



T.C.
AFYONKARAHİSAR
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**GİNKGO BİLOBANIN FARELERDE
KIL BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Arş. Grv. Dr. Nur Betül İnan

DANIŞMAN
Dr. Öğretim Üyesi Seçil Soylu

DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
AFYONKARAHİSAR, 2020

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**GİNKGO BİLOBANIN FARELERDE
KIL BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Arş. Grv. Dr. Nur Betül İnan

DANIŞMAN
Dr. Öğretim Üyesi Seçil Soylu

AFYONKARAHİSAR, 2020

T.C. AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DERİ ve ZÜHREVİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Tez Başlığı : Ginkgo Bilobanın Farelerde Kıl Büyümesi Üzerine Etkileri

Tezi Hazırlayan : Arş. Grv. Dr. Nur Betül İnan

Tez Savunma Tarihi :

Tez Kabul Tarihi :

Tez Danışmanı : Dr. Öğretim Üyesi Seçil Soylu

İşbu çalışma, jürimiz tarafından DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Dr. Öğretim Üyesi Seçil Soylu

ÜYE

ÜYE

DEKAN



TEŞEKKÜR

Tezimde ve asistanlığında emeği geçen herkese, eşim Dr. Öğretim Üyesi Bayram İnan'a, babam Doç. Dr. Arif Baştuğ'a, anneme ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | | |
|-------|---|-----|
| I. | KISALTMALAR..... | III |
| II. | TABLOLAR LİSTESİ..... | IV |
| III. | ŞEKİLLER LİSTESİ..... | V |
| IV. | 1. GİRİŞ..... | 1 |
| V. | 2. GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| | 2.1. KIL FOLİKÜLÜ HISTOMORFOLOJİSİ..... | 2 |
| | 2.2. KIL GELİŞİMİ..... | 3 |
| | 2.3. ANDROGENETİK ALOPESİ..... | 5 |
| | 2.4. GİNKGO BİLOBA..... | 5 |
| VI. | 3. GEREÇ ve YÖNTEM..... | 8 |
| VII. | 4. BULGULAR..... | 10 |
| VIII. | 5. TARTIŞMA..... | 18 |
| IX. | 6. SONUÇ..... | 28 |
| X. | ÖZET..... | 29 |
| XI. | ABSTRACT..... | 32 |
| XII. | 7. KAYNAKLAR..... | 35 |

KISALTMALAR

GB : Ginkgo biloba

KF : Kıl folikülü

AGA: Androjenetik alopesi



TABLÖLAR LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo I. Deney gruplarının kıl folikülü ortalama çapı, anagen kıl/telogen kıl oranı, kıl folikülü ortalama uzunluğu, subkütan doku folikül sayısı parametrelerinde ortalama ve standart sapmaları..... | 14 |
|---|----|



ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|------------------|--|
| Şekil 1. | Olgun kıl folikülü sagittal kesiti.....3 |
| | 1.a. İfundibulum, istmus, suprabulbar bölge ve bulbus. |
| | 1.b. İstmusun yüksek büyütmede görünümü. |
| | 1.c. Bulbusun yüksek büyütmede görünümü. |
| Şekil 2. | Olgun kıl folikülü katmanlarının şematik çizimi.....3 |
| Şekil 3. | Anagen evrede kıl folikülü şematik çizimi.....4 |
| | 3.a. Erken anagen evrede kıl folikülü. |
| | 3.b. İleri anagen evrede kıl folikülü. |
| Şekil 4. | Katagen evrede kıl folikülü şematik çizimi.....4 |
| Şekil 5. | Telogen evrede kıl folikülü şematik çizimi.....4 |
| Şekil 6. | Deney gruplarında kıl büyümesi makroskopik görünümü.....10 |
| Şekil 7. | Günlere göre kıl çıkma yüzdesi.....11 |
| Şekil 8. | Deney gruplarında kıl folikülü morfolojileri.....12 |
| | 8.a. Negatif kontrol grubu. |
| | 8.b. Pozitif kontrol grubu. |
| | 8.c. Topikal GB grubu. |
| | 8.d. Sistemik GB grubu. |
| Şekil 9. | Deney gruplarında kıl folikülü sayı ve çapları.....13 |
| | 9.a. Negatif kontrol grubu. |
| | 9.b. Pozitif kontrol grubu. |
| | 9.c. Topikal GB grubu. |
| | 9.d. Sistemik GB grubu. |
| Şekil 10. | Gruplara göre subkütan doku folikül sayıları.....14 |
| Şekil 11. | Gruplara göre kıl folikülü ortalama çapları.....15 |
| Şekil 12. | Gruplara göre kıl folikülü ortalama uzunluğu.....16 |
| Şekil 13. | Gruplara göre anagen kıl/telogen kıl oranı.....17 |

