilir. Aynı zamanda numunenin antienflamatuvar etkisi, aktivitesi bilinen antienflamatuvar bir ajanla kıyaslanarak tespit edilir (Özbek ve Öztürk, 2003).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak, Türkiye’de doğal olarak yetişen beş *Euphorbia* türünün kurutulmuş toprak üstü kısımları kullanıldı (Çizelge 2.1). Türler arazi çalışmaları doğrultusunda farklı lokalitelerden toplandı, herbaryum için seçilen örnekler preslenip kurutulduktan sonra teşhis edilerek verilen kayıt numaraları ile Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu’na (AEF) ve Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu’na (CUFH) kaldırıldı (Şekil 2.1-2.5).

Çizelge 2.1. Bitkisel materyalin toplandığı lokaliteler

Bitki Türü	Herbaryum Numarası	Lokalite	Toplama Tarihi	Teşhis Eden
<i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.	AEF 26268	<u>A4</u> , Ankara, Yenimahalle ilçesi, Çayyolu köyü, yol kenarı, 900-1000 m	10.07.2012	H. Duman
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	AEF 26269	<u>C3</u> , Antalya, Korkuteli ilçesi, Çomaklı köyü, dere mevki, 900-1000 m	14.05.2012	H. Duman
<i>Euphorbia characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> (Hoppe ex. W. Koch) A. R. Smith	AEF 26270	<u>C3</u> , Antalya, Korkuteli ilçesi Yazır köyü, Marzum köprüsü mevki, yamaçlar, 900-1000 m	15.05.2012	H. Duman
<i>Euphorbia virgata</i> Waldst. & Kit.	M 1326	<u>B6</u> , Sivas, Hafik-Zara ilçeleri arası, Tödürge Gölü kenarı, 1200-1300 m	16.09.2012	M. Tekin
<i>Euphorbia seguieriana</i> subsp. <i>seguieriana</i> Necker.	M 1321	<u>A1</u> , Kırklareli, Demirköy-İğneada ilçeleri arası, İğneada’ya 19 km kala yol kenarı, 0-400 m	21.08.2012	M. Tekin



Şekil 2.1. *Euphorbia macroclada* Boiss.



Şekil 2.2. *Euphorbia helioscopia* L.



Şekil 2.3. *Euphorbia characias* subsp. *wulfenii* (Hoppe ex Koch) Smith



Şekil 2.4. *Euphorbia virgata* Waldst. & Kit.



Şekil 2.5. *Euphorbia seguieriana* subsp. *seguieriana* Necker

2.1.2. Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Gereçler

Çözücüler

Etil asetat	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
Hekzan	Sigma-Aldrich
Sülfürik asit	Merck
Glasiyal asetik asit	Merck
Formik asit	Merck
Fosforik asit	Sigma-Aldrich
Asetonitril	Sigma-Aldrich
Toluen	Tekkim

Adsorbanlar

Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

Yöntem

Adsorban

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	Silika jel 60 F ₂₅₄ (Merck, 1.05554 20x20) kaplı hazır plak Silika jel 60 RP-18 F ₂₅₄ (Merck, 1.05559 20x20) kaplı hazır ters faz plak
Kolon Kromatografisi (KK)	Silika jel 60 (70-230 mesh, 0.063-0.200 mm, Merck 1.07734.1000 ASTM) Sefadeks LH-20

Belirteç

Vanilin-H₂SO₄ (Vanilin'in derişik sülfürik asit içindeki %1'lik çözeltisi)

Çözücü Sistemleri

Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü ve çözücü sistemleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri

Çözücü	Uygulama Alanı
Hekzan	Ekstraksiyon
Etil asetat	Ekstraksiyon, KK (Silika jel)
Metanol	Ekstraksiyon, KK (Silika jel)
Su	İTK, KK (Silika jel)
Etil asetat:Glasial asetik asit:Formik asit:Su (100:11:11:26)	İTK
Kloroform:Metanol:Su	İTK
Etil asetat:Metanol:Su	İTK
Etil asetat:Metanol	İTK
Toluen:Kloroform:Metanol	İTK
Fosforik asit:Su (0,2:99,8)	YPSK
Asetonitril	YPSK

Fitokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

YPSK Sistemi	Agilent 1260 G1315 DAD (Diode Array Dedector)
UV Lambası	Camag
Kütle Spektrometresi	Waters 2695 Allia Micromass ZQ
NMR Spektrometresi	Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digi
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC
Evaporatör	Büchi, Büchi RE 111, Heidolf 5111
Kromatografi Tankı	Camag (Cam küvet)
Terazi	Mettler Toledo ML 204
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex RK 510

Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

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

2.2. Yöntem

2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

2.2.1.1. Ekstraksiyon Çalışmaları

Büyük ölçekli ekstraksiyon (total ekstraksiyon) öncesinde, biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama (BAYF) yöntemi doğrultusunda, biyolojik olarak aktif tür/türlerin ve bu türlerin aktif fraksiyon/fraksiyonlarının tespiti amacıyla ön tarama çalışmaları yapıldı. Ön tarama çalışmalarından sonra aktif olduğu tespit edilen tür ve fraksiyondan büyük ölçekli total ekstre hazırlanarak izolasyon çalışmalarına geçildi.

Ön tarama çalışmaları için toz edilen bitkisel materyallerden düşük miktarlar kullanılarak beş *Euphorbia* türünün kurutulmuş toprak üstü kısımlarından (*E. macroclada*, *E. helioscopia*, *E. characias* subsp. *wulfenii*, *E. virgata* ve *E. seguieriana* subsp. *seguieriana*) hareketli maserasyon ile oda sıcaklığında 3 farklı polaritede (sırasıyla *n*-hekzan, etil asetat ve metanol) ekstre hazırlandı ve biyolojik aktivite ön tarama testleri yapıldı.

2.2.1.1.1. Ön Tarama Çalışmaları: Hekzan, Etil Asetat ve Metanol Ekstrelerinin Hazırlanması

Çalışma materyali olarak seçilen beş *Euphorbia* türünün kurutulup toz edilmiş toprak üstü kısımlarından, aktif tür/türlerin aktif fraksiyonunun tespiti amacıyla ön biyolojik aktivite tarama testlerinde kullanılmak üzere 3 farklı polaritede ekstre hazırlandı. Bu amaçla her bir bitki türünden 80 g tartıldı ve ilk olarak 900 mL *n*-hekzan ile 4 defa 8 saat ekstre edildi. Pilili süzgeç kağıdı kullanılarak süzüntü ayrıldı, artık kurutulduktan sonra üzerine 900 mL etil asetat ilave edildi ve 4 defa 8 saat ekstraksiyon yapıldı. Süzüldükten sonra aynı şekilde süzüntü ayrıldı ve artık kurutulduktan sonra 900 mL metanol ile 4 defa ekstre edildi. Her defasında çözücü

yenilenerek ekstraksiyon gücü artırıldı. Süzüntülerin çözücüleri vakumda evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldı, metanollü ekstrenin çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra su ile alınarak dondurulup liyofilize edilerek, *n*-hekzan, etil asetat ve metanollü ekstreler hazırlandı. Elde edilen ekstre miktarları ve % verimleri kaydedilerek ön tarama çalışmaları için biyolojik aktivite testlerine geçildi.

2.2.1.1.2. Total Hekzan, Etil Asetat ve Metanol Ekstrelerinin Hazırlanması

Ön tarama testlerinde biyolojik etki açısından en yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilen tür ve fraksiyon, *E. characias* subsp. *wulfenii* türünün metanollü fraksiyonudur. Bundan sonraki çalışmalara bu fraksiyon ile devam edildi. İzolasyon çalışmalarında kullanılabilmek üzere fazla miktarda ekstre eldesi için *E. characias* subsp. *wulfenii*'nin kurutulmuş ve toz edilmiş toprak üstü kısımlarından metanollü total ekstre hazırlandı. Bunun için 950 g bitkisel materyal sırasıyla 7,5 L *n*-hekzan, etil asetat ve metanol ile 4'er defa ekstre edildi. Hekzanlı ekstre süzülüp süzüntü ayrıldıktan sonra kalan artık kurutularak üzerine etil asetat ilave edildi ve ekstraksiyon yapıldı. Tekrar süzülerek süzüntü ayrıldı ve kalan artık kurutulduktan sonra metanol ile ekstre edildi. Metanollü ekstre süzüldükten sonra süzüntüdeki çözücü vakumda uzaklaştırıldı, kalan ekstre su ile alınarak donduruldu ve liyofilize edilerek kurutuldu. Böylece çalışmalarda kullanılacak metanollü total ekstre elde edilmiş oldu. Her defasında çözücüler yenilenerek verim artırıldı. Elde edilen ekstre miktarı ve % verim kaydedilerek izolasyon ve kromatografik çalışmalara geçildi.

2.2.1.2. Kromatografik Çalışmalar

2.2.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi

Kolon kromatografisine başlamadan önce fraksiyonlamada kullanılacak çözücü sistemlerinin tespiti için *E. characias* subsp. *wulfenii*'nin metanollü ekstresi silika jel 60 F₂₅₄ (Merck, 1.05554 20x20) kaplı hazır plaklar üzerinde, Çizelge 2.3'te belirtilen

Çözücü sistemleri denenerek incelendi. Bileşiklere ait lekeler Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile ısıtma sonucunda belirlendi. İTK analizleri sonunda farklı çözücü sistemlerinin farklı madde gruplarını plak başlangıç noktasından sürüklediğı tespit edildi ve polaritesi birbirine çok yakın fazla sayıda madde olduğı gözlemlendi. Bileşikleri gruplar halinde izokratik elüsyon ile farklı çözücü sistemleri kullanarak ayırmanın en başarılı yol olacağı düşünöldü (bu sistemler ile lekeler plakta birbirlerinden daha uzakta görölmektedir, bu yöntemle ayırmada daha etkili sonuç alınabilir) ve 3 farklı çözücü sisteminin izokratik elüsyon ile artan polaritede sırayla kolondan geçirilmesine karar verildi.

Çizelge 2.3. *E. characias* subsp. *wulfenii*'nin metanollü ekstresinin kolon kromatografisi elüsyonunda kullanılan çözücü karışımı tespiti için denenen ve toplanan fraksiyonların İTK analizlerinde plaklardaki lekelerin takibini yapmak ve ayırımını gözlemlemek için kullanılan İTK çözücü sistemleri

Çözücü Sistemi	Çözücü Oranları
Kloroform:Metanol:Su	1 a (60:40:4) 1 b (70:30:0) 1 c (61:32:7) 1 d (60:40:7) 12 a (65:25:4) 12 b (64:50:10)
Toluen:Kloroform:Metanol	4 a (4:4:1) 4 b (4:4:2) 4 c (8:8:6)
Etil asetat:Metanol:Su	2 a (77:15:8) 2 b (100:13,5:10) 5 a (100:13,5:5) 5 b (100:13,5:2,5) 5 c (100:10:5) 5 d (100:5:5) 5 e (120:13,5:5) 5 f (120:10:5) 6 a (80:10:5) 6 b (60:10:5) 6 c (40:10:5) 7 a (75:20:8) 7 b (75:30:8) 7 c (75:40:8) 7 d (75:50:8) 7 e (75:50:15) 7 f (75:50:25) 7 g (40:13,5:10) 7 h (30:16:10)
Etil asetat:Metanol	9 a (50:50) 9 b (40:60) 9 c (30:700)
Etil asetat:Glasiyal asetik asit: Formik asit:Su	8 a (100:11:11:26) 8 b (80:11:11:26)
Kloroform:Glasiyal asetik asit: Metanol:Su	11 a (64:32:12:8) 11 b (60:32:12:8)

*Çözücü sistemlerine çalışma esnasında plakların üzerine not edilmesi işlemini kolaylaştırmak amacıyla rakam ve yanında harften oluşan kodlar verilmiştir.

2.2.1.2.2. Kolon Kromatografisi

Etkiden sorumlu olabilecek bileşik/bileşikleri izole etmek amacıyla, biyolojik etki açısından aktif olduğu ön tarama çalışmalarıyla tespit edilen ve bu doğrultuda total ekstresi hazırlanan *E. characias* subsp. *wulfenii*'nin metanollü fraksiyonu kullanıldı. İzolasyon çalışmalarına öncelikle dolgu maddesi silika jel olan kolon kromatografisi yöntemiyle başlandı.

2.2.1.2.2.1. Açık Kolonun Hazırlanması

Adsorban olarak Silika jel 60 (70-230 mesh, 0.063-0.200 mm, Merck 1.07734.1000 ASTM) kullanıldı. 565 g silika jel tartılarak, 6 cm çapında ve 80 cm boyundaki cam kolona etil asetat ile karıştırıldıktan sonra hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu (dolgu maddesi yüksekliği: 55 cm). Musluktan bir süre çözücü akıtılarak ve bir gece bekletilerek kolon dolgu maddesinin iyice oturması sağlandıktan sonra ayrımı yapılacak metanollü ekstre uygulandı.

2.2.1.2.2.2. Metanollü Ekstrenin Kolona Uygulanması

Metanollü kuru ekstrenin kolona uygulanması kuru tatbik (Slurry) metoduna göre yapıldı. Bu amaçla metanollü ekstre tam olarak tartıldıktan sonra (30 g) bir kapsülde metanol içerisinde tamamen çözüldü ve ağırlığı kadar silika jel yavaş yavaş ilave edilerek (30 g) karıştırıldı. Kuruması için 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 kolonda havalanması engellendi. Etil asetat:metanol:su (120:10:5) çözücü sistemiyle izokratik akış ile birlikte ekstre fraksiyonlandırılmaya başlandı (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kolon kromatografisi çalışmasına ait bir resim

2.2.1.2.2.3. Metanollü Ekstrenin Fraksiyonlandırılması

Elüsyon işlemine ön tarama çalışmalarında en iyi ayrımın görüldüğü etil asetat:metanol:su (120:10:5) çözücü sistemi ile başlandı. 250'şer mL'lik 23 fraksiyon toplandı. Toplanan fraksiyonların kromatografik profilleri İTK ve YPSK ile izlendi. Fraksiyonlar en iyi leke ayrımının görüldüğü etil asetat:glasiyal asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) çözücü sistemiyle izlendi. İlk 23 fraksiyon bu metotla analiz edildi. 23. fraksiyona kadar fraksiyonlarda madde konsantrasyonunun azaldığı ve artık lekelerin gözlenemediği görüldü. Buradan hareketle 24. fraksiyondan itibaren etil asetat:metanol:su (40:13,5:10) sistemi ile daha polar madde gruplarını toplayarak elüsyona devam edildi. 21 fraksiyon daha bu sistemle toplanarak 44. fraksiyona gelindi. Yine lekelerin yoğunluğu azalınca, yani madde miktarı azalmaya başlayınca 45. fraksiyondan itibaren kolondan sadece metanol

geçirilerek daha da polar bileşiklerden oluşan 20 fraksiyon daha toplandı ve toplamda 250’şer mL’lik 64 fraksiyon toplanmış oldu.

İlk kolondan sonra biyolojik olarak aktif olduğu tespit edilen 8-12. fraksiyonların birleştirilmesiyle oluşan fraksiyonunun (MEOH-2) içerdiği bileşikleri saflaştırmak amacıyla molekül büyüklüğüne göre ayırım sağlayan dolgu materyali Sefadeks LH-20’nin kullanıldığı kolon kromatografisi ve kristallendirme gibi yöntemlerden yararlanıldı.

2.2.1.2.2.4. Sefadeks Kolonun Hazırlanması

Çapraz bağlı dekstran jel olan Sefadeks LH-20’den 84 g tartılarak üzerini örtecek kadar metanol içerisinde bırakılıp şişmesi sağlandı. Daha sonra pamukla zemin oluşturulmuş 3,5 cm çapında, 60 cm uzunluğunda cam kolona 45 cm yüksekliğe kadar musluk açıkken metanol ile karıştırılarak akışkan bir halde dolduruldu. Musluktan metanol geçirilerek bir süre akış sağlandı. Musluk kapatılarak kolon bir süre bekletildi ve sefadeksin oturması sağlandı. Ayırımı yapılacak maddeleri içeren fraksiyonlar (9. fraksiyon, 10. fraksiyon, 11. fraksiyon) sırasıyla kolona uygulandı.

2.2.1.2.2.5. Fraksiyonların Sefadeks Kolona Uygulanması

Birinci kolondan alınan 9., 10. ve 11. fraksiyonlardaki maddelerin takibi İTK ve YPSK ile yapıldı. Fraksiyonlar sırasıyla sefadeks kolona uygulanarak molekül büyüklükleri farklı olan bileşiklerin ayrılması sağlandı.

İlk olarak 9. fraksiyon çözünbileceği kadar metanolde çözöldü ve sefadeks üzerine sıvı halde pipet yardımıyla bırakılarak kolona yüklendi. Fraksiyon aşağıya doğru indikçe sefadeksin üzeri kurumayacak şekilde sürekli metanol ilavesi yapıldı. Musluktan 1 mL/dak akış hızında çözöcü akıtılarak 10’ar mL’lik 55 fraksiyon toplandı.

Bir diğ er maddenin izolasyonu için 10. fraksiyon çözünebileceği kadar metanolde   z ld  ve sefadeks üzerine sıvı halde pipet yardımıyla bırakılarak kolona yüklendi. Fraksiyon aşağıya doğru indikçe sefadeksin üzeri kurumayacak şekilde sürekli metanol ilavesi yapıldı. Musluktan 1 mL/dak akış hızında çözücü akıtılarak 10'ar mL'lik 47 fraksiyon toplandı.

Yukarıdakilerden farklı diğ er maddenin izolasyonu için 11. fraksiyon çözünebileceği kadar metanolde   z ld  ve sefadeks üzerine sıvı halde pipet yardımıyla bırakılarak kolona yüklendi. Fraksiyon aşağıya doğru indikçe sefadeksin üzeri kurumayacak şekilde sürekli metanol ilavesi yapıldı. Musluktan 1 mL/dak akış hızında çözücü akıtılarak 10'ar mL'lik 55 fraksiyon toplandı.

2.2.1.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analizleri

BAYF'ın her basamağında İTK analizlerinin yanı sıra YPSK ile kalitatif analizler de kullanılarak fraksiyonların ve izole edilecek maddelerin en doğru ve kesin sonuçlarla takibi yapıldı.

YPSK ile kalitatif analizlerin yanında izole edilen saf maddelerin kantitatif analiz çalışmalarının da yapılabilmesi için izole edilen ve standart madde olarak kullanılan saf maddelerden stok   zeltiiler; bitkisel materyalden de numune çözeltisi hazırlandı. Etkiden sorumlu saf madde miktarlarını tayin etmek için standartlara ait kalibrasyon eğrileri çizildi ve bitkisel materyaldeki etkin maddelerin miktar tayini üç paralel     mle yapıldı.

2.2.1.2.3.1. Standart   zeltiilerin ve Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Bitkiden BAYF ile izole edilen ve miktar tayini yapılacak olan saf maddeler EC-1, EC-2 ve EC-3 referans standart madde olarak kullanıldı. Her bir saf maddeden 1 mg

tartılıp metanol:su (80:20) karışımında çözüldü. Örnekler metanol:su (80:20) ile balon jode 10 mL'ye tamamlandı. Böylece stok çözeltiler hazırlanmış oldu.

Stok çözeltilerden hareketle, kalibrasyon eğrisi için kullanılacak 0,005 mg/mL; 0,010 mg/mL; 0,025 mg/mL, 0,050 mg/mL; 0,075 mg/mL ve 0,1 mg/mL konsantrasyonlardaki dilüsyonlar her bir standart madde için hazırlandı. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için hazırlanan bu çözeltilerin her biri 10 µL hacimde 3'er kez enjekte edildi ve analiz sonucu pik altında kalan alanların ortalaması, konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi.

2.2.1.2.3.2. Numune Çözeltilerin Hazırlanması

Bitkisel materyal olarak kullanılan *E. characias* subsp. *wulfenii*'nin kurutulmuş ve toz edilmiş toprak üstü kısımlarından 1 g tam tartım alındı ve 100 mL metanol:su (80:20) ile ultrasonik banyoda her bir tur 15 dak olacak şekilde ısınmaya neden olmadan 8 defa ekstre edildi (2 saat). Daha sonra süzülerek metanol:su (80:20) ile balon jode 100 mL'ye tamamlandı. Miktar tayini yapılacak saf maddelerin kalibrasyon eğrisi için hazırlanan dilüsyon noktaları aralığında kalması için hazırlanan bu çözeltiden 500 µL alınıp 500 µL metanol ilave edilerek yarı yarıya seyreltilti. Sonuç olarak 500 mg/100 mL konsantrasyonda hazırlanan numune çözeltisi 0,45 µm'lik filtrelerden süzülerek enjeksiyon yapıldı.

2.2.1.2.3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analiz Koşulları

YPSK Sistemi	: Agilent 1260 G1315 DAD
Kolon	: ACE 5 (250 x 4,6 mm; 5 µm partikül büyüklüğü)
Hareketli Faz A	: %0,2 fosforik asit içeren su
Hareketli Faz B	: Asetonitril
Akış Tipi	: Gradient Elüsyon
Akış Hızı	: 1 mL/dak
Sıcaklık	: 40°C
Enjeksiyon Hacmi	: 10 µL
Dalga Boyu	: 254 nm

Kromatografik olarak en iyi pik ayrımının görüldüğü gradient elüsyon sistemi Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. YPSK analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi

Zaman (dak)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış Hızı (mL/dak)
0	90	10	1
20	40	60	1
20,01	0	100	1
25	0	100	1

2.2.2. Analitik Yöntemin Validasyonu

2.2.2.1. Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık, analit standardının artan konsantrasyonuna karşı analit cevabı grafiğe geçirildiğinde, bir doğru (kalibrasyon grafiği) elde edilmesi ve çizilen grafikte noktaların mümkün olduğunca doğru üzerinde olmasıdır. Doğrunun eğim (m) ve

korelasyon katsayısı (r^2) doğrusallığı veren parametrelerdir. r^2 değerinin 1'e yakın olması gerekir (Figueiredo ve ark., 2015).

$y = mx + n$ [kalibrasyon denklemi]

y = Alan [hesaplanan]

x = Konsantrasyon [mg/mL]

m = Regresyon doğrusunun eğimi

n = Doğrunun y-eksenini kestiği nokta

r^2 = Korelasyon katsayısı

Aralık, kalibrasyon grafiğinin doğrusal olduğu alt ve üst konsantrasyonları içeren kısımdır. İzole edilen maddelerin miktar tayininin yapıldığı bitkisel materyalden hazırlanan ekstredeki pik alanları ve miktarları, en düşük ve yüksek standart madde konsantrasyonu noktalarından oluşan aralıktadır.

2.2.2.2. Kesinlik

Kesinlik, geliştirilen analiz yönteminin çalışma koşullarında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Kesinlik sonuçları yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ile ifade edilir. Analit en az 6 kez tayin edilir. Standart maddelerden hazırlanan analitler 6 kez enjekte edildi.

2.2.2.3. Teşhis Sınırı (LOD-Limit of Dedection)

Teşhis sınırı, analit sinyalinin gözlenebildiği; fakat kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte tayin sınırları içerisine girmeyen en düşük konsantrasyondur. Deneysel yolla sinyal/gürültü oranının 3 olduğu analit konsantrasyonu 'teşhis sınırı' olarak kabul edilir.

EC-1, EC-2 ve EC-3 standartları için LOD, en düşük standart çözelti konsantrasyonu olan 0,005 mg/mL kromatogramında bulunan gürültü sinyalinin 3 katı olarak hesaplandı.

2.2.2.4. Tayin Sınırı (LOQ-Limit of Quantification)

Tayin sınırı, analitin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının hesaplanabileceği doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya doğrusallığın (kalibrasyon eğrisinin) en alt konsantrasyonunu oluşturan veya altında olabilen konsantrasyon düzeyidir. Deneysel yolla sinyal/gürültü oranının 10 olduğu analit konsantrasyonu ‘tayin sınırı’ olarak kabul edilir.

EC-1, EC-2 ve EC-3 standartları için LOQ, en düşük standart çözelti konsantrasyonu olan 0,005 mg/mL kromatogramında bulunan gürültü sinyalinin 10 katı olarak hesaplandı.

2.2.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini

Kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, YPSK gibi kromatografik yöntemler kullanılarak birbirinden ayrılan bileşikler kristallendirme ve kromatografik yöntemlerle saflaştırıldı. Her bir bileşiğin yapısı aşağıda belirtilen spektroskopik yöntemlerle tayin edildi.

2.2.3.1. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

Bileşiklerin dötero metanol (MeOD) 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.

2.2.3.2. K t le Spektroskopisi

 zole edilen bileşiklerin kütleleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı II’de bulunan Waters 2695 Allia Micromass ZQ marka LC/MS cihazı ile  l  ld . Örnekler metanol içinde   z l p, dil e edildikten sonra aşağıda verilen şartlar altında 10  L enjekte edilerek analizler yapıldı.

LC/MS  artları

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 �L

2.2.3.3. UV Spektroskopisi

Bileşiklerin metanol içinde hazırlanan çözeltilerinin farklı dalga boylarında UV spektrumları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nde bulunan Agilent 1260 G1315 DAD cihazı kullanılarak alındı.

2.2.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.2.4.1. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Deney Hayvanları, Referans Maddeler ve Test Numunelerinin Hazırlanması

2.2.4.1.1. Deney Hayvanları

Deneylerde ağırlıkları 25-30 g aralığında değişen erkek Swiss Albino fareler ve ağırlıkları 160-180 g aralığında değişen erkek Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı. Deneye başlamadan önce hayvanların ortama adapte olabilmesi için hayvanlar laboratuvar şartlarında en az üç gün bekletildi. Bekleme süresince hayvanlar standart pellet yem ve su ile beslenerek, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık uygulaması yapılan laboratuvarda oda sıcaklığında barındırıldılar. Deneylerde her grupta altışar hayvan kullanıldı.

2.2.4.1.2. Biyolojik Aktivite Deneylerinde Kullanılan Referans Maddeler

Biyolojik aktivite çalışmaları sonunda elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla yara iyileştirici aktivite deneylerinde standart yara iyileştirici madde olarak Madecassol® pomat kullanıldı. Referans madde grubundaki her deney hayvanının yarası üzerine haricen 500'er mg Madecassol® pomat uygulandı.

Antienflamatuvar etkinin değerlendirilmesi amacıyla referans madde olarak %0,5'lik CMC (karboksimetilsellüloz) içinde hazırlanmış 10 mg/kg indometasin kullanıldı.

2.2.4.1.3. Test Numunelerinin Hazırlanması

Yara iyileştirici aktivite çalışmalarında kullanılan test numunelerini içeren merhemler, Madecassol® pomatin bazı olan glikol sterarat:1,2 propilen glikol:sıvı parafin (3:6:1) karışımı kullanılarak %1 oranında ekstre içerecek şekilde hazırlandı.

Antienflamatuvar aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla, test numuneleri %0,5'lik sodyum karboksimetilselüloz (Na-CMC) çözeltisi içerisinde, gerektiğinde ultrasonik banyo yardımıyla süspanse edilerek hazırlandı ve deney hayvanlarına özel mide gavajı ile oral yolla uygulandı. Kontrol grubu hayvanlarına ise sadece test numunelerinin hazırlanmasında kullanılan %0,5'lik Na-CMC verildi.

2.2.4.2. Yara İyileştirici Aktivite Tayini

2.2.4.2.1. In Vivo Deneyler

2.2.4.2.1.1. Çizgisel İnsizyon Yara Modeli

Çizgisel insizyon yara modeli kullanılarak yapılan çalışmada test numunelerinin ve referans maddelerin yara gerilimini artırıcı etkileri, dolayısıyla kolajen yapımı üzerindeki etkileri değerlendirildi (Küpeli Akkol ve ark., 2009; Lodhi ve ark., 2006 ve Suguna ve ark., 2002).

Sıçanlara zayıf eter anestezisi altında, intraperitoneal yolla 0,15 cc Ketalar® enjeksiyonu ile genel anestezi yapıldı. Bistüri ile sırt kısımlarının orta hattından 2 cm uzaklıkta iki adet 5 cm'lik kesiler atılarak çizgisel insizyon yaraları oluşturuldu. Yaralara cerrahi ipek iplikle ve eşit aralıklarla 3 adet dikiş atıldı. Dokuz gün boyunca günde bir defa 500'er mg %1 ekstre/fraksiyon içeren merhem formülasyonları haricen yaralar üzerine uygulandı. Dokuzuncu günün sonunda dikişler alındı ve 10. gün hayvanlar servikal dislokasyon ile öldürüldü. Yara oluşturulan bölgeler yara

kenarlarının 1'er cm çevresinden cerrahi makasla kesilip alındı. Yaralardan biri histopatolojik incelemeler için ayrıldıktan sonra diğer yaranın tensiometre ile gerilim kuvveti ölçüldü (Süntar ve ark., 2011).

2.2.4.2.1.2. Dairesel Eksizyon Yara Modeli

Dairesel eksizyon yara modeli kullanılarak yapılan çalışmada, test numunelerinin ve referans maddelerin etkileri doğrultusunda yara alanlarındaki küçülme tespit edilerek numunelerin yara kontraksiyonu üzerindeki etkileri değerlendirildi (Küpeli Akkol ve ark., 2011 ve Sadaf ve ark., 2006).

Farelere zayıf eter anestezisi altında intraperitoneal yolla 0,01 cc Ketalar® enjeksiyonu ile genel anestezi yapıldı. Biyopsi punch ile 5 mm çapında dairel eksizyon yaraları oluşturuldu ve 10 gün boyunca her gün 500'er mg %1 ekstre/fraksiyon içeren merhem formülasyonları haricen yaralara uygulandı. Yara alanları her gün dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı ve AutoCAD program kullanılarak yara alanlarındaki küçülme hesaplandı. Dairesel eksizyon yara modelinde, yara alanlarındaki küçülmelerin değerlendirildiği yüzde kontraksiyon oranları hesaplandı (Küpeli Akkol ve ark., 2011).

2.2.4.2.2. Hidroksiprolin Tayini

Dokulardaki kolajen miktarı, kolajenin yapısında bulunan hidroksiprolinin ölçümü ile belirlenir. Hidroksiprolin miktarının fazla olması dokuda kolajenin fazla olduğunu gösterir (Rasik ve ark., 1999). Woessner tarafından geliştirilen L (-) Hidroksiprolin tayini yöntemi çeşitli modifikasyonlar yapılarak uygulandı (Değim ve ark., 2002; Küpeli Akkol ve ark., 2012 ve Woessner, 1961).

Dokulardaki hidroksiprolin miktarının ölçümü için hidroksiprolin standardından 5 mg tartılarak 50 mL 0,001 N HCl'de çözüldü ve stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan

stoktan farklı konsantrasyonlarda dilüsyon çözeltileri (0,5 µg/mL; 1 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2 µg/mL ve 2,5 µg/mL) hazırlanarak her bir çözeltiden 2 mL tüplere alındı. Ölçüm yapılacak dokular tartılarak pyrex tüplere konuldu ve üzerlerine 5 mL 6 N HCl ilave edilerek 130°C’de 3 saat hidroliz edildi. İndikatör olarak birkaç damla %0,02’lik metil kırmızısı ilave edildikten sonra çözeltinin rengi sarıya dönene ve pH 6-7 arasında olana kadar 2,5 N NaOH eklendi.

Taze hazırlanmış Kloramin T’den 1 mL, standart ve test çözeltilerinin 2 mL’si üzerine ilave edilerek 20 dak oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 1 mL perklorik asit ve 1 mL taze hazırlanmış 0,2 g/mL *p*-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi ilave edilerek, çözeltilerdeki tabakalanma kayboluna kadar çalkalandı. Çözeltiler 60°C’lik su banyosunda 20 dak bekletildikten sonra, 5 dak musluk suyu altında soğutuldu. Çözeltilerin absorbansı 557 nm’de ölçüldü (Değim ve ark., 2002).

2.2.4.2.3. Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik incelemeler için ayrılan uygun büyüklükteki deri biyopsileri %10’luk tamponlu formaldehit içerisinde bekletildi. Dokular dehidrasyon ve şeffaflaştırma işlemlerinden sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler lam üzerine alınarak hematoksilen-eozin (HE) ve Van Gieson boyaları ile boyandı. Işık mikroskobu (Olympus CX41 bağlı Kameram® Dijital Image Analiz Sistemi) ile incelenen dokular morfometrik ve kolorometrik olarak değerlendirildikten sonra epidermal ve dermal re-modelleme hafif (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) olmak üzere derecelendirildi. Epidermis, re-epitelizasyon veya ülser; dermis ise fibroblast proliferasyonu açısından değerlendirildi. Mononükleer ve/veya polimorfonükleer hücreler de neovaskülarizasyon ve kolajen birikimi yönünden incelendikten sonra epidermal ve dermal re-modelleme evrelendirildi. Tüm bu incelemelerin ardından yara iyileşmesi ile ilgili bulgular birleştirilerek iyileşme enflamasyon evresi, proliferasyon evresi ve re-modelleme evresi yönünden evrelendirildi (Küpeli Akkol ve ark., 2011; Peşin Süntar ve ark., 2010b ve Süntar ve ark., 2010b).

2.2.4.2.4. In Vitro Deneyler

Yara iyileştirici aktivitenin mekanizmasını aydınlatmak amacı ile gerçekleştirilen *in vitro* deneylerde, test numunelerinin hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri üzerindeki inhibitör etkilerinin ölçülmesine yönelik çalışmalar yapıldı.

2.2.4.2.4.1. Hyaluronidaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi

Çalışmamızda test numunelerinin hyaluronidaz enzimi üzerindeki inhibitör etkilerinin belirlenmesi amacıyla sodyum hyaluronattan salınan *N*-asetilglukozamin miktarının ölçülmesine dayanan yöntem uygulandı (Sahasrabudhe ve Deodhar, 2010).

Çalışmada sıgırdan elde edilen hyaluronidazın 50 µL'si (7900 ünite/mL) 0,1 M asetat tamponunda (pH 3,6) çözüldükten sonra, %5 DMSO (dimetilsülfoksit) içinde çözülmüş farklı konsantrasyonlarda test numunesini içeren 50 µL ekstre çözeltisi ile karıştırıldı. Kontrol grubu için sadece 50 µL %5 DMSO kullanıldı. 37°C'de 20 dak inkübe edilen karışım, 50 µL kalsiyum klorür (12,5 mM) ilave edildikten sonra tekrar 37°C'de 20 dak inkübasyona bırakıldı. Çözeltiye 250 µL sodyum hyaluronat (1,2 mg/mL) eklenip, 37°C'de 40 dak daha inkübe edilerek 50 µL 0,4 M NaOH ve 100 µL 0,2 M sodyum borat ilave edildi. Kaynayan su banyosunda 3 dak bekletilen karışım, soğutulduktan sonra 1,5 mL *p*-dimetilaminobenzaldehyt çözeltisi eklenip 37°C'de 20 dak daha inkübasyona bırakıldı. Çözeltinin absorbansı spektrofotometre kullanılarak 585 nm'de ölçüldü.

Referans madde olarak 100 µg/mL konsantrasyonda tannik asit kullanıldı.

2.2.4.2.4.2. Kolajenaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi

Clostridium histolyticum kolajenaz (ChC) enzimi 50 mM trisin tamponu (10 mM CaCl₂ ve 400 mM NaCl ile) içinde 0.8 ünite/mL olacak şekilde çözöldü. Aynı tampon içinde 2 mM olacak şekilde substrat *N*-[3-(2-furil) akrilol]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) hazırlandı. Her bir kuyucuğa 25 µL tampon, 25 µL ekstre ve 25 µL enzim eklenerek 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Üzerlerine 50 µL substrat eklendikten sonra absorpsanslar 340 nm’de ölçöldü. Ölçüm her bir örnek için iki kez tekrarlandı.

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

Enzim inhibisyon değeri aşğıdaki formöle göre hesaplandı:

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

A_a : Kontrol grubunun absorpsans değeri

A_b : Test numunesinin absorpsans değeri

2.2.4.2.4.3. Elastaz Enzim İnhibisyonunun Ölçölmesi

Ekstre ve insan nötrofil elastaz enzimi (HNE) (17 mU/mL) 0,1 M Tris-HCl tamponu (pH 7,5) içinde 25°C’de 5 dak inkübasyona bırakıldı. Karışma HNE’nin substratı olan *N*-(metoksissukkinil)-Ala-Ala-Pro-Val 4-nitroanilid (MAAPVN) ilave edildi ve 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra karışma 1 mg/mL soya tripsin inhibitörü eklendi. *p*-nitroanilin oluşumuna bağılı olarak gerçekteşen absorpsiyon değeri 405 nm’de spektrofotometre yardımıyla ölçöldü (Melzig ve ark., 2001).

2.2.4.3. Antienflamatuvar Aktivite Tayini

Antienflamatuvar aktivitenin tespiti amacıyla farelerde akut yöntemlerden, kapiller permeabilite artışının inhibisyonu yöntemi (Whittle yöntemi) kullanıldı (Whittle, 1964).

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

Asetik asit, kapiller damarların proteinlere olan geçirgenliğini artırarak, plazmanın kapillerlerden vücut boşluklarına sızmasına neden olur. Bu olayın gerçekleştiği şartlarda antienflamatuvar amaçla kullanılan test numunesinin sızmayı inhibe etmesi istenen bir durumdur.

Antienflamatuvar aktivitenin tayininde, Whittle'in deney hayvanlarında uygulanmak üzere geliştirdiği model kullanıldı (Whittle Yöntemi). Bu modelde asetik asit ile oluşturulan eksudasyonun tespit edilmesi amacıyla proteine bağlanma yeteneğine sahip Pontamine Sky Blue veya Evans Blue gibi boyar maddelerden yararlanıldı. Abdominal boşlukta toplanan eksudadan alınan boyar maddenin renk yoğunluğu spektrofotometrik yöntemle ölçülerek test numunesinin sağladığı inhibisyon antienflamatuvar aktivite olarak değerlendirildi (Küpeli, 2000).

Deneyde farelere test numuneleri ve referans madde olarak kullanılan indometasin uygulandıktan 30 dakika sonra her farenin marjinal kuyruk venasına %4'lük Evans Blue çözeltisinden enjekte edildi. 10 dakika sonra intraperitoneal yolla %0,5'lik asetik asit çözeltisi verildi. Yirmi dakika sonra servikal dislokasyonla öldürülen hayvanların peritonu açıldı ve içeriği distile su ile yıkanarak içinde 0,1 N NaOH bulunan 10 mL'lik balon jojelere aktarıldı, ardından hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Boyar maddenin absorbansı 590 nm'de spektrofotometre kullanılarak ölçüldü.

Boyar madde olarak kullanılan Evans Blue'dan farklı konsantrasyonlarda (2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) dilüsyonlar hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Absorbanslar Lambert-Beer kanunu esası ile 590 nm'de ölçüldü ve aşağıdaki formül kullanılarak iltihaplanmanın inhibisyonu hesaplandı:

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

A_a : Kontrol grubundaki boyar maddenin absorbansı

A_b : Test numunesi uygulanan gruptaki boyar maddenin absorbansı

2.2.4.5. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

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

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

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

3. BULGULAR

3.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1. Ekstraksiyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.1.1.1. Ön Tarama Çalışmaları ile İlgili Bulgular

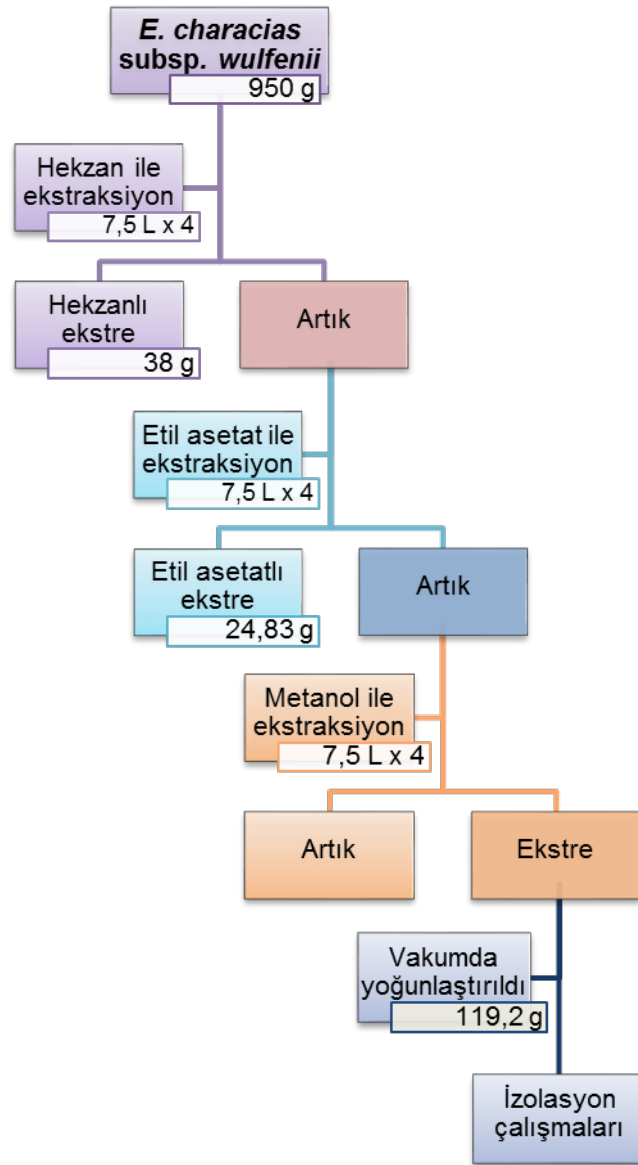
Yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktivite açısından aktif tür/türlerin tespiti amacıyla ön tarama çalışmaları için beş *Euphorbia* türünün her birinin kurutulmuş toprak üstü kısımlarından (*E. macroclada*, *E. helioscopia*, *E. characias* subsp. *wulfenii*, *E. virgata* ve *E. seguieriana* subsp. *seguieriana*) 80 g tartılarak hareketli maserasyon ile oda sıcaklığında 3 farklı polaritede (sırasıyla *n*-hekzan, etil asetat ve metanol) ekstre hazırlandı. Hazırlanan ekstrelerden çözücülerini uçurulduktan sonra elde edilen kuru ekstrelerin miktarları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Euphorbia* türlerinden yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktivite açısından aktif tür/türlerin tespiti amacıyla ön tarama çalışmaları için hazırlanan ekstrelerin miktarları

Tür	Miktar (g)		
	<i>n</i> -Hekzanlı Ekstreler	Etil Asetatlı Ekstreler	Metanollü Ekstreler
<i>E. macroclada</i>	2,6101 g	1,3824 g	10,4512 g
<i>E. helioscopia</i>	3,0820 g	0,8774 g	5,8205 g
<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i>	5,2507 g	1,9474 g	9,7359 g
<i>E. virgata</i>	4,3814 g	1,4992 g	9,2697 g
<i>E. seguieriana</i> subsp. <i>seguieriana</i>	2,3111 g	0,7963 g	6,4717 g

3.1.1.2. Total Hekzan, Etil Asetat ve Metanol Ekstreleri ile İlgili Bulgular

Ön tarama çalışmaları sonunda biyolojik olarak aktif olduğu tespit edilen *E. characias* subsp. *wulfenii* türünün metanollü fraksiyonundan, izolasyon basamaklarını yürütmek amacıyla total ekstre hazırlama çalışmaları yapıldı. Bölüm 2.2.1.1.2’de açıklanan şekilde gerçekleştirilen çalışma sonunda 38 g hekzanlı, 24,83 g etil asetatlı ve izolasyon çalışmalarında kullanılacak olan 119,2 g metanollü ekstre elde edildi. Total ekstre hazırlanmasında izlenen yol Şekil 3.1’de verilmiştir.

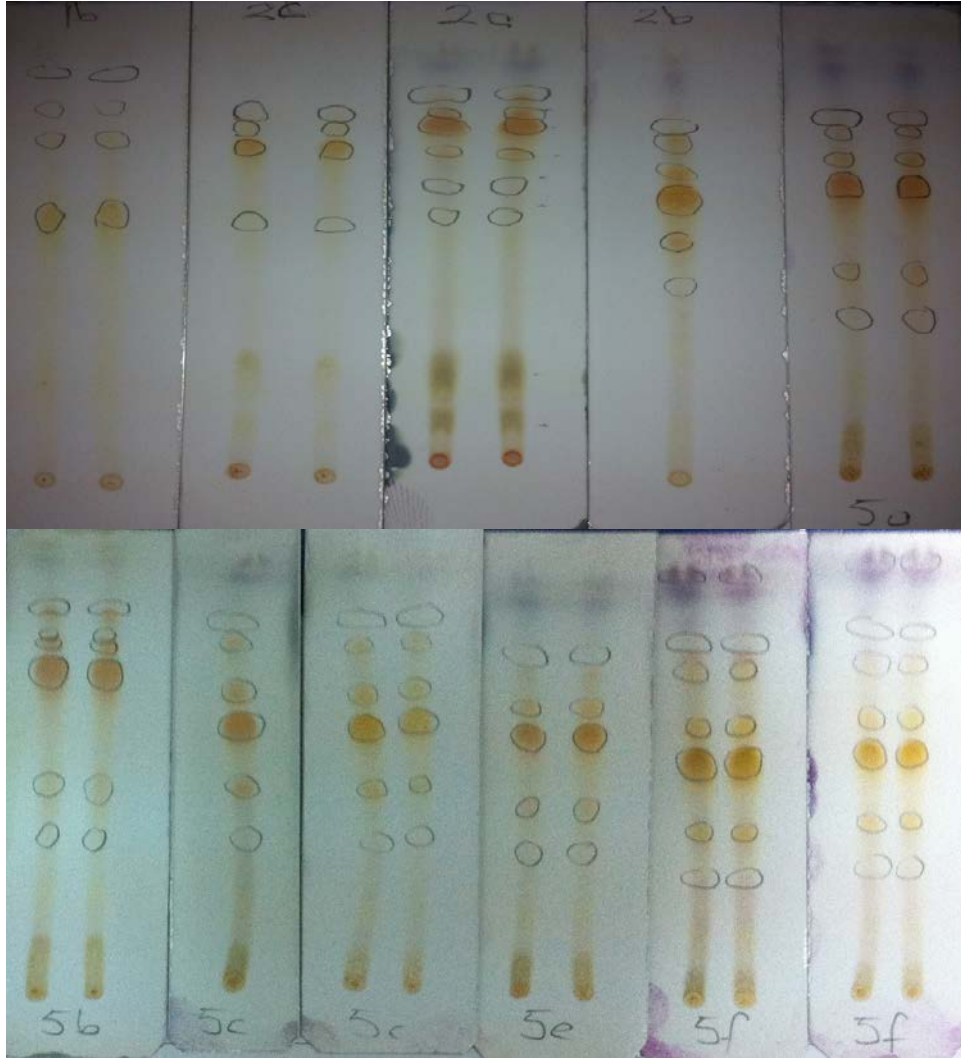


Şekil 3.1. *E. characias* subsp. *wulfenii* total metanol ekstresinin hazırlanışı

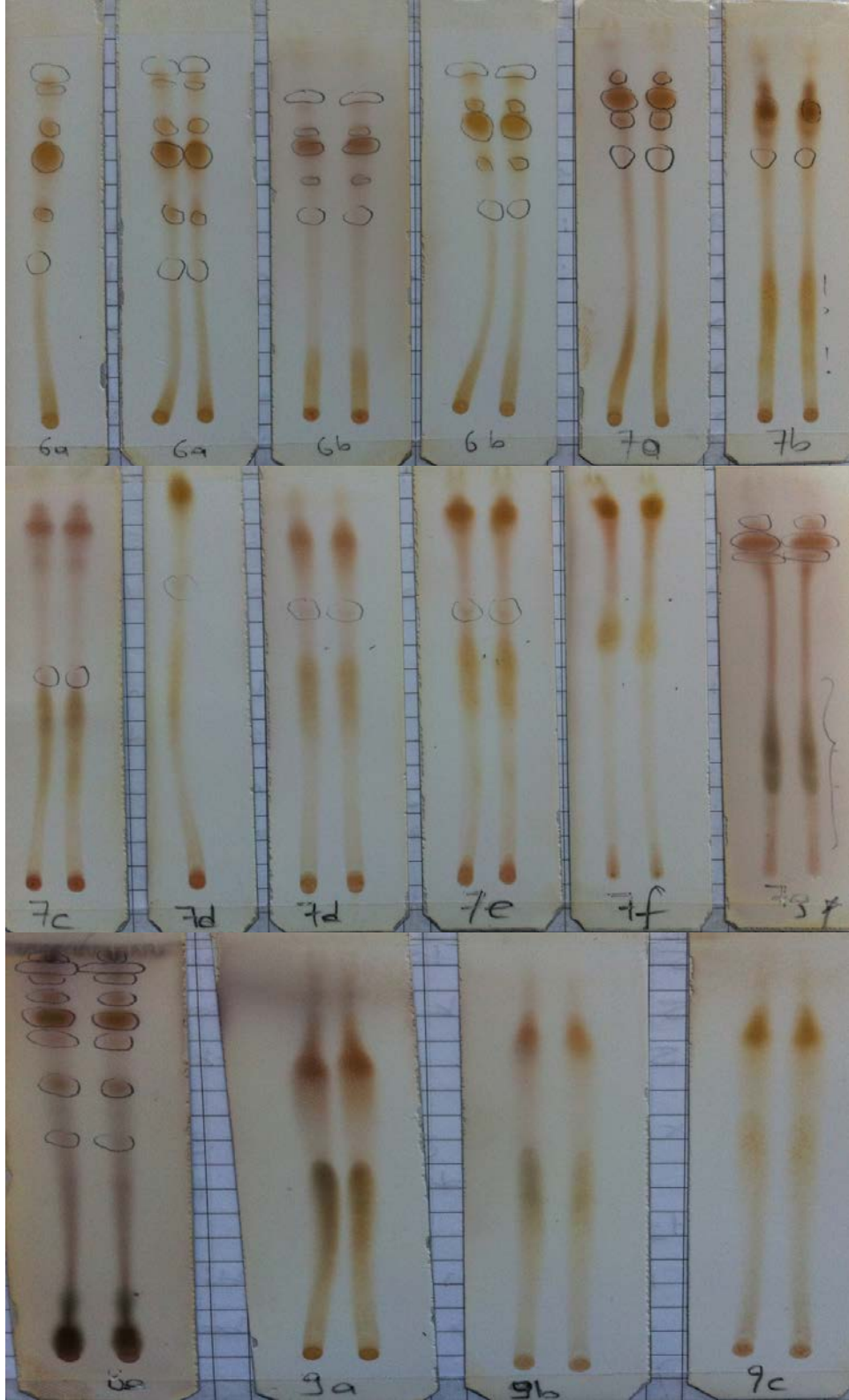
3.1.2. Kromatografik Bulgular

3.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları

E. characias subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması çalışmasında kullanılan çözücü sistemleri gereç ve yöntemde verilmişti. Bu sistemlerin bulunması için yapılan İTK çalışmalarına ait bulgular Şekil 3.2’de yer almaktadır.



Şekil 3.2. *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması çalışmasında kullanılan çözücü sistemlerinin bulunması için yapılan İTK çalışmalarına ait kromatogramlar (yan yana uygulanan lekeler aynı ekstreye aittir)

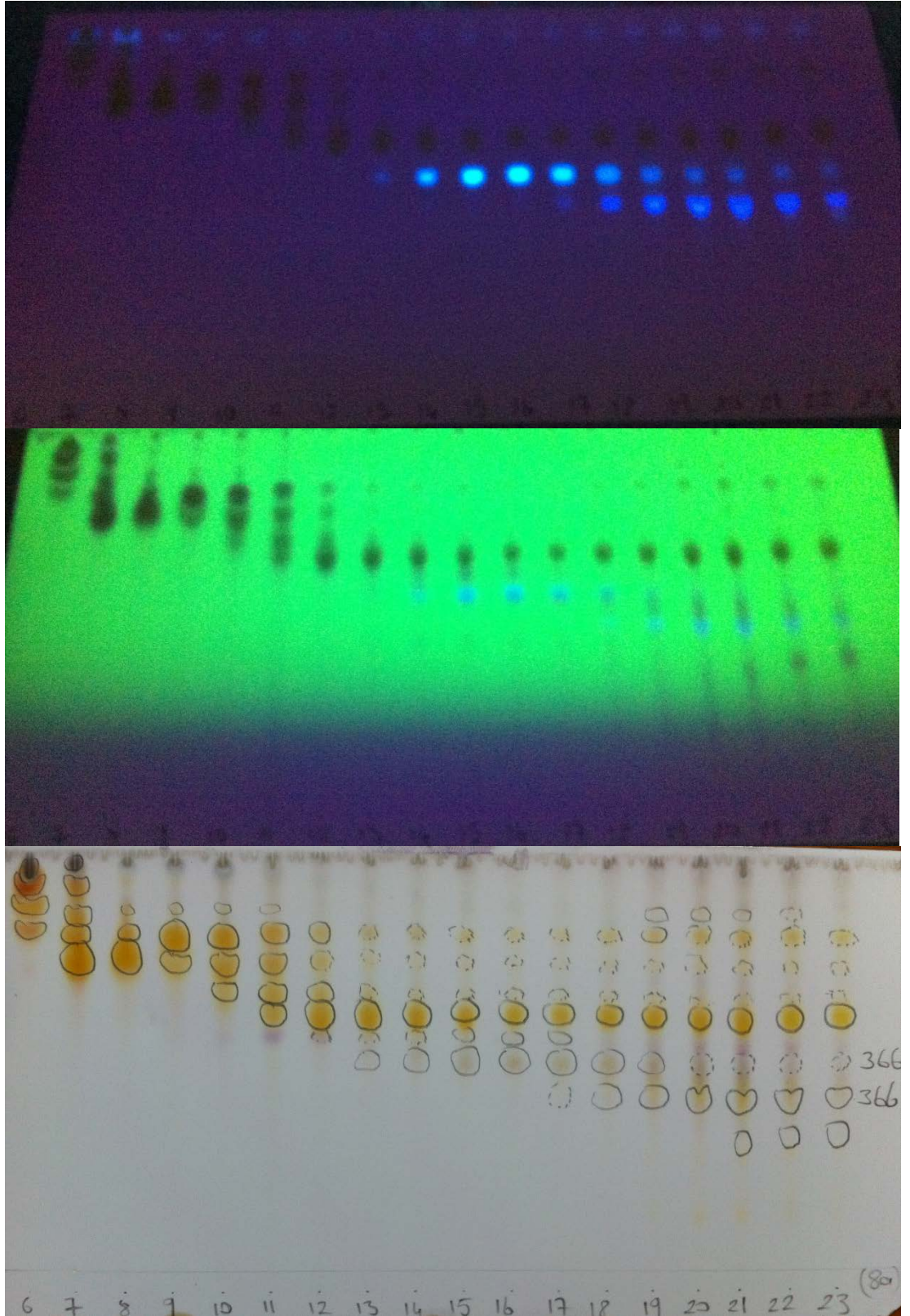


Şekil 3.2. Devam. *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması çalışmasında kullanılan çözücü sistemlerinin bulunması için yapılan İTK çalışmalarına ait kromatogramlar (yan yana uygulanan lekeler aynı ekstreye aittir)

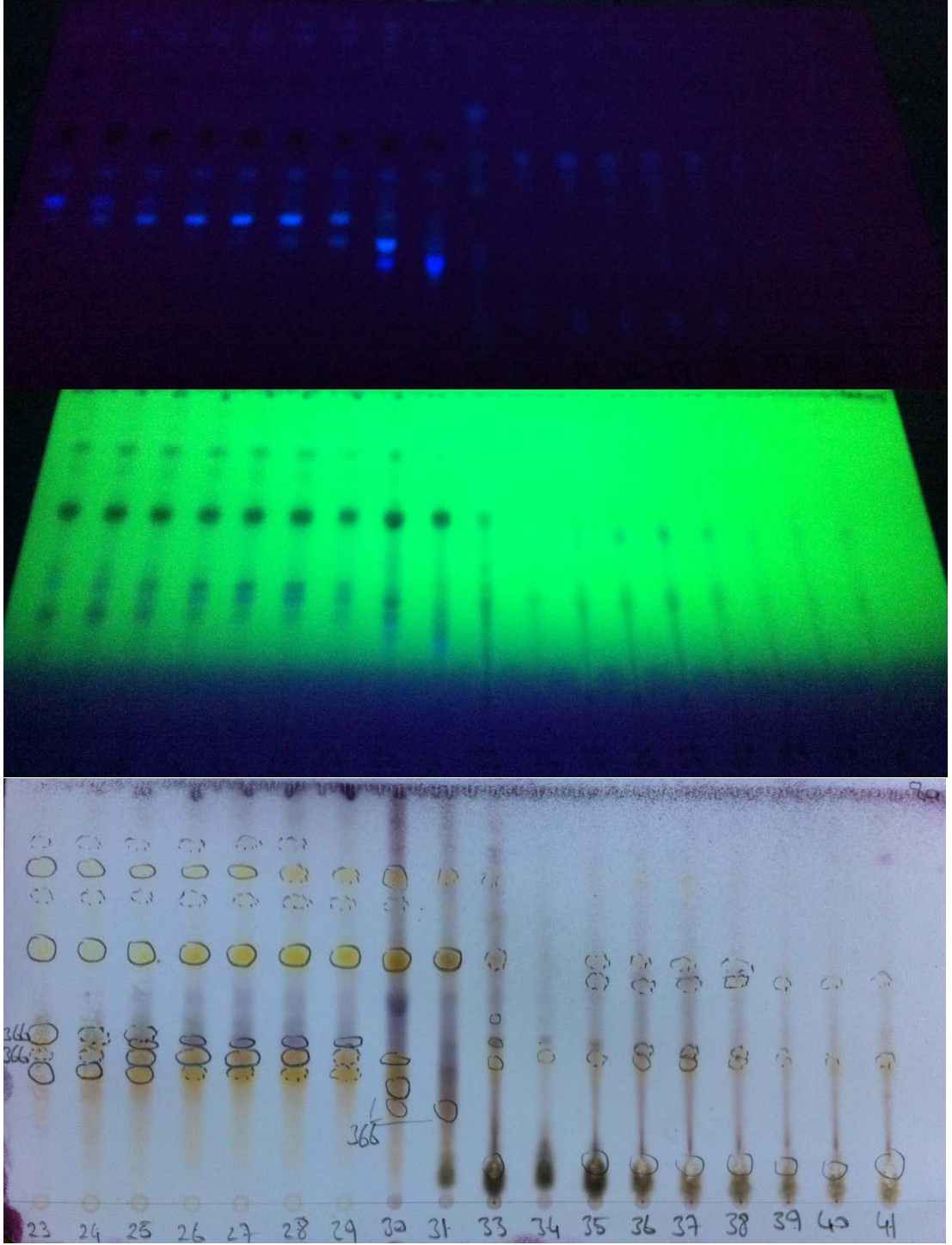
Şekil 3.2’de yer alan kromatogramlar değerlendirildiğinde, plakların üst kısmında ayrılmış haldeki maddeleri ve start noktasında kalan, plak üzerinde sürüklenmeyen maddeleri ayırmak için çok sayıda sistem denendi ve başarılı olundu. Her iki grup maddeler ve en sonunda en polar maddelerin kolondan ayrı ayrı alınabilmesi için üç farklı çözücü sisteminin kullanılmasına karar verildi. Büyük çaplı ilk kolonda gradient elüsyon için fazla miktarda çözücü ve zaman harcanacağı, çok sayıda fraksiyon toplanacağı ve izokratik elüsyona göre avantaj sağlanamayacağı düşünülerek İTK denemeleri ile bulunan kromatografik ayırımın iyi olduğu çözücü sistemleri kullanıldı.

İlk elüsyon için çözücü sistemi 5f, etil asetat:metanol:su (120:10:5); ikinci elüsyon için daha polar olan çözücü sistemi 7g, etil asetat:metanol:su (40:13,5:10); üçüncü ve son elüsyon için %100 metanol kolondan geçirilerek fraksiyonlar toplandı.

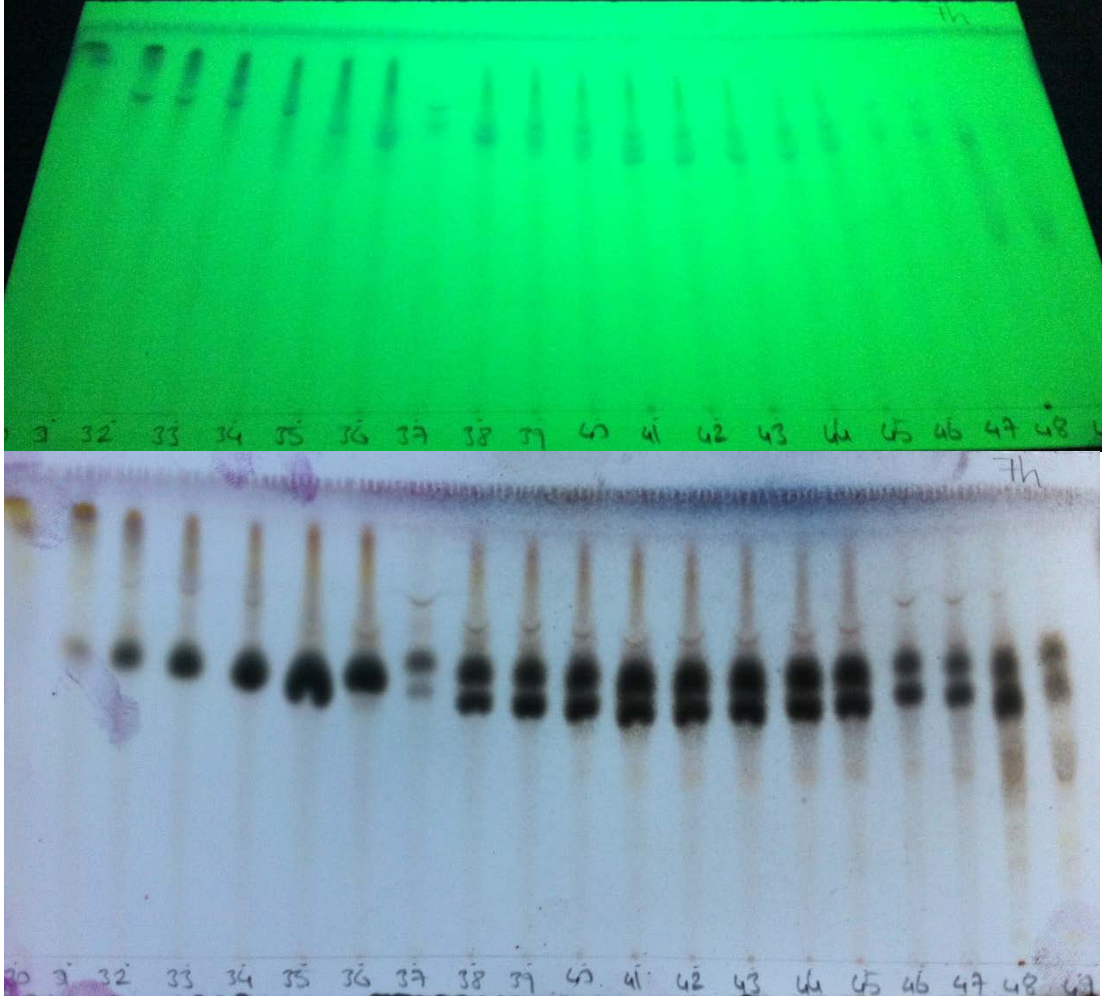
Toplanan tüm fraksiyonların (64 fraksiyon) İTK profilleri Şekil 3.3-3.5’te verilmiştir.



Şekil 3.3. *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen 6.-23. fraksiyonların (yukarıdan aşağıya doğru 366 nm, 254 nm dalga boyu ve Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile muamele edilmiş gün ışığındaki) İTK kromatogramları

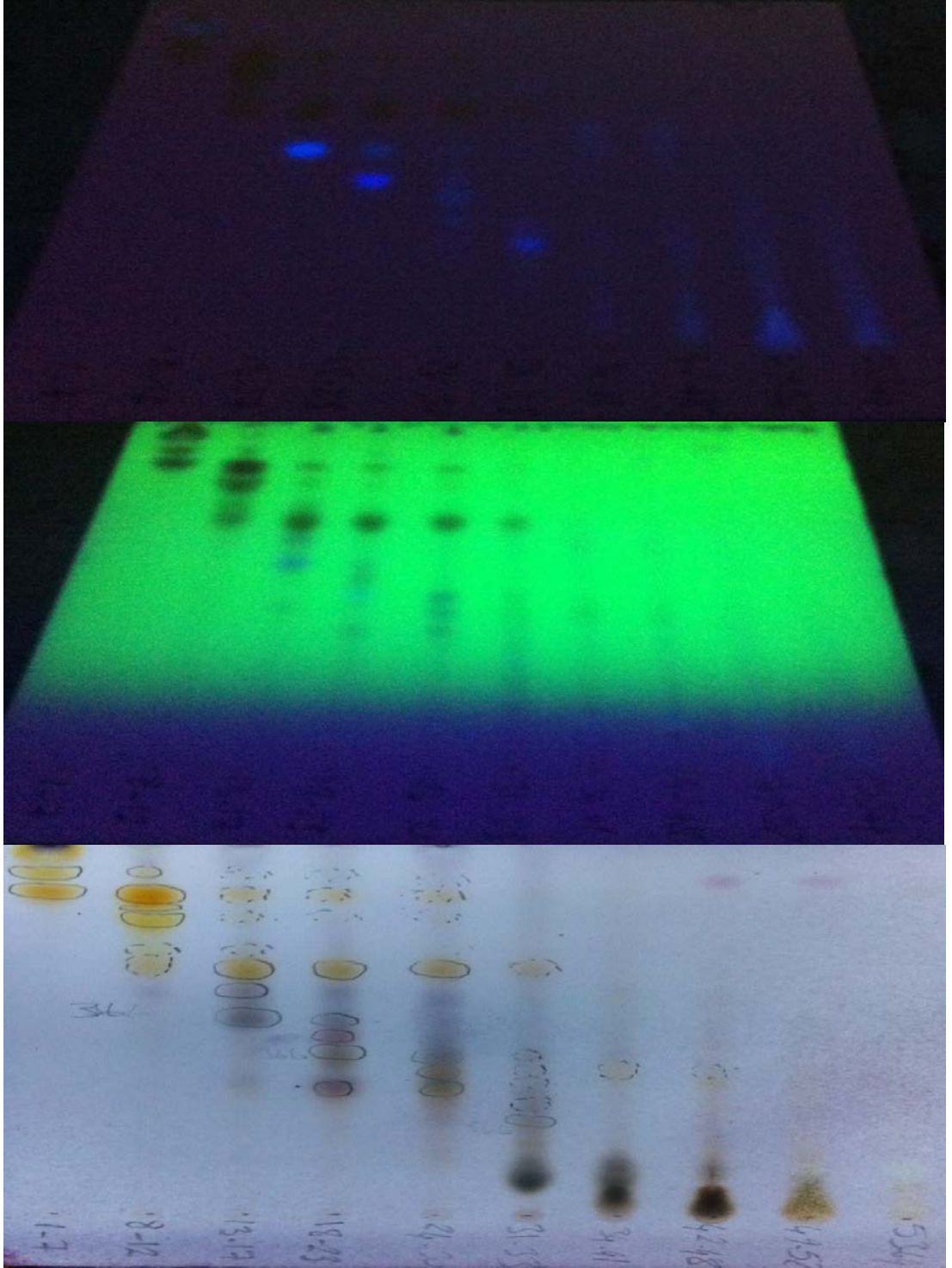


Şekil 3.4. *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen 23.-41. fraksiyonların (yukarıdan aşağıya doğru 366 nm, 254 nm dalga boyu ve Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile muamele edilmiş gün ışığındaki) İTK kromatogramları



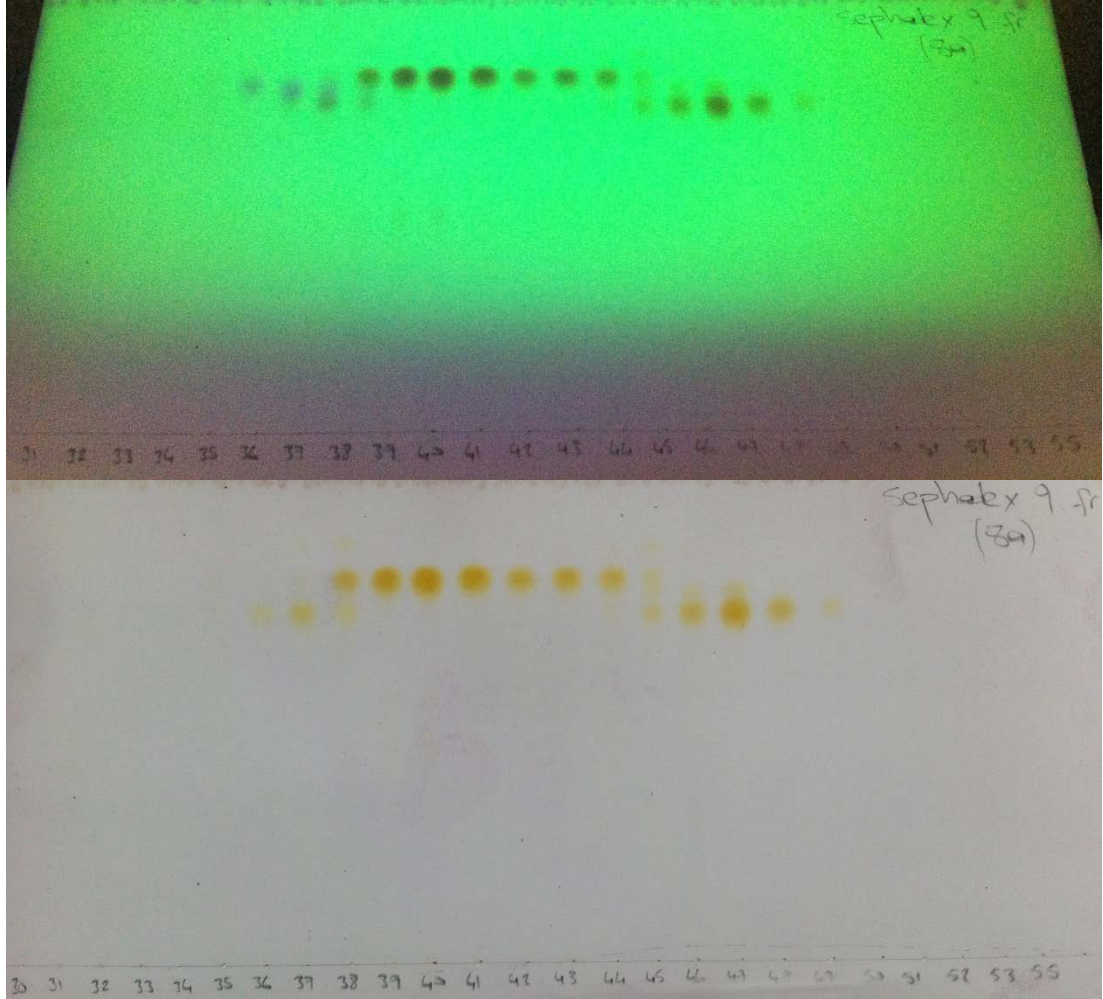
Şekil 3.5. *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen 30.-49. fraksiyonların (yukarıdan aşağıya doğru 254 nm dalga boyu ve Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile muamele edilmiş gün ışığındaki) İTK kromatogramları

Toplanan 64 fraksiyonun İTK ve YPSK profilleri incelenerek aynı bileşikler taşıyan fraksiyonlar biyolojik aktivite çalışmaları için birleştirilmiş ve fraksiyon sayısı azaltılmıştır. Biyolojik aktivite testleri uygulanacak olan birleştirilmiş fraksiyonların İTK profilleri Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6. *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen ve biyolojik aktivite tayini için birleştirilen [1-7]=MEOH-1; [8-12]=MEOH-2; [13-17]=MEOH-3; [18-23]=MEOH-4; [24-30]= MEOH-5; [31-33]=MEOH-6; [(34-41)+(42-48)+(49-52)+(53-64)]=MEOH-7 fraksiyonların (yukarıdan aşağıya doğru 366 nm, 254 nm dalga boyu ve Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile muamele edilmiş gün ışığındaki) İTK kromatogramları

Aktif olduğu tespit edilen MEOH-2 fraksiyonu içinde yer alan 9. fraksiyon sefadeks kolon kromatografisi ile alt fraksiyonlara ayrıldı. Toplanan fraksiyonların ve saflaştırılma aşamasındaki maddelerin İTK profili Şekil 3.7’de verilmiştir. Bu teknikler aynı şekilde 10. ve 11. fraksiyonlara da uygulandı. Bu çalışma sırasında YPSK ile de alt fraksiyonların kontrolü İTK ile paralel olarak yapıldı.



Şekil 3.7. *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen 9. fraksiyonun sefadeks kolon ile alt fraksiyonlarına ayrılarak saf maddelerin eldesini gösteren (yukarıdan aşağıya doğru 254 nm dalga boyu ve Vanilin-H₂SO₄ reaktifi ile muamele edilmiş gün ışığındaki) İTK kromatogramları

3.1.2.2. Kolon Kromatografisi Bulguları

3.1.2.2.1. Açık Kolon Kromatografisi Bulguları

E. characias subsp. *wulfenii* toprak üstü kısımlarından oda sıcaklığında hazırlanan metanollü aktif ekstrenin kolon kromatografisi ile fraksiyonlara ayrılması işlemiyle elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü oranları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

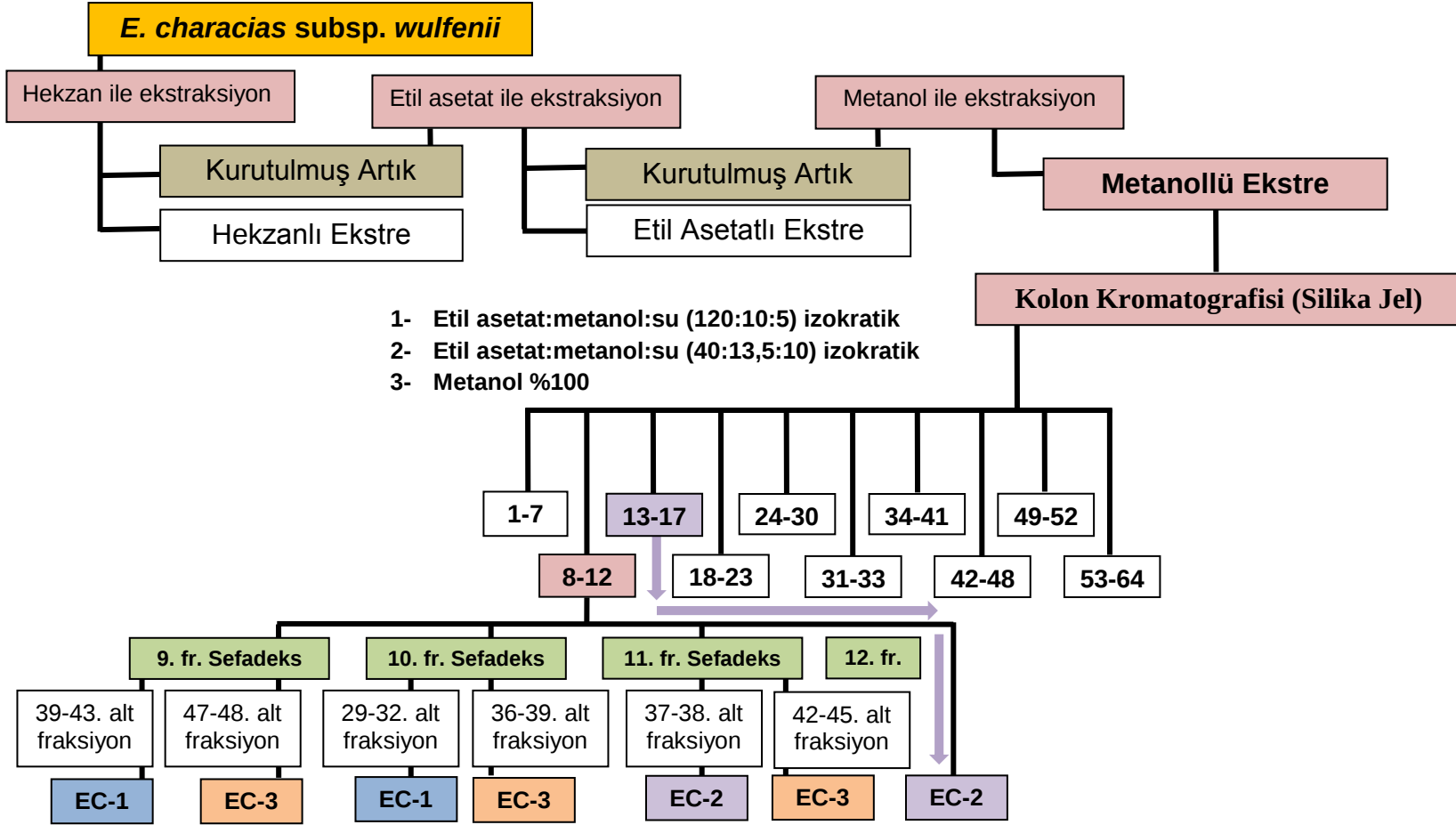
Çizelge 3.2. Kolon kromatografisinde elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü oranları

Fraksiyon	Çözücü Oranları
1-7 (MEOH-1)	Etil asetat:metanol:su (120:10:5)
8-12 (MEOH-2)	Etil asetat:metanol:su (120:10:5)
13-17 (MEOH-3)	Etil asetat:metanol:su (120:10:5)
18-23 (MEOH-4)	Etil asetat:metanol:su (120:10:5)
24-30 (MEOH-5)	Etil asetat:metanol:su (40:13,5:10)
31-33 (MEOH-6)	Etil asetat:metanol:su (40:13,5:10)
34-41 (MEOH-7)	Etil asetat:metanol:su (40:13,5:10)
42-48 (MEOH-7)	45. fraksiyondan sonra metanol
49-52 (MEOH-7)	Metanol
53-64 (MEOH-7)	Metanol

Aynı ya da benzer maddeleri içerenler fraksiyonlardan belirli miktarlar, İTK ve YPSK kromatogramları doğrultusunda biyolojik aktivite testleri için birleştirildi. Birleştirilen 64 fraksiyon, MEOH kodları ile başlayan 7 fraksiyona indirgenmiş oldu. Bu 7 fraksiyona biyolojik olarak aktif olan fraksiyonun tespiti için aktivite testleri uygulandı ve aktif olduğu tespit edilen MEOH-2 fraksiyonu ile izolasyon ve saflaştırma çalışmalarına devam edildi. MEOH-2 fraksiyonu kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardan 8., 9., 10., 11. ve 12. fraksiyonları içermektedir (Çizelge 3.2).

İzolasyon çalışmalarında fraksiyonlardaki maddelerin daha temiz kalabilmesi ve sonraki veya önceki fraksiyondaki diğer maddelerle kirlenmemesi için izolasyon çalışmaları 8., 9., 10., 11. ve 12. fraksiyonlarda ayrı ayrı yürütüldü.

Toplanan fraksiyonların birleştirilmesinden sonra elde edilen fraksiyonlar, bu fraksiyonlardan izole edilen maddeler ve izolasyon şeması Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.8. *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinden izole edilen bileşikler ve izolasyon şeması

Yapılan İTK ve YPSK analizleri doğrultusunda birinci kolondan toplanan ve biyolojik olarak aktif MEOH-2 fraksiyonu içinde yer alan 12. fraksiyondaki EC-2 kodlu maddenin, takip eden 13., 14., 15., 16. ve 17. fraksiyonlarda da bulunduğu tespit edildi. 12. fraksiyona göre EC-2'yi çok daha fazla miktarda içeren bu fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyondan çözücünün yavaş yavaş uzaklaştırılmasıyla ortamdaki konsantrasyonu artan madde çöktürüldü, süzülerek alındı ve aseton ile yıkanarak saf halde izole edildi (EC-2).

3.1.2.2.2. Sefadeks Kolon Kromatografisi Bulguları

Birinci kolondan alınan 9. fraksiyonun (352 mg) sefadeks kolon ile toplanan alt fraksiyonlarının İTK ve YPSK ile analizleri yapılarak izole edilecek bileşikler takip edildi. Birbirinden ayrılmış ve saf halde kalan, İTK ve YPSK profilleri aynı olan (aynı R_f -retansiyon faktörü ve aynı R_t 'ye-retansiyon zamanına sahip) maddelerin olduğu 39.-43. fraksiyonlar birleştirildi ve çözücünün uzaklaştırılmasıyla EC-1 kodlu saf madde; 47. ve 48. fraksiyonların birleştirilip, çözücünün uzaklaştırılmasıyla da EC-3 kodlu saf madde izole edildi.

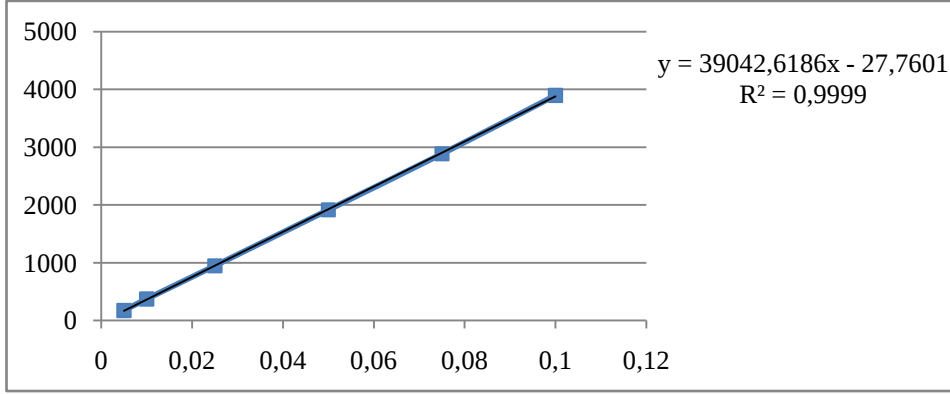
Birinci kolondan alınan 10. fraksiyonun (284,4 mg) sefadeks kolon ile toplanan alt fraksiyonlarının İTK ve YPSK ile analizleri yapılarak izole edilecek bileşikler takip edildi. Birbirinden ayrılmış ve saf halde kalan, İTK ve YPSK profilleri aynı olan (aynı R_f ve aynı R_t 'ye sahip) maddelerin olduğu 29.-32. fraksiyonlar birleştirildi ve çözücünün uzaklaştırılmasıyla EC-1 kodlu saf madde; 36.-39. fraksiyonların birleştirilip, çözücünün uzaklaştırılmasıyla da EC-3 kodlu saf madde izole edildi.

Birinci kolondan alınan 11. fraksiyonun (176,9 mg) sefadeks kolon ile toplanan alt fraksiyonlarının İTK ve YPSK ile analizleri yapılarak izole edilecek bileşikler takip edildi. Birbirinden ayrılmış ve saf halde kalan, İTK ve YPSK profilleri aynı olan (aynı R_f ve R_t 'ye sahip) maddelerin olduğu 37. ve 38. fraksiyonlar birleştirildi ve çözücünün uzaklaştırılmasıyla EC-2 kodlu saf madde; 42.-45. fraksiyonların birleştirilip, çözücünün uzaklaştırılmasıyla da EC-3 kodlu saf madde izole edildi.