1. GİRİŞ

Saç dökülmesi hemen herkesin hayatının bir döneminde karşılaştığı bir kozmetik sorundur. Yaşamsal fonksiyonları etkilemese de estetik olarak güzel bir görünüm için önemi büyüktür. Bu nedenle etkilenen bireyleri çare aramaya iter. Dermatoloji bölümüne başvuru nedenlerinin büyük bir kısmını oluşturur. Dökülme nedenleri çok çeşitli olsa da temel olarak saç döngüsü değişimi ile sonuçlanır. Bu değişim ile telogen fazdan anagen faza geçiş zorlaşır, anagen faz kısalır ve telogen kıl folikülü/anagen kıl folikülü oranı artar. Dökülme tedavisinde amaç bu değişimi tersine çevirmektir. Kullanılan çok sayıda medikasyon mevcuttur. Özellikle doğaya dönüş trendi ile çok sayıda bitkisel ilaç bu amaçla kullanılmaktadır. Ancak çoğunun etki, yan etki ve güvenilirliği gösterilmemiştir. Bu konuda bilimsel kanıtlara ihtiyaç mevcuttur.

Ginkgo biloba, günümüzde varlığını sürdüren hiçbir benzer tür bulunmayan, sınıfında, takımında ve familyasında tek cins olan bir ağaçtır. 270 milyon yıl boyunca değişim göstermediği bilindiği için yaşayan bir fosil kabul edilmektedir. Asya geleneksel tıbbında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bilişsel ve hafıza artırıcı, cinsel güç artırıcı etkileri olduğu öne sürülmüştür. Alzheimer hastalığı, senil demans, serebral yetmezlik, intermitan klodikasyon ve multi-infarkt demansta destek tedavisi amaçlı klinik kullanımı mevcuttur. Etki mekanizmaları artmış serebral kan akımı, antioksidan etkileri ve antiinflamatuvar etkilerini içerir. Kıl folikülünün anagen fazdan telogen faza geçişine neden olan faktörler olarak vazodilatasyon mekanizmalarının bozulması, oksidan stresin artması ve inflamatuvar süreçlerin tetiklenmesi suçlanmıştır. Bu bulgulardan hareketle çalışmamızda ginkgo bilobanın kıl folikülü üzerine topikal ve sistemik uygulama ile etkilerinin in vivo olarak araştırılması planlanmıştır. Bu sayede maddenin güvenli olup olmadığı, kıl folikülü üzerine olumlu yada olumsuz etkileri, diğer olası etki ve yan etkilerinin tespiti hedeflenmiştir. Topikal veya sistemik kullanımının kıl folikülü üzerine olumlu etkisi gösterilmesi durumunda saç dökülmesi için yeni bir tedavi alternatifi olabilecektir. Çalışma sonuçları, yeni çalışmalara ışık tutabilecektir.