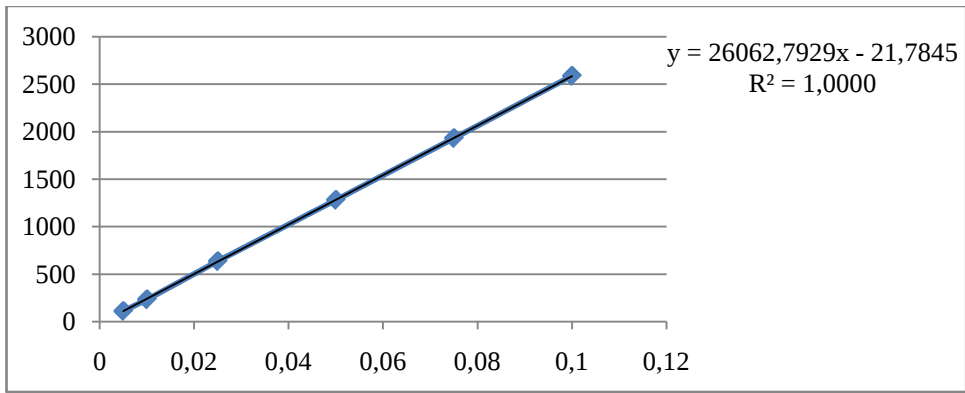
3.1.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Çalışmalarına Ait Bulgular

3.1.2.3.1. Standart Çözeltilerin ve Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması ile İlgili Bulgular

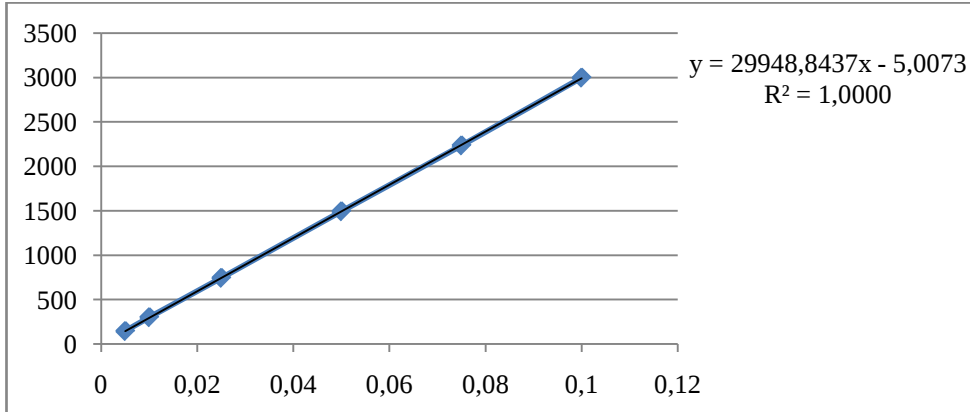
EC-1, EC-2 ve EC-3 kodlu saf maddeler kalitatif ve kantitatif analizlerde standart madde olarak kullanıldı. Her bir maddeden hareketle stok çözeltiler Bölüm 2.2.1.2.3.1’de anlatıldığı şekilde 0,1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Stok çözeltilerden hareketle 0,005 mg/mL, 0,010 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,050 mg/mL, 0,075 mg/mL konsantrasyonlarda 5 dilüsyon hazırlandı. En konsantre olan stok çözelti ile birlikte toplam 6 dilüsyondan hareketle kalibrasyon eğrisi çizebilmek için analizler gerçekleştirildi. Her bir konsantrasyondan 10 µL hacimde 3’er defa enjeksiyon yapıldı ve analizler sonunda saf madde piklerinin altında kalan alanların ortalaması konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği ve denklemi oluşturuldu. Kalibrasyon aralığının belirlenmesinde maddelerin bitkisel materyaldeki konsantrasyonları dikkate alındı. EC-1, EC-2 ve EC-3 için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemler Şekil 3.9-3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.9. EC-1 bileşiği için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemi



Şekil 3.10. EC-2 bileşiği için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemi



Şekil 3.11. EC-3 bileşiği için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemi

3.1.2.3.2. Numune Çözeltilerin Hazırlanması ve Miktar Tayini ile İlgili Bulgular

E. characias subsp. *wulfenii*'nin kurutulmuş toprak üstü kısımlarından 500 mg/100 mL konsantrasyonda numune çözeltisi Bölüm 2.2.1.2.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanarak 0,45 mm'lik filtrelerden geçirilip sterilize edildi ve 10 µL hacimde 3'er defa enjeksiyon yapıldı.

Bitkisel materyale ait kromatogramda bulunan izole edilmiş saf maddelere ait piklerin pik alanları, kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak, bileşiklerin konsantrasyonları hesaplandı ve mg/mL olarak bulunan değerler seyreltme faktörleriyle çarpılarak 500 mg'daki madde miktarları mg olarak hesaplandı. Yüzde hesabı yapılarak 100 mg'daki madde miktarı mg olarak bulundu, yani % miktarlar hesaplanmış oldu (Çizelge 3.3). Hesaplamalara ait örnek aşağıda verilmiş olup ,diğer maddeler için de hesaplama aynı şekilde yapılmıştır.

***E. characias* subsp. *wulfenii*'de EC-1 miktar tayinine ait örnek hesaplama:**

EC-1 için kalibrasyon denklemi:

$$y = 39042,6186x - 27,7601; \text{ pik alanı: } 2361,3 \text{ mAU}$$

$$2361,3 = 39042,6186x - 27,7601$$

$$x = 0,061191 \text{ mg/mL}$$

Bitkisel materyalin konsantrasyonu 500 mg/100 mL'dir.

500 mg bitkideki EC-1 miktarını bulabilmek için 0,061191 mg/mL, seyreltme faktörüyle (100) çarpıldı.

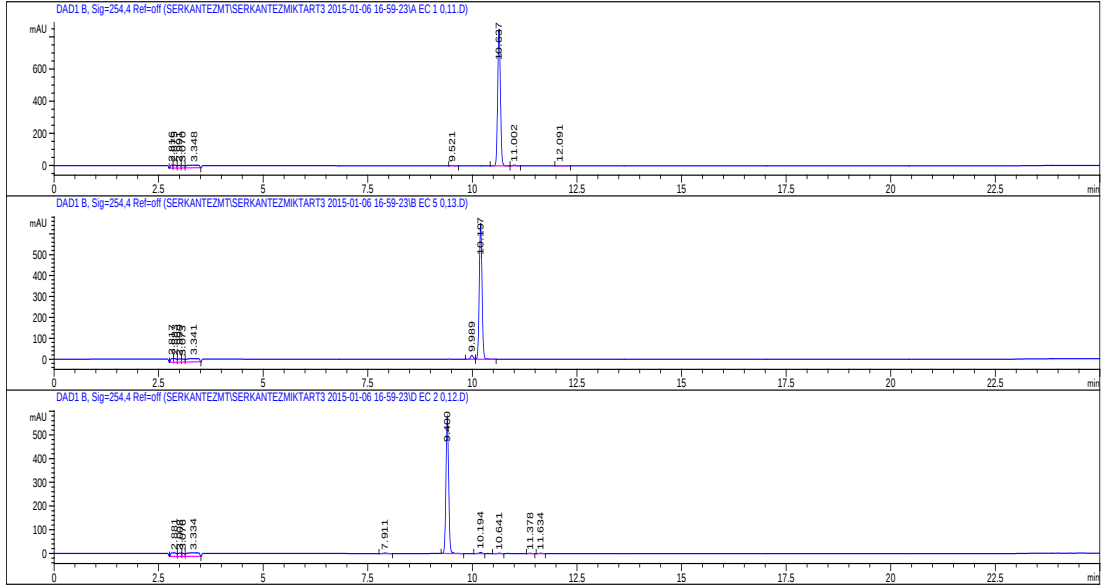
$$0,061191 \text{ mg/mL} \times 100 \text{ mL} = 6,1191 \text{ mg (500 mg'daki madde miktarı)}$$

$$6,1191/5 = 1,2238 \text{ mg (100 mg'daki madde miktarı)}$$

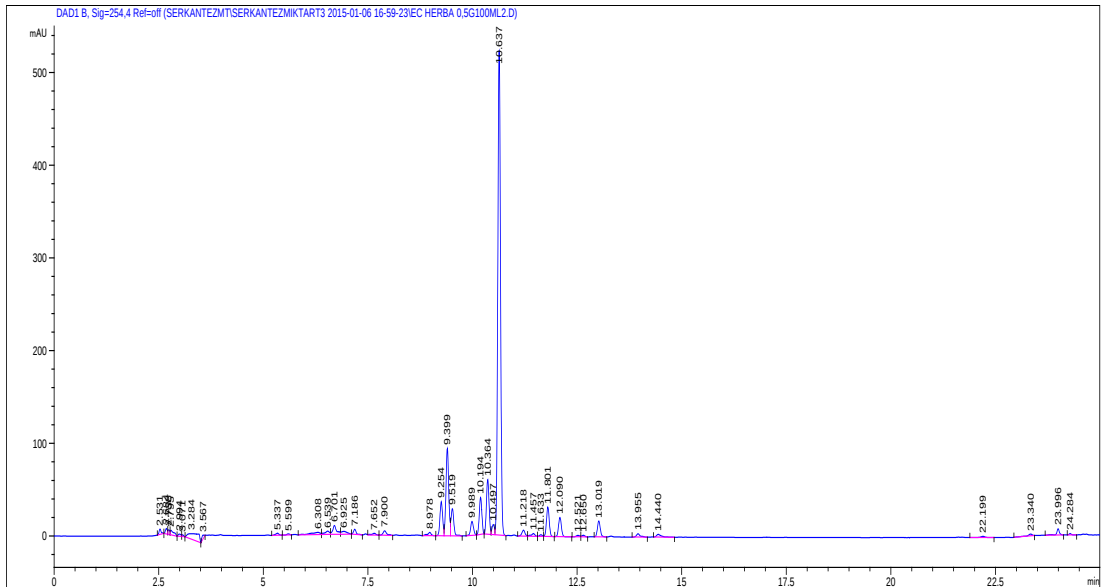
Çizelge 3.3. *E. characias* subsp. *wulfenii*'deki EC-1, EC-2 ve EC-3 miktarları

Saf Madde	500 mg/100 mL ± SS	%'de Miktar ± SS	Retansiyon Zamanı (dak)
EC-1	6,1191 ± 0,0388	1,2238 ± 0,0077	10,637
EC-2	1,7628 ± 0,0406	0,3525 ± 0,0081	10,194
EC-3	0,5972 ± 0,0119	0,1194 ± 0,0023	9,399

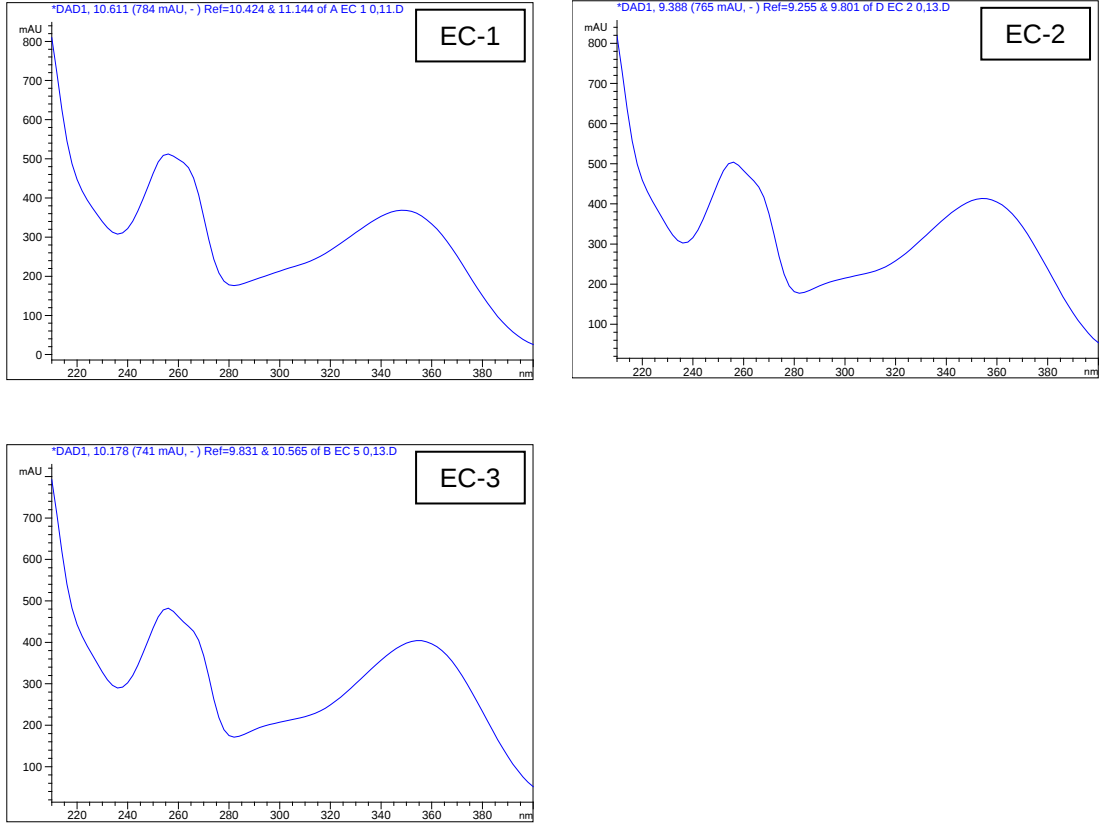
Saf maddelerin ve *E. characias* subsp. *wulfenii*'nin kurutulmuş toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrenin YPSK kromatogramları ile saf maddelerin 254 nm dalga boyundaki UV spektrumları sırasıyla Şekil 3.12-3.14'te verilmiştir.



Şekil 3.12. İzole edilen saf maddelerin YPSK kromatogramı (yukarıdan aşağıya doğru EC-1, EC-3, EC-2)



Şekil 3.13. *E. characias* subsp. *wulfenii* total ekstresinin YPSK kromatogramı



Şekil 3.14. İzole edilen saf maddelerin 254 nm dalga boyundaki UV spektrumları

3.2. Analitik Yöntemin Validasyonuna Ait Bulgular

Analitik yöntem validasyonuna ait doğrusallık, kesinlik ve teşhis sınırı ile tayin sınırı parametrelerine ait bulgular Çizelge 3.4’te verilmiştir.

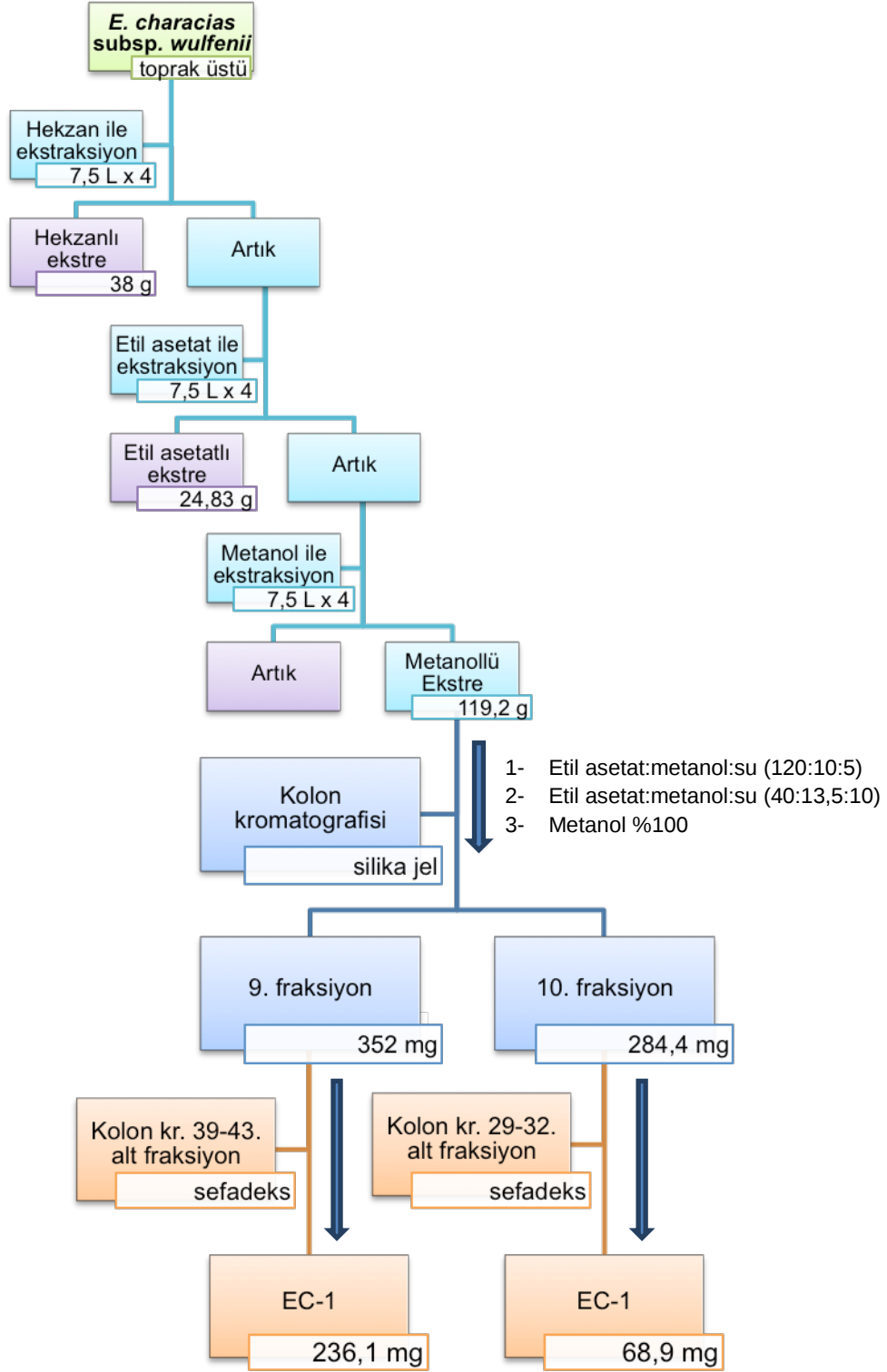
Çizelge 3.4. Analitik yöntem validasyonuna ait bulgular

İzole Edilen Madde	Kalibrasyon Denklemi	r^2	LOD $\mu\text{g/mL}$	LOQ $\mu\text{g/mL}$	%BSS
EC-1	$y=39042,6186x - 27,7601$	0,9999	0,1243	0,4146	0,6750
EC-2	$y=26062,7929x - 21,7845$	1,0000	0,1983	0,6611	0,5190
EC-3	$y=29948,8437x - 5,0073$	1,0000	0,1736	0,5787	1,1695

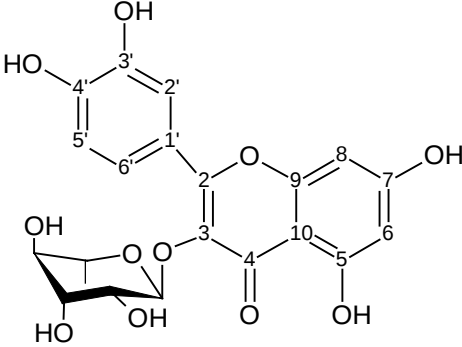
* %BSS (Bağıl Standart Sapma)= (Standart Sapma/Ortalama) X 100

3.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini Bulguları

3.3.1. EC-1 Bileşiğinin Yapı Tayini ile İlgili Bulgular



Şekil 3.15. EC-1 bileşiğinin izolasyon şeması

	
Molekül Adı	Kersetin-3-O-ramnozid (kersitrin)
Molekül Ağırlığı	449,49 [M+H] ⁺
Molekül Formülü	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Özelliği	Sarı renkte amorf toz

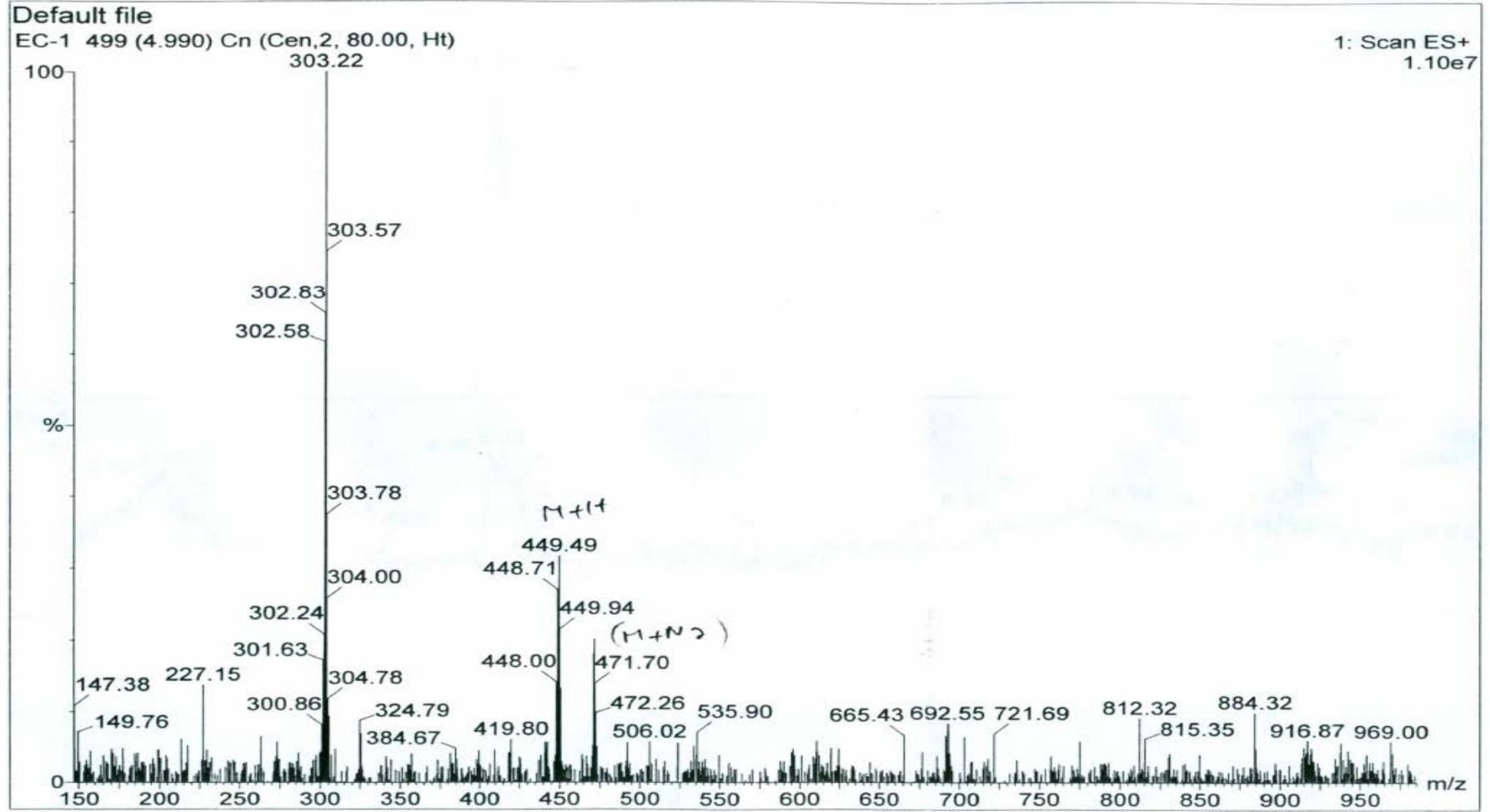
Şekil 3.16. EC-1 bileşiğinin yapı tayini bulguları

Kütle spektrumu (Şekil 3.17) ve NMR spektrumlarının (Şekil 3.18-3.25) çözümlenmesi ile elde edilen bulgular Şekil 3.16 ve Çizelge 3.5'te gösterilmektedir.

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

Kimyasal Kayma	Proton	C	δ (ppm)
-	-	-	-
-	-	C-2	156.46
-	-	C-3	134.22
-	-	C-4	177.76
-	-	C-5	161.30
6.21 (1H, d, J=2.4 Hz)	H-6	C-6	98.70
-	-	C-7	164.19
6.39 (1H, d, J=2.0 Hz)	H-8	C-8	93.64
-	-	C-9	157.32
-	-	C-10	104.09
-	H-1'	C-1'	120.73
7.30 (1H, d, J=2.4 Hz)	H-2'	C-2'	115.47
-	H-3'	C-3'	145.21
-	H-4'	C-4'	148.45
6.87 (1H, d, J=8.0 Hz)	H-5'	C-5'	115.66
7.25 (1H, dd, J=2.4, 8.0 Hz)	H-6'	C-6'	121.13
5.25 (1H, d, J=1.2 Hz)	H-1''	C-1''	101.84
3.50 (1H, m)	H-2''	C-2''	70.36
3.16 (1H, m)	H-3''	C-3''	70.59
3.24 (1H, m)	H-4''	C-4''	71.18
3.97 (1H, brs)	H-5''	C-5''	70.06
0.82 (3H, d, J=6.0 Hz)	H-6''	C-6''	17.50

Çizelge 3.5'te görüldüğü gibi, EC-1 kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde δ 6.21 (1H, d, $J=2.4$ Hz) ve δ 6.39 (1H, d, $J=2.0$ Hz) ppm'lerde gözlenen sinyaller birbirine göre meta pozisyonda yer alan iki protonu işaret etmektedir. δ 7.30 (1H, d, $J=2.4$ Hz), δ 6.87 (1H, d, $J=8.0$ Hz) ve δ 7.25 (1H, dd, $J=2.4, 8.0$ Hz) ppm'lerde gözlenen sinyaller ise trisüstitüe benzen halkasını işaret etmektedir. ^{13}C -NMR spektrumunda 21 karbon atomuna ait sinyal gözlenmiştir. DEPT spektrumuna göre ise 1 metil, 10 metin ve 10 kuaterner karbon atomunun varlığı tespit edilmiştir. δ 177.76 ppm'de gözlenen kuaterner karbon atomuna ait sinyal karbonil grubunun varlığını (C-4) işaret etmektedir. Bu veriler EC-1 kodlu bileşiğin kersetin türevi olduğunu ortaya koymaktadır. ^1H -NMR spektrumunda δ 12.66 ppm'de gözlenen singlet karakteristik olarak 5. konumda yer alan -OH grubunu işaret etmektedir. ^1H -NMR spektrumunda anomerik protona ait olan δ 5.25 ppm'de gözlenen dublet ($J=1.2$ Hz) α pozisyonundan bağlı bir ozon varlığını düşündürmektedir. ^1H -NMR spektrumunda δ 0.82 ppm'de gözlenen dublet ($J=6.0$ Hz, 3H) ve ^{13}C -NMR spektrumunda δ 17.50 ppm'de gözlenen karbon atomuna ait sinyal metil grubunun varlığını göstermektedir. Bu veriler ile diğer ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR verileri ozon ramnoz olduğunu göstermektedir. HMBC spektrumunda δ 5.25 ppm'deki anomerik proton sinyalinin δ 134.22 ppm'deki karbon atomu sinyali ile etkileşmesi ozon 3. konumdan bağlandığını göstermektedir. Bu bilgiler EC-1 kodlu bileşiğin kersetin-3-O- α -ramnozit olduğunu ortaya koymaktadır. Kütle spektrumu incelendiğinde gözlenen 449,49 $[\text{M}+\text{H}]^+$ moleküler iyon piki bileşiğin kersetin-3-O- α -ramnozit olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca elde edilen veriler literatür bilgileri ile de desteklenmiştir (Aderogba ve ark., 2012 ve Lin ve Lin, 1999).



Şekil 3.17. EC-1 bileşiğinin ES MS spektrumu

EC-1

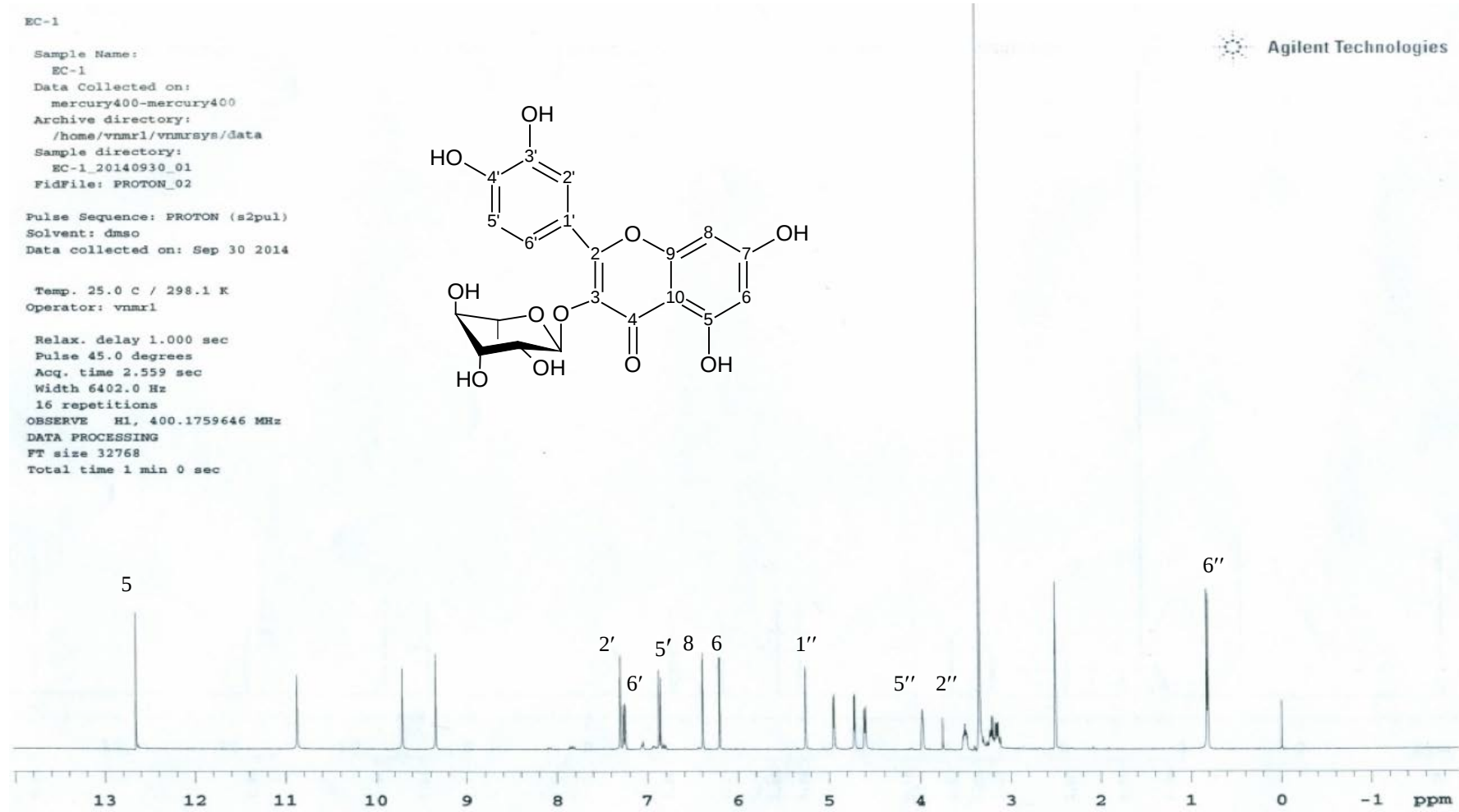
Sample Name:
EC-1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-1_20140930_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Sep 30 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
16 repetitions
OBSERVE HL, 400.1759646 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min 0 sec

Agilent Technologies



Şekil 3.18. EC-1 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

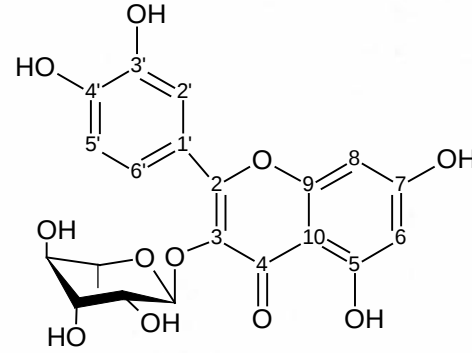
EC-1

Sample Name:
EC-1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-1_20141007_01
FidFile: CARBON_01

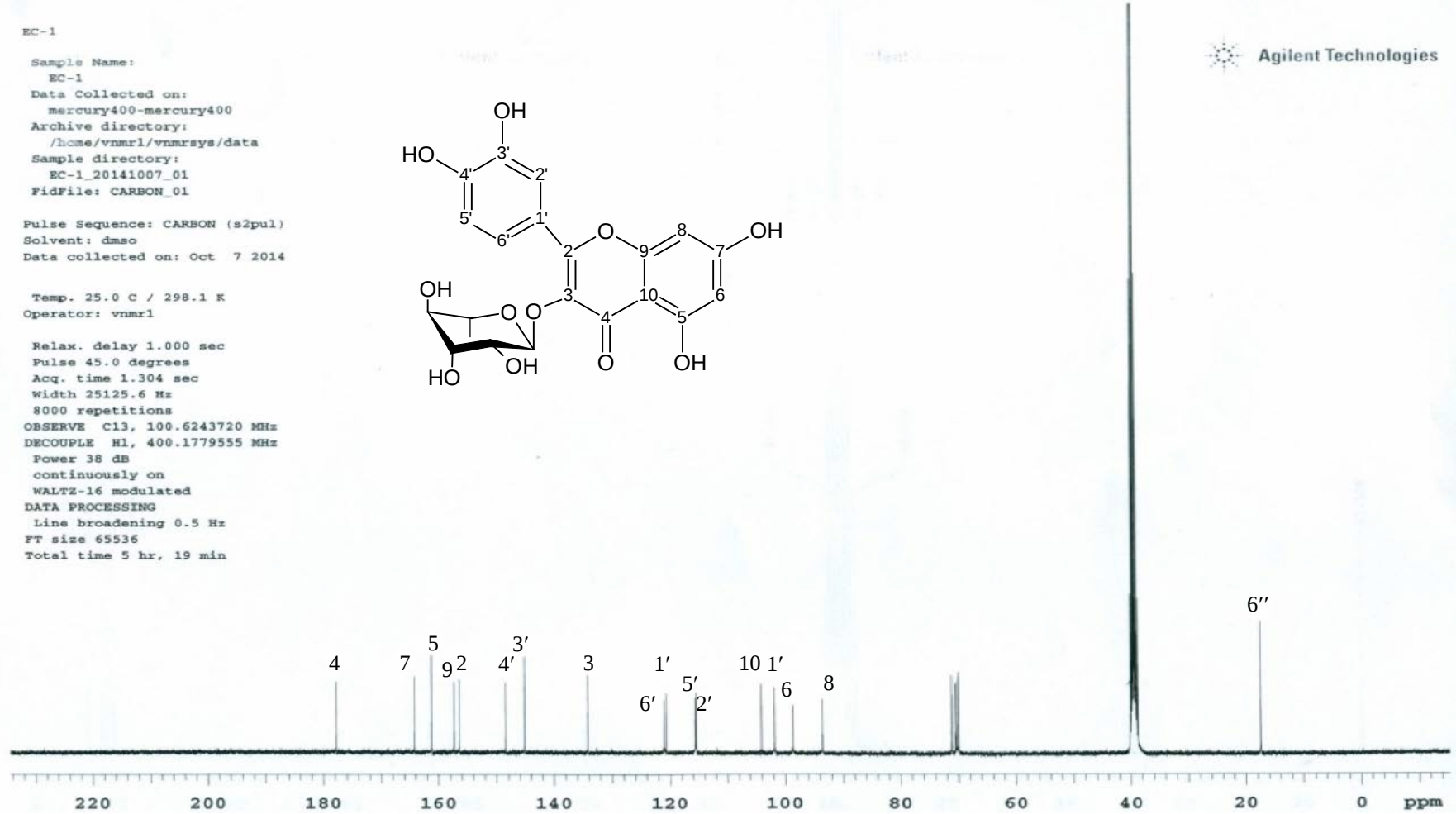
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 7 2014

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
8000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243720 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 5 hr, 19 min



Agilent Technologies



Şekil 3.19. EC-1 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

EC-1

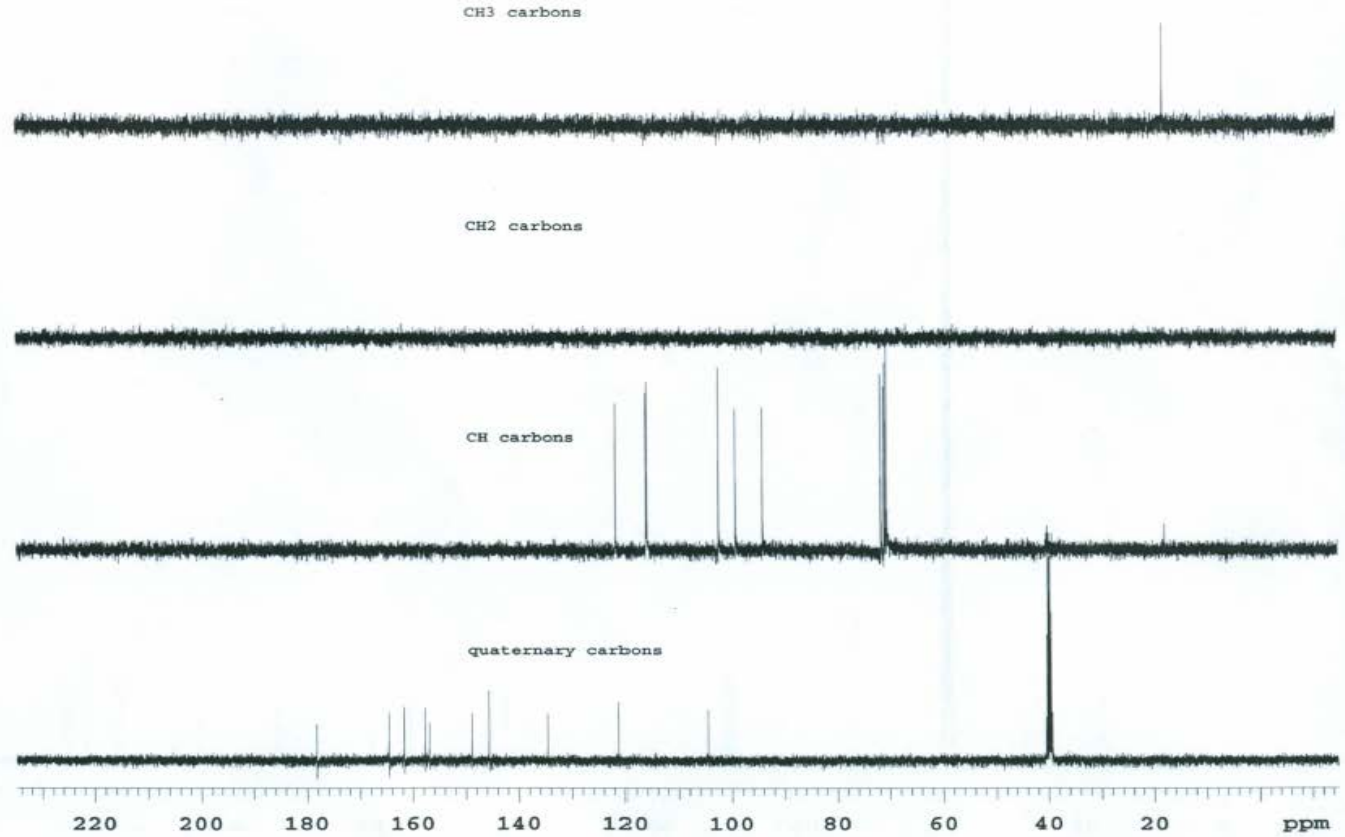
Sample Name:
EC-1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-1_20141007_01
FidFile: DEPT_01

Pulse Sequence: DEPT
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 7 2014

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
256 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 1 hr, 57 min

Agilent Technologies



Şekil 3.20. EC-1 bileşiğinin DEPT spektrumu

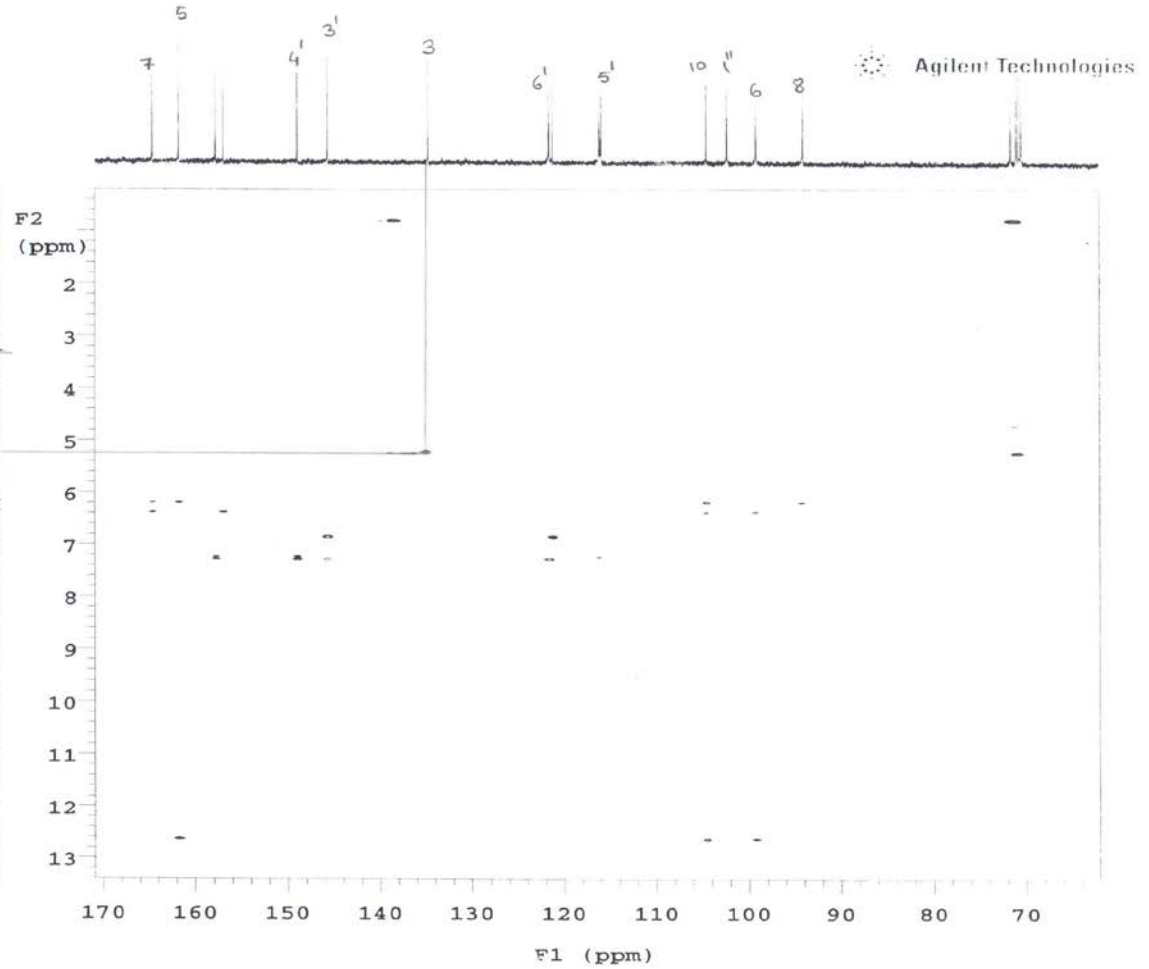
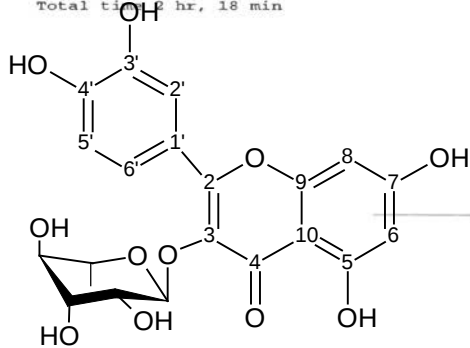
EC-1

Sample Name:
EC-1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-1 20141007 01
FidFile: gHMBC 01

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: dmsd
Data collected on: Oct 8 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 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.008 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 2 hr, 18 min