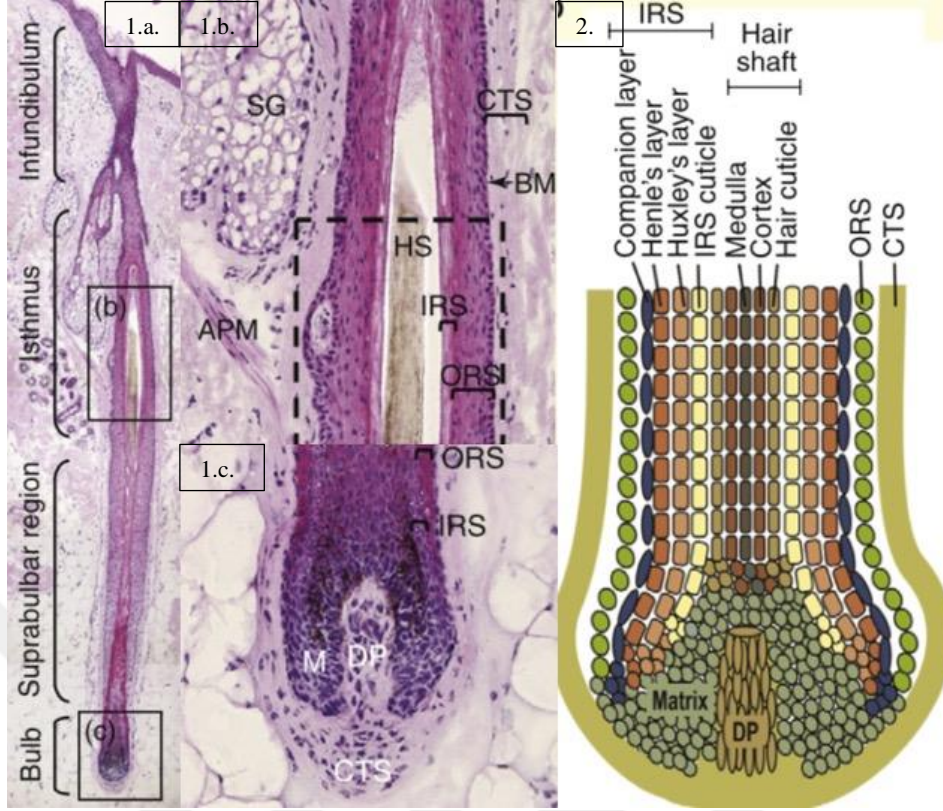
2. GENEL BİLGİLER

2.1. KIL FOLİKÜLÜ HİSTOMORFOLOJİSİ

Kıl folikülü (KF), pilosebase ünite ile ilişkili bulunan, memeliler için karakteristik, dinamik ve karmaşık bir mini organdır (1). İnsan ve murin kıl folikülleri organizasyon ve fonksiyonun aynı temel özelliklerini paylaşırlar ve faredeki temel kıl araştırmaları uzun zamandan beri hem temel hem de saç biyolojisi anlayışımızın öncüsü olmuştur (2). Her iki türde de kıl folikülleri aynı ana hücre tiplerini içerir ve aktif büyüme (anagen), regresyon (katagen) ve göreceli “sessizlik” (telogen) fazları arasında değişen, tekrarlayan döngüye girer (1,2).

Olgun (anagen) KF'nin distal kısmı infundibulum olarak isimlendirilir ve epidermis yüzeyine açılan kıl kanalı, kıl kanalını çevreleyen dış kök kılıfı bu kısımda bulunur. İfundibulum proksimal kısmında sebace glandın açıldığı yerle sonlanır. Bu kısımdan erekteör pili kası insersiyosuna kadar istmus olarak adlandırılır. İfundibulum ve istmus saç döngüsü değişimlerinin belirgin olmadığı, nisbeten kalıcı kısımlardır. İstmusun alt kısmı saç bulbusuna suprabulbar bölge ile bağlanır. Suprabulbar bölge distalinde yer alan şişkin kısım kıl germi olarak adlandırılır, epitelyal ve melanositik kök hücreler yer alır. Bulbus, KF proksimalinde yer alan soğan şekilli kalınlaşmadır. Matrix keratinositleri, melanositler ve dış kök kılıfı hücrelerinden oluşur ve dermal papillayı sarar (Şekil 1). Dermal papilla sıkı paketlenmiş fibroblastlardan oluşur, kıl shaftı uzunluk ve çapını belirler. İfundibulum, istmus, suprabulbar bölge ve bulbus ektoderm; dermal papilla mezoderm kaynaklıdır (1-3).

Anagen KF enine kesitte içten dışa doğru medulla, korteks ve kutikuladan oluşan kıl shaftı; iç kök kılıfı kutikulası, Huxley tabakası, Henley tabakası, tamamlayıcı katmandan oluşan iç kök kılıfı; dış kök kılıfı ve bunlara dışarıdan sıkıca bağlanan bağ dokusu kılıfından oluşur (Şekil 2) (1,3).



Şekil 1. Olgun kıl folikülü sagittal kesiti.

- 1.a. İnfundibulum, istmus, suprabulbar bölge ve bulbus.
- 1.b. İstmusun yüksek büyütmede görünümü.
- 1.c. Bulbusun yüksek büyütmede görünümü.

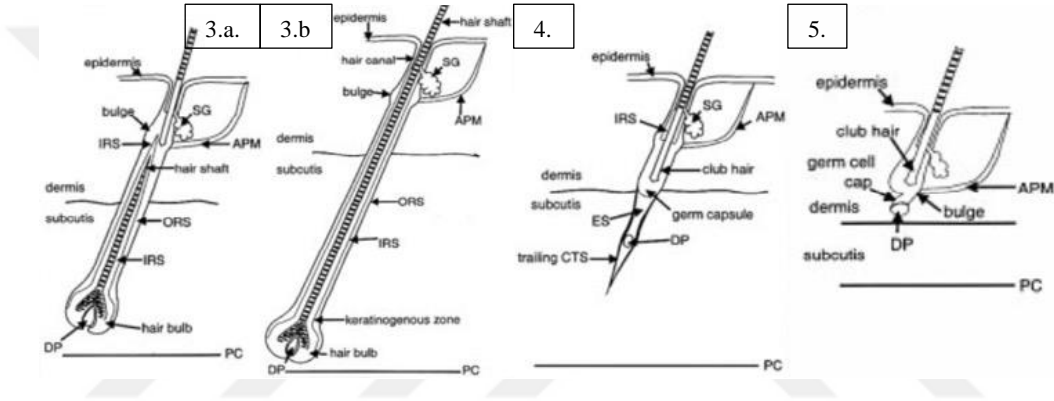
Şekil 2. Olgun kıl folikülü katmanlarının şematik çizimi.

(APM: Erektör pili kası, BM: Bazal membran, Bulb: Bulbus, Companion layer: Tamamlayıcı katman, CTS: Bağ doku kılıfı, DP: Dermal papilla, Hair cuticle: Kutikula, Henley's layer: Henley tabakası, HS: Kıl shaftı, Huxley's layer: Huxley tabakası, IRS: İç kök kılıfı, IRS cuticle: İç kök kılıfı kutikulası, Isthmus: İstmus, M: Matriks, ORS: Dış kök kılıfı, SG: Sebace gland, Suprabulbar bölge).

2.2. KIL GELİŞİMİ

Anagen evre boyunca proliferasyon hakimdir. Dermal papilla kompakt halden gevşek bir kıvama geçer, dermal papilla üzerinde farklılaşan keratinize hücreler iç kök kılıfını oluşturur, iç kök kılıfı dışında dış kök kılıfı belirir, yeni KF gelişir ve uzayarak saç kanalına girer, bulbus dermisten subkutis tabakası derinlerine doğru gömülür, tüm cilt tabakalarında kalınlaşma olur (Şekil 3).

Pigmente farelerde cilt rengi koyulaşması ve cilt kalınlaşması makroskopik olarak da gözlenebilir. Katagen evrede tüm yapılarda apoptoz hakimdir. KF proksimali çomaklaşır ve apoptotik odaklar nedeni ile fırçamsı görünüm alır, dermal papilla gevşek ve soğan şekilli görünümünden kompakt ve top şekilli görünümüne dönüşür, bulbus subkutis tabakasından dermise doğru ilerler, tüm cilt tabakalarında incelme olur, pigmente türlerde melanin inkontinansı görülür (Şekil 4). Telogen evrede KF tamamen dermis içine gömülüdür, dermal papilla kompakt yapıda ve top şeklindedir (Şekil 5). Keratinositlerde proliferasyonla beraber anagen evre tekrar başlar (2,3).



Şekil 3. Anagen evrede kıl folikülü şematik çizimi.

3.a. Erken anagen evrede kıl folikülü.