Şekil 3.21. EC-1 bileşiğinin HMBC spektrumu

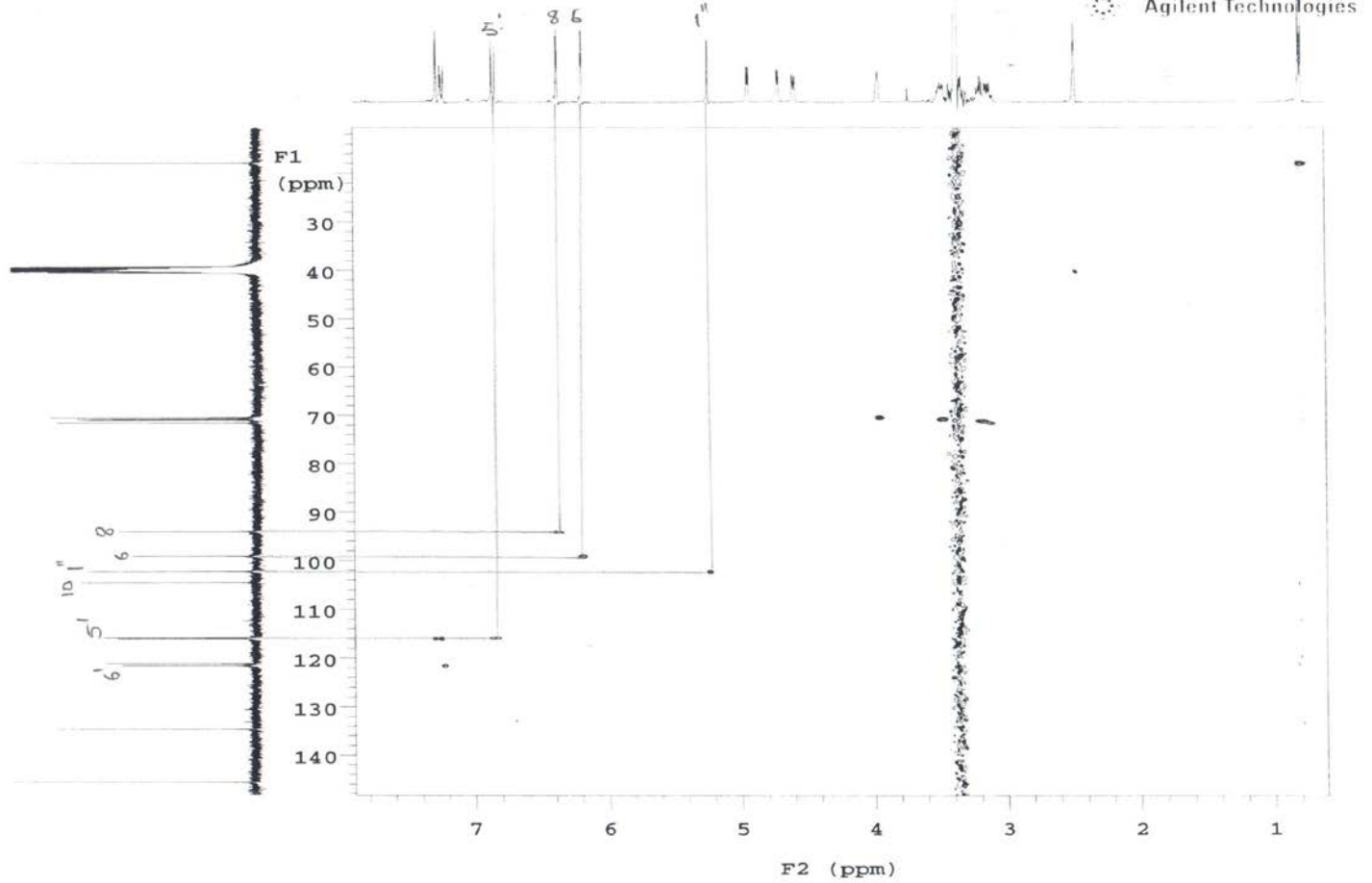
EC-1

Sample Name:
EC-1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-1 20141007 01
FidFile: gHSQC 01

Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: dmsd
Data collected on: Oct 8 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 23141.5 Hz
8 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DECOUPLE C13, 100.6348953 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 0.010 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 27 min



Şekil 3.22. EC-1 bileşiğinin HSQC spektrumu

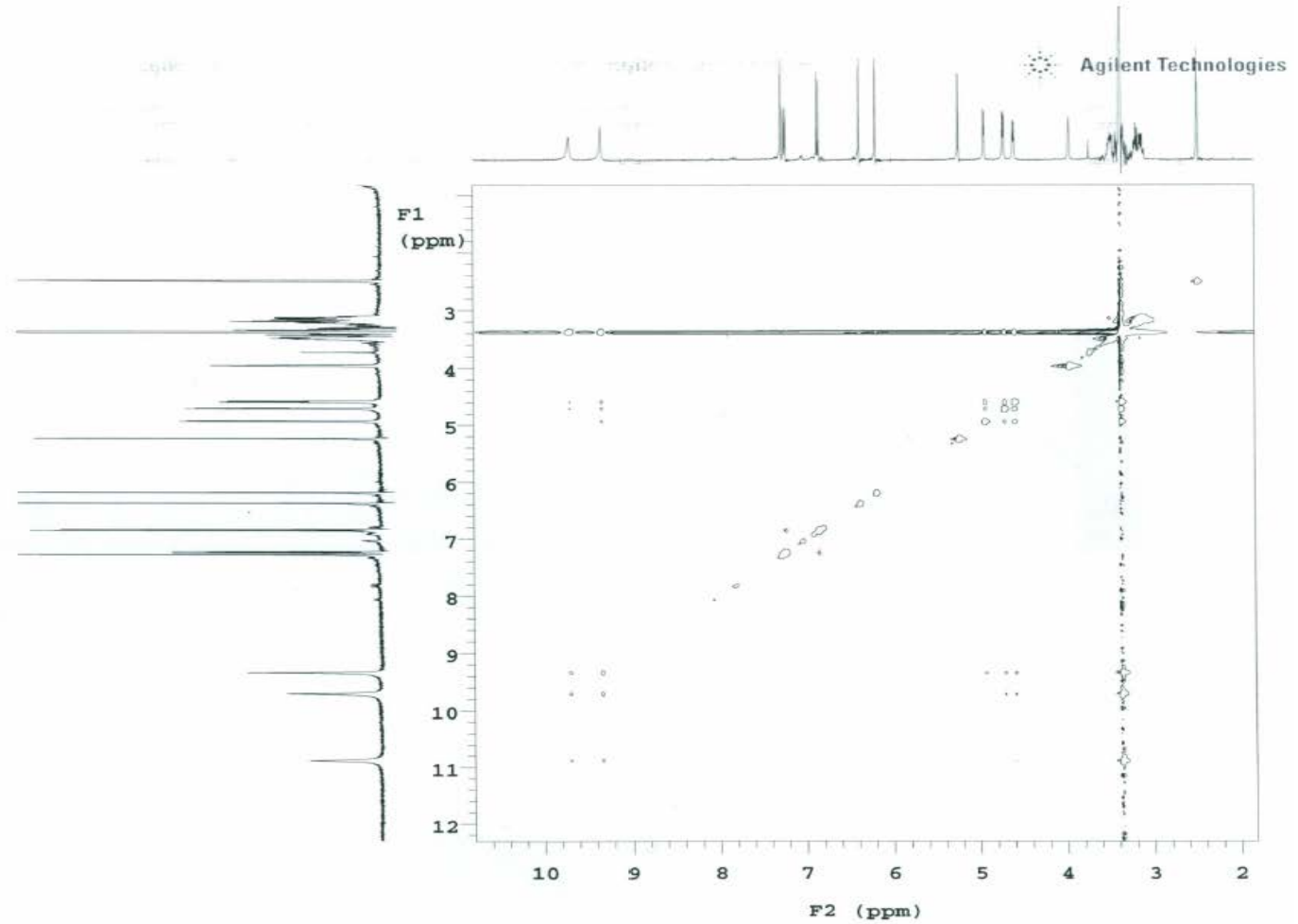
EC-1

Sample Name: EC-1
Data Collected on: mercury400-mercury400
Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: EC-1_20141007_01
FidFile: NOESY_01

Pulse Sequence: NOESY
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 7 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6207.3 Hz
2D width 6207.3 Hz
8 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.030 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 18 min



Şekil 3.23. EC-1 bileşiğinin NOESY spektrumu

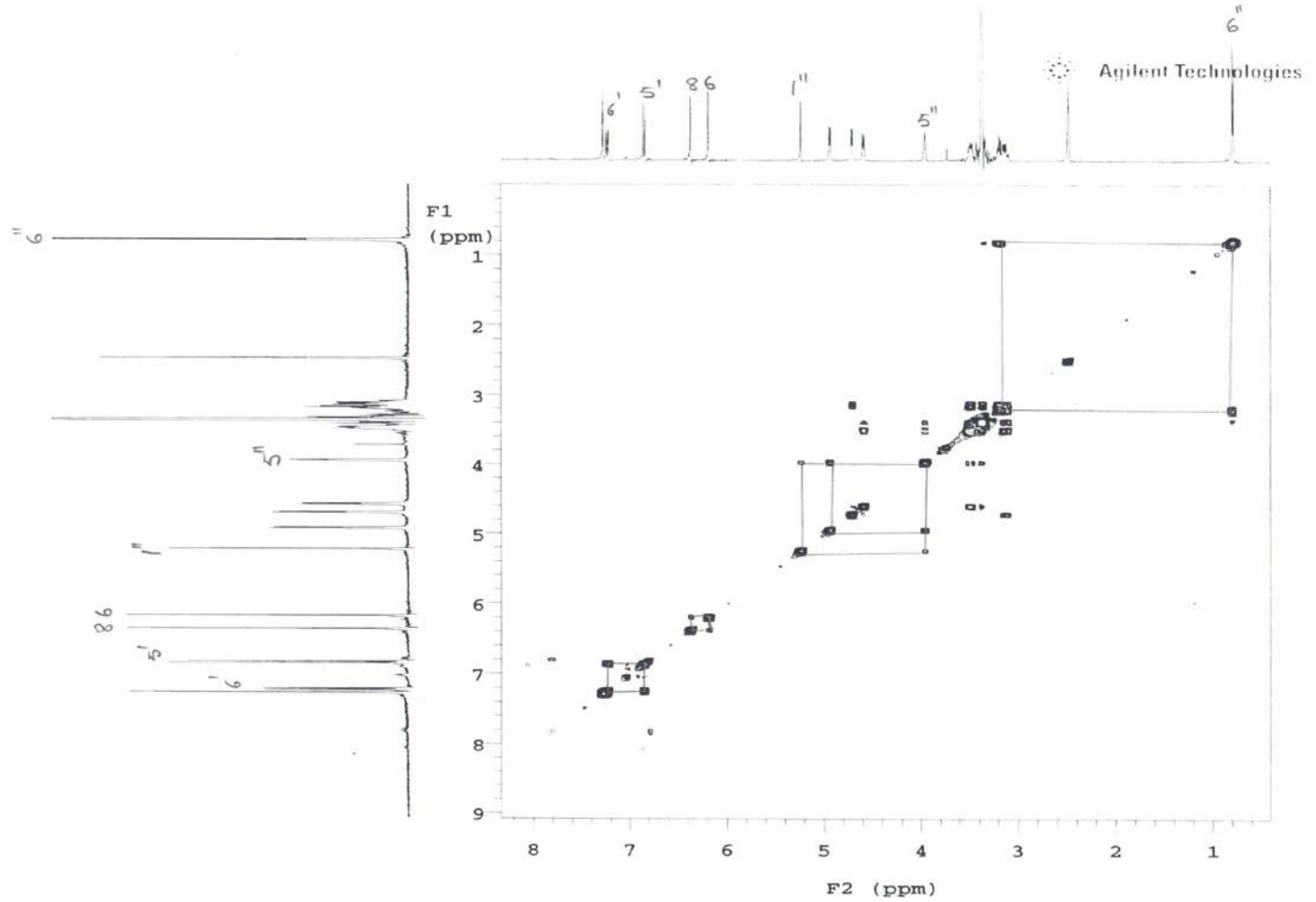
EC-1

Sample Name:
EC-1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-1 20141007 01
FidFile: gCOSY_01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: dmsd
Data collected on: Oct 7 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6207.3 Hz
2D Width 6207.3 Hz
4 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.021 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 12 min



Şekil 3.24. EC-1 bileşiğinin COSY spektrumu

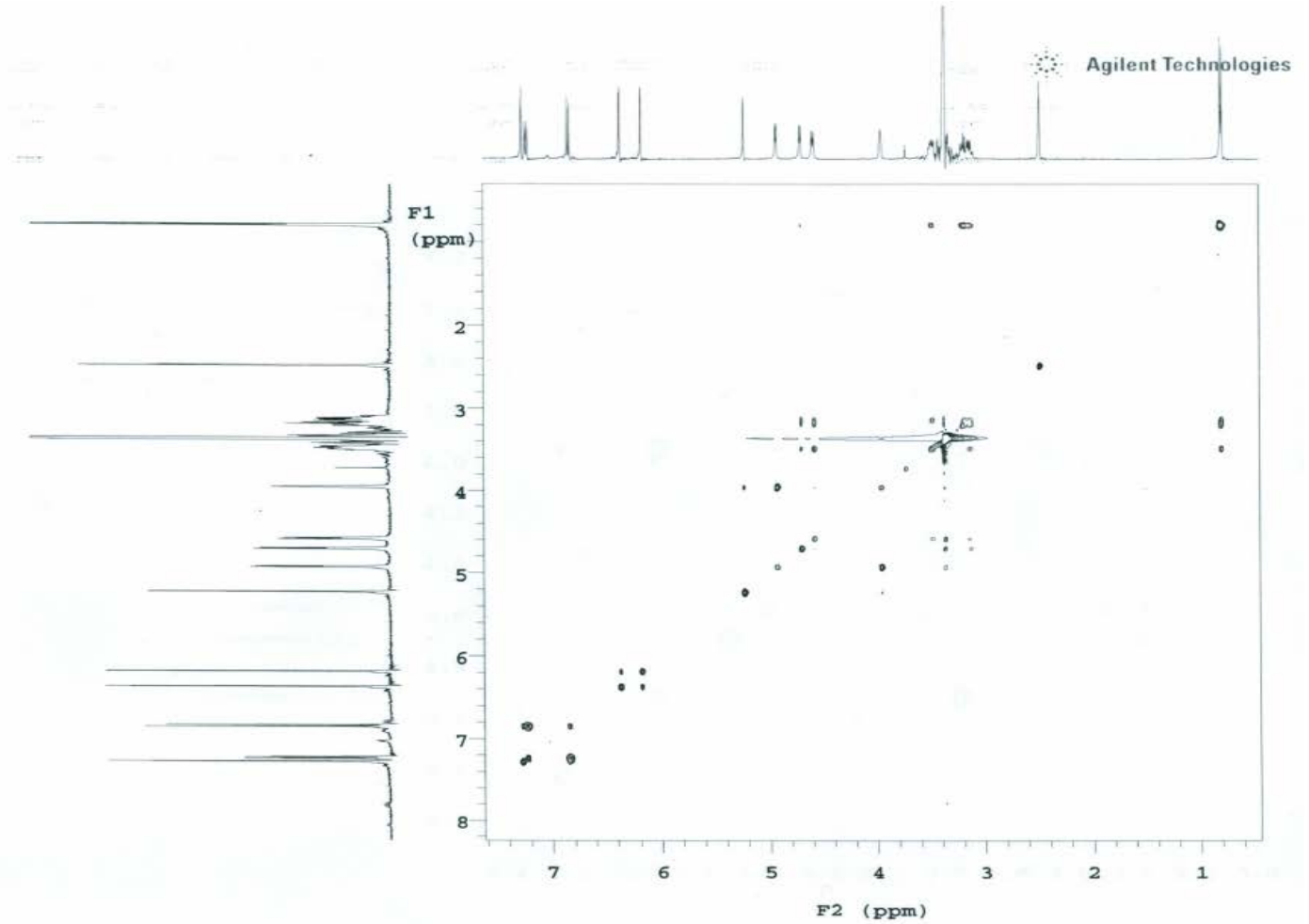
EC-1

Sample Name:
EC-1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-1_20141007_01
FidFile: TOCSY_01

Pulse Sequence: TOCSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 7 2014

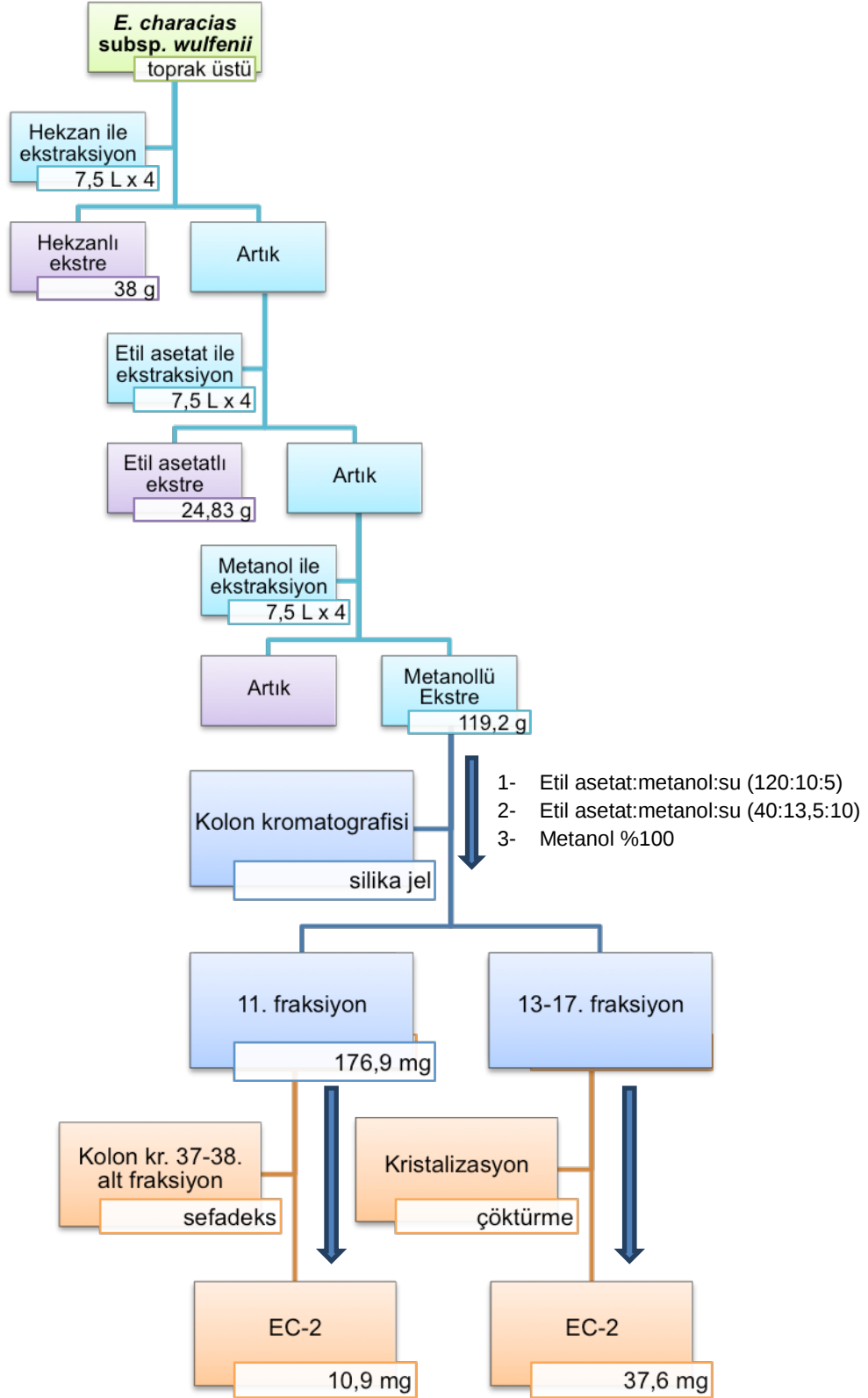
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6207.3 Hz
2D Width 6207.3 Hz
2 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.030 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 20 min

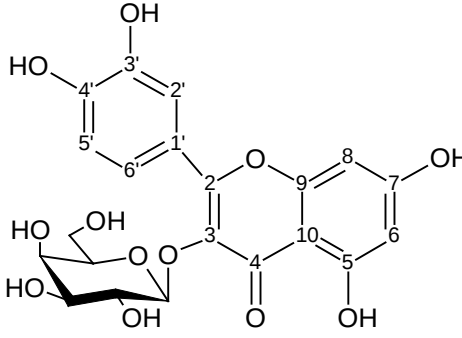


Şekil 3.25. EC-1 bileşiğinin TOCSY spektrumu

3.3.2. EC-2 Bileşiminin Yapı Tayini ile İlgili Bulgular



Şekil 3.26. EC-2 bileşiminin izolasyon şeması

	
Molekül Adı	Kersetin-3-O-galaktozit (hiperozit)
Molekül Ağırlığı	465,39 [M+H] ⁺
Molekül Formülü	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Özellği	Sarı renkte amorf toz

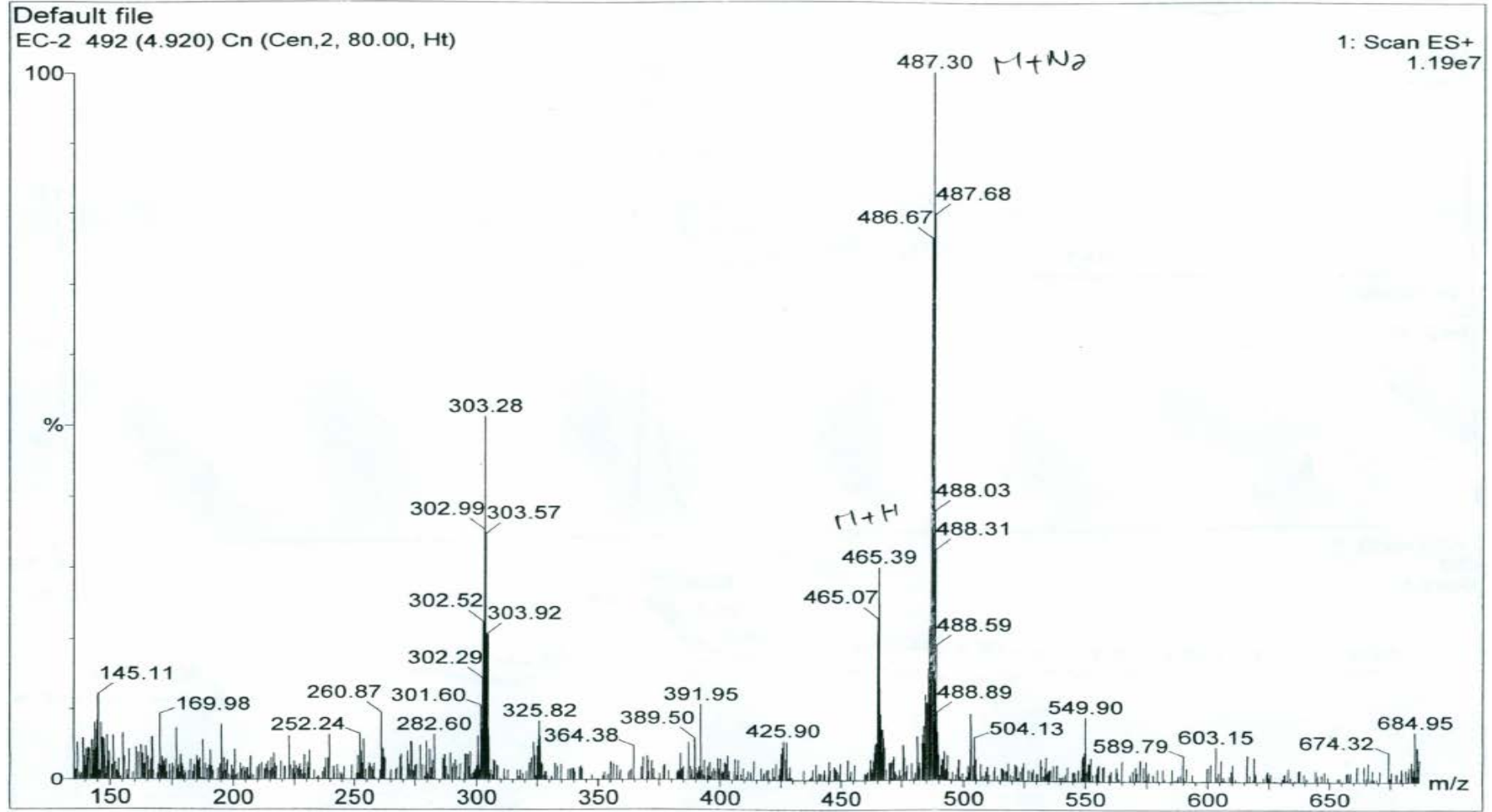
Şekil 3.27. EC-2 bileşiğinin yapı tayini bulguları

Kütle spektrumu (Şekil 3.28) ve NMR spektrumlarının (Şekil 3.29-3.36) çözümlenmesi ile elde edilen bulgular Şekil 3.27 ve Çizelge 3.6’da gösterilmektedir.

Çizelge 3.6. EC-2 bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR bulguları

Kimyasal Kayma	Proton	C	δ (ppm)
-	-	-	-
-	-	C-2	156.63
-	-	C-3	133.90
-	-	C-4	177.89
-	-	C-5	161.65
6.20 (1H, d, J=2.4 Hz)	H-6	C-6	99.16
-	-	C-7	164.80
6.40 (1H, d, J=1.6 Hz)	H-8	C-8	93.96
-	-	C-9	156.75
-	-	C-10	104.27
-	H-1'	C-1'	121.52
7.52 (1H, d, J=2.4 Hz)	H-2'	C-2'	115.62
-	H-3'	C-3'	145.28
-	H-4'	C-4'	148.93
6.81 (1H, d, J=8.4 Hz)	H-5'	C-5'	116.36
7.67 (1H, dd, J=2.4, 8.4 Hz)	H-6'	C-6'	122.42
5.37 (1H, d, J=8.0 Hz)	H-1''	C-1''	102.25
3.56 (1H, t, J=8.4 Hz)	H-2''	C-2''	71.64
3.36 (1H, m)	H-3''	C-3''	73.62
3.65 (1H, d, J=3.2 Hz)	H-4''	C-4''	68.36
3.3 (1H, m)	H-5''	C-5''	76.28
3.24 (1H, m); 3.44 (1H, m)	H-6''	C-6''	60.57

Çizelge 3.6’da görüldüğü gibi, EC-2 kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde EC-1 kodlu bileşiğe çok benzer olduğu gözlenmiştir. ^1H -NMR spektrumunda δ 6.20 (1H, d, $J=2.4$ Hz) ve δ 6.40 (1H, d, $J=1.6$ Hz) ppm’lerde gözlenen sinyaller sırasıyla H-6 ve H-8 konumlarını; δ 7.52 (1H, d, $J=2.4$ Hz), δ 6.81 (1H, d, $J=8.4$ Hz) ve δ 7.67 (1H, dd, $J=2.4, 8.4$ Hz) ppm’lerde gözlenen sinyaller ise H-2’, H-5’ ve H-6’ konumlarını işaret etmektedir. ^{13}C -NMR spektrumunda 21 karbon atomuna ait sinyal gözlenmiştir. DEPT spektrumuna göre ise 1 metilen, 10 metin ve 10 kuaterner karbon atomunun varlığı tespit edilmiştir. δ 177.89 ppm’de gözlenen kuaterner karbon atomuna ait sinyal karbonil grubunun varlığını (C-4) işaret etmektedir. Bu veriler EC-2 kodlu bileşiğin de kersetin türevi olduğunu ortaya koymaktadır. 5-OH grubuna ait olan karakteristik singlet ^1H -NMR spektrumunda δ 12.63 ppm’de gözlenmiştir. ^1H -NMR spektrumunda anomerik protona ait olan δ 5.37 ppm’de gözlenen dublet ($J=8.0$ Hz, 1H) β pozisyonundan bağlı bir ozon varlığını düşündürmektedir. ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR verileri ozon galaktoz olduğunu göstermektedir. HMBC spektrumunda anomerik proton δ 5.37 ppm’deki sinyalin δ 133.90 ppm’deki karbon atomu sinyali ile etkileşmesi ozon 3. konumdan bağlandığını göstermektedir. Bu bilgiler EC-2 kodlu bileşiğin kersetin-3-O- β -galaktozit olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca kütle spektrumu incelendiğinde gözlenen 465,39 $[\text{M}+\text{H}]^+$ moleküler iyon piki ve literatür verileri (Pereira ve ark., 2012) EC-2 kodlu bileşiğin kersetin-3-O- β -galaktozit (hiperozit) olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 3.28. EC-2 bileşiğinin ES MS spektrumu

EC-2

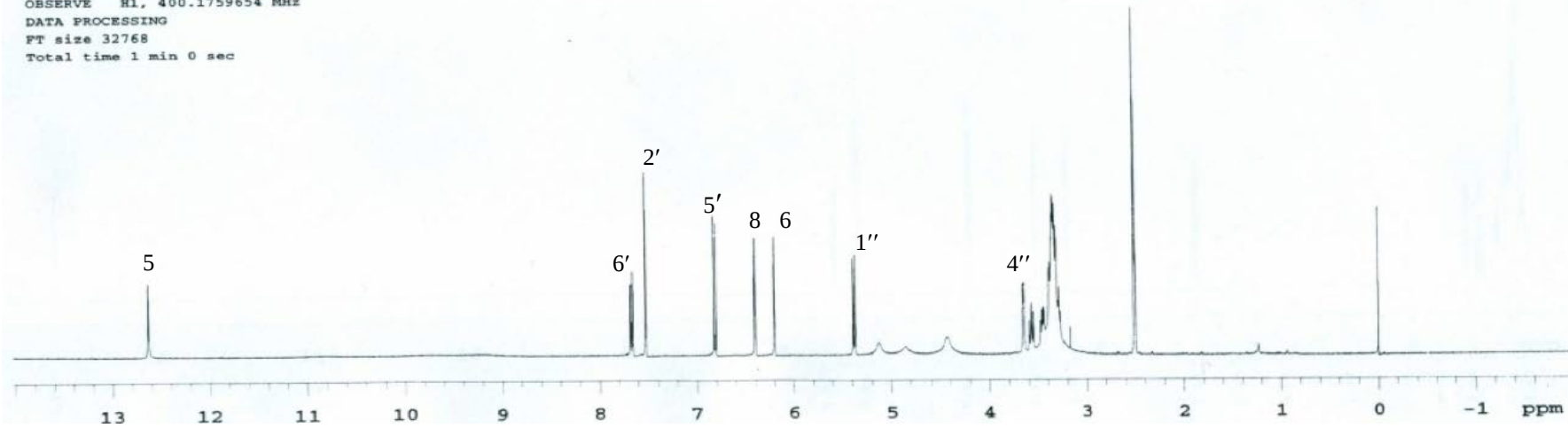
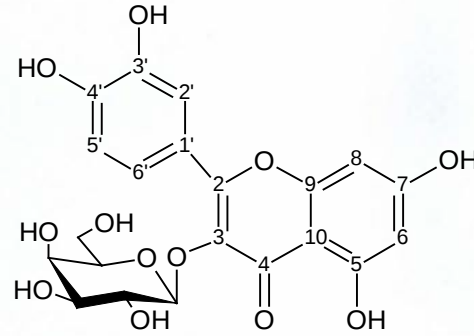
Sample Name:
EC-2
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-2_20140930_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Sep 30 2014

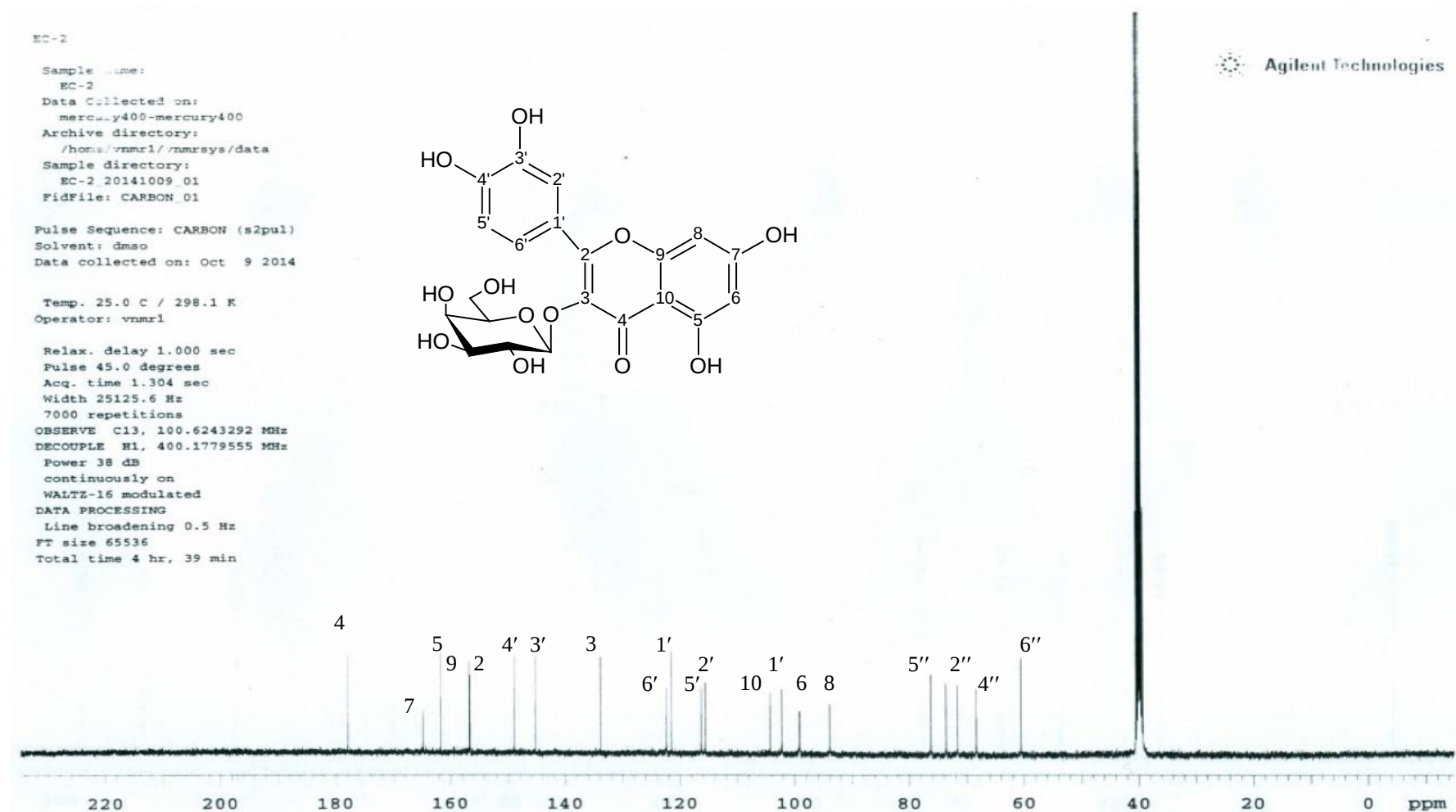
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759654 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min 0 sec

Agilent Technologies



Şekil 3.29. EC-2 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.30. EC-2 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

EC-2

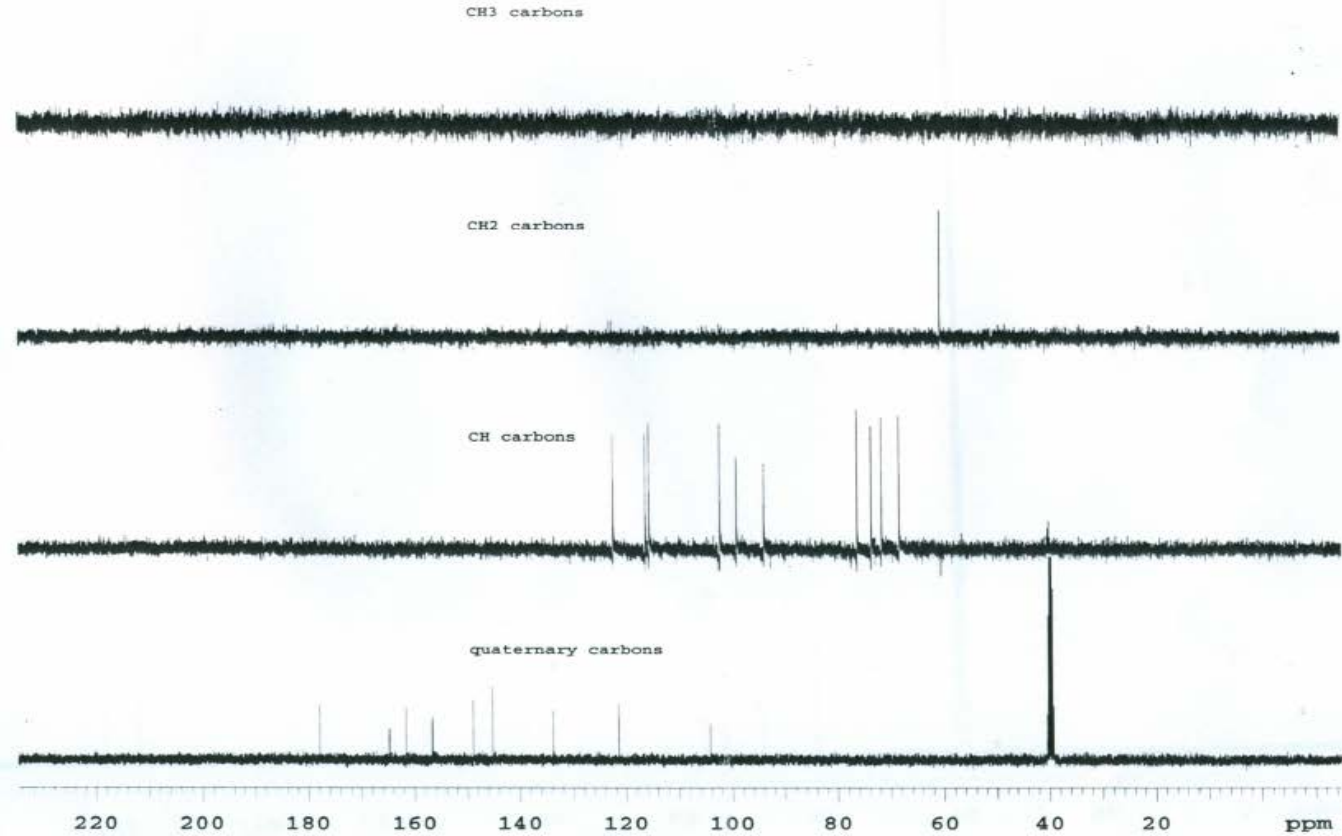
Sample Name:
EC-2
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmr-sys/data
Sample directory:
EC-2 20141009_01
FidFile: DEPT_01

Pulse Sequence: DEPT
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 9 2014

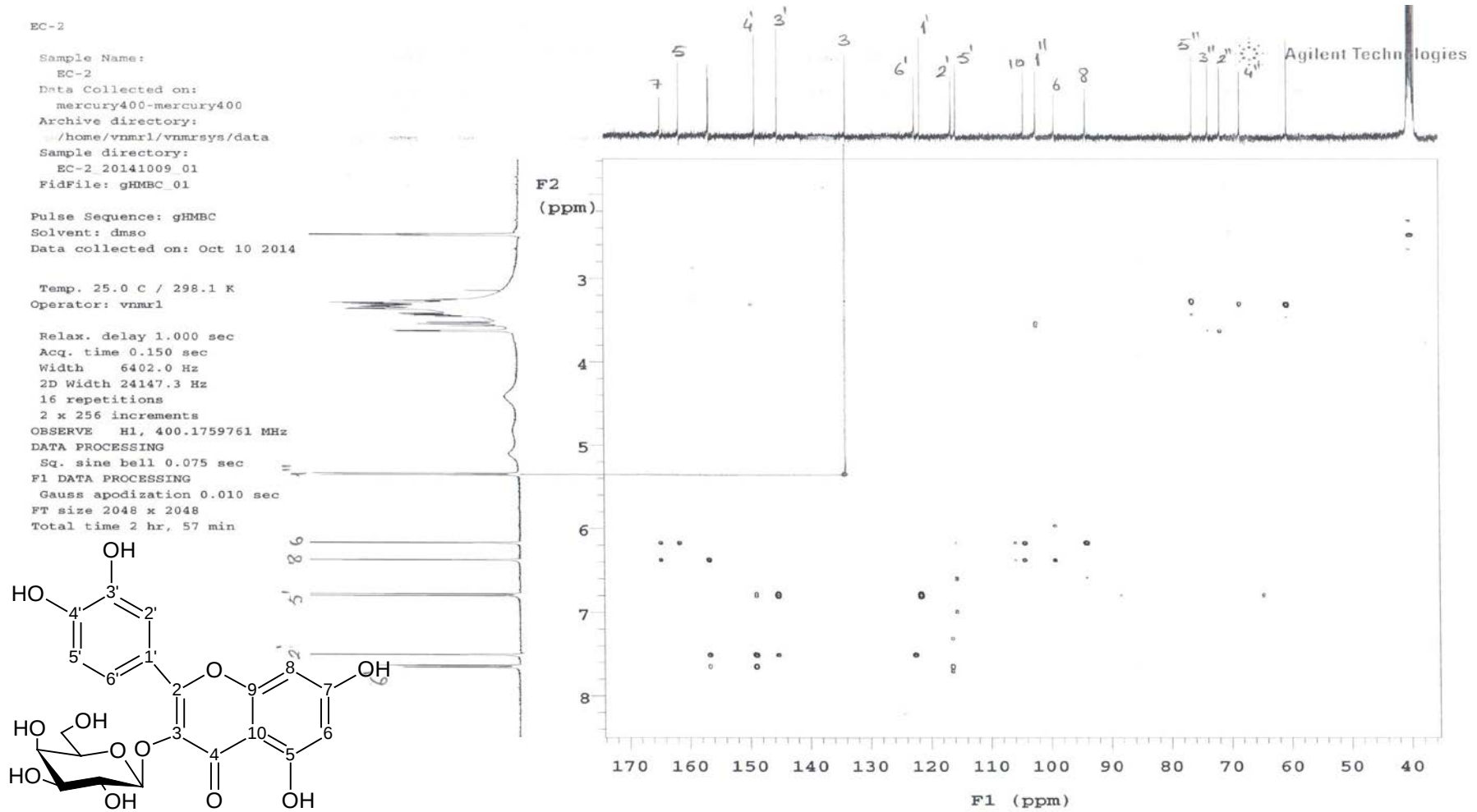
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
256 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 1 hr, 57 min