3.b. İleri anagen evrede kıl folikülü.

Şekil 4. Katagen evrede kıl folikülü şematik çizimi.

Şekil 5. Telogen evrede kıl folikülü şematik çizimi.

(APM: Erektör pili kası, Bulge: Kıl germi, Club hair: Çomaklaşmış kıl, DP: Dermal papilla, Epithelial strand: Epitelyal tabaka, Germ cell cap: Germ hücre çıkıntısı, Hair bulb: Bulbus, Hair canal: Saç kanalı, Hair shaft: Kıl shaftı, IRS: İç kök kılıfı, Keratinogenous zone: Keratinleşme bölgesi, ORS: Dış kök kılıfı, PC: Pannikulus karnosus, SG: Sebace gland, Trailing CTS: Sürüklenen bağ doku kılıfı)

KF çalışmalarında, çevresel faktörlerden kaçınmak ve KF gelişimini kılılı derinin tümünde standart şekilde senkronize etmek için depilasyon uygulanarak tüm kıl shaftları yerinden ayrılır (3). Bu sayede homojen anagen gelişimi indüklenmiş olur. Farelerde cilt kalınlığı ve KF döngüsünün sıkı birleşimi nedeniyle, anagen gelişimi neredeyse tüm cilt bölmelerinin yapısında ve

kalınlığında derin değişikliklere neden olur. Trikoqram ile yarı invaziv bir şekilde anagen/telogen kıl oranını belirlenebilse de, katajen kıl foliküllerini tanımlamak, cilt bölmelerindeki değişikliği ayırt etmek, doğru bir anagen-katagen-telogen KF oranı oluşturmak için cilt biyopsileri ve histolojik evreleme kıl araştırmalarında gerekli bir esastır (2-4).

2.3. ANDROGENETİK ALOPESİ

Saç, kişinin sosyal ve cinsel kimliğinde önemli role sahiptir. Eski çağlardan bu yana saç dökülmesi çözüm aranan bir sorun olmuştur (4,5). Androgenetik alopesi (AGA), en yaygın görülen saç dökülmesi tipidir. Değişik penetrasyonlar gösteren ilerleyici bir dominant kalıtım hastalığıdır (6,7). Erkeklerde kadınlardan daha sık görülür ve daha şiddetli seyreder. Prevalansı yaşla artar, toplumun en az %50'si etkilenmiştir (4,6,8). Klinikte saç dökülmesi paterni karakteristik olarak erkekte bitemporal saç çizgisinin geriye çekilmesi, verteksteki helezonal saçların kaybı; kadında alından geriye doğru skalp orta hat boyunca diffüz incelme şeklinde görülür. Tanı çoğunlukla klinik olarak konur. Hamilton ve Ludwig sınıflamaları şiddet değerlendirmesi için en yaygın kullanılan skalalardır (6,7,9).

AGA'nın ana histopatolojik özelliği terminal kıllarda minyatürleşmedir. Subkütan yağ dokuda KF sayısı azalır, foliküller giderek daha yüzeysel ve küçük hale gelir. Saç shaftları daha ince, daha kısa ve daha soluk hal alır. Minyatürize foliküllerin daha kısa bir anagen fazı vardır. Sonuç olarak anagen kıl sayısında azalma ve telogen kıl sayısında artma meydana gelir (4,6,7). Etiyopatogenezinde genetik zeminde hormonal ve çevresel faktörlerin etkisi ile mikroinflamasyon ve dermal papillada bozulmuş kan akımı suçlanmıştır (4,5). Tedavide FDA onaylı ajanlar topikal minoksidil ve oral finasteridten ibarettir. Birinci basamak tedaviye cevap vermeyen hastalar için alternatif olabilecek yeni tedavilerin incelenmesine çok ihtiyaç vardır (10).