Agilent Technologies



Şekil 3.31. EC-2 bileşiğinin DEPT spektrumu



Şekil 3.32. EC-2 bileşiğinin HMBC spektrumu

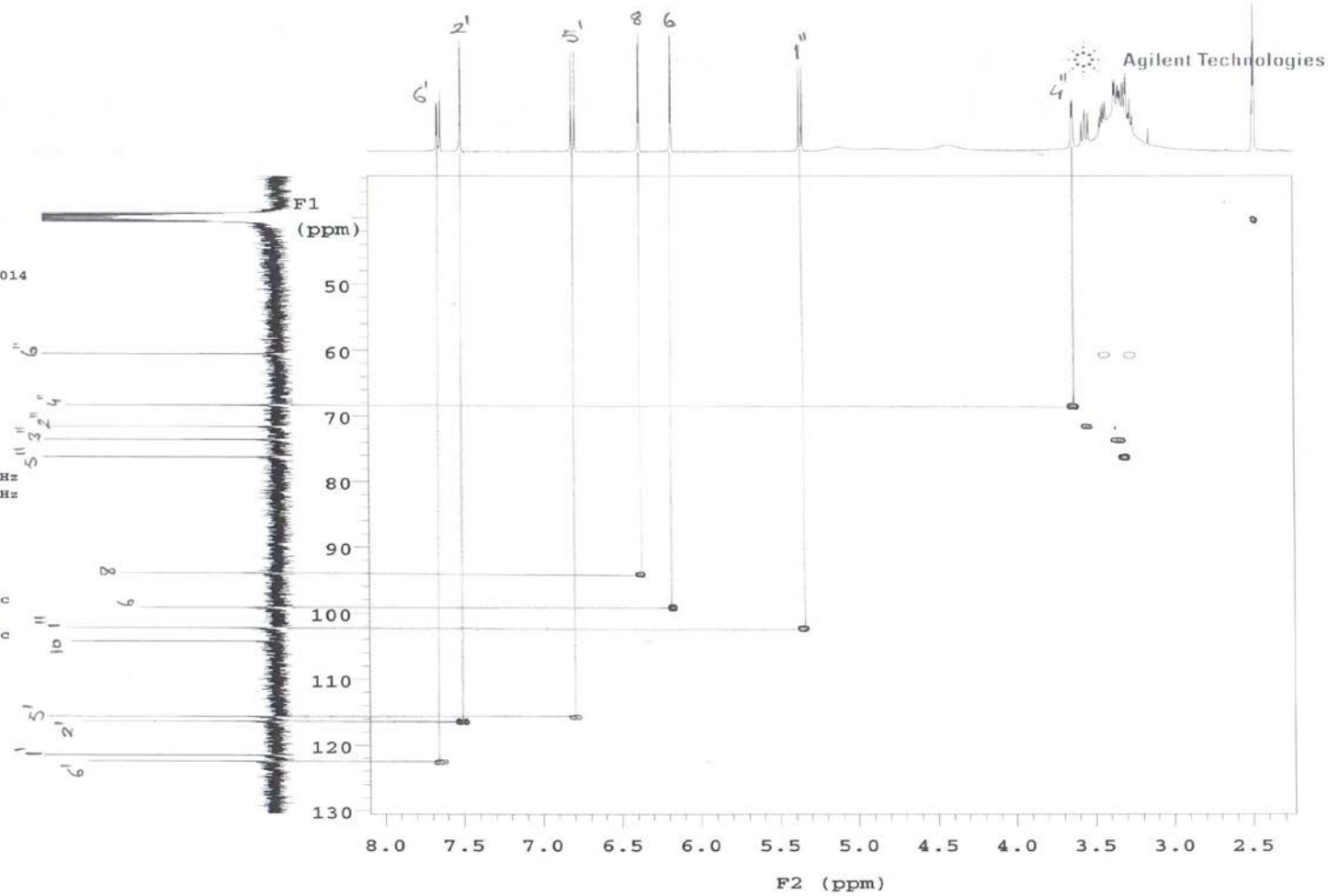
EC-2

Sample Name:
EC-2
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-2 20141009_01
FidFile: gHSQC_01

Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 10 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 200 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 0.009 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 2 hr, 13 min



Şekil 3.33. EC-2 bileşiğinin HSQC spektrumu

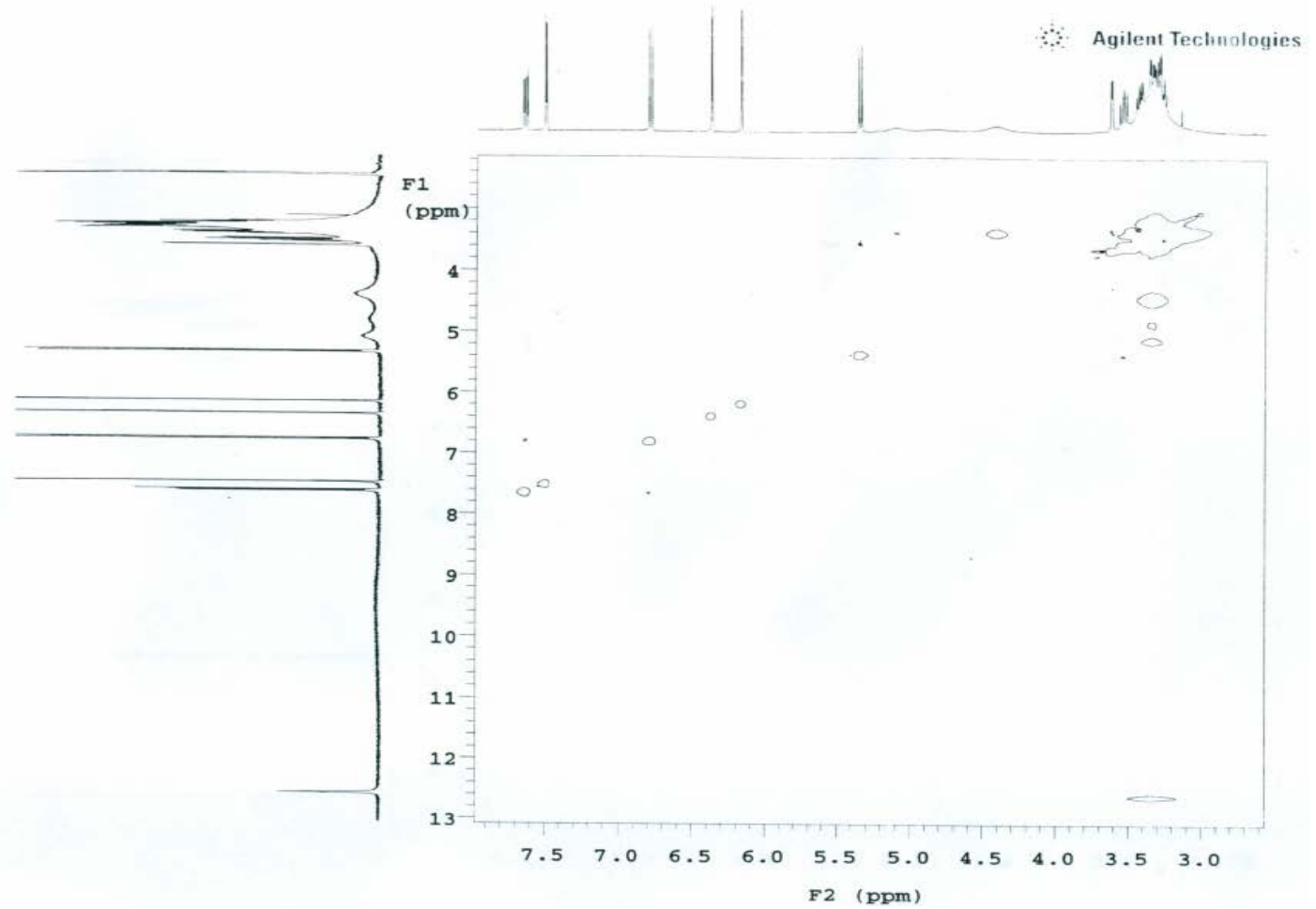
EC-2

Sample Name:
EC-2
Data Collected on:
mercury400 mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-2 20141009_01
FidFile: NOESY_01

Pulse Sequence: NOESY
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 9 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6188.1 Hz
2D Width 6188.1 Hz
8 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.030 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 18 min



Şekil 3.34. EC-2 bileşiğinin NOESY spektrumu

EC-2

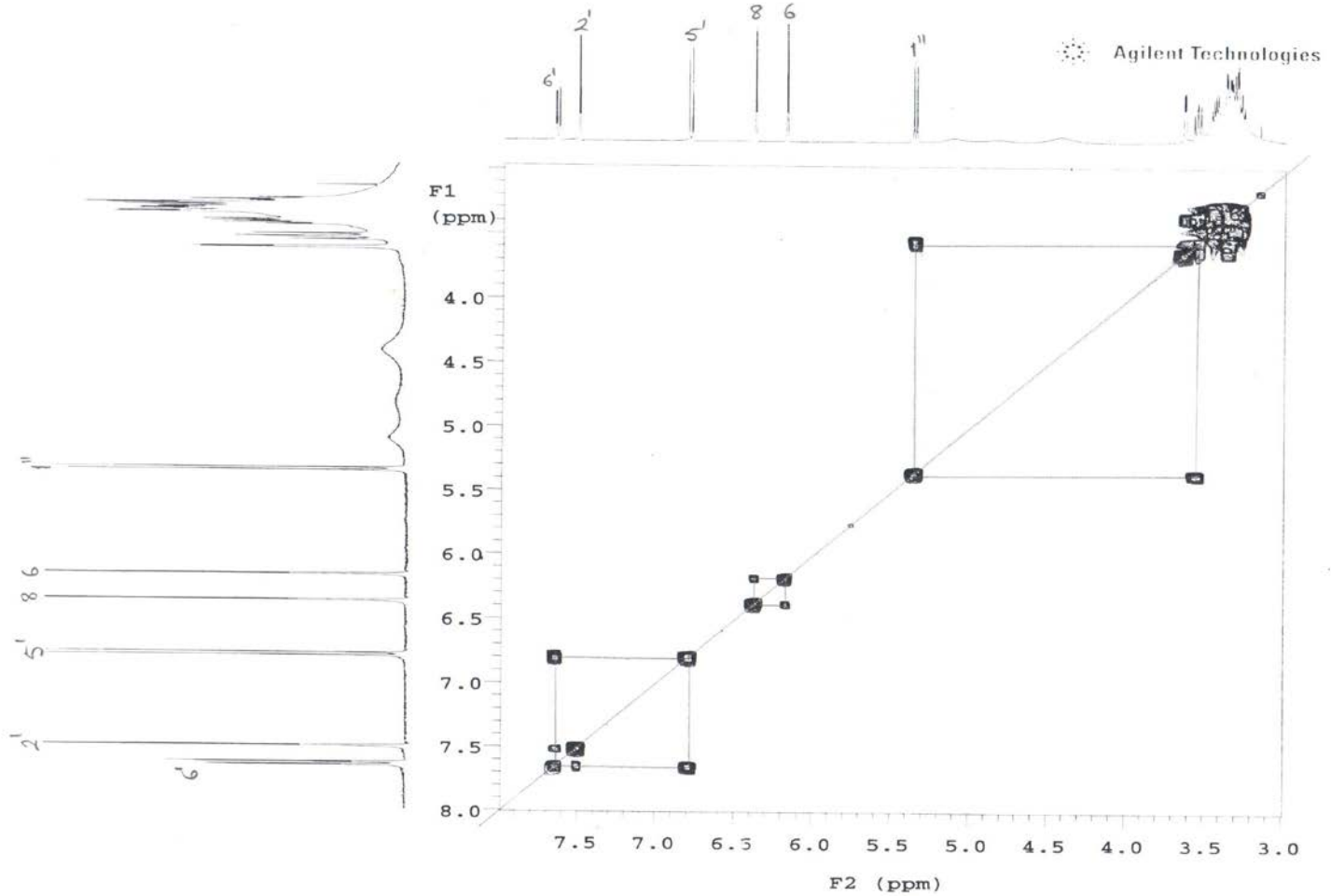
Sample Name:
EC-2
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-2 20141009 01
FidFile: gCOSY 01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 9 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6188.1 Hz
2D Width 6188.1 Hz
4 repetitions
128 increments

OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.021 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 12 min



Şekil 3.35. EC-2 bileşiğinin COSY spektrumu

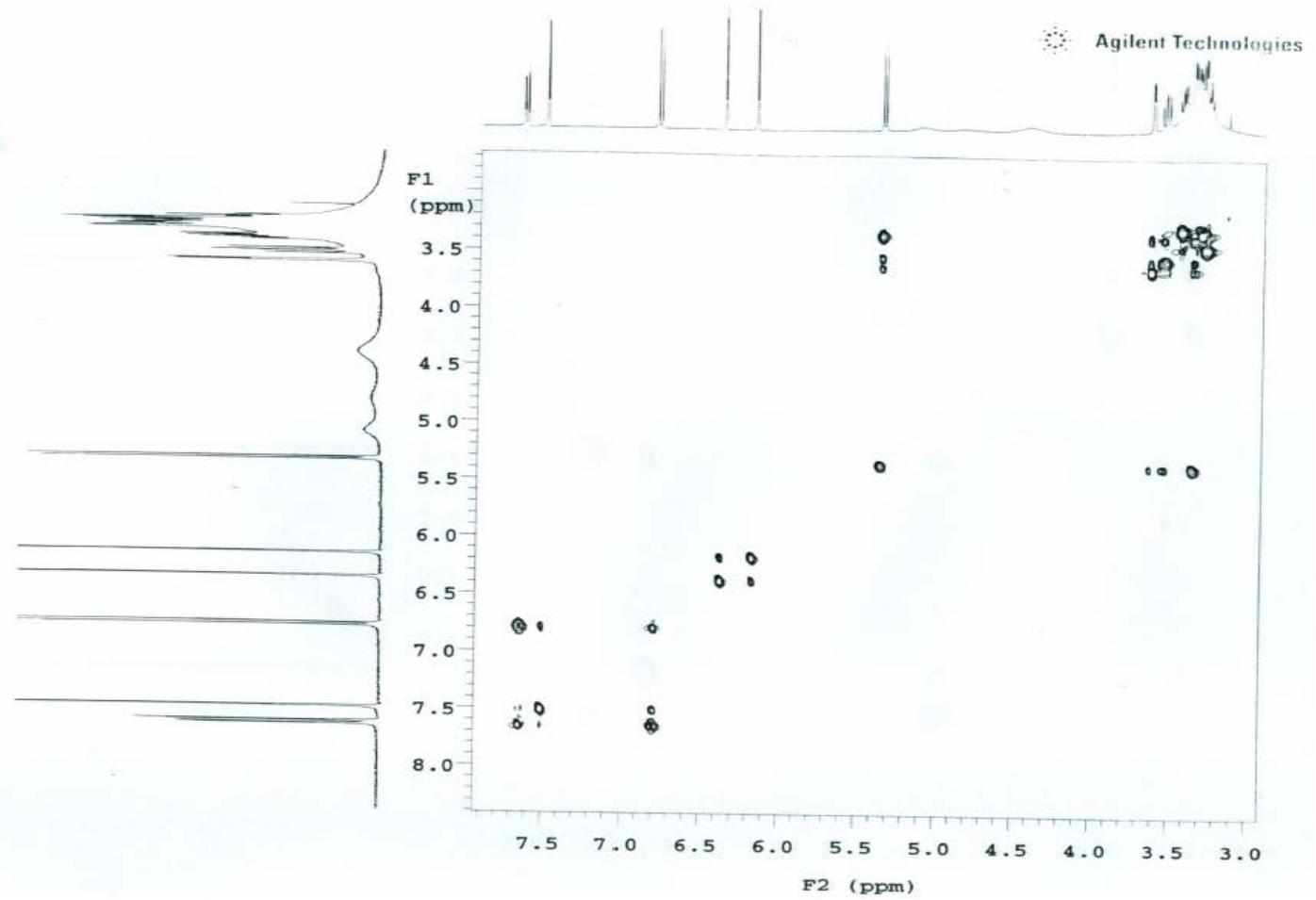
EC-2

Sample Name:
EC-2
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-2 20141009_01
FidFile: TOCSY_01

Pulse Sequence: TOCSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 9 2014

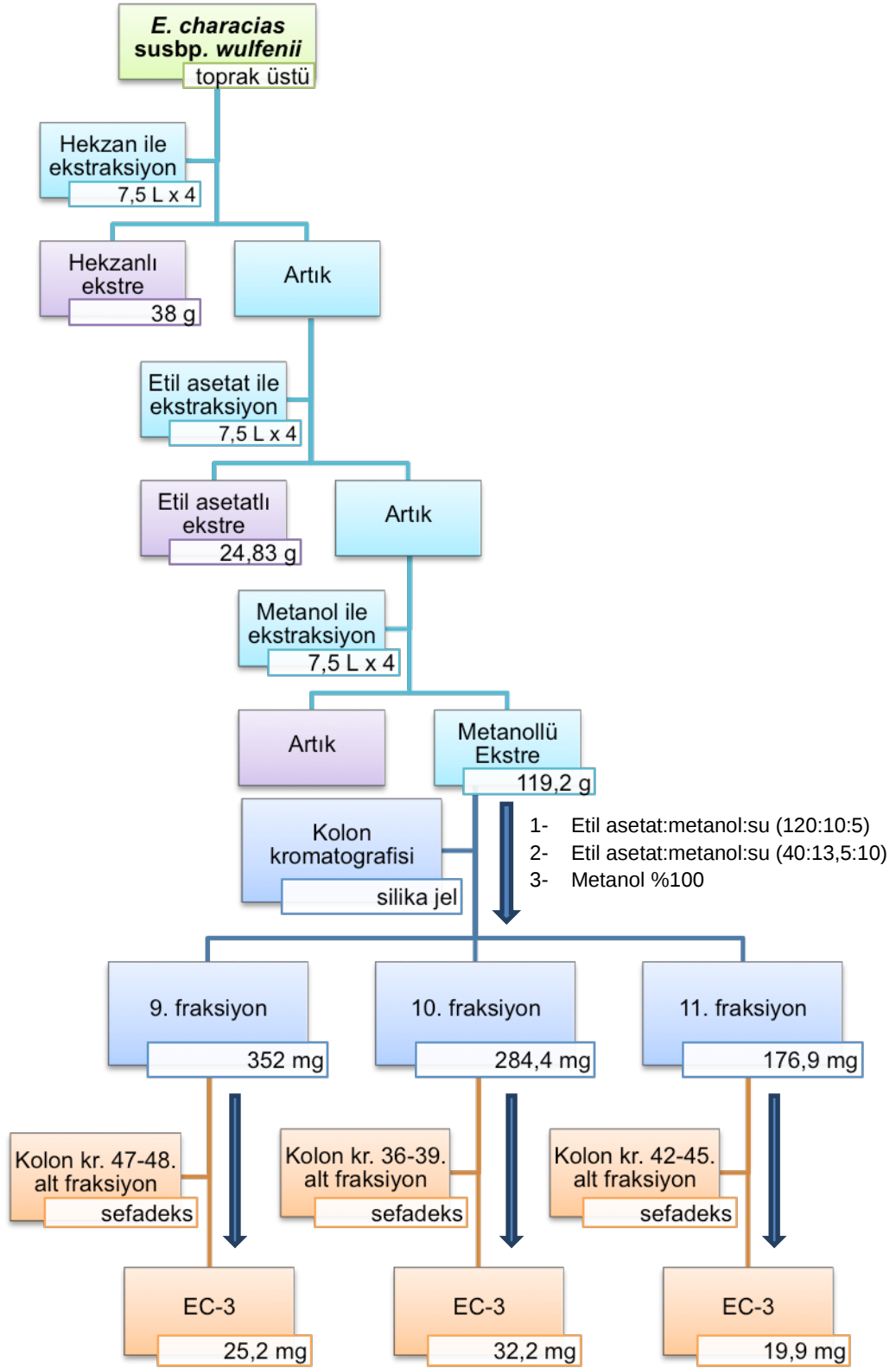
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6188.1 Hz
2D Width 6188.1 Hz
2 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.030 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 20 min



Şekil 3.36. EC-2 bileşiğinin TOCSY spektrumu

3.3.3. EC-3 Bileşiğinin Yapı Tayini ile İlgili Bulgular



Şekil 3.37. EC-3 bileşiğinin izolasyon şeması

Molekül Adı	Kersetin-3-O-arabinozit
Molekül Ağırlığı	435,09 [M+H] ⁺
Molekül Formülü	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁
Özelliği	Sarı renkte amorf toz

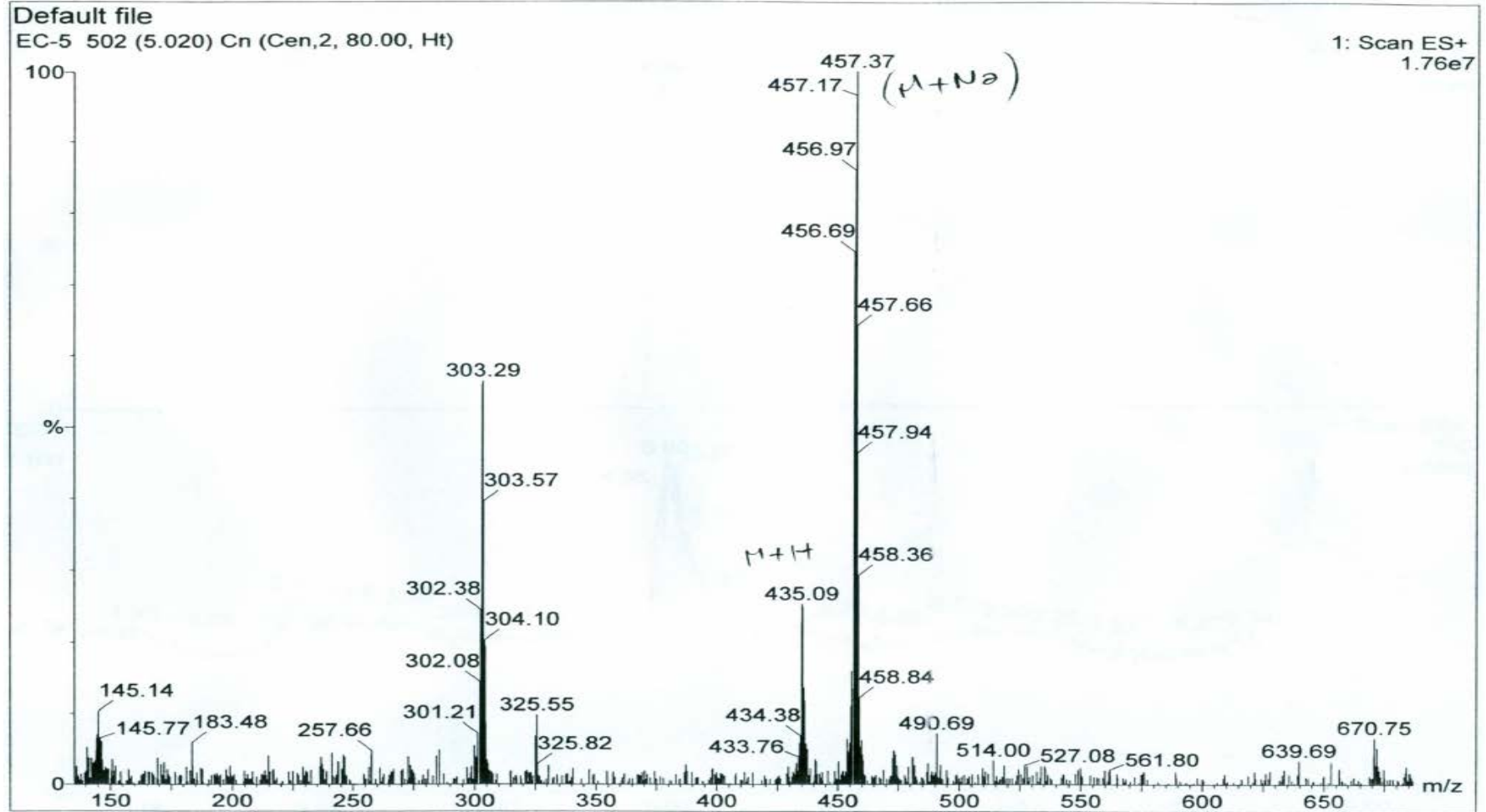
Şekil 3.38. EC-3 bileşiğinin yapı tayini bulguları

Kütle spektrumu (Şekil 3.39) ve NMR spektrumlarının (Şekil 3.40-3.47) çözümlenmesi ile elde edilen bulgular Şekil 3.38 ve Çizelge 3.7’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. EC-3 bileşiğinin ¹H ve ¹³C NMR bulguları

Kimyasal Kayma	Proton	C	δ (ppm)
-	-	-	-
-	-	C-2	156.71
-	-	C-3	134.18
-	-	C-4	177.96
-	-	C-5	161.65
6.18 (1H, d, J=2.4 Hz)	H-6	C-6	99.10
-	-	C-7	164.60
6.38 (1H, d, J=2.0 Hz)	H-8	C-8	93.94
-	-	C-9	156.70
-	-	C-10	104.36
-	H-1'	C-1'	121.34
7.48 (1H, d, J=2.4 Hz)	H-2'	C-2'	116.19
-	H-3'	C-3'	145.41
-	H-4'	C-4'	149.02
6.82 (1H, d, J=8.4 Hz)	H-5'	C-5'	115.80
7.63 (1H, dd, J=2.4, 8.0 Hz)	H-6'	C-6'	122.51
5.25 (1H, d, J=5.6 Hz)	H-1''	C-1''	101.83
3.73 (1H, m)	H-2''	C-2''	71.16
3.50 (1H, m)	H-3''	C-3''	72.07
3.63 (1H, m)	H-4''	C-4''	66.49
3.19 (1H, dd, J=2.4, 11.2 Hz)	H-5''	C-5''	64.69
3.57 (1H, dd, J=5.6, 9.2 Hz)			

Çizelge 3.7’de belirtildiği gibi, EC-3 kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde EC-1 kodlu bileşiğe çok benzer olduğu gözlenmiştir. ^1H -NMR spektrumunda δ 6.18 (1H, d, $J=2.4$ Hz) ve δ 6.38 (1H, d, $J=2.0$ Hz) ppm’lerde gözlenen sinyaller sırasıyla H-6 ve H-8 konumlarını; δ 7.48 (1H, d, $J=2.4$ Hz), δ 6.82 (1H, d, $J=8.4$ Hz) ve δ 7.63 (1H, dd, $J=2.4, 8.0$ Hz) ppm’lerde gözlenen sinyaller ise H-2’, H-5’ ve H-6’ konumlarını işaret etmektedir. ^{13}C -NMR spektrumunda 20 karbon atomuna ait sinyal gözlenmiştir. DEPT spektrumuna göre ise 1 metilen, 9 metin ve 10 kuaterner karbon atomunun varlığı tespit edilmiştir. δ 177.96 ppm’de gözlenen kuaterner karbon atomuna ait sinyal karbonil grubunun varlığını (C-4) işaret etmektedir. Bu veriler EC-3 kodlu bileşiğin de kersetin türevi olduğunu ortaya koymaktadır. 5-OH grubuna ait olan karakteristik singlet ^1H -NMR spektrumunda δ 12.62 ppm’de gözlenmiştir. ^1H -NMR spektrumunda anomerik protona ait olan δ 5.25 ppm’de gözlenen dublet ($J=5.6$ Hz, 1H) bir ozun varlığını düşündürmektedir. ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR verileri ozun arabinoz olduğunu göstermektedir. HMBC spektrumunda δ 5.25 ppm’deki anomerik proton sinyalinin δ 134.18 ppm’deki karbon atomu sinyali ile etkileşmesi ozun 3. konumdan bağlandığını göstermektedir. Bu bilgiler EC-3 kodlu bileşiğin kersetin-3-O- α -arabinopiranozit olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca kütle spektrumu incelendiğinde gözlenen 435,09 $[\text{M}+\text{H}]^+$ moleküler iyon piki ve literatür verileri (Fraisie ve ark., 2000) EC-3 kodlu bileşiğin kersetin-3-O- α -L-arabinopiranozit olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 3.39. EC-3 bileşiğinin ES MS spektrumu

EC-5

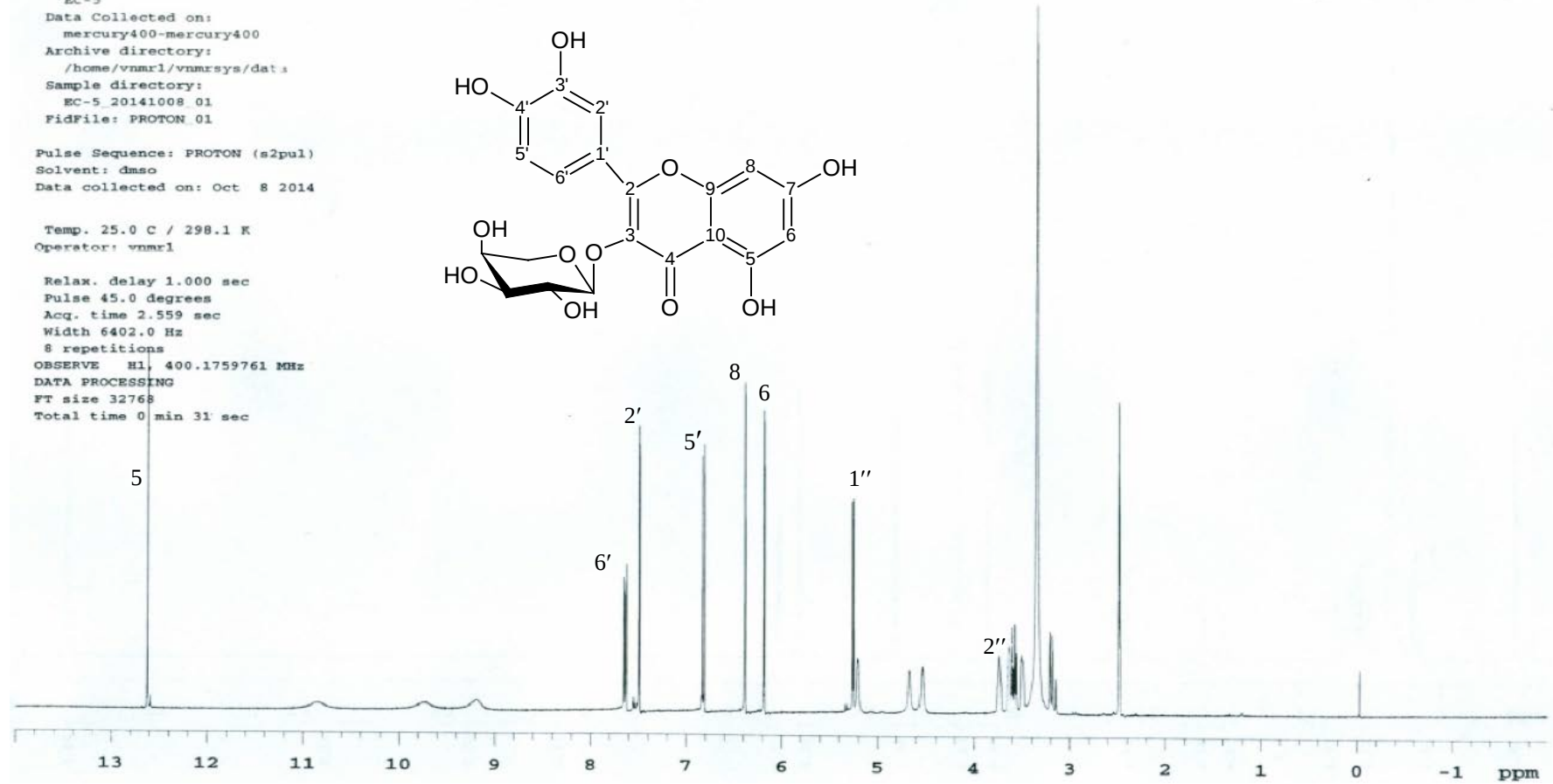
Sample Name:
EC-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-5_20141008_01
FidFile: PROTON 01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Oct 8 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

Agilent Technologies



Şekil 3.40. EC-3 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

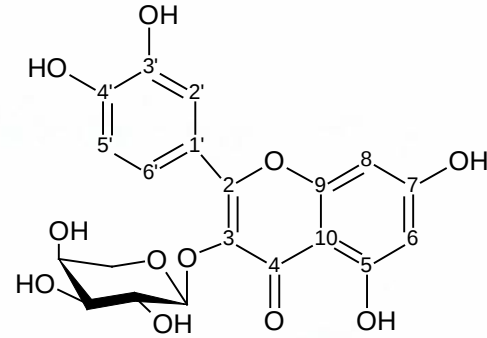
EC-5

Sample Name:
EC-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-5_20141008_01
FidFile: CARBON_01

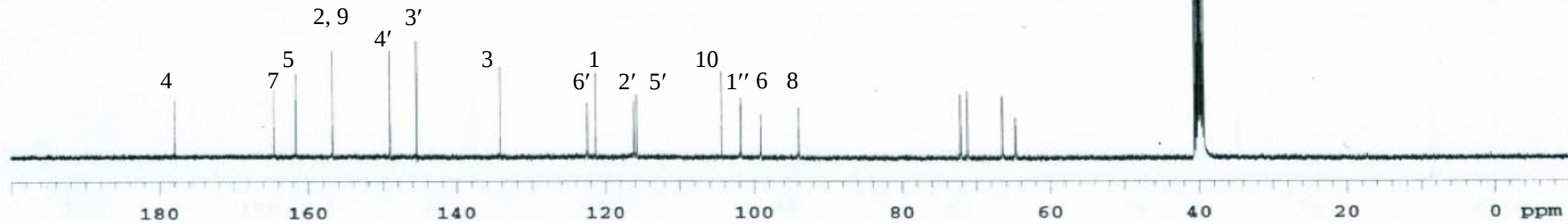
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 8 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
5000 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 3 hr, 40 min



Agilent Technologies



Şekil 3.41. EC-3 bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu

EC-5

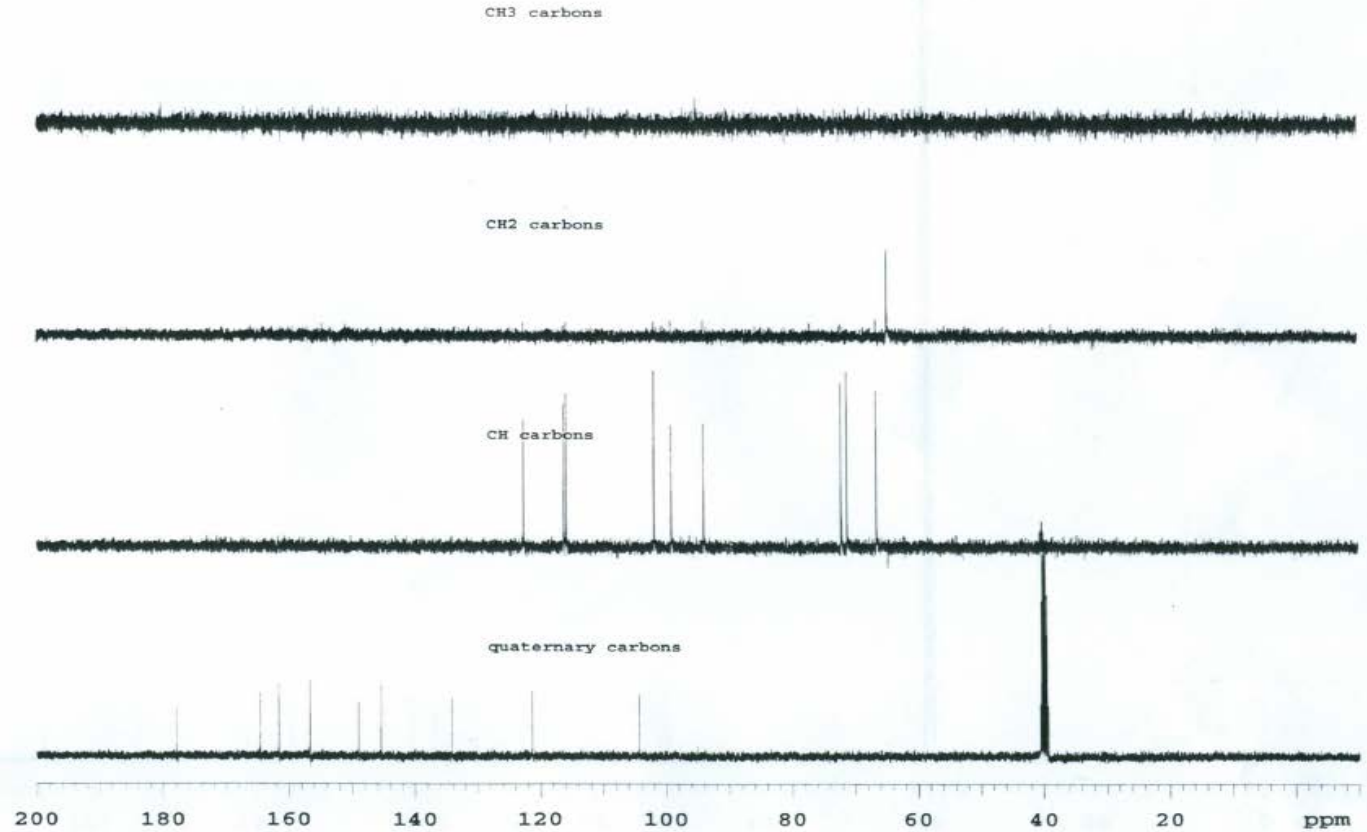
Sample Name:
EC-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrdata
Sample directory:
EC-5_20141008_01
FidFile: DEPT_01

Pulse Sequence: DEPT
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 8 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
256 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 2 hr, 5 min

Agilent Technologies



Şekil 3.42. EC-3 bileşiğinin DEPT spektrumu

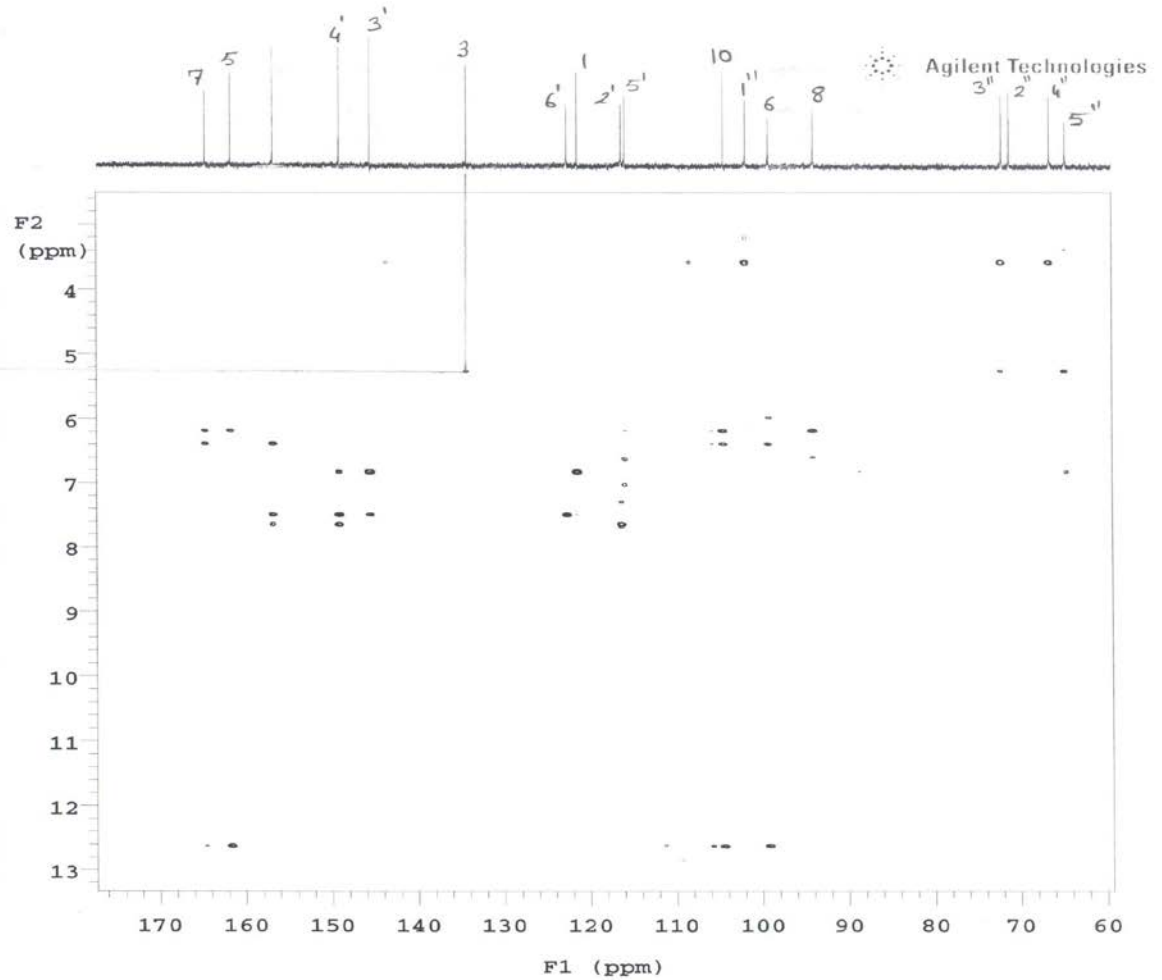
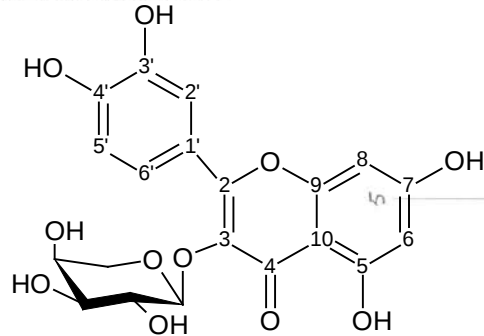
EC-5

Sample Name:
EC-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-5_20141008_01
FidFile: gHMBC 01

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 9 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
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 3.43. EC-3 bileşiğinin HMBC spektrumu

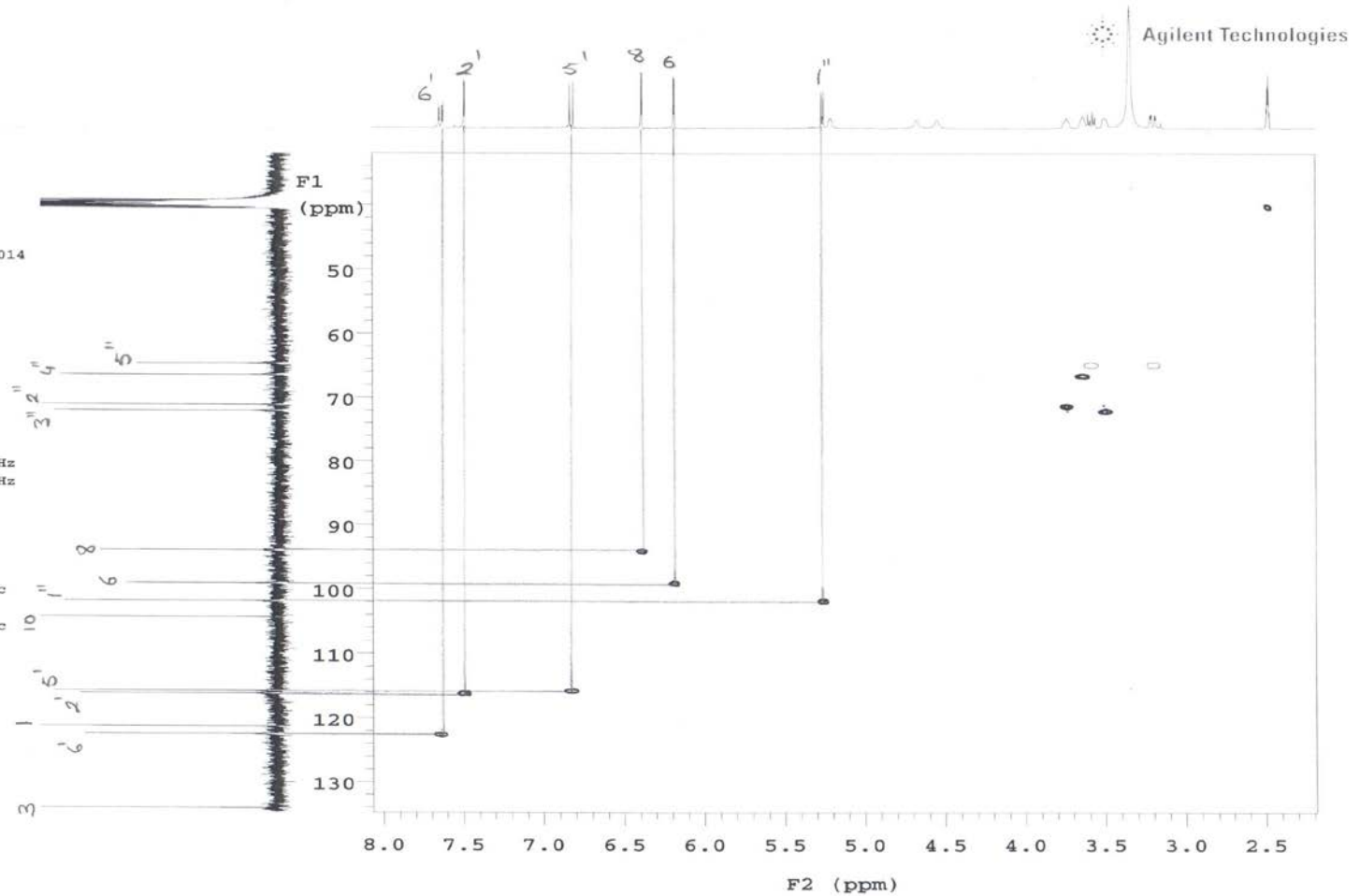
EC-5

Sample Name:
EC-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-5_20141008_01
FidFile: gHSQC_01

Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: dmsd
Data collected on: Oct 9 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 3.44. EC-3 bileşiğinin HSQC spektrumu

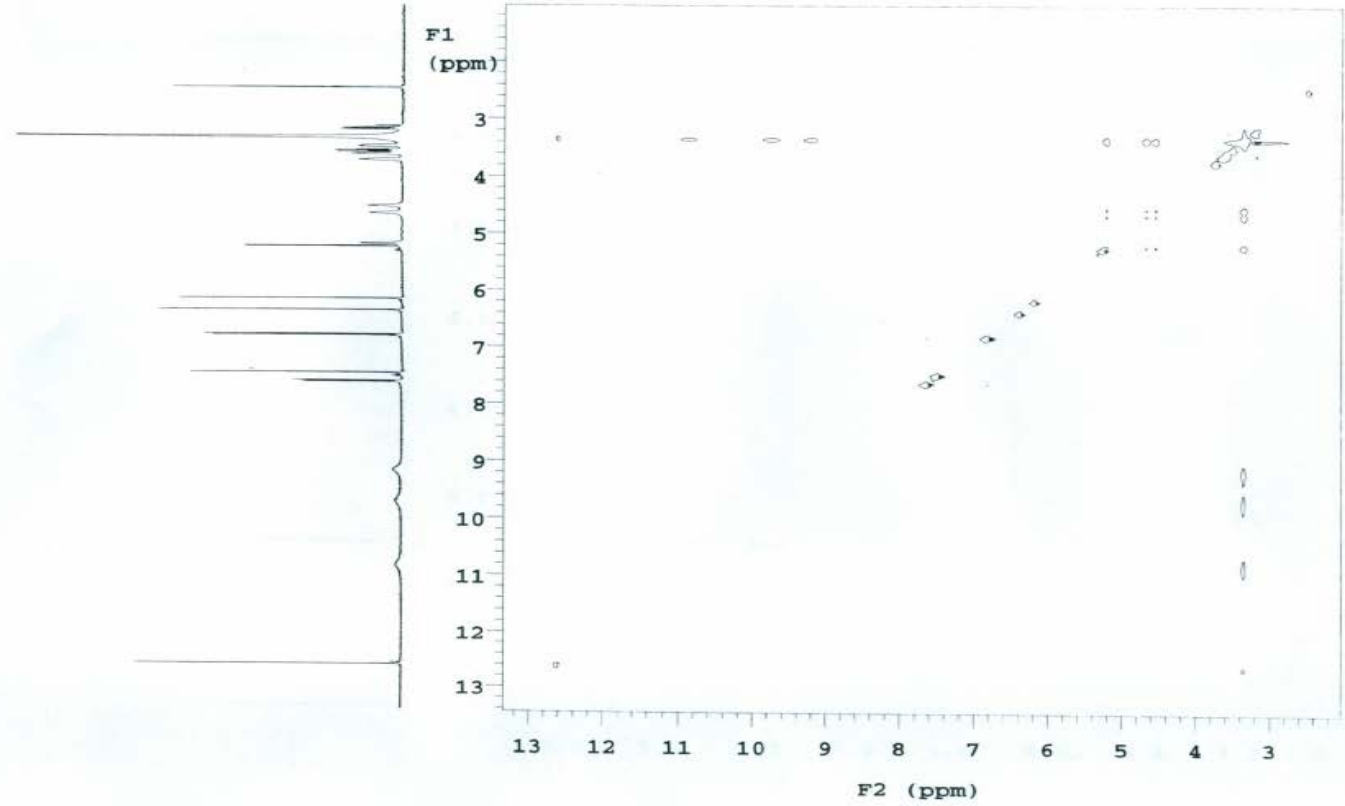
EC-5

Sample Name:
EC-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-5_20141008_01
FidFile: NOESY_01

Pulse Sequence: NOESY
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 9 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6180.5 Hz
2D Width 6180.5 Hz
8 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.030 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 18 min



Şekil 3.45. EC-3 bileşiğinin NOESY spektrumu

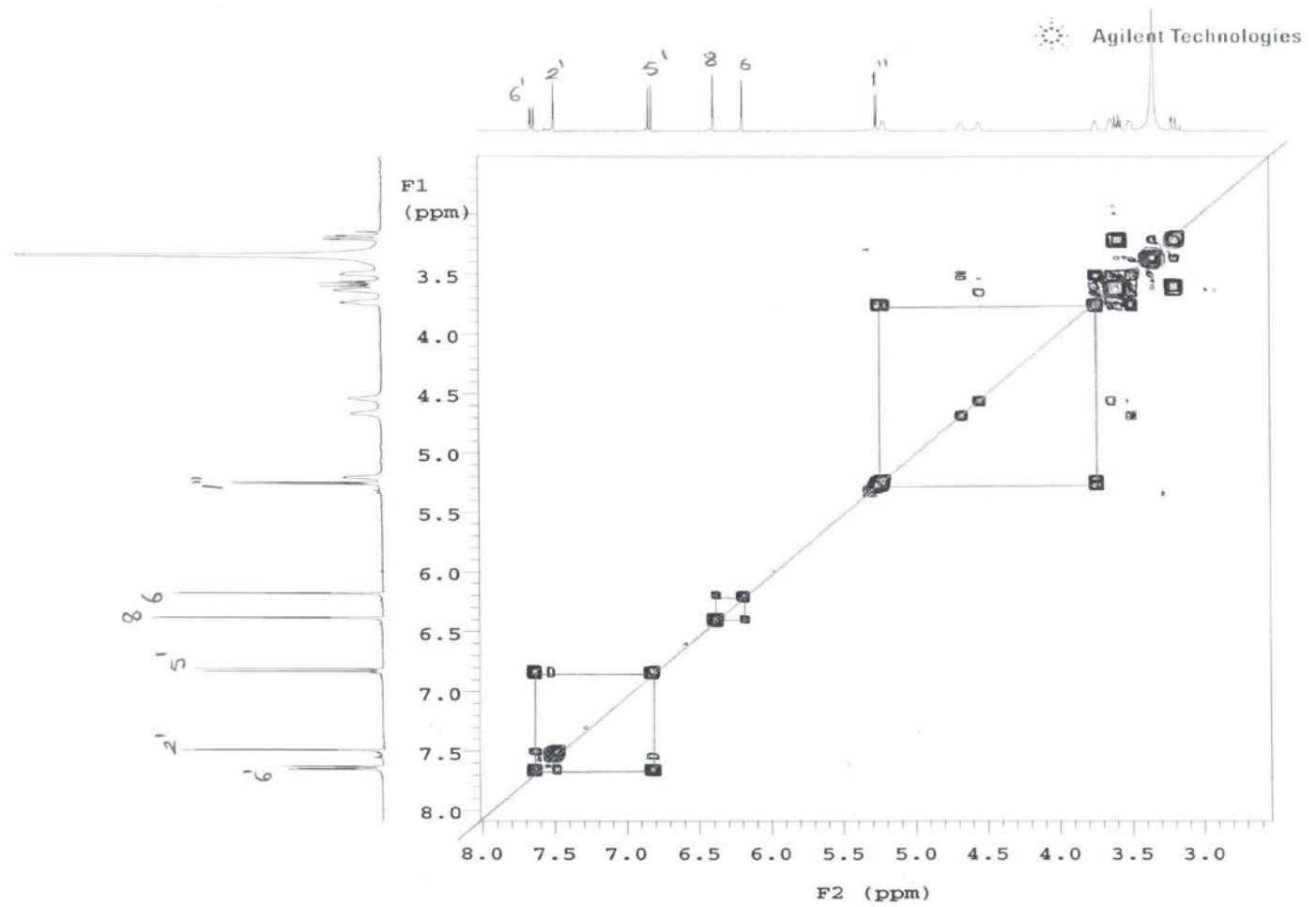
EC-5

Sample Name:
EC-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-5 20141008_01
FidFile: gCOSY_01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 8 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6180.5 Hz
2D Width 6180.5 Hz
4 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.021 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 12 min



Şekil 3.46. EC-3 bileşiğinin COSY spektrumu

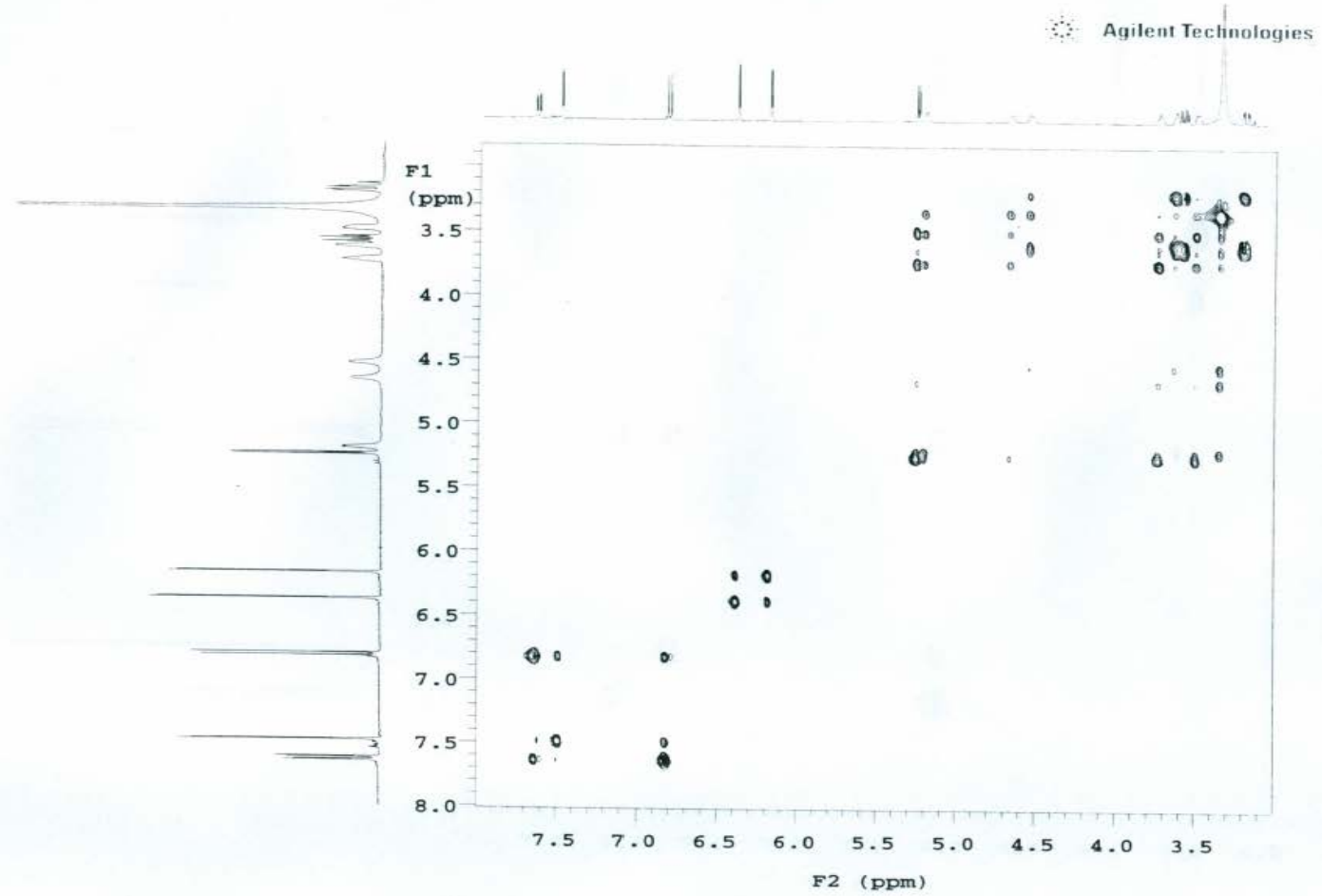
EC-5

Sample Name:
EC-5
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
EC-5 20141008 01
FidFile: TOCSY 01

Pulse Sequence: TOCSY
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 8 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6180.5 Hz
2D Width 6180.5 Hz
2 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 400.1759761 MHz
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.030 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 20 min



Şekil 3.47. EC-3 bileşiğinin TOCSY spektrumu

3.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

Biyolojik olarak aktif türün tespiti ve bu türden BAYF ile etkiden sorumlu saf maddelerin izolasyonu için öncelikle beş *Euphorbia* türünün kurutulmuş toprak üstü kısımlarından Bölüm 2.2.1.1.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan 3 farklı polaritedeki ekstrelerin yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktivitesi test edildi. Aktivite çalışmaları çizgisel insizyon yara modeli ve hidroksiprolin miktar tayini, dairesel eksizyon yara modeli ve Whittle yöntemleri kullanılarak yapıldı.

3.4.1. Yara İyileştirici Aktivite Tayini Bulguları

3.4.1.1. *In Vivo* Deneylere Ait Bulgular

3.4.1.1.1. İnsizyon, Eksizyon Yara Modeli ve Hidroksiprolin Tayini Bulguları

Yara iyileştirici aktivitenin tayini için beş farklı *Euphorbia* türünden hazırlanan üç farklı polaritedeki ekstrelerin insizyon yara modeli üzerindeki etkileri Bölüm 2.2.4.2.1.1’de; eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri de Bölüm 2.2.4.2.1.2’de anlatıldığı şekilde araştırıldı. Hidroksiprolin tayini Bölüm 2.2.4.2.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar insizyon yara modeli sonuçları ile beraber değerlendirildi.

Çizelge 3.8’de belirtildiği gibi, insizyon yara modelinde her bitki grubunun en etkili fraksiyonunun metanollü ekstreleri olduğu görüldü. *E. characias* subsp. *wulfenii*’nin kurutulmuş toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstrenin insizyon yara modelinde %43,03 oranında yara gerilim kuvveti oluşturduğu, diğer ekstre gruplarından daha yüksek biyolojik aktivite gösterdiği tespit edildi. Daha sonra en yüksek etkiyi %37,56 ile *E. helioscopia* ve %30,06 ile *E. macroclada*’nın gösterdiği görüldü. Dokulardaki hidroksiprolin miktarının yüksek olması kolajen varlığının göstergesidir ve iyileşmeyi hızlandırır. Yara gerilme kuvvetinin kaynaklandığı

hidroksiprolinin miktarları da yukarıda belirtilen sonuçlara paralellik göstermektedir. *E. seguieriana* subsp. *seguieriana* %23,69 ve *E. virgata* % 23,09 oranında aktivite göstererek modelde en düşük etkiye sahip bitkiler olarak test edildi.

Çizelge 3.8. *Euphorbia* türlerinden hazırlanan test numunelerinin insizyon yara modeli üzerindeki etkileri

Materyal	Ekstre	Yara Gerilme Kuvveti ± OSH (% Yara gerilimi)	Hidroksiprolin (µg/mg) ± OSH
Baz Merhem		13.34 ± 1.79 (2.30)	12.47 ± 2.15
Negatif Kontrol		13.04 ± 1.87 -	9.66 ± 2.51
<i>Euphorbia virgata</i>	<i>n</i> -Hekzan	14.07 ± 1.38 (5.47)	13.01 ± 2.70
	EtOAc	14.61 ± 1.42 (9.52)	12.36 ± 2.02
	MeOH	16.42 ± 1.56 (23.09)	17.85 ± 2.17
<i>Euphorbia macroclada</i>	<i>n</i> -Hekzan	13.08 ± 1.41 -	14.78 ± 2.12
	EtOAc	13.87 ± 1.29 (3.97)	11.06 ± 2.33
	MeOH	17.35 ± 1.17 (30.06**)	28.37 ± 1.59**
<i>Euphorbia seguieriana</i> subsp. <i>seguieriana</i>	<i>n</i> -Hekzan	14.02 ± 1.46 (5.09)	10.28 ± 2.19
	EtOAc	14.58 ± 1.15 (9.30)	10.92 ± 2.26
	MeOH	16.50 ± 1.39 (23.69)	20.74 ± 1.99
<i>Euphorbia characias</i> subsp. <i>wulfenii</i>	<i>n</i> -Hekzan	14.17 ± 1.52 (6.22)	9.67 ± 2.13
	EtOAc	16.11 ± 1.79 (20.76)	20.62 ± 2.01
	MeOH	19.08 ± 1.47 (43.03**)	35.47 ± 1.38***
<i>Euphorbia helioscopia</i>	<i>n</i> -Hekzan	14.27 ± 1.58 (6.97)	11.73 ± 2.07
	EtOAc	15.12 ± 1.70 (13.34)	15.08 ± 2.11
	MeOH	18.35 ± 1.84 (37.56**)	30.64 ± 1.44**
Madecassol®		21.41 ± 1.17 (60.49***)	47.61 ± 1.13***

*; 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’da belirtildiği gibi, eksizyon yara modelinde de her bitki grubunun en etkili fraksiyonunun metanollü ekstreleri olduğu görüldü. Çalışmada 10. günün sonunda *E. characias* subsp. *wulfenii*’nin kurutulmuş toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstrenin %65,24 oranında kontraksiyon oluşturduğu ve diğer ekstre gruplarından anlamlı ölçüde daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi. Daha sonra en yüksek etkiyi %43,93 ile *E. macroclada* ve %43,61 ile *E. helioscopia*’nın gösterdiği görüldü. *E. virgata* %26,89 ve *E. sequieriana* subsp. *sequieriana* %19,34 oranında aktivite göstererek eksizyon yara modelinde en düşük etkiye sahip bitkiler olarak test edildi.

Çizelge 3.9. *Euphorbia* türlerinden hazırlanan test numunelerinin eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri

Materyal	Ekstre	Yara Alanı (mm ²) ± OSH (% Kontraksiyon)					
		0. gün	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün	10. gün
Baz Merhem		19.89 ± 2.31	17.32 ± 2.37 -	15.29 ± 2.42 -	12.71 ± 1.96 (1.93)	6.49 ± 1.49 (8.46)	3.05 ± 1.25 (10.03)
Negatif Kontrol		19.21 ± 2.19	17.15 ± 2.24	15.21 ± 2.30	12.96 ± 1.77	7.09 ± 1.57	3.39 ± 1.82
<i>Euphorbia virgata</i>	<i>n</i> -Hekzan	19.33 ± 2.02	17.48 ± 1.84 -	15.02 ± 1.47 (1.77)	13.02 ± 1.38 -	6.19 ± 1.03 (4.62)	2.95 ± 0.41 (3.28)
	EtOAc	19.53 ± 2.11	16.91 ± 1.96 (2.37)	14.78 ± 1.29 (3.34)	12.82 ± 1.26 -	5.82 ± 1.07 (10.32)	2.98 ± 0.66 (2.29)
	MeOH	19.38 ± 2.25	15.88 ± 1.82 (8.31)	14.51 ± 1.25 (5.10)	11.91 ± 1.17 (6.29)	5.74 ± 0.98 (11.56)	2.23 ± 0.71 (26.89)
<i>Euphorbia macroclada</i>	<i>n</i> -Hekzan	19.62 ± 2.28	16.34 ± 1.61 (5.66)	14.92 ± 2.10 (2.42)	12.85 ± 1.40 -	6.04 ± 1.51 (6.93)	2.97 ± 0.98 (2.62)
	EtOAc	19.45 ± 2.17	15.01 ± 1.45 (13.34)	13.95 ± 1.98 (8.76)	11.72 ± 1.36 (7.79)	5.72 ± 0.60 (11.86)	2.47 ± 0.49 (19.02)
	MeOH	19.47 ± 2.26	14.37 ± 1.58 (17.03)	12.99 ± 1.79 (15.04)	10.87 ± 1.44 (14.48)	4.44 ± 0.35 (31.59)*	1.71 ± 0.77 (43.93)**
<i>Euphorbia seguieriana</i> subsp. <i>seguieriana</i>	<i>n</i> -Hekzan	19.49 ± 2.14	17.42 ± 1.79 -	15.04 ± 1.59 (1.64)	11.24 ± 1.42 (11.57)	5.84 ± 1.12 (10.01)	2.86 ± 0.81 (6.23)
	EtOAc	20.02 ± 2.03	16.49 ± 1.81 (4.79)	16.42 ± 1.10 -	11.32 ± 1.45 (10.94)	5.76 ± 1.13 (11.25)	2.59 ± 0.89 (15.08)
	MeOH	19.99 ± 2.22	16.32 ± 1.85 (5.77)	15.44 ± 1.47 -	11.43 ± 1.55 (10.07)	4.89 ± 1.08 (24.65)	2.46 ± 0.92 (19.34)

Çizelge 3.9. Devam. *Euphorbia* türlerinden hazırlanan test numunelerinin eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri

Materyal	Ekstre	Yara Alanı (mm ²) ± OSH (% Kontraksiyon)					
		0. gün	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün	10. gün
Baz Merhem		19.89 ± 2.31	17.32 ± 2.37 -	15.29 ± 2.42 -	12.71 ± 1.96 (1.93)	6.49 ± 1.49 (8.46)	3.05 ± 1.25 (10.03)
Negatif Kontrol		19.21 ± 2.19	17.15 ± 2.24	15.21 ± 2.30	12.96 ± 1.77	7.09 ± 1.57	3.39 ± 1.82
<i>Euphorbia characias</i> subsp. <i>wulfenii</i>	<i>n</i> -Hekzan	19.32 ± 2.01	16.85 ± 1.43 (2.71)	14.18 ± 1.12 (7.26)	10.17 ± 1.39 (19.98)	5.74 ± 1.22 (11.56)	2.72 ± 0.49 (10.82)
	EtOAc	19.27 ± 2.10	16.39 ± 1.59 (5.37)	13.41 ± 1.19 (12.29)	9.99 ± 1.43 (21.40)	4.52 ± 0.89 (30.35)	1.95 ± 0.58 (36.07)*
	MeOH	21.03 ± 2.11	15.11 ± 1.34 (12.76)	12.88 ± 1.23 (15.76)	9.90 ± 1.57 (22.11)	4.36 ± 0.92 (32.82)*	1.06 ± 0.39 (65.24)**
<i>Euphorbia helioscopia</i>	<i>n</i> -Hekzan	19.57 ± 2.04	17.25 ± 1.28 (0.40)	14.25 ± 1.31 (6.80)	11.52 ± 1.37 (9.36)	5.87 ± 0.97 (9.55)	3.22 ± 0.71 -
	EtOAc	19.31 ± 2.07	16.81 ± 1.19 (2.94)	14.06 ± 1.43 (17.20)	10.84 ± 1.30 (16.28)	4.92 ± 0.81 (24.19)	2.35 ± 0.65 (22.95)
	MeOH	20.10 ± 2.31	15.71 ± 1.23 (9.29)	14.01 ± 1.25 (8.37)	10.79 ± 1.53 (15.11)	4.02 ± 0.74 (38.06)*	1.72 ± 0.32 (43.61)**
Madecassol®		19.81 ± 2.05	14.28 ± 1.30 (17.55)	12.20 ± 1.37 (20.21)	6.82 ± 1.24 (46.34)**	1.85 ± 0.62 (71.49)**	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; ekstre grupları baz merhem grubuyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

Eksizyon yara modeli bulgularının insizyon yara modeli ve hidrokspirolin tayini bulguları ile paralellik gösterdiği, bu doğrultuda en yüksek aktiviteyi *E. characias* subsp. *wulfenii* metanol ekstresinin gösterdiği görülmektedir.

Beş farklı *Euphorbia* türü üzerinde gerçekleştirilen aktivite deneylerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek yara iyileştirici aktiviteyi gösteren *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresi ile izolasyon çalışmalarına devam edilmesine karar verildi. Aktif olduğu tespit edilen *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinden BAYF doğrultusunda kolon kromatografisi tekniği ile toplanan 64 fraksiyon Bölüm 3.1.2.2.1’de belirtilen şekilde birleştirilerek MEOH kodlu 7 fraksiyon grubu elde edildi. Aktivite çalışmaları için benzer maddde gruplarını taşıdığı tespit edilen MEOH-4 ile MEOH-5, MEOH 6 ile de MEOH-7 birleştirilerek 5 fraksiyon grubu elde edildi. Fraksiyonların çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkileri ve hidrokspirolin tayini bulguları Çizelge 3.10’da; eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri de Çizelge 3.11’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.10’da görüldüğü gibi, MEOH-2 fraksiyonu %39,73 ile diğer fraksiyonlardan daha fazla yara gerilim kuvveti oluşturmaktadır. Aynı şekilde hidrokspirolin miktarı da bu ekstrede 32,17 µg/mg ile en yüksek orandadır. Yani diğer fraksiyonlara oranla yarada daha fazla iyileşme sağlamaktadır. MEOH-2’nin bu modelde biyolojik olarak en aktif fraksiyon olduğu göze çarpmaktadır.

Çizelge 3.10. Birleştirilen fraksiyonlardan hazırlanan test numunelerinin insizyon yara modeli üzerindeki etkileri

Materyal	Yara Gerilme Kuvveti $\pm$ OSH (% Yara gerilimi)	Hidroksiprolin ($\mu\text{g}/\text{mg}$) $\pm$ OSH
Baz Merhem	10.95 ± 1.44 (11.51)	10.39 ± 2.03
Negatif Kontrol	9.82 ± 1.73 -	10.03 ± 2.47
MEOH-1	14.28 ± 1.59 (30.41**)	$29.14 \pm 1.66^{**}$
MEOH-2	15.30 ± 1.41 (39.73****)	$32.17 \pm 1.31^{****}$
MEOH-3	13.78 ± 1.68 (25.84*)	19.63 ± 1.98
MEOH-4 + MEOH-5	12.80 ± 1.77 (16.89)	15.12 ± 2.08
MEOH-6 + MEOH-7	11.59 ± 1.43 (5.84)	9.44 ± 2.21
Madecassol®	16.64 ± 1.62 (51.96****)	$44.87 \pm 1.25^{****}$

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

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

Çizelge 3.11’de belirtildiği gibi, MEOH-2 fraksiyonu %53,22 ile diğer fraksiyonlardan daha fazla yara kontraksiyonu oluşturmaktadır. Yani diğer fraksiyonlara oranla yara alanında daha fazla küçülmeye neden olmaktadır. Bu modelde de MEOH-2’nin biyolojik olarak en aktif fraksiyon olarak göze çarpmaktadır.

Çizelge 3.11. Birleştirilen fraksiyonlardan hazırlanan test numunelerinin eksizyon yara modeli üzerindeki etkileri

Materyal	Yara Alanı (mm ²) ± OSH (% Kontraksiyon)					
	0. gün	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün	10. gün
Baz Merhem	19.36 ± 2.34	17.11 ± 2.26 (2.01)	15.36 ± 2.27 (4.12)	12.95 ± 1.82 -	6.82 ± 1.66 (3.54)	3.42 ± 1.41 (4.20)
Negatif Kontrol	19.22 ± 2.28	17.46 ± 2.17	16.02 ± 2.34	12.45 ± 1.89	7.07 ± 1.72	3.57 ± 1.79
MEOH-1	19.29 ± 2.43	16.89 ± 2.11 (1.29)	13.93 ± 2.20 (9.31)	9.38 ± 2.14 (27.57)	6.68 ± 1.84 (2.05)	1.99 ± 1.26 (41.81)*
MEOH-2	19.55 ± 2.38	17.02 ± 2.08 (0.53)	13.18 ± 2.32 (14.19)	9.31 ± 1.76 (28.11)	4.26 ± 1.25 (37.54)*	1.60 ± 0.86 (53.22)**
MEOH-3	19.17 ± 2.61	16.92 ± 2.15 (1.11)	14.01 ± 2.27 (8.79)	10.40 ± 1.92 (19.69)	4.57 ± 1.08 (32.99)*	2.14 ± 1.16 (37.43)*
MEOH-4 + MEOH-5	19.41 ± 2.70	17.06 ± 2.19 (0.29)	15.05 ± 2.63 (2.02)	11.67 ± 1.74 (9.88)	5.91 ± 1.17 (13.34)	2.60 ± 0.95 (23.98)
MEOH-6 + MEOH-7	19.39 ± 2.74	16.91 ± 2.42 (1.17)	15.27 ± 2.38 (0.59)	11.98 ± 2.01 (7.49)	6.01 ± 1.33 (11.88)	3.01 ± 1.04 (11.99)
Madecassol®	19.47 ± 2.56	15.01 ± 1.85 (12.27)	12.39 ± 1.92 (19.34)	7.92 ± 1.57 (38.84)*	2.17 ± 0.49 (68.18)**	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; ekstre grupları baz merhem grubuyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.4.1.1.2. Histopatolojik İnceleme Bulguları

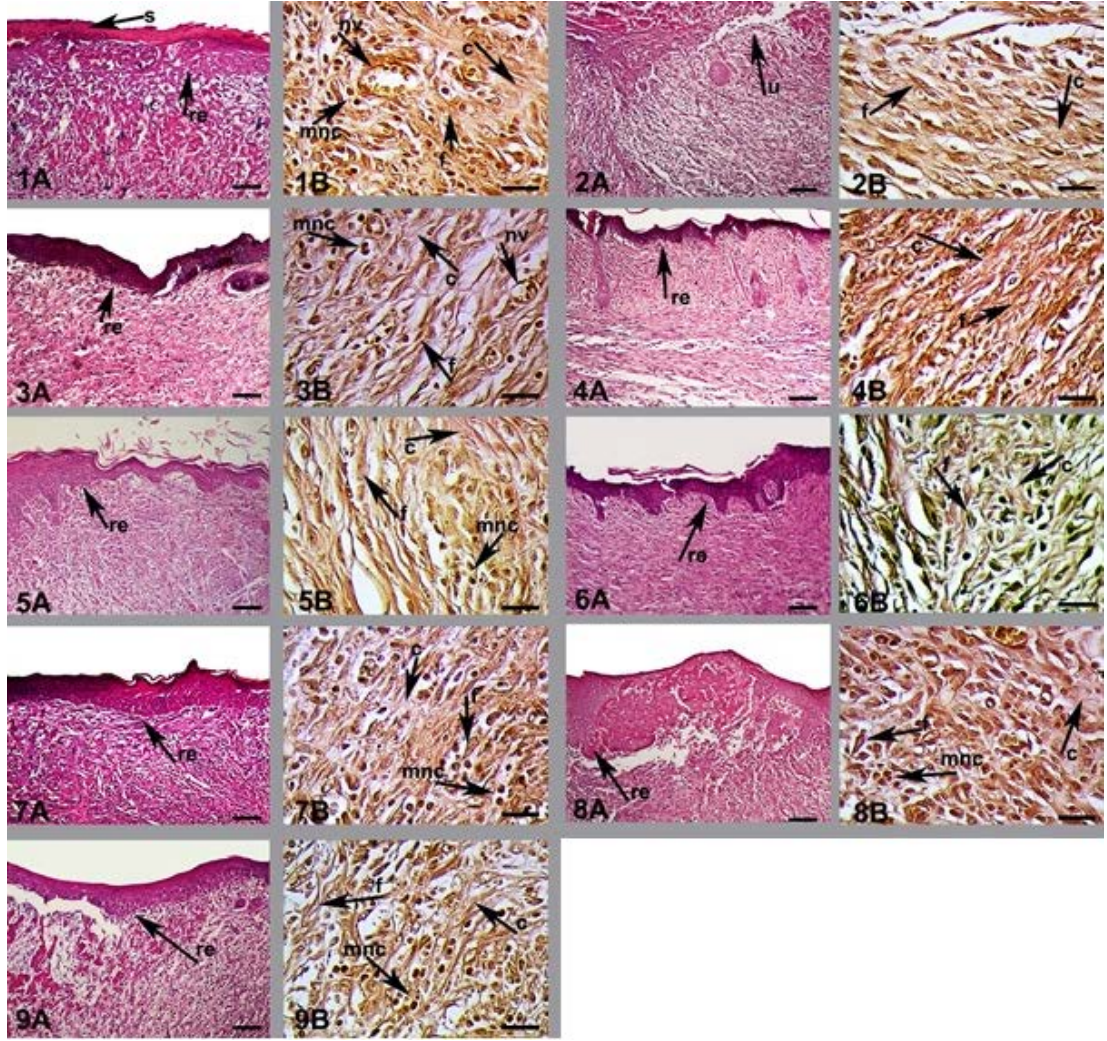
Yara iyileştirici aktivite açısından etkili bulunan ve etkiye neden olabilecek bileşiklerin izolasyonu hedeflenen, *E. characias* subsp. *wulfenii* toprak üstü kısımlarından Bölüm 2.2.1.1.1’de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan metanol ekstresi ve bu ekstrenin aktif bulunan fraksiyonu MEOH-2 ile tedavi edilen dokular üzerinde gerçekleştirilen histopatolojik incelemelere dair sonuçlar Çizelge 3.12’de, histopatoloji sonuçlarını destekleyen fotoğraflar da Şekil 3.48’de gösterilmektedir (sadece en aktif ekstrelerin histopatoloji çalışmaları yapılmıştır).

Histopatolojik incelemeler sonucunda, epidermal ve dermal re-modelleme, re-epitelizasyon süreçlerinde negatif kontrol grubu dışındaki diğer tüm gruplarda değişik oranlarda iyileşme gözlemlendi. En düzgün iyileşmenin gözlemlendiği grupların sırasıyla Referans grup, *E. characias* subsp. *wulfenii* metanol ekstresi, MEOH-2 fraksiyonu, *E. helioscopia* metanol ekstresi, MEOH-1 fraksiyonu, *E. macroclada* metanol ekstresi ve MEOH-3 fraksiyonu ile tedavi edilen dokular olduğu tespit edildi.

Çizelge 3.12. Test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının histopatoloji sonuçları

Gruplar	Yara İyileşme Süreci								İyileşme Fazları		
	Y	U	RE	FP	KD	MN	PM	NV	EF	PF	RF
Baz Merhem	+/++	+	+	+++	++/+++	++/+++	+/++	++/+++	++/+++	+++	+
Negatif Kontrol	+++	++/+++	-	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	-
<i>E. macroclada</i> -MeOH	+	-	++	++/+++	++/+++	++/+++	++	++	++	++/+++	++
<i>E. characias</i> subsp. <i>wulfenii</i> - MeOH	-/+	-	++/+++	++/+++	++	++	+	+/++	++	++/+++	++
<i>E. helioscopia</i> -MeOH	+	-	++/+++	++/+++	++/+++	++	+/++	++	++	++/+++	++
MEOH-1	+	-	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++	++	++	+++	++
MEOH-2	+	-	++/+++	+++	+++	++/+++	+/++	++	++	+++	++
MEOH-3	++	+	+/++	+++	+++	+++	++	++/+++	++/+++	+++	+/++
Madecassol®	-/+	-	++/+++	++	++	+/++	-/+	+	+	++	++/+++

Dokular hafif (+), orta (++), şiddetli (+++) olmak üzere derecelendirildi. Y: Yara kabuğu, U: Ülser, RE: Re-epitelizasyon, FP: Fibroblast proliferasyonu, KD: Kolajen depolanması, MN: Mononükleer hücreler, PM: Polimorfonükleer hücreler, NV: Neovaskülerizasyon, EF: Enflamasyon fazı, PF: Proliferasyon fazı, RF: Re-modeling fazı



Hematoksilen-eozin ile boyanmış epidermis ve dermis; Resimlerin orijinal büyütmesi x 100 olup büyütme barı 120 μm 'dir. Bilgiler her gruptaki 6'şar hayvanın ortalamasını yansıttak şekildedir.

1: Baz Merhem; 2: Negatif Kontrol; 3: *E. macroclada* metanol ekstresi; 4: *E. characias* subsp. *wulfenii* metanol ekstresi; 5: *E. helioscopia* metanol ekstresi; 6: MEOH-1. Fraksiyon; 7: MEOH-2. Fraksiyon; 8: MEOH-3. Fraksiyon; 9: Madecassol®

Şekil 3.48. Test numuneleri ile tedavi edilen yara dokularının hematoksislen-eozin ile boyanmasının ardından ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

3.4.1.2. *In Vitro* Deneylere Ait Bulgular (Hyaluronidaz, Kolajenaz ve Elastaz Enzim İnhibisyonu)

E. characias subsp. *wulfenii*'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin fraksiyonlanmasıyla elde edilen ve en yüksek biyolojik aktiviteye sahip MEOH-2 fraksiyonundan saflaştırma çalışmaları sonunda izole edilen üç bileşiğin, yara iyileşmesinde etkili olan proteinlerin yıkımına sebep olan hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri araştırıldı. İzole edilen bileşiklerin enzim inhibisyonu üzerindeki etkileri Çizelge 3.13'te gösterilmektedir.

İzole edilen bileşiklerin enzim inhibisyonu üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde EC-1 bileşiğinin kolajenaz enzimini %32,61; elastaz enzimini %39,46; EC-2 bileşiğinin kolajenaz enzimini %38,05; elastaz enzimini %50,84; EC-3 bileşiğinin de kolajenaz enzimini %30,47; elastaz enzimini %41,25 oranında inhibe ettiği bulundu. İzole edilen bileşiklerin hyaluronidaz enzimini anlamlı ölçüde inhibe etmedikleri tespit edildi.

Çizelge 3.13. İzole edilen bileşiklerin hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzim inhibisyonu üzerindeki etkileri

Materyal	Konsantrasyon (µg/mL)	% Hyaluronidaz İnhibisyonu ± OSH	% Kolajenaz İnhibisyonu ± OSH	% Elastaz İnhibisyonu ± OSH
EC-1	50	11.79 ± 1.91	23.72 ± 2.01	22.18 ± 1.84
	100	19.35 ± 1.83	32.61 ± 1.45*	39.46 ± 1.79*
EC-2	50	15.62 ± 1.89	15.20 ± 1.79	26.37 ± 1.79
	100	23.48 ± 1.93	38.05 ± 1.51*	50.84 ± 1.41**
EC-3	50	13.48 ± 2.14	19.31 ± 1.62	23.59 ± 1.96
	100	22.14 ± 1.96	30.47 ± 1.41*	41.25 ± 1.81*
Tannik asit	100	82.18 ± 0.97***	-	-
Epigallokateşin gallat	100	-	43.29 ± 1.30**	81.26 ± 1.38***

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

3.4.2. Antienflamatuvar Aktivite Tayini Bulguları

Aktif tür seçimi amacıyla antienflamatuvar aktivitenin tespiti için, beş farklı *Euphorbia* türünden hazırlanan 3 farklı polaritedeki ekstrenin asetik asit nedenli kapiller permeabilite artışının inhibisyonu (Whittle Yöntemi) üzerindeki etkileri Bölüm 2.2.4.3.1’de anlatıldığı şekilde araştırıldı.

Çizelge 3.14’te gösterildiği gibi asetik asit nedenli kapiller permeabilitenin inhibisyonuna dayanan Whittle Yöntemi’nde *n*-hekzan, etil asetat ve metanollü ekstreler içinde en yüksek inhibitör etkiyi %38,81 oranı ile *E. macroclada* metanollü ekstresinin gösterdiği, *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinin de %34,74 ile yakın oranda etkili olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.14. *Euphorbia* türlerinden hazırlanan test numunelerinin Whittle yöntemi üzerindeki etkileri

Materyal	Ekstre	Doz (mg/kg)	Evans Blue Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ OSH	İnhibisyon (%)
Kontrol			12.29 $\pm$ 1.25	
<i>Euphorbia virgata</i>	<i>n</i> -Hekzan	100	12.41 $\pm$ 1.02	-
	EtOAc	100	11.85 $\pm$ 1.27	3.58
	MeOH	100	10.32 $\pm$ 1.21	16.03
<i>Euphorbia macroclada</i>	<i>n</i> -Hekzan	100	12.75 $\pm$ 1.33	-
	EtOAc	100	11.47 $\pm$ 1.39	6.67
	MeOH	100	7.52 $\pm$ 0.93	38.81***
<i>Euphorbia seguieriana</i> subsp. <i>seguieriana</i>	<i>n</i> -Hekzan	100	13.04 $\pm$ 1.76	-
	EtOAc	100	11.31 $\pm$ 1.49	7.97
	MeOH	100	10.75 $\pm$ 1.05	12.53
<i>Euphorbia characias</i> subsp. <i>wulfenii</i>	<i>n</i> -Hekzan	100	11.95 $\pm$ 1.34	2.77
	EtOAc	100	9.24 $\pm$ 0.85	24.82
	MeOH	100	8.02 $\pm$ 0.79	34.74**
<i>Euphorbia helioscopia</i>	<i>n</i> -Hekzan	100	10.99 $\pm$ 0.91	10.58
	EtOAc	100	9.91 $\pm$ 0.74	19.37
	MeOH	100	9.45 $\pm$ 1.02	23.11
Indometasin		10.0	6.81 $\pm$ 0.37	44.59***

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

Çizelge 3.15'te belirtildiği gibi, MEOH-2 fraksiyonunun diğer fraksiyonlardan daha fazla inhibisyon yaptığı belirlenmiştir. Yani diğer fraksiyonlara oranla plazmanın vücut boşluklarına eksudasyonunu daha fazla engellemektedir ki bu yara iyileşmesinde istenen bir durumdur. Bu modelde biyolojik olarak en aktif fraksiyonun MEOH-2 olduğu göze çarpmaktadır.