2.4. GİNKGO BİLOBA

Ginkgo biloba (GB), Ginkgoata kök grubu içerisinde Ginkgofita bölümündeki tek tür olan ve evrimsel süreçte yaşadığı değişiklikler minimal olması sebebi ile yaşayan fosil olarak bilinen bir ağaç türüdür (11,12). Filogenetik çalışmalar ginkgoata kök grubu yaşının yaklaşık 325 milyon yıl olduğunu göstermiştir (13). Menşe yerinin Doğu Çin olduğu düşünülmektedir (11,12). Çin, Japonya ve Kore’de doğal olarak yetişmektedir (12). Bitki hastalıklarına belirgin şekilde dirençlidir (11). Çin geleneksel tıbbında ve mutfağında çeşitli amaçlarla binlerce yıldır kullanılmaktadır (12,14). Yaprak, kök ve kabuklu yemişinden elde edilen çok çeşitli ticari formları mevcuttur. Neredeyse tüm formlarında bulunan aktif farmakolojik içerik aynıdır: %24-36 oranında flavonol glikozidleri (kemprefol, meletin, izoramnetin ve diğerleri), %4-11 oranında terpen trilaktonlar (ginkgolid türleri) ve eser miktarda ginkgolik asit (11-15).

Flavonoidler antioksidan etkiye sahiptir, nöronal reseptörlerle etkileşime girebilir ve hipokampusta hafıza ve öğrenme süreçlerinde etkili yolları aktive edebilir (16,17). Terpen laktonları trombosit aktive edici faktör reseptör antagonizması, kan akımını artırma, serbest radikallerin neden olduğu membran hasarının önlenmesi gibi farklı biyolojik aktivitelere sahiptir (15,18). Hem flavonoidler hem terpenler antiapoptotik etkilidir (19). Bu aktif bileşenlerle GB öğrenme ve hafıza bozukluğuna karşı koruma sağlayabilir, bilişsel bozulmayı durdurabilir veya yavaşlatabilir (15,20). Yaşlı erkek farelerde GB’nın hipokampal nörogenez üzerinde olumlu etkileri immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir (21). Demanslı bireylerde 22 hafta boyunca 200 mg/gün’den daha yüksek dozda (genellikle 240 mg/g) GB tüketilmesinin plaseboya göre bilişsel performans, günlük yaşam aktiviteleri ve klinik global izlenim üzerinde potansiyel olarak yararlı etkileri olduğunu göstermektedir (15). Deneysel fokal serebral iskemi üzerine yapılan bir metaanalizde antiapoptotik, antioksidatif ve antiinflamatuvar mekanizmalar ile önemli nöroprotektif etkisi vurgulanmıştır (22). Bir çalışmada fare modelinde cerrahi işlem sırasında GB verilmesinin overde iskemi/reperfüzyon hasarını histopatolojik olarak anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (23). Yetişkin sıçanlarda testiküler iskemi/reperfüzyon hasarının

neden olduğu subfertiliteyi iyileştirme mekanizması olarak mitokondrial NAD⁺ seviyesi ilişkili apopitoz ve oksidatif stresi azaltması öne sürölmüştür (24). Vasköler faktörler ve oksidatif hasarın yaşa bağlı maköle dejenerasyonunda potansiyel mekanizmalardan olmasından hareketle yapılan çalışmalarda görme üzerine bazı olumlu etkileri bildirilmiştir (25). Farelerde parasetamolle indöklenen akut hepatik hasarı önleyebileceğine dair kanıtlar mevcuttur (26).

Güvenlik verileri, GB ile ilgili önemli güvenlik endişeleri ortaya koymamıştır (27). Önerilen günlük doz 2 yada 3'e bölünmüş şekilde 120-240 mg'dır (20,28). Ames toksisite testinde dört standart Salmonella suşu üzerinde GB'nin herhangi bir mutajenite etkisi olmamıştır (29). GB, küçük yan etkileri olan güvenli bir ajandır (15,29).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmadaki fareler Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (Afyonkarahisar, Türkiye) temin edildi. Çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28.05.2019 tarih ve 49533702/69 sayılı onayı ile 09.07.19 – 06.08.19 tarihleri arasında yapıldı. Toplam 28 adet Swiss Albino cinsi 7 haftalık erkek fare dahil edildi. Deney protokolünde depilasyon için Veet Tüy Dökücü Krem Hassas Ciltler (Reckitt Benckiser, Massy, Fransa) kullanıldı. Medikasyon olarak Minoksidil %2 Deri Spreyi (Pharmactive, Tekirdağ, Türkiye) ve Gingko Biloba Sıvı Yaprak Ekstraktı 10 ml/1200 mg (Sepe Natural, İzmir, Türkiye) kullanıldı. Görüntülemeler Sony DSC-T7 dijital kamera (Sony Corp., Tokyo, Japonya) ile yapıldı.