Çizelge 3.15. Birleştirilen fraksiyonlardan hazırlanan test numunelerinin Whittle yöntemi üzerindeki etkileri

Materyal	Doz (mg/kg)	Evans Blue Konsantrasyonu (µg/mL) ± OSH	İnhibisyon (%)
Kontrol		11.05 ± 1.39	
MEOH-1	100	7.83 ± 1.45	29.14*
MEOH-2	100	6.71 ± 1.71	39.28**
MEOH-3	100	8.19 ± 1.68	25.88*
MEOH-4 + MEOH-5	100	12.35 ± 1.86	-
MEOH-6 +MEOH-7	100	11.63 ± 1.99	-
Indometasin	10.0	5.30 ± 1.47	52.04***

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

Antienflamatuvar aktivite deneyinde elde edilen sonuçların, yara iyileştirici aktivite sonuçlarıyla paralellik gösterdiği tespit edildi. Tüm *in vivo* deney sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde, biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama işlemine *E. characias* subsp. *wulfenii* metanol ekstresi ile devam etmenin uygun olduğu bir kez daha doğrulandı.

4. TARTIŞMA

İnsanlığın varoluşundan bu yana hastalıklardan korunmada ve hastalıkların tedavisinde bitkiler ilk başvurulacak kaynaklar olmuştur. Günümüzde yapılan araştırmalar halen insanların %80'inin hastalık durumunda ilk başvurdukları tedavi materyalinin bitkiler olduğunu göstermektedir (Mittal ve ark., 2013).

Bitkiler içerdikleri aktif metabolitler nedeniyle kuvvetli fizyolojik ve biyolojik etki gösterirler. Bu bileşiklerden, bitkiden izole edilerek saf halde yararlanılabildiği gibi, doğrudan bitkinin veya bitkiden elde edilen ekstrenin kullanılması yoluyla da tedavide yararlanılır (Altundağ ve Öztürk, 2011).

Etnobotanik çalışmalarla elde edilen bulguların ışığında bitkilerin tedavideki önemi artmıştır. Son yıllarda, sentetik kimyasal ürünlerin yanı sıra, bitkisel kaynaklı ürünler de gıda takviyesi, bitkisel ilaç veya ilaçların içeriğine katılan etkili bileşiklerin kaynağı olarak geniş bir pazar payına sahiptir (Schmidt ve ark., 2008).

Bitkisel ürünlerin piyasadaki öneminin artması, halkın tedavi ve koruyucu amaçlarla bu ürünleri kullanması bilimsel olarak oldukça değerli olan bu bilgileri, ekonomik açıdan da önemli kılmış, halk sağlığı açısından da bitkiler üzerinde yapılan bilimsel çalışmaların artırılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Bitkisel kaynaklar ile en sık tedavi edilen hastalıkların başında yaralar ve enflamasyon hastalıkları gelmektedir. Antienflamatuvar etkili ve yara iyileştirici yeni ilaçların keşfinde en önemli kaynak, geleneksel tedavide kullanılan bitkilerden elde edilen verilerdir (Erdemoğlu ve ark., 2003).

İnsanlar kullanım kolaylığı, güvenilir olması ve yan etkilerinin konvansiyonel ilaçlara nazaran daha az olması nedeniyle bitkileri yara iyileştirici olarak tercih etmektedir (Mittal ve ark., 2013 ve Suguna ve ark., 2002).

Sağlık harcamalarında yara iyileşmesi için harcanan bütçe oldukça fazladır. Özellikle kronik yaralar, pek çok ülkede büyük sağlık sorunları arasında gösterilmektedir. Avrupa’da ve dünyada akut yaralar cerrahi bakım, antiseptikler ve antienflamatuvar ilaçlarla rutin olarak tedavi edilirken, kronik yaraların iyileştirilmesi tüm dünyada halen büyük bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (Wang ve ark., 2013). Yara iyileşmesinin sağlanması fiziksel olarak gerekli olduğu kadar özellikle kronik yaralar, hastaların psikolojik ve sosyal yaşantısını da olumsuz yönde etkilemektedir. Kronik yaralara eşlik eden enflamasyon ve ağrılar da hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle bilim dünyası mevcut konvansiyonel ilaçların yanında yeni ilaçların keşfinde umut olabilecek ve semptomların giderilmesinde kullanılabilecek bitkisel ürünlerin yara iyileştirici etkilerini araştırmaktadır (Menke ve ark., 2007).

Yaraların iyileştirilmesinde kilit rol oynayan enflamasyon inhibisyonu ile cilt üzerinde, bazı organlarda veya eklemlerde oluşan fiziksel ve kimyasal etmenlere bağlı yaraların iyileştirilmesinde kullanılan *Euphorbia* türlerinin antienflamatuvar ve yara iyileştirici etkilerinin kanıtlanmış olması, üzerinde yeterli çalışma bulunmayan; ancak aynı ya da benzer etkin madde gruplarını taşıyan diğer *Euphorbia* türlerini de yara iyileştirici aktivite açısından araştırılmaya değer ve önemli kılmaktadır. Bu nedenle halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılan *E. macroclada*, *E. seguieriana* subsp. *seguieriana*, *E. virgata*, *E. characias* subsp. *wulfenii* ve *E. helioscopia* türleri çalışma konusu olarak seçilmiştir.

Yara iyileşmesi biyokimyasal ve hücrel reaksiyonları kapsayan, enflamasyonla başlayıp onarım ve remodeling ile tamamlanan karmaşık bir süreçtir. Yara iyileşmesi sürecini başlatan ve diğer faktörleri yöneten ana hücreler makrofajlardır. Makrofajlar çeşitli kimyasal faktörlerin salınmasını sağlar, bu kimyasal faktörler de fibroblast ve kolajen yapımını harekete geçirerek yara iyileşmesini başlatırlar (Sadaf ve ark., 2006). Fibroblast proliferasyonu artar ve kolajen sentezi hızlanır. Yara izi oluşum süreci yeni damarların meydana gelmesi ve yara kontraksiyonu ile devam eder (Özkorkmaz ve Özay, 2009). Kolajen miktarı ve yara kontraksiyonunun değerlendirilmesi yara iyileşmesinin ne ölçüde gerçekleştiğinin göstergesidir. Bu

doğrultuda yara iyileştirici aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla iki farklı *in vivo* deney modeli (çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon yara modeli) kullanıldı. Bu modellerden biri epitel oluşumunda rol oynayarak yara iyileşmesini sağlayan kolajen oluşumu ve yaranın sağlamlığı hakkında bilgi veren, sıçanlarda uygulanan çizgisel insizyon yara modelidir. Hayvanların sırt kısımlarında oluşturulan insizyon yaralara 10 gün boyunca test numuneleri uygulanarak yaralar tedavi edildi. Ardından yaralardaki gerilme kuvveti ölçüldü. Gerilme kuvvetindeki artış yarada daha fazla iyileşme görüldüğünün göstergesi olarak değerlendirildi (Lodhi ve ark., 2006 ve Suguna ve ark., 2002). Yara dokusunda iyileşme için gerekli olan matriks proteinlerinden kolajenin, miktarının tayini için de kolajeni oluşturan aminoasit olan hidroksiprolinin miktarı ölçüldü. Hidroksiprolin miktarının yüksek olması kolajen miktarının fazlalığının, yani yarada daha iyi iyileşme görüldüğünün göstergesidir (Değim ve ark., 2002 ve Woessner, 1961). Bir diğer model olan dairesel eksizyon yara modelinde farelerin sırt kısımlarında oluşturulan dairesel yaralara 12 gün boyunca test numuneleri uygulanarak yaralarda oluşan kontraksiyon ile yara alanındaki küçülme oranı tespit edildi. En fazla küçülmenin görüldüğü gruplar en iyi yara iyileşmesinin olduğu gruplar olarak değerlendirildi (Sadaf ve ark., 2006). Yara iyileşmesinde erken dönemde gerekli olan enflamasyon evresinin uzaması sonucu endotel zedelenmesi ve doku hasarı oluşmaktadır. Ekstrelerin erken dönemde enflamasyonu ne oranda gerilettiğinin tespiti için asetik asit ile oluşturulan kapiller permeabilite artışının test numuneleri tarafından inhibisyonu araştırıldı. İnhibisyonun yüksek olması antienflamatuvar aktivitenin o oranda yüksek olduğunun göstergesi olarak değerlendirildi (Whittle, 1964).

Biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama için, çalışma konusu olarak seçilen beş farklı *Euphorbia* türünden yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktivite açısından en etkili olanını tespit etmek amacıyla ön tarama çalışmaları yapıldı. Ön tarama çalışmaları için beş *Euphorbia* türünden bitkisel posa, her defasında daha polar olan çözücüyle ekstre edilmek suretiyle hazırlanan farklı polaritedeki ekstrelerin, yara modelleri üzerindeki etkileri ve antienflamatuvar aktiviteleri değerlendirildi.

İnsizyon yara modelinde yara gerilimindeki en yüksek artışı *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinin sağladığı ve hidroksiprolin miktarının da aynı ekstre ile tedavi edilen dokularda diğer ekstre gruplarına oranla daha yüksek olduğu tespit edildi (Çizelge 3.8). Eksizyon yara modelinde, yara alanında 10. gün sonunda en yüksek oranda küçülmeyi en yüksek oranda yara kontraksiyonu oluşturan *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinin sağladığı görüldü (Çizelge 3.9).

Asetik asit nedenli kapiller permeabilitenin artışının inhibe edilerek yara bölgesinde plazma eksudasyonunun önlenmesi ve böylece iltihabın kronikleşerek yara iyileşmesinin gecikmesini engelleyen antienflamatuvar aktivitenin test edildiği çalışmada *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinin aynı dozda *E. macroclada* metanollü ekstresinden sonra ikinci en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edildi (Çizelge 3.14).

Ön tarama çalışmaları sonunda yara modelleri ve antienflamatuvar aktivite test sonuçlarının paralellik gösterdiği dikkate alındığında *E. characias* subsp. *wulfenii* metanollü ekstresinin en güçlü yara iyileştirici aktiviteye sahip ekstre olduğu görülmektedir. Bu nedenle aktif bileşiklerin izolasyon çalışmalarına bu ekstre ile devam edilmesine karar verildi.

Kromatografik profilleri benzeyen bileşikler bir arada olacak şekilde gruplandırılan fraksiyonlardan MEOH kodlu yeni fraksiyon grupları oluşturuldu. Bu fraksiyonlar biyolojik aktivite testleri ile yeniden test edilerek etkiye sebep olan bileşiklerin hangi fraksiyon grubunda yer aldığı tespit edildi. İnsizyon yara modeli ile test edilen ekstrelerden, MEOH-2 fraksiyonu diğer fraksiyonlardan daha fazla yara gerilim kuvveti oluşturmaktadır. Aynı şekilde hidroksiprolin miktarı da bu ekstrede diğer ekstrele göre daha yüksek orandadır. Yani diğer fraksiyonlara oranla yarada daha fazla iyileşme sağlamaktadır (Çizelge 3.10). Bu sonuca paralel olarak eksizyon yara modelinde de, MEOH-2 fraksiyonu diğer fraksiyonlardan daha yüksek oranda yara kontraksiyonu oluşturarak yara alanında daha fazla küçülmeye neden olmaktadır (Çizelge 3.11).

Asetik asit nedenli kapiller permeabilite artışını en yüksek oranda inhibe eden grubun yine MEOH-2 fraksiyon grubu olduğu görülmektedir (Çizelge 3.15).

Test numuneleri ile tedavi edilen yaralardan alınan doku örneklerinin histopatolojik incelemeleri sonucunda, iyileşmenin orta derecede görüldüğü gruplarda epitelizasyonun kısmen tamamlandığı, dermal bölgelerde makrofajların olduğu hücresel yapılar görülmektedir. Epidermal ve dermal re-modelleme, re-epitelizasyon açısından en düzgün iyileşmenin gözlemlendiği grupların referans gruptan (Madecassol®) sonra *E. characias* subsp. *wulfenii* metanol ekstresi ile bu ekstrenin fraksiyonlanması ile oluşturulan ve aktivite testleri sonrasında etkili bulunan MEOH-2 fraksiyonu ile tedavi edilen dokular olduğu tespit edildi. Bu dokularda epitelizasyonun tamamlandığı ve dermal bütünlüğün büyük ölçüde sağlandığı görülmektedir (Çizelge 3.12 ve Şekil 3.48). Histopatolojik inceleme bulguları yara iyileştirici aktivite sonuçları ile de paralellik göstermektedir.

Tüm biyolojik aktivite sonuçları değerlendirildiğinde *E. characias* subsp. *wulfenii*'den elde edilen MEOH-2 fraksiyonunun en güçlü yara iyi edici aktiviteye sahip fraksiyon olduğu ve saf maddelerin izolasyonu işlemine MEOH-2 fraksiyonu ile devam edilmesinin uygun olduğuna karar verildi.

Biyolojik olarak en aktif fraksiyon olan MEOH-2'den, kromatografik teknikler ile bileşiklerin saflaştırılması işlemi gerçekleştirildi. İzole edilen saf maddelerin YPSK ile saflık kontrolleri yapıldıktan sonra LC/MS, ¹H-NMR ve ¹³C-NMR yanında iki boyutlu NMR teknikleri ile (DEPT, HMBC, HSQC, NOESY, COSY, TOCSY) yapı tayinleri gerçekleştirildi.

Yapı tayini çalışmaları sonunda aktif fraksiyonlardan izole edilen bileşiklerin kersetin-3-O-ramnozit (kersitrin), kersetin-3-O-galaktozit (hiperozit) ve kersetin-3-O-arabinozit olduğu belirlenmiştir.

Biyolojik aktivite çalışmaları, izole edilen üç bileşik üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* deneyler ile tamamlandı. Ekstraselüler matriks proteinlerinden kolajen, hücrelere destekleyici iskelet oluşturan yapısal ve dominant bir proteindir (Rasik ve ark., 1999). Elastin, doku için gerekli esnekliği, hyaluronik asit ise suyun tutulmasına neden olarak nem dengesini sağlar. Hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz, ekstraselüler matriks proteinlerinin enzimatik yıkımına neden olan enzimlerdir. Bu enzimler enflamasyon ve yaralanma gibi durumlarda bağ doku makromoleküllerinin kontrolsüzce yıkımına, dolayısıyla yara iyileşmesinde gecikmeye neden olarak, kronik yaraların patofizyolojisinde önemli rol oynarlar (Menke ve ark., 2007 ve Sahasrabudhe ve Deodhar, 2010). Yapılan çalışmalar kronik yaralardaki metalloproteinazların miktarının fazla olduğunu, bu nedenle bu enzimlerin düşük seviyede tutulmasının yara iyileşmesi için gerekli olabileceğini göstermektedir (Edwards ve ark., 2004). Çalışmamızda yara iyileştirici aktivite gösteren fraksiyondan izole edilen maddelerin hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimi üzerindeki inhibitör etkileri değerlendirildiğinde, bileşiklerin kolajenaz ve elastaz enzimi üzerinde inhibitör etki gösterdiği, anca hyaluronidaz enzimi üzerinde anlamlı derecede inhibitör etkiye sahip olmadıkları tespit edildi (Çizelge 3.13). Yapılan diğer çalışmalar da kersetin ve glikozitlerinin ekstraselüler matriks proteinlerini yıkan enzimler üzerinde inhibitör aktivite gösterdiğini belirtmektedir. *Curcuma longa* L. ve *Vitis vinifera* L.'den izole edilen flavonoidlerden kersetin glikozitlerinin elastaz enzimi üzerinde inhibitör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Yine *Achillea millefolium* L. ve *Acacia catechu* Willd.'dan izole edilen flavonoidlerin de elastaz enzimini 100 µg/mL konsantrasyonda %50'den fazla inhibe ettiği bildirilmiştir (Sahasrabudhe ve Deodhar, 2010).

Bitkiler içerdikleri çok çeşitli etken maddeler sayesinde, yara iyileşmesinin farklı mekanizmalarını etkileyerek doku onarımında rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar bitkilerdeki sekonder bileşiklerin yara iyileştirici etkileri olduğunu ve bu amaçla geliştirilecek yeni ilaçlar için iyi birer kaynak olabileceğini göstermektedir (Wang ve ark., 2013).

Çalışmamızda aktif fraksiyondan flavonoit glikoziti üç bileşik izole edilmiştir. Literatürde *Euphorbia* türlerinin ve başka bitkilerden elde edilen flavonoit yapısında bileşiklerin yara iyileştirici aktivitesi olduğu belirtilmektedir.

Yapılan bir çalışmada *E. heterophylla* yapraklarından elde edilen etanollü ekstrelerin ve *E. neriifolia* lateksinden elde edilen sulu ekstrelerin eksizyon yara modelleri üzerinde yara iyileştirici aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Flavonoitlerin bu etkiden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Yapılan diğer çalışmalar flavonoitlerin lipit peroksidasyonunu inhibe ettiğini, damar oluşumunu artırdığını, kolajen sentezini stimüle ettiğini, astrenjan ve antimikrobiyal etkileri sayesinde yara kontraksiyonu ve epitelizeasyonunu artırarak yara iyileşmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Ghosh ve Gaba, 2013 ve Mittal ve ark., 2013). Polifenolik bileşiklerin, özellikle flavonoitler ve glukozitlerinin yara enfeksiyonuna karşı etkili olduğu ve keratinosit proliferasyonunu uyardığı tespit edilmiştir, ayrıca ekstraselüler matriks proteinlerinden kolajenin yapımını hızlandırdığı ve fibroblast farklılaşmasını sağlayarak doku onarımına yardımcı olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark., 2013).

Çalışmamızda izole edilen flavonoit glikozitlerinin yara modelleri üzerindeki pozitif etkileri ve *in vitro* enzim inhibisyonu üzerindeki olumlu sonuçları, bu maddelerin yara iyileşme mekanizmasında etkili olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile uyumludur.

Yapılan çalışmalar kersetin glikozitlerinin yara iyileştirici etkileri olduğunu göstermektedir. Süntar ve ark. (2010), yaptıkları bir çalışmada Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılan *Sambucus ebulus* L. bitkisinin yara iyileştirici aktivitesini araştırmışlardır. Biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama çalışması ile aktif fraksiyondan kersetin-3-O-glikozit izole etmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada *Salvia leucantha*’dan izole edilen kersetin-3-O-ramnozit-2-gallat sıçanlarda eksizyon yara modeli üzerinde yara iyileştirici aktivite göstermiştir. Flavonoit glikoziti 16. günün sonunda anlamlı ölçüde yara

kontraksiyonu göstermiştir. Referans grup ile tedavi edilen yara alanı 18,93 mm² iken 200 mg/kg dozda flavonoit glikozidi ile tedavi edilen grupta yara alanı 31,50 mm² olarak ölçülmüştür (Manivannan ve ark., 2014). Çalışmamızda elde ettiğimiz biyolojik aktivite sonuçları ve literatür bilgisi de, izole ettiğimiz ve bitkideki oranı diğer maddelere göre daha yüksek olan, kersetin-3-O-glikozitlerinin etkiden sorumlu bileşikler olabileceği düşüncesini desteklemektedir.

Biyolojik olarak aktif bulunan *E. characias* subsp. *wulfenii* türünden izole edilen bileşiklerin bitkideki miktarlarının tayini için YPSK analizleri gerçekleştirildi ve yöntemin validasyonu yapıldı. Miktar tayini için izole edilen maddelerden 0,1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltiler hazırlandı. Her bir stok çözelti metanol ile seyreltilerek 0,005-0,1 mg/mL aralığında 6 dilüsyon üçer kez enjekte edilerek pik alanlarına karşı konsantrasyon verilerini içeren kalibrasyon grafikleri her bir saf madde için ayrı ayrı oluşturuldu. Bitkiden hazırlanan 500 mg/100 mL konsantrasyondaki metanollü ekstre de 3'er kez enjekte edilerek kromatogramdaki saf maddelerin pik alanları tespit edildi. Bitki ekstresinden alınan saf maddelere ait pik alanları her bir saf madde için oluşturulan kalibrasyon denklemlerinde 'y' değeri yerine koyularak miktar tayinleri gerçekleştirildi. *E. characias* subsp. *wulfenii*'de en yüksek oranda bulunan madde %1,22 ile kersetin-3-O-ramnozit olarak tespit edildi. İzole edilen diğer maddelerden kersetin-3-O-galaktozit miktarı %0,35 ve kersetin-3-O-arabinozit miktarı ise %0,11 olarak tespit edildi (Çizelge 3.3).

Elde edilen ekstre kromatogramı değerlendirildiğinde (Şekil 3.13), *E. characias* subsp. *wulfenii*'nin içeriğinde en yüksek oranda bulunan maddelerin, aktif fraksiyondan izole ettiğimiz maddeler olduğu görülmektedir. Bu veriler biyolojik aktivite bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde, *E. characias* subsp. *wulfenii*'nin yara iyileştirici aktivitesinin izole edilen bileşiklerden kaynaklandığı düşüncesini desteklemektedir.

İzole edilen maddelerin miktar tayininin yapıldığı bitkisel materyalden hazırlanan ekstredeki pik alanları ve miktarları, en düşük ve yüksek standart madde

konsantrasyonu noktalarından oluşan aralıktadır. Kalibrasyon grafiğinde doğrunun eğim (m) ve korelasyon katsayısı (r^2) doğrusallığı veren parametrelerdir. r^2 değerinin 1'e yakın olması gerekir. Elde edilen kalibrasyon doğrularına ait r^2 değerlerinin 1'e çok yakın olması okunan pik alanlarından bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar olduğunu göstermektedir (izelge 3.4, şekil 3.9-3.11).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye’de yetişen *Euphorbia* türleri üzerinde yapılan çalışmaların daha çok etnobotanik ve fitokimyasal çalışmalar olduğu görülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda bu bitkilerin çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiş; ancak bu kullanımlara temel oluşturan kimyasal bileşiklere yönelik yeterli çalışma yapılmamıştır. Yapılan çalışmalarda kullanılan *Euphorbia* türleri genellikle çalışmanın yapıldığı bölgede yetişen türler ile sınırlı kalmıştır.

Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici olarak kullanımı olan ve bilimsel çalışmalarla desteklenmeyi bekleyen, üzerinde sınırlı aktivite çalışması olan ya da henüz çalışılmamış türler çalışma konumuz olarak seçilmiştir.

Yapılan etnobotanik çalışmalar ışığında bazı *Euphorbia* türlerinin yara iyileştirici olarak kullanımı olduğu tespit edilmiş; ancak etkiye sebep olan kimyasal bileşiklerin izolasyonuna kadar giden, biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama çalışması tarafımızdan ilk kez yapılmıştır.

Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılan bazı *Euphorbia* türleri üzerinde biyolojik aktivite testleri, aktif tür üzerinde ekstreden başlayıp etkiden sorumlu saf madde izolasyonuna kadar giden ve izole edilen bileşiklerin miktar tayinlerini içeren böyle bir çalışmanın olmaması, çalışmamızın kapsamlı olduğunu ve orijinalliğini göstermektedir.

Bu çalışma ile, bitkilerin halk arasında kullanımı, kimyasal bileşikleri açısından bilimsel temellere oturtulmuş ve yine halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılan *E. characias* subsp. *wulfenii* türünden etkiden sorumlu üç bileşik olan kersetin-3-O-ramnozit (kersitrin), kersetin-3-O-galaktozit (hiperozit) ve kersetin-3-O-arabinozit izole edilmiştir. Böylece, *Euphorbia* türleri üzerinde yapılan diğer çalışmalardan

farklı olarak, bu türün halk arasındaki kullanımının temel dayanağı bilimsel olarak aydınlatılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalar gerek diğer *Euphorbia* türlerinin, gerekse de kersetin türevlerinin yara iyileştirici aktivitesi olduğunu göstermektedir. Deneyler sonunda elde ettiğimiz bulgular ve literatür verileri çalışma konusu olarak seçtiğimiz *E. characias* subsp. *wulfenii*'nin yara iyileştirici olarak etkili olduğunu göstermektedir.

Yapılan prelinik çalışmalar diğer *Euphorbia* türlerinin de aynı ya da benzer etkileri olabileceğini düşündürmekte ve yeni geliştirilecek ilaçlara kaynak olabilmesi için çalışmaların artırılması gerektiğine işaret etmektedir. Yapılan çalışmalar dikkate alındığında antienflamatuvar ve yara iyileştirici etkinin, üzerinde bu konuda çalışma yapılmayan türler için daha detaylı irdelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Halk arasındaki kullanımından yola çıkılarak çalışma konusu dışında kalan diğer *Euphorbia* türlerinin de böyle bir potansiyeli olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

ÖZET

Türkiye’de Halk Arasında Yara İyileştirici Olarak Kullanılan Bazı *Euphorbia* L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

Bu çalışmada, ülkemizde bazı türleri halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılan *Euphorbia* cinsine ait beş tür seçilmiş ve aktif bileşikleri izole etmek için biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama metodu kullanılmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, *E. macroclada*, *E. seguieriana* subsp. *seguieriana*, *E. characias* subsp. *wulfenii*, *E. virgata* ve *E. helioscopia* türlerinin toprak üstü kısımlarından sıralı olarak hazırlanan *n*-hekzan, etil asetat ve metanol ekstralarının yara iyileştirici ve antienflamatuvar etkileri test edildi. Yara iyileştirici aktivite tayini için çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon yara modelleri ile hidroksiprolin tayin metodu kullanıldı. Antienflamatuvar aktivite tayini için akut enflamasyon modellerinden olan asetik asit nedenli kapiller permeabilitenin artışının inhibisyonu (Whittle yöntemi) metodu kullanıldı. Hazırlanan ekstralar arasında, yara iyileştirici aktivitesi en yüksek olan *E. characias* subsp. *wulfenii* metanol ekstresi, etkili bileşiklerin izolasyonu için kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrıldı. Elde edilen fraksiyonların biyolojik aktivite tayin sonuçları değerlendirildi ve aktif olduğu tespit edilen fraksiyonda izolasyon ve saflaştırma işlemlerine devam edildi.

Kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi kromatografik yöntemlerden yararlanılarak, aktif bileşikler aktif fraksiyondan izole edildi. İzole edilen üç bileşiğin, çeşitli spektroskopik yöntemler yardımıyla yapı tayinleri gerçekleştirildi. İzole edilen bileşiklerin, kersetin-3-*O*-ramnozid (kersitrin), kersetin-3-*O*-galaktozid (hiperozit) ve kersetin-3-*O*-arabinozit olduğu tespit edildi. Bu bileşiklerin yara iyileşmesini geciktiren enzimler olan hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri üzerindeki inhibisyonları test edildi, üç bileşiğin de kolajenaz ve elastaz enzimlerini anlamlı ölçüde inhibe ettiği tespit edildi.

Aktif fraksiyondan izole edilen üç bileşiğin bitkideki miktarları, yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak ölçüldü. Saf maddelerden hazırlanan dilüsyonlar ile kalibrasyon denklemi oluşturuldu ve *E. characias* subsp. *wulfenii*’den hazırlanan total ekstrede miktar tayini gerçekleştirildi. Bitkinin %1.22 kersitrin, %0,35 hiperozit ve %0,11 oranında kersetin-3-*O*-arabinozit taşıdığı tespit edildi. Analitik yöntemin validasyonu doğruluk, kesinlik, teşhis sınırı ve tayin sınırı parametreleriyle gerçekleştirildi.

Anahtar Sözcükler : Antienflamatuvar aktivite, Biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama, İzolasyon, Kersetin türevleri, Yara iyileştirici aktivite.

SUMMARY

Pharmacognostical Investigations on Some *Euphorbia* L. Species Used Traditionally as Wound Healer in Turkey

In this study, five species have been selected from *Euphorbia* species, of which some species are used traditionally as wound healer in our country, and bioactivity-guided fractionation method has been used to isolate the active compounds.

In line with this purpose, wound healing and anti-inflammatory effects of *n*-hexane, ethyl acetate, and methanol extracts, which were successively prepared from aerial parts of *E. macroclada*, *E. sequieriana* subsp. *sequieriana*, *E. characias* subsp. *wulfenii*, *E. virgata* and *E. helioscopia* species were tested. For wound healing activity assay, linear incision and circular excision wound models, and hydroxyproline assay method were used. For anti-inflammatory activity assay, an acute inflammation model, namely acetic acid induced capillary permeability increase inhibition method (Whittle method) was used. *E. characias* subsp. *wulfenii* methanol extract, which was the extract with highest wound healing activity among extracts prepared, were separated into its fractions by column chromatography for isolation of efficient compounds. Biological activity of the fractions were assessed and further isolation and purification processes have been carried out in the active fraction.

Active compounds were isolated from active fraction by utilizing chromatographic methods such as column chromatography, thin layer chromatography, and high performance liquid chromatography. Structure elucidations of the isolated three compounds were performed by various spectroscopic methods. The isolated compounds were detected as quercetin-3-*O*-rhamnoside (quercitrin), quercetin-3-*O*-galactoside (hyperoside), and quercetin-3-*O*-arabinoside. The inhibition effects of these compounds on hyaluronidase, collagenase, and elastase enzymes which delay wound healing, were tested and, it was detected that all three compounds significantly inhibited collagenase and elastase enzymes.

The amounts of three compounds, isolated from the active fraction, in the plant were determined by using high performance liquid chromatography. Calibration equation was calculated with dilutions, prepared from pure substances, and assay was performed in total extract, prepared from *E. characias* subsp. *wulfenii*. It was detected that the plant had 1.22% quercitrin, 0.35% hyperoside, and 0.11% quercetin-3-*O*-arabinoside. The validation of the analytical method was performed by linearity, precision, limit of detection, and limit of quantification parameters.

Key Words: Anti-inflammatory activity, Bioactivity-Guided Fractionation, Isolation, Quercetin derivatives, Wound healing activity.

KAYNAKLAR

- ABDELGALEIL SAM, EI-ASWAD AF, NAKATANI M (2002). Molluscicidal and anti-feedant activities of diterpenes from *Euphorbia paralias* L. *Pest. Manag. Sci.*, **58**: 479-482.
- ADEDAPO AA, ABATAN MO, AKINLOYE AK, IDOWU SO, OLORUNSOGO OO (2003). Morphometric and Histopathological Studies on the Effects of Some Chromatographic Fractions of *Phyllanthus amarus* and *Euphorbia hirta* on the Male Reproductive Organs of Rats. *J. Vet. Sci.*, **4(2)**: 181-185.
- ADEROGBA MA, NDHLALA AR, RENGASAMY KRR, VAN STADEN J (2013). Antimicrobial and Selected *In vitro* Enzyme Inhibitory Effects of Leaf Extracts, Flavonols and Indole Alkaloids Isolated from *Croton menyharthii*. *Molecules*, **18**: 12633-12644.
- 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. *Journal of Ethnopharmacology*, **84**: 211-227.
- AHMAD VU, HUSSAIN H, BUKHARI IA, HUSSAIN J, JASSBI AR, DAR A (2005). Antinociceptive diterpene from *Euphorbia decipiens*. *Fitoterapia*, **76**: 230-232.
- AHMAD SF, ATTIA SM, BAKHEET SA, ASHOUR AE, ZOHEIR KMA, ABD-ALLAH ARA (2014). Anti-inflammatory effect of *Euphorbia hirta* in an adjuvant-induced arthritic murine model. *Immunological Investigations*, **43(3)**: 197-211.
- AHMED ES, AL-ZANBAGI NA (2006). Mammal Toxicity and Mutagenicity Assessment of the Methanol Extract of the Molluscicidal Plant *Euphorbia schimperiana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **9(10)**: 1911-1916.
- AJOSE FOA (2007). Some Nigerian plants of dermatologic importance. *International Journal of Dermatology*, **46(1)**: 48-55.
- AKHGAR MR, RAJAEI P, AIEEN S (2014). Constituents of the essential oil of *Euphorbia hebecarpa*. *Chemistry of Natural Compounds*, **50(5)**: 929-930.
- AKIHISA T, WIJERATNE EMK, TOKUDA H, ENJO F, TORIUMI M, KIMURA Y, KOIKE K, NIKAIDO T, TEZUKA Y, NISHINO H (2002). Eupha-7,9(11),24-trien-3 β -ol ("Antiquol C") and Other Triterpenes from *Euphorbia antiquorum* Latex and Their Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation. *J. Nat.Prod.*, **65**: 158-162.

- ALJANCIC IS, PESIC M, MILOSAVLJEVIC SM, TODOROVIC NM, JADRANIN M, MILOSAVLJEVIC G, POVRENOVIC D, BANKOVIC J, TANIC N, MARKOVIC ID, RUZDIJIC S, VAJS VE, TESEVIC VV (2011). Isolation and Biological Evaluation of Jatrophone Diterpenoids from *Euphorbia dendroides*. *Journal of Natural Products*. **74**: 1613-1620.
- AL-SULTAN SI, HUSSEIN YA (2006). Acute Toxicity of *Euphorbia helioscopia* in Rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, **5(2)**: 135-140.
- ALTUNDAĞ E, ÖZTÜRK M (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Social and Behavioral Sciences*, **19**: 756-777.
- AMIRGHOFRAAN Z, BAHMANI M, AZADMEHR A, JAVIDNIA K (2006). Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **132**: 427-432.
- ANUSUYA N, RAJU K, MANIAN S (2010). Hepatoprotective and toxicological assessment of an ethnomedicinal plant *Euphorbia fusiformis* Buch.-Ham.ex D. Don. *Journal of Ethnopharmacology*, **127**: 463-467.
- APPENDINO G, JAKUPOVIC S, TRON GC, JAPOVIC J, MILON V, BALLERO M (1998). Macrocyclic Diterpenoids from *Euphorbia semiperfoliata*. *J. Nat. Prod.* **61**: 749-756.
- APPENDINO G, BELLORO E, TRON GC, JAKUPOVIC J, BALLERO M (2000). Polycyclic diterpenoids from *Euphorbia characias*. *Fitoterapia*, **71**: 134-142.
- ARSLANTAŞ MK (2007). İskemik Yara Tedavisinde Eritropoetin Etkinliği. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- AVILA L, PEREZ M, SANCHEZ-DUFFHUES G, HERNANDEZ-GALAN R, MUNOZ E, CABEZAS F, QUINONES W, TORRES F, ECHEVERRI F (2010). Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. *Phytochemistry*, **71**: 243-248.
- BAKHSHI GD, LANGADE DG, DESAI VS (2008). Prospective, Open Label Study of *Euphorbia prostrata* Extract 100 mg in the Treatment of Bleeding Haemorrhoids. *Bombay Hospital Journal*, **50(4)**: 577-583.
- BALACH IB, BALACH MK, SAQIB QN (2008). Anti-tumor 12-deoxyphorbol esters from *Euphorbia cornigera*. *European of Medicinal Chemistry*, **43**: 274-281.
- BALACH IB, BALACH MK (2010). Irritant and co-carcinogenic diterpene esters from the latex of *Euphorbia cauducifolia* L. *Journal of Asian Natural Products Research*, **12(7)**: 600-613.

- BANI S, CHAND D, SURI KA, SURI OP, SHARMA OP (1996). Antiinflammatory Effects of an Ethyl Acetate Extract of *Euphorbia royleana*. *Phytotherapy Research*, **10**: 285-291.
- BANI S, SURI KA, SURI OP, SHARMA OP (1997). Analgesic and Antipyretic Properties of *Euphorbia royleana* Latex. *Phytotherapy Research*, **2**: 597-599.
- BANI S, KAUL A, JAGGI BS, SURI KA, SURI OP, SHARMA OP (2000). Anti-inflammatory activity of the hydrosoluble fraction of *Euphorbia royleana* latex. *Fitoterapia*, **71**: 655-662.
- BANI S, KAUL A, KHAN B, AHMAD SF, SURI KA, SATTI NK, AMINA M, QAZI GN (2005). Immunosuppressive properties of an ethyl acetate fraction from *Euphorbia royleana*. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**:185-192.
- BARILE E, LANZOTTI V (2007). Biogenetical Related Highly Oxygenated Macrocyclic Diterpenes from Sea Spurge *Euphorbia paralias*. *Organic Letters*, **9(18)**: 3603-3606.
- BARILE E, FATTORUSSO E, IALENTI A, IANARO A, LANZOTTI V (2007). Paraliane and pepluane diterpenes as anti-inflammatory agents: First insights in structure–activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **17**: 4196-4200.
- BARLA A, BİRMAN H, KÜLTÜR Ş, ÖKSÜZ S (2006). Secondary Metabolites from *Euphorbia helioscopia* and Their Vasodepressor Activity. *Turk. J. Chem.*, **30**: 325-332.
- BARLA A, ÖZTÜRK M, KÜLTÜR Ş, ÖKSÜZ S (2007). Screening of antioxidant activity of three *Euphorbia* species from Turkey. *Fitoterapia*, **78**: 423-425.
- BARRANTES E, GUINEA M (2003). Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Sciences*, **72**: 843-50.
- BASMA AA, ZAKARIA Z, LATHA LY, SASIDHARAN S (2011). Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 386-390.
- BATTU GR, ETHADI SR, PRIYA VG, PRIYA SK, CHANDRIKA K, RAO VA, REDDY SO. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of *Euphorbia heyneana* Spreng. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **(201)**: 191-194.
- BAYTOP T (1999). Türkiye’de bitkilerle tedavi. Geçmişte ve bugün. İlaveli 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri.
- BELDON P (2010). Basic Science of Wound Healing. *Surgery*, **28(9)**: 409-412.
- BIGONIYA P, RANA AC (2007). Wound healing activity of *Euphorbia neriifolia* leaf ethanolic extract in rats. *Journal of Natural Remedies*, **7(1)**: 94-101.

- BIGONIYA P, RANA AC (2010). Protective effect of *Euphorbia neriifolia* saponin fraction on CCl₄-induced acute hepatotoxicity. *African Journal of Biotechnology*, **9(42)**: 7148-7156.
- BRUNI R, MUZZOLI M, BALLERO M, LOI MC, FANTIN G, POLI F, SACCHETTI G (2004). Tocopherols, fatty acids and sterols in seeds of four Sardinian wild *Euphorbia* species. *Fitoterapia*, **75**: 50-61.
- BRUSSEL DE (2004). Medicinal Plants of Mt. Pelion, Greece. *Economic Botany*, **58**: 174-202.
- CATENI F, ZILIC J, ALTIERI T, ZACCHIGNA M, PROCIDA G, GAGGERI R, ROSSI D, COLLINA S (2014). Lipid metabolites with free-radical scavenging activity from *Euphorbia helioscopia* L. *Chem. Phys. Lipids.*, **181**: 90-98.
- CHAABI M, FREUND-MICHEL V, FROSSARD N, RANDRIANTSOA A (2007). Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**: 134-139.
- CHEN H, WANG Z, YANG LI (2012). Analysis of euphornin in *Euphorbia helioscopia* L. and its cytotoxicity to mice lung adenocarcinoma cells (LA795). *Nat. Prod. Res.*, **26**: 2112-2116.
- CHENG HY, LIN TC, TANG CM, WANG KC, LIN LT, LIN CC (2004). Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virüs entry and late stage replication of *Herpes simplex virüs* type 2 *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotheraphy*, **53**: 577-583.
- COREA G, FATTORUSSO C, FATTORUSSO E, LANZOTTI V (2005). Amigdaloidins A–L, twelve new 13 α -OH jatrophone diterpenes from *Euphorbia amygdaloides* L. *Tetrahedron*, **61**: 4485-4494.
- ÇAKILCIOĞLU U, KHATUN S, TÜRKOĞLU İ, HAYTA S (2011). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maden (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, **137**: 469-486.
- DAOUBI M, BENHARREF A, HERNANDEZ-GALAN R, MACIAS-SANCHEZ AJ, COLLADO IG (2004). Two Novel Steroids From *Euphorbia officinarum* Latex. *Natural Product Research*, **18 (2)**: 177–181.
- DAOUBI M, MAQUEZ N, MAZOIR N, BENHARREF A, HERNANDEZ-GALAN R, MUNOZ E, COLLADO IG (2007). Isolation of new phenylacetylglucol derivatives that reactivate HIV-1 latency and a novel spirotriterpenoid from *Euphorbia officinarum* latex. *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, **15**: 4577-4584.
- DAVIS PH (ed.) (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 7. Edinburgh: Edinburgh University Press, p.: 571.

- 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.
- DELGADO IF, DE-CARVALHO RR, DE-OLIVEIRA ACAX, KURIYAMA SN, OLIVEIRA-FILHO EC, SOUZA CAM, PAUMGARTTEN FJR (2003). Absence of tumor promoting activity of *Euphorbia milii* latex on the mouse back skin. *Toxicology Letters*, **145**: 175-180.
- DEMİRCİ S, ÖZHATAY N (2011). An Ethnobotanical Study in Southern Turkey; Wild Plants Used As Economic Purpose in Andırın, Kahramanmaraş. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, **57**:
- DEMİRKİRAN Ö, TOPÇU G, HUSSAIN J, AHMAD VU, CHOUDHARY MI (2011). Structure elucidation of two new unusual monoterpene glycosides from *Euphorbia decipiens*, by 1D and 2D NMR experiments. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **49**: 673-677.
- DEY M, RIPOLI C, POULEVA R, DORN R, ARANOVICH I, ZAUROV D, KURMUKOV A, ELISEYEVA M, BELOLIPOV I, AKIMALIEV A, SODOMBEKOV I, AKIMALIEV D, LILA MA, RASKIN I (2008). Plant Extracts from Central Asia showing Antiinflammatory Activities in Gene Expression Assays. *Phytotherapy Research*, **22**: 929-934.
- DUBEY S, MEHTA SC (2014). Hepatoprotective Activity of *Euphorbia hirta* Linn. Plant against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury in Rats. *International Conference on Food, Biological and Medical Sciences (FBMS)*, 108-111.
- EDWARDS JV, HOWLEY P, COHEN IK (2004). *In vitro* inhibition of human neutrophil elastase by oleic acid albumin formulations from derivatized cotton wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics*, **284**: 1-12.
- ENOCH S, LEAPER DJ (2007). Basic Science of Wound healing. *Surgery*, **26(2)**: 31-37.
- ERDEMOĞLU N, KÜPELİ E, YEŞİLADA E (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **89**: 123-129.
- ERTAŞ A, YILMAZ MA, FIRAT M (2015). Chemical profile by LC–MS/MS, GC/MS and antioxidant activities of the essential oils and crude extracts of two *Euphorbia* species. *Natural Product Research*, **29(6)**: 529-534.
- ESTOMBA D, LADIO A, LOZADA M (2006). Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-western Patagonia. *Journal of Ethnopharmacology*, **103**: 109-119.
- EZER N, AVCI K (2004). Çerkeş (Çankırı) Yöresinde Kullanılan Halk İlaçları. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **24(2)**: 67-80.

- EZER N, MUMCU ARISAN Ö (2006). Folk Medicines in Merzifon (Amasya, Turkey). *Turk. J. Bot.*, **30**: 223-230.
- FAI PBA, FAGADE SO (2005). Acute toxicity of *Euphorbia kamerunica* on *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **62**: 128-131.
- FALANGA V (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Erisim adresi: [<http://www.thelancet.com>]. Erişim Tarihi: 5/9/2015. **366**: 1736-1743.
- FERNANDEZ-ARCHE A, SAENZ MT, ARROYO M, PUERTA RDL, GARCIA MD (2010). Topical anti-inflammatory effect of tirucallol, a triterpene isolated from *Euphorbia lactea* latex. *Phytomedicine*, **17**: 146-148.
- FOKIALAKIS N, MELLIOU E, MAGIATIS P, HARVALA C, MITAKU S (2003). Composition of the Steam Volatiles of Six *Euphorbia* spp. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, **18**: 39-42.
- FRAISSE D, HEITZ A, CARNAT A, CARNAT AP, LAMAISON JL (2000). Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia*, **71** (4): 463-464.
- GAUR K, RANA AC, NEMA RK, KORI ML, SHARMA CS (2009). Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of Hydro-Alcoholic Leaves Extract of *Euphorbia Neriifolia* Linn. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **2**(1): 26-29.
- GENCE H (2008). Fötal Yara İyileşmesi. *Journal of Ankara University Faculty of Medicine*, **61**(3): 171-179.
- GHOSH PK, GABA A (2013). Phyto-Extracts in Wound Healing. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **16**(5): 760-820.
- GOSAIN A, DIPIETRO LA (2004). Aging and Wound Healing. *World J. Surg.*, **28**: 321-326.
- GOYAL M, SASMAL D, NAGORI BP (2011). Review on Medicinal Plants used by Local Community of Jodhpur District of Thar Desert. *International Journal of Pharmacology*, **7**(3): 333-339.
- GOYAL M, NAGORI BP, SASMAL D (2012). Wound healing activity of latex of *Euphorbia caducifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, **144**: 786-790.
- GUO J, HE HP, FANG X, DI YT, LI SL, ZHANG Z, LENG Y, HUA HM, HAO XJ (2010). Kansuinone, a novel euphane-type triterpene from *Euphorbia kansui*. *Tetrahedron Letter*, **51**: 6286-6289.
- GUPTA PJ (2011). The efficacy of *Euphorbia prostrata* in early grades of symptomatic hemorrhoids-a pilot study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **15**: 199-203.

- GUYTON DC, HALL JE (2014). Tıbbi Fizyoloji. 12. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, s.:428-432.
- GÜRHAN G, EZER N (2004). Halk Arasında Hemoroit Tedavisinde Kullanılan Bitkiler-I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **24(1)**: 37-55.
- HABA H, LAVAUD C, HARKAT H, MAGID AA, MARCOURT L, BENKHALED M (2007). Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*, **68**: 1255-1260.
- HE F, PU JX, HUANG SX, XIAO WL, YANG LB, LI XN, ZHAO Y, DING J, XU CH, SUN HD (2008). Eight New Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia nematocypha*. *Helvetica Chimica Acta*, **91**: 2139-2147.
- HONDA G, YEŞİLADA E, TABATA M, SEZİK E, FUJITA T, TAKEDA Y, TAKAISHI Y, TANAKA T (1996). Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. *Journal of Ethnopharmacology*, **53**: 75-87.
- HORE SK, AHUJA V, MEHTA G, KUMAR P, PANDEY SK, AHMAD AH (2006). Effect of aqueous *Euphorbia hirta* leaf extract on gastrointestinal motility. *Fitoterapia*, **77**: 35-38.
- HUANG Y, AISA HA (2010). Jatrophone diterpenoids from Fructus *Euphorbia sororia*. *Phytochemistry Letters*, **3**: 176-180.
- ILYAS M, PARVEEN M, AMIN KMY (1998). Neriifolione, A Triterpene From *Euphorbia Neriifolia*. *Phytochemistry*, **48(3)**: 561-563.
- INNGJERDINGEN K, NERGARD CS, DIALLO D, MOUNKORO PP, PAULSEN BS (2004). An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, **92**: 233-244.
- ITO M, SHIMURA H, WATANABE N, TAMAI M, HANADA K, TAKAHASHI A, TANAKA Y, ARAI I, PEI-LING Z, CHANG R, WEI-WING C, JUN-SHAN Y, YA-LUN S, YU-LAN W (1990). Hepatoprotective Compounds from *Canarium album* and *Euphorbia nematocypha*, *Chem. Pharm. Bull.*, **38(8)**: 2201-2203.
- JABEEN N, KHANUM R, SHAKUAT S, MEHMOOD S, GULFRAZ M (2008). Protective Effects of *Euphorbia Helioscopia* on Different Wound Models in Rats. *CJPAS*, **2**: 175-178.
- JAIPRAKASH B, CHANDRAMOHAN, REDDY DN (2006). Burn Wound Healing Activity of *Euphorbia hirta*. *Ancient Science of Life*, **25**: 16-18.
- JASSBI AR (2006). Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*, **67**: 1977-1984.

- JYOTHI TM, PRABHU K, JAYACHANDRAN E, LAKSHMINARASU S, RAMACHANDRA SS (2008a). Hepatoprotective and antioxidant activity of *Euphorbia antiquorum*. *Phcog Mag.*, **4(13)**: 127-133.
- JYOTHI TM, SHANKARIAH MM, PRABHU K, LAKSHMINARASU S, SRINIVASA GM, RAMACHANDRA SS (2008b). Hepatoprotective and Antioxidant Activity of *Euphorbia tirucalli*. *IJPT*, **7**: 25-30.
- KARGIOĞLU M, CENKÇİ S, SERTESER A, EVLİYAOĞLU N, KONUK M, KÖK MŞ, BAĞCI Y (2008). An Ethnobotanical Survey of Inner-West Anatolia, Turkey. *Hum. Ecol.*, **36**: 763-777.
- KUMAR A, PRASAD M, MISHRA D, SRIVASTAV SK, SRIVASTAV AK (2010). Toxicity of aqueous extract of *Euphorbia tirucalli* latex on catfish, *Heteropneustes fossilis*, *Exotoxicology and Enviromental Safety*, **73**: 1671-1673.
- 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). *Journal of Ethnopharmacology*, **111**: 341-364.
- KÜPELİ E (2000). *Berberis crataegina* DC. Bitkisinin Romatizma Tedavisindeki Etkisi Üzerinde Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- KÜPELİ AKKOL E, KOCA U, PEŞİN İ, YILMAZER D, TOKER G, YEŞİLADA E (2009). Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. By *in vivo* models. *Journal of Ethnopharmacology*, **124**: 137-141.
- KÜPELİ AKKOL E, SÜNTAR İ, KELES H, YEŞİLADA E (2011). The potential role of female flowers inflorescence of *Typha domingensis* Pers. in wound management. *Journal of Ethnopharmacology*, **133**: 1027-1032.
- KÜPELİ AKKOL E, SÜNTAR İ, FAFAL ERDOĞAN T, KELEŞ H, MERT GONENÇ T, KIVÇAK B (2012). Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, **139**: 478-484.
- LI RW, MYERS SP, LEACH DN, LIN GD, LEACH G (2003). A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **85**: 25-32.
- LI J, CHEN J, KIRSNER R (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, **25**: 9-18.
- LI XL, LI Y, WANG SF, ZHAO YL, LIU KC, WANG XM, YANG YP (2009). Ingot and Ingenol Diterpenes from the Aerial Parts of *Euphorbia royleana* and Their Antiangiogenic Activities. *J. Nat., Prod.*, **72**: 1001-1005.

- LIANG X, LIU ZG, CAO YF, MENG DL, HUA HM (2014). Chemotaxonomic and chemical studies on two plants from genus of *Euphorbia*: *Euphorbia fischeriana* and *Euphorbia ebracteolata*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **57**: 345-349.
- LIMA EMC, MEDEIROS JMR, DAVIN LB (2003). Pentacyclic triterpenes from *Euphorbia stygiana*. *Phytochemistry*, **63**: 421-425.
- LIN JH, LIN YT (1999). Flavonoids from the Leaves of *Loranthus kaoi* (Chao) Kiu. *Journal of Food and Drug Analysis*, **7(3)**: 185-190.
- LIU YX, WANG MZ, SUN XF (1994). Clinical analysis of 72 epileptic patients treated with alkaline extract of *Euphorbia fischeriana*. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, **14(5)**: 282-284.
- LIU X, YE W, YU B, ZHAO S, WU H, CHE C (2004). Two new flavonol glycosides from *Gymnema sylvestre* and *Euphorbia ebracteolata*, *Carbohydrate Research*, **339**: 891-895.
- LIU C, LIAO ZX, LIU SJ, QU AB, WANG HS (2014). Two new diterpene derivatives from *Euphorbia lunulata* Bge and their anti-proliferative activities. *Fitoterapia*, **96**: 33-38.
- LODHI S, PAWAR RS, JAIN AP, SINGHAI AK (2006). Wound healing potential of *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **108**: 204-210.
- LONE BA, CHISHTI MZ, BHAT FA, TAK H, BANDH SA (2012). *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of *Euphorbia helioscopia* L. *Vet. Parasitol.*, **189**: 317-321.
- LONE BA, BANDH SA, CHISHTI MZ, BHAT FA, TAK H, NISA H (2013). Anthelmintic and antimicrobial activity of methanolic and aqueous extracts of *Euphorbia helioscopia* L. *Trop. Anim. Health. Prod.*, **45**: 743-749.
- LU ZQ, CHEN GT, ZHANG JQ, HUANG HL, GUAN SH, GUO DA (2007). Four New Lanostane Triterpenoids from *Euphorbia humifusa*. *Helvetica Chimica Acta*, **90**: 2245-2250.
- LU ZQ, GUAN SH, LI XN, CHEN GT, ZHANG JQ, HUANG HL, LIU X, GUO DA (2008a). Cytotoxic Diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*, *J. Nat. Prod.*, **71**: 83-876.
- LU ZQ, YANG M, ZHANG JQ, CHEN GT, HUANG HL, GUAN SH, MA C, LIU X, GUO DA (2008b). Ingenane Diterpenoids from *Euphorbia esula*. *Phytochemistry*, **69**: 812-819.
- LUYEN BTT, TAI BH, THAO NP, EUN KJ, CHA JY, XIN MJ, LEE YM, KIM YH (2014a). Anti-inflammatory components of *Euphorbia humifusa* Willd. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **24**: 1895-1900.

- LUYEN BTT, TAI BH, THAO NP, LEE SH, JANG HD, LEE YM, KIM YH (2014b). Evaluation of the Anti-osteoporosis and Antioxidant Activities of Phenolic Compounds from *Euphorbia maculata*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **57(5)**: 573-579.
- MADUREIRA AM, ASCENSO JR, VALDEIRA L, DUARTE A, FRADE JP, FREITAS G, FERREIRA MJU (2003). Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. *Natural Product Research*, **17(5)**: 375-380.
- MANIVANNAN R, PRABAKARAN K, ILAYARAJA S (2014). Isolation, Identification and Antibacterial and Wound Healing Studies of Quercetin-3-O- α -L-Rhamnopyranoside -2''- Gallate. *Int. J. Appl. Sci. Eng.*, **12(2)**: 99-106.
- MAOULAININE L, JELASSI A, HASSEN I, OULD MS, OULD BA (2012). Antioxidant proprieties of methanolic and ethanolic extracts of *Euphorbia helioscopia* (L.) aerial parts. *Int. Food Res. J.*, **19**: 1125-1130.
- MARC EB, NELLY A, ANNICK DD, FREDERIC D (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology*, **120**: 315-334.
- MELZIG MF, LOSER B, CIESIELSKI S (2001). Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie*, **56**: 967-970.
- MENKE NB, WARD KR, WITTEN TM, BONCHEV DG, DIEGELMANN RF (2007). Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology*, **25**: 19-25.
- MIRANDA FJ, ALABADI JA, ORTI M, CENTENO JM, PINON M, YUSTE A, SANZ-CERVERA JF, MARCO JA, ALBORCH E (1998). Comparative Analysis of the Vascular Actions of Diterpenes Isolated from *Euphorbia canariensis*. *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**: 237-241.
- MITCHELL RN, COTRAN RS (2003). Basic Pathology (Temel Patoloji). 7. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, s.: 33-58.
- MITTAL A, SARDANA S, PANDEY A (2013). Herbal Boon For Wounds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5(2)**: 1-12.
- NAGORI BP, SOLANKI R (2011). Role of Medicinal Plants in Wound Healing. *Research Journal of Medicinal Plant*, **5(4)**: 392-405.
- NAMSA ND, TAG H, MANDAL M, KALITA P, DAS AK (2009). An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the Lohit community of Arunachal Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology*, **125**: 234-245.

- NATARAJAN D, BRITTO SJ, SRINIVASAN K, NAGAMRUGAN N, MOHANASUNDARI C, PERUMAL G (2005). Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *Journal of Ethnopharmacology*, **102**: 123-126.
- NATARAJAN D, NAGAMURUGAN N, RAMACHANDRAN A, MOHANASUNDARI C, SRINIVASAN K (2007). Anticandidal and anticryptococcal activity of *Euphorbia fusiformis*, a rare medicinal plant. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 719-721.
- NAZEMIYEH H, KAZEMI EM, ZARE K, JODARI M, NAHAR L, SARKER SD (2010). Free radical scavengers from the aerial parts of *Euphorbia petiolata*. *J. Nat. Prod.*, **64**: 187-190.
- NISHIMURA T, WANG LY, KUSANO K, KITANAKA S (2005). Flavonoids That Mimic Human Ligands from the Whole Plants of *Euphorbia lunulata*. *Chem. Pharm. Bull.* **53(3)**: 305-308.
- NOORI M, CHEHREGHANI A, KAVEH M (2009). Flavonoids of 17 species of *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in Iran. *Toxicological & Environmental Chemistry* **91(4)**: 631-641.
- NURSAL TZ, BAYKAL A, HAMALOĞLU E (1999). Yaşlılarda Yara İyileşmesi: Fark Var Mı? *Turkish Journal of Geriatrics*, **2(1)**: 29-32.
- ORAL DÇ (2007). Konya İlinde Kullanılan Halk İlaçları Üzerinde Etnobotanik Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ÖKSÜZ S, GÜREK F, LIN LZ, GIL RR, PEZZUTO JM, CORDELL GA (1996). Aleppicatin A and B From *Euphorbia Aleppica*. *Phytochemistry*, **42(2)**: 473-478.
- ÖKSÜZ S, GÜREK F, YANG SW, LIN LZ, CORDELL GA (1997). Paralinones A and B, Novel diterpene Esters from *Euphorbia paralias*. *Tetrahedron*, **53(9)**: 3215-3222.
- ÖKSÜZ S, GÜREK F, QIU SX, CORDELL GA (1998). Diterpene Polyesters from *Euphorbia seguieriana*. *J. Nat. Prod.*, **61**: 1198-1201.
- ÖZORAN Y, ÇOBANOĞLU Ü (2007). Akut ve Kronik İnflamasyon. *Temel Patoloji*. Ed. KUZHEY GM. Güneş Kitabevi, s.: 45-60.
- ÖZBEK H , ÖZTÜRK A (2003). Antienflamatuvar etkinliğin ölçülmesinde kullanılan yöntemler. *Van Tıp Derg.* **10(1)**: 23-28.
- ÖZKORKMAZ GE, ÖZAY Y (2009). Yara İyileşmesi ve Yara İyileşmesinde Kullanılan Bazı Bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **2(2)**: 63-67.
- 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, ÖTER Ş, KORKMAZ A (2009). Kronik yara iyileşmesi modelinde topikal nikotinamid ve asetil sisteinin etkileri. *Ulusal Cerrahi Derg.*, **25(4)**: 165-169.
- ÖZLER M, ŞİMŞEK K, ÖZKAN C, TOPAL T, ÖTER Ş, KORKMAZ A (2010). Pinealektomili ratlarda yara iyileşmesi. *Gülhane Tıp Dergisi*, **52**: 181-184.
- PAN LL, FANG PL, ZHANG XJ, NI W, LI L, YANG LM, CHEN CX, ZHENG YT, LI CT, HAO XJ, LIU HY (2011). Tiglane-Type Diterpenoid Glycosides from *Euphorbia fischeriana*. *J. Nat. Prod.*, **74**: 1508-1512.
- PARK KH, KOH DS, LEE SH, JUNG IM, KIM KH, LEE CH, KIM KH, LIM YH (2001). Anti-Allergic and Anti-Asthmatic Activity of Helioscopinin-A, a Polyphenol Compound, Isolated from *Euphorbia helioscopia*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**: 138-142.
- PARSAK CK, SAKMAN G, ÇELİK Ü (2007). Yara İyileşmesi, Yara Bakımı ve Komplikasyonları. *Arşiv*, **16**: 159.
- PATEL AV, WRIGHT D, BLUNDEN G, SUMMER S, RICE J (2011). Stable Molluscicide Formulation of an Aqueous Extract of *Euphorbia myrsinites*. *Phytother. Res.*, **25**: 1412-1414.
- PATIL SB, NAIKWADE NS, MAGDUM CS (2009). Review on Phytochemistry and Pharmacological Aspects of *Euphorbia hirta* Linn. *JPRHC*, **1(1)**: 113-133.
- PENG Q, LI G, MA Y, HUANG J, WEI X, WANG J (2012). Chemical constituents of *Euphorbia kansui*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **43**: 64-66.
- PEŞİN SÜNTAR İ, KÜPELİ AKKOL E, NURAY YALÇIN F, KOCA U, KELEŞ H, YEŞİLADA E (2010a). Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin-3-O-glucoside. *J Ethnopharmacol*, **129**: 106-114.
- PEŞİN SÜNTAR İ, KÜPELİ AKKOL E, YILMAZER D, BAYKAL T, ALPER M, KIRMIZİBEKMEZ H, YEŞİLADA E (2010b). Investigations on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol.*, **127**: 468-477.
- PEREIRA C, BARRETO JUNIOR CB, KUSTER RM, SIMAS NK, SAKURAGUI CM, PORZEL A, WESSJOHANN L (2012). Flavonoids and Neolignan Glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Quim. Nova.*, **35(6)**: 1123-1126.
- PING KY, DARAH I, CHEN Y, SREERAMANAN S, SASIDHARAN S (2013). Acute and Subchronic Toxicity Study of *Euphorbia hirta* L. Methanol Extract in Rats. *Biomed Research International*, Vol. 2013: 1-14.
- POLAT R, SATIL F (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir–Turkey). *J Ethnopharmacol.*, **139**: 626-641.

- RAGASA CY, CORNELIO KB (2013). Triterpenes from *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **11(5)**: 528-533.
- RAHMAN AHMM, AKTER M (2013). Taxonomy and Medicinal Uses of Euphorbiaceae (Spurge) Family of Rajshahi, Bangladesh. *Research in Plant Sciences*, **1(3)**: 74-80.
- RAMEZANI M, BEHRAVAN J, ARAB M, FARZAD SA (2008). Antiviral Activity of *Euphorbia helioscopia* Extract. *Journal of Biological Sciences* **8(4)**: 809-813.
- RAMSAY JR, SUHRBIER A, AYLWARD JH, OGBOURNE S, COZZ SJ, POULSEN MG, BAUMANN KC, WELBURN P, REDLICH GL, PARSONS PG (2011). The sap from *Euphorbia peplus* is effective against human nonmelanoma skin cancers. *British Journal of Dermatology*, **164**: 633-636.
- RASIK AM, RAGHUBIR R, GUPTA A, SHUKLA A, DUBEY MP, SRIVASTAVA S, JAIN HK, JULSHRESTHA DK (1999). Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. *J Ethnopharmacol.*, **68**: 261-266.
- ROBSON MC (1997). WOUND INFECTION: A Failure of Wound Healing Caused by an Imbalance of Bacteria. *Surgical Clinics of North America*, **77(3)**: 637-650.
- RUAN HL, ZHOU XF, ZHANG YH, PI HF, WU JZ, SUN HD (2007). Ferulic acid esters from *Euphorbia hylonoma*. *Fitoterapia*, **78**: 72-73.
- SADAF F, SALEEM R, AHMED M, AHMAD SI, NAVAID-UL Z (2006). Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology*, **107**: 161-163.
- SAHASRABUDHE A, DEODHAR M (2010). Anti-hyaluronidase, Anti-elastase Activity of *Garcinia indica*. *International Journal of Botany*, **6(3)**: 299-303.
- SALEEM U, AHMAD B, HUSSAIN K, AHMAD M, BUKHARI NI, ISHTIAQ S (2014a). Estimation of Antioxidant Power in Various Extracts of *Euphorbia helioscopia* L. with Five Different *in vitro* Antioxidant Models. *Asian J. Chem.*, **26(4)**: 1241-1245.
- SALEEM U, AHMAD B, AHMAD M, HUSSAIN J, BUKHARI NI, ANJUM AA (2014b). Determination of Cytotoxicity of Latex and Methanol Extract of *Euphorbia helioscopia* Leaves on Vero Cell Line with MTT Assay. *Pakistan J. Zool.*, **46(3)**: 741-745.
- SALEEM U, AHMAD B, AHMAD M, HUSSAIN K, BUKHARI NI (2015). Anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-pyretic activities of latex and leaves methanol extract of *Euphorbia helioscopia*. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, **5(4)**: 322-328.
- SANTOS AF, AZEVEDO DPL, SANTOS MATA RC, MENDONCA DIMD, SANT'ANA AEG (2007). The lethality of *Euphorbia conspicuato* adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. *Biosource Technology*, **98**: 135-139.

- SCHMIDT BM, RIBNICKY DM, POULEV A, LOGENDRA S, CEFALU WT, RASKIN I (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism Clinical and Experimental*, **57**(1): 3-9.
- SEZİK E, YEŞİLADA E, TABATA M, HONDA G, TAKAISHI Y, FUJITA T, TANAKA T, TAKEDA Y (1997). Traditional Medicine in Turkey VIII. Folk medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır Provinces. *Economic Botany*, **51**(3): 195-211.
- SEZİK E, YEŞİLADA E, HONDA G, TAKAISHI Y, TAKEDA Y, TANAKA T (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, **75**: 95-115.
- SHALE TL, STIRK WA, VAN STADEN J (1999). Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **67**: 347-354.
- SHARMA V, JANMEDA P (2014). Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia neriifolia* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, In Press.
- SHARMA N, SAMARAKOON KW, GYAWALI R, PARK YH, LEE SJ, OH SJ, LEE TH, JEONG DK (2014). Evaluation of the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anticancer Activities of *Euphorbia hirta* Ethanolic Extract. *Molecules*, **19**: 14567-14581.
- SHI JG, SHI YP, JIA ZJ (1997). Sesquiterpenoids from *Euphorbia wangii*. *Phytochemistry*, **45** (2): 343-347.
- SHI HM, LONG BS, CUT XM, MIN ZD (2005). A new bisabolane sesquiterpenoid from *Euphorbia chrysocoma*, *Journal of Asian Natural Products Research*, **7**(6): 857-860.
- SHI QW, SU XH, KIYOTA H. (2008). Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. *Chem. Rev.*, **108**: 4295-4327.
- SHIH MF, CHENG YD, SHEN CR, CHERNG JY (2010). A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. *J Nat Med*, **64**: 330-335.
- SHIRANI M, ALIBABAEI Z, KHEIRI S, SHIRZAD H, TAJI F, ASGARI A, RAFIEIAN M (2011). Effect of *Euphorbia Helioscopia* Extract on Acute and Chronic Pain in Mice. *J. Babol Univ. Med. Sci.*, **13**(4): 14-18.
- SINGH GD, KAISER P, YOUSOUF MS, SINGH S, KHAJURIA A, KOUL A, BANI S, KAPAHİ BK, SATTI NK, SURI KA, JOHRI RK (2006). Inhibition of Early and Late Phase Allergic Reactions by *Euphorbia hirta* L. *Phytother. Res.*, **20**: 316-321.

- SINGH SK, PRABHA T, KAVITHA B, CHOUHAN HS, BHARTI SK (2009). Anti-inflammatory and Hepatoprotective Activities of Ethanolic Extract of *Euphorbia thymifolia* Linn. *Pharmacologyonline*, **1**: 986-994.
- SINGH KK, RAUNIAR GP, SANGRAULA H (2012). Experimental Study of Anticonvulsive Effects of *Euphorbia pulcherrima* in Mice. Erişim Adresi: [http://www.webmedcentral.com]. Erişim Tarihi: 12/06/2012.
- SUDHAKAR M, RAO CV, RAO PM, RAJU DB, VENKATESWARLU Y (2006). Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. *Fitoterapia*, **77**: 378-380.
- SUGUNA L, SINGH S, SIVAKUMAR P, SAMPATH P, CHANDRAKASAN G (2002). Influence of *Terminalia chebula* on dermal wound healing in rats. *Phytotherapy Research*, **16**: 227-231.
- SULYOK E, VASAS A, REDEI D, FORGO P, KELE Z, PINKE G, HOHMANN J (2011). New premyrsinane-type diterpene polyesters from *Euphorbia falcata*, *Tetrahedron*. **67**: 7289-7293.
- SÜNTAR İ, TATLI İİ, KÜPELİ AKKOL E, KELEŞ H, KAHRAMAN C, 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 . Doktora Tezi . Gazi Üniv . Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- SÜNTAR İ, BALDEMİR A, COSKUN M, KELES H, AKKOL EK (2011). Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, **135(1)**: 63-70.
- TABATA M, SEZİK E, HONDA G, YEŞİLADA E, FUKUI H, GOTO K, IKESHIRO Y (1994). Traditional Medicine in Turkey III. Folk Medicine in East Anatolia, Van and Bitlis Provinces. *Int. J. Pharmacog.* **32(1)**: 3-12.
- TANG Q, SU Z, HAN Z, MA X, XU D, LIANG Y, CAO H, WANG X, QU X, HOFFMAN A, LIU H, GU D, QIU D (2012). LC–MS method for detecting prostratin in plant extracts and identification of a high-yielding population of *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry Letters*, **5**: 214-218.
- TANKER N, TANKER M, COŞKUN M (2014). Farmasötik Botanik. 4. Baskı. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. p.: 249-250.
- TIAN Y, SUN LM, LIU XQ, LI B, WANG Q, DONG JX (2010). Anti-HBV active flavone glucosides from *Euphorbia humifusa* Willd. *Fitoterapia*, **81**: 799-802.

- TIAN Y, SUN LM, LI B, LIU XQ, DONG JX (2011). New anti-HBV caryophyllane-type sesquiterpenoids from *Euphorbia humifusa* Willd. *Fitoterapia*, **82**: 251-254.
- TIWARI P, KUMAR K, PANDEY AK, PANDEY A, SAHU PK (2011). Antihepatotoxic Activity of *Euphorbia hirta* and by using the combination of *Euphorbia hirta* and *Boerhaavia diffusa* Extracts on Some Experimental Models of Liver Injury in Rats. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Research*, **2(2)**: 126-130.
- TÜMEN G, MALYER H, BAŞER KHC, ÖZ AYDIN S (2005). Plants used in Anatolia for wound healing. *Proceedings of the IVth International Congress of Ethnobotany (ICEB)*, 217-221.
- UGULU İ, BASLAR S, YOREK N, DOĞAN Y (2009). The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around İzmir province, Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3(5)**: 345-367.
- VALENTE C, PEDRO M, DUARTE A, NASCIMENTO MSJ, ABREU PM, FERREIRA MJU (2004). Bioactive Diterpenoids, a New Jatrophane and Two ent-Abietanes, and Other Constituents from *Euphorbia pubescens*. *J. Nat. Prod.*, **67**: 902-904.
- VAMSIDHAR I, MOHAMMED AH, NATARAJ B, RAO CM, RAMESH M (2000). Antinociceptive activity of *Euphorbia heterophylla* roots. *Fitoterapia*, **71**: 562-563.
- WANG LY, WANG NL, YAO XS, MIYATA S, KITANAKA S (2003). Euphane and Tirucallane Triterpenes from the Roots of *Euphorbia kansui* and Their *in vitro* Effects on the Cell Division of *Xenopus*. *J. Nat. Prod.*, **66**: 630-633.
- WANG ZY, LIU HP, ZHANG YC, GUO LQ, LI X, SHI XF (2012). Anticancer Potential of *Euphorbia helioscopia* L. Extracts Against Human Cancer Cells. *The Anatomical Record* **295**: 223-233.
- WANG R, LECHTENBERG M, SENDKER J, PETEREIT F, DETERS A, HENSEL A (2013). Wound-healing plants from TCM: *in vitro* investigations on selected TCM plants and their influence on human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Fitoterapia*, **84**: 308-317.
- WHELAN LC, RYAN MF (2003). Ethanolic extracts of *Euphorbia* and other ethnobotanical species as inhibitors of human tumor cell growth. *Phytomedicine*, **10**: 53-58.
- WHITTLE BA (1964). The Use of Capillary Permeability in Mice to Distinguish Between Narcotic and Nonnarcotic Analgesics. *Brit. J. Pharmacol.*, **22**: 246-253.
- WOESSNER JF (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **93**: 440-447.

- YANG CM, CHENG HY, LIN TC, CHIANG LC, LIN CC (2005). *Euphorbia thymifolia* suppresses *Herpes simplex* virüs-2 infection by directly inactivating virus infectivity. *Clinical and Experimental Pharmacology and Phsyiology*, **32**: 346-349.
- YASUKAWA K, AKIHISA T, YOSHIDA ZY, TAKIDO M (2000). Inhibitory Effect of Euphol, a Triterpene Alcohol from the Roots of *Euphorbia kansui*, on Tumour Promotion by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate in Two-stage Carcinogenesis in Mouse Skin. *J Pharm Pharmacol*, **52**: 119-124.
- YEŞİL Y (2007). Kürecik (Akçadağ/Malatya) Bucağında Etnobotanik Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- YEŞİLADA E, SEZİK E, HONDA G, TAKAISHI Y, TAKEDA Y, TANAKA T (1999). Traditional medicine in Turkey IX: Folk medicine in north-west Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, **64**: 195-210.
- YEŞİLADA E (2005). Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**: 135-137.
- YEŞİLADA E, HONDA G, SEZİK E, TABATA M, FUJITA T, TANAKA T, TAKEDA Y, TAKAISHI Y (1995). Traditional Medicine in Turkey V. Folk medicine in inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*, **46**: 133-152.
- YI W, WEI Q, DI G, JING-YU L, YANG-LI L (2012). Phenols and flavonoids from the aerial part of *Euphorbia hirta*. *Chese Journal of Natural Medicines*, **10(1)**: 40-42.
- YOUNG A, McNAUGHT CE (2011). The physiology of wound healing. *Surgery*, **29(10)**: 475-479.
- YOUSSEF MS, KAISER P, TAHIR M, SINGH GD, SINGH S, SHARMA VK, SATTI NK, HAQUE SE, JOHRI RK (2007). Anti-anaphylactic effect of *Euphorbia hirta*. *Fitoterapia*, **78**: 535-539.
- YU F, LU S, YU F, SHI J, MCGUIRE PM, WANG R (2008). Cytotoxic activity of an octadecenoic acid extract from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) on human tumour cell strains. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **60**: 253-259.
- ZAYED SMAD, SOLIMAN MFSM, GOTTA H, SORG B, HECKER E (2001). Dietary cancer risk from conditional cancerogens (tumor promoters) in produce of livestock fed on species of spurge (Euphorbiaceae). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **127**: 40-47.
- ZHANG N, CAI H, CAI BC, YANG H, LI JS, YANG GM (2010). Two new cytotoxic acetophenone derivatives from *Euphorbia ebracteolata* Hayata. *Fitoterapia*, **81**: 385-388.

EKLER



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 78-10830
KONU :

28.05/2012

Sayın

Prof.Dr.Gülçin SALTAN
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Gülçin SALTAN, Esra AKKOL, İpek SÜNTAR ve Serkan ÖZBİLGİN'den oluşan, G.Ü.ET-12.049 kod numaralı ve "*Türkiye'de Halk Arasında Yara İyileştirici Olarak Kullanılan Bazı Euphorbia L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-12.049 and entitled "*Pharmacognostical Studies on Some Euphorbia L.Species Used as Wound Healing in Turkish Folk Medicine*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN V.
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı



EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Raporu

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Serkan
Soyadı : ÖZBİLGİN
Doğum yeri ve tarihi : Antalya – 01.02.1983
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresi ve telefon :Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı - 0 537 404 27 74

II. Eğitimi

2007-2010 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi
Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Eğitimi)
2002-2006 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans Eğitimi)
1994-2001 Antalya Metin Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesi
(Ortaokul ve Lise Eğitim)
1989-1994 Antalya Mehmet Akif Ersoy İlkokulu (İlkokul Eğitimi)

Yabancı Dili İngilizce

III. Ünvanları

2010 - Bilim Uzmanı
2006 - Eczacı

IV. Mesleki Deneyimi

2006-2007 Alp Eczanesi Mesul Müdürlüğü
2007 – (Devam Ediyor) Araştırma görevlisi
(Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı)

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Farmakognozi ve Fitoterapi Derneği (FFD)

VI. Bilimsel İlgi Alanları

1- SCI-Expanded kapsamında yer alan yayınlar

1. KÜPELİ AKKOL E, DEMİREL MA, BAHADIR ACIKARA O, SÜNTAR İ, ERGENE B, İLHAN M, ÖZBİLGİN S, SALTAN S, KELEŞ H, TEKİN M (2015). Phytochemical analyses and effects of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and *Alchemilla persica* Rothm. in rat endometriosis model. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 02/2015; DOI: 10.1007/s00404-015-3665-3666.
2. İLHAN M, ERGENE B, SÜNTAR İ, ÖZBİLGİN S, SALTAN ÇİTOĞLU G, DEMİREL MA, KELEŞ H, ALTUN ML, 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.
3. ERYILMAZ M, ÖZBİLGİN S, ERGENE B, SEVER YILMAZ B, ALTUN ML, SALTAN G (2013). Antimicrobial activity of Turkish *Viburnum* species. *Bangladesh J. Bot.*, **42(2)**: 355-360.

2- Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

1. ÖZBİLGİN S, ERGENE B, ALTUN ML, SEVER YILMAZ B, SALTAN G, YÜKSEL G (2015). HPLC method for the analysis of chlorogenic acid of *Viburnum tinus* L. and *Viburnum orientale* Pallas. *Turk. J. Pharm. Sci.*, **12(1)**: 231-236.
2. ÖZBİLGİN S, SEZGİN-BAYINDIR Z, SALTAN G, YÜKSEL N (2015). *In Vitro* Phytoequivalency of Artichoke Extracts (*Cynara scolymus* L.) and Their Drug Products. *Turk. J. Pharm. Sci.*, **12(2)**: 147-156.

3. ÖZBİLGİN S, SALTAN ÇİTOĞLU G (2012). Uses of Some *Euphorbia* Species in Traditional Medicine in Turkey and Their Biological Activities. *Turk. J. Pharm. Sci.*, **9(2)**: 241-256.

3- Diğer Yayınlar

1. ÖZBİLGİN S, SALTAN G (2011). Mitolojiden gelen modern bir fitofarmakoterapötik. *Cynara scolymus* L. (Enginar). *Modern Fitofarmakoterapi ve Doğal Farmasötikler Dergisi*, **1(4)**: 25-34.

4- Uluslararası Kitap Bölüm Yazarlığı

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

5- Ulusal Kitap Bölüm Yazarlığı

1. ÖZBİLGİN S (2011). *Cynara scolymus* (Enginar). In: DEMİREZER Ö, ERSÖZ T, SARAÇOĞLU İ, ŞENER B. Tedavide kullanılan bitkiler. (FFD Monografı) 2. Baskı. Ankara, nobel tıp kitapevleri. s.: 183-188.

6- Uluslararası Poster Sunum Listesi

1. ÖZBİLGİN S, SALTAN G, SÜNTAR I, KÜPELİ AKKOL E, BAHADIR ACIKARA Ö (2015). Isolation and Quantification of Quercetin Glycosides in *Euphorbia characias* L. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 9-12 June, Ankara, Turkey.

2. ÖZBİLGİN S, SALTAN G, SÜNTAR İ, KÜPELİ AKKOL E, BAHADIR ACIKARA Ö (2015). Anti-inflammatory and Wound-healing Activity of *Euphorbia characias* L., and Bioassay-guided Isolation of Some Flavonoids. *The 63rd International Congress and Annual Meeting of The Society for Medicinal Plant and Natural Product Research*, 23-27 August, Budapest, Hungary.
3. KÜPELİ AKKOL E, DEMIREL MA, 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. *9th Symposium on International Chromatography of Natural Products*, Poland.
4. ÖZBİLGİN S, BAHADIR ACIKARA Ö, SALTAN ÇİTOĞLU G, DALL'ACQUA S, SMEJKAL K, ÖZGÖKÇE F (2013). A new Hgh Performance Liquid Chromatographic Analysis For Major and Minor Triterpenes in *Scorzonera* Species. *Workshop on Plant Products Chemistry International Symposium on Medicinal-Aromatic Plants*, 4-7 June, İzmir, Turkey.
5. ŞENOL S, ERDOĞAN ORHAN İ, ÖZBİLGİN S, YAZGAN AN, SEVER YILMAZ B, ALTUN ML, SALTAN G (2012). Exploring *in vitro* neurobiological activity of *Viburnum orientale* Pallas through enzyme inhibition and antioxidant assays. *10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, 26-29 June, Ankara, Turkey.
6. ÖZÇELİK H, ÇOBAN T, ÖZBİLGİN Ö, YAZGAN AN, SEVER YILMAZ B, ALTUN ML, SALTAN G (2012). Total phenol and flavonoid content and radical scavenging capacity of some Turkish *Viburnum* species. *10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, 26-29 June, Ankara, Turkey.

7. ÖZBİLGİN S, ALTUN ML, SEVER YILMAZ B, ERGENE B, SALTAN 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), 2-6 September, Graz, Austria.
8. ÖZBİLGİN S, SEZGİN BAYINDIR Z, SALTAN G, YÜKSEL N (2012). *In Vitro* Pharmaceutical Equivalency of Artichoke Extracts And Their Drug Products, *9th Central European Symposium On Pharmaceutical Technology*, 20-22 September, Dubrovnik, Croatia.
9. ÖZBİLGİN S, SALTAN G, BAHADIR Ö (2010). Chemical Constituents of *Cynara Scolymus* Spray Dried Leaf Extract. *The 58th International Congress and Annual Meeting of The Society for Medicinal Plant and Natural Product Research*, 29 August-2 September, Berlin, Germany.
10. ÖZBİLGİN S, SALTAN G (2010). Phytoequivalence and quality control analysis of several preparations of *Cynara scolymus* L. utilized for liver and digestive disorders. *6th Conference on Aromatic and Medicinal Plants of Southeast European Countries* (6th CMAPSEEC), 18-22 April, Antalya, Turkey.
11. SALTAN G, ÖZBİLGİN S (2009). High performance liquid chromatographic analysis of chlorogenic acid of *Cynara scolymus* L. *Plants from High Altitude-Phytochemistry and Bioactivity*, 26-29 April, Tyrol, Austria.

7- Ulusal Poster Sunum Listesi

1. ÖZBİLGİN S, ERYILMAZ M, ERGENE B, SEVER YILMAZ B, ALTUN ML, SALTAN G (2012). Türkiye'de yetişen *Viburnum* türlerinin antimikrobiyal aktivitesi. *20. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 10-13 Ekim, Antalya, Türkiye.

2. ALTUN ML, SEVER YILMAZ B, ÖZBİLGİN S, ERGENE B, SALTAN G (2012). *Viburnum tinus* L. ve *Viburnum orientale* Pallas türlerinde YBSK yöntemi ile klorojenik asit miktar tayini. 20. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 10-13 Ekim, Antalya, Türkiye.
3. SALTAN G, BAHADIR Ö, ÖZBİLGİN S (2010). Türkiye de Yetişen Bazı *Scorzonera* Türlerinde Bulunan Analjezik Etkili Bileşiklerin YBSK ile Araştırılması. 19. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 27-30 Ekim, Mersin, Türkiye.
4. ÖZBİLGİN S, SALTAN G, BAHADIR Ö (2010). Püskürtmeli Kurutulmuş *Cynara scolymus* L. Ekstresinin Hazırlanması. 19. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 27-30 Ekim, Mersin, Türkiye.

VII. Bilimsel Etkinlikleri

1- Ulusal Projeler

1. Gülçin SALTAN, Serkan ÖZBİLGİN. Türkiye’de Halk Arasında Yara İyileştirici Olarak Kullanılan Bazı *Euphorbia* L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Bilimsel Araştırmalar (BAP), Lisansüstü Tez Projesi, 2013-2015.
2. Gülçin SALTAN, Özlem BAHADIR ACIKARA, Serkan ÖZBİLGİN, Burçin ERGENE. Türkiye’de Yetişen Bazı *Scorzonera* L. Türlerinin Fenolik Bileşiklerinin Araştırılması. Bilimsel Araştırmalar (BAP) Projesi, 2013 (Devam ediyor).
3. Deniz Çayırı (*Zostera* spp.) Ölü Yaprak Ekstraktının Patojen Bakterilere Karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin ve *Artemia naupliileri*’nin 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 (Teknokent), 2014 (Devam ediyor).

2- Seminer Sunumu

1. Diyabet ve Diyabette Kullanılan Bitkisel Ürünler, 2011 (Doktora Semineri)
2. Kronik İnflamasyon Hastalıklarda ve Kansere oluşumunda Transkripsiyon Faktörü (NF- κ B) Etkisi, 2011 (Doktora Semineri)
3. *Monascus purpureus* Went. (Çin Mayası), Eczacılıktaki Önemi ve Kullanılışı, 2008 (Yüksek Lisans Semineri)

VIII-Diğer Bilgiler

Bilimsel Toplantı Organizasyonları

1. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Tarafından Düzenlenen ‘11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences’ isimli sempozyumda Sosyal Komite Üyeliği (Isops 11, 2015)
2. ‘20. Ulusal Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı’ Sosyal Komite Üyeliği (20. Bihat, 2012)
3. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Tarafından Düzenlenen ‘9th International Symposium On Pharmaceutical Sciences’ isimli sempozyumda Sosyal Komite Üyeliği (Isops 9, 2009)