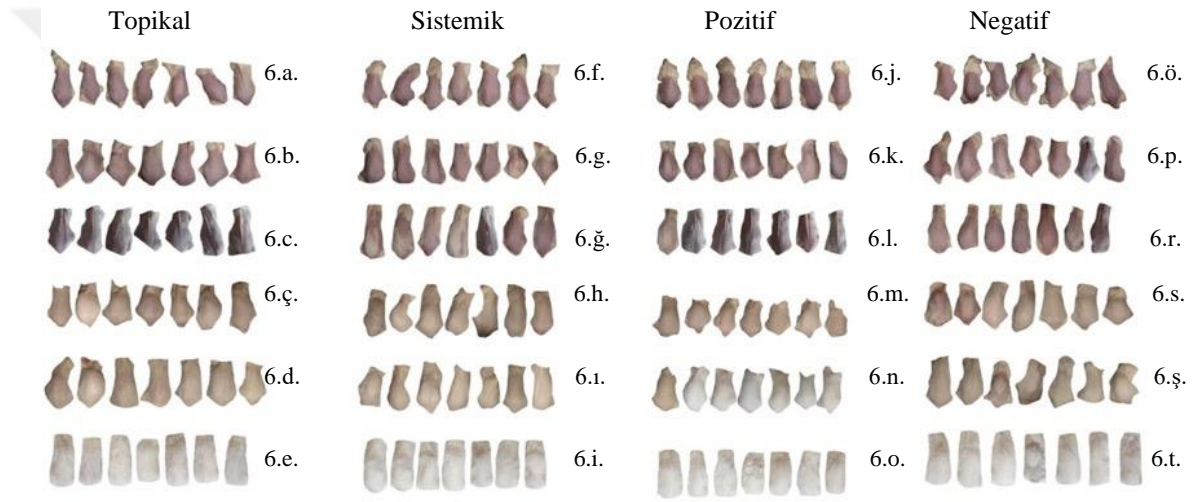
Farelerin yeni ortamlarına bir hafta boyunca adapte olmalarına izin verildi. Su ve yiyecek erişimi kısıtlanmadı. Hayvanlar polipropilen kafeslerde standart şartlar altında (12 saat ışık ve karanlık döngüsü, 24±0.5 °C ve %55±5 nem) tutuldu. Aklimatizasyondan 7 gün sonra, tüm farelere 30 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin karışımı kas içine uygulanarak anestezi sağlandı. Yaklaşık 2 cm genişlik ve 4 cm uzunluktaki dorsal kıllar traş bıçağı kullanılarak traş edildi. Bölgedeki kıl foliküllerini homojen olarak anagen safhaya sokmak için kalan kıllar tüy dökücü krem ile elimine edildi. Fareler hiç bir ürün uygulanmayacak grup negatif kontrol grubu (N=7), %2 topikal minoksidil uygulanacak grup pozitif kontrol grubu (N=7), topikal GB uygulanacak grup (N=7), oral GB uygulanacak grup (N=7) olmak üzere randomize dört gruba ayrıldı. Oral GB verilecek grup için insan dozundan hayvan dozuna dönüşümde vücut yüzey alanı ile Km faktörü esas alan (İnsan için Km=37, Fare için Km=3) “İnsan eşdeğer dozu (mg/kg)= Hayvan eşdeğer dozu (mg/kg)x (İnsan Km/Hayvan Km)” formülü kullanılarak deney hayvanı dozu hesaplandı (15,20,30). İnsan için önerilen günlük doz (iki yada üçe bölünmüş şekilde 240 mg) fare için çevrim yapıldığında günlük 19,5 mg olarak belirlendi. Topikal minoksidil ve topikal GB günde iki kez 0.08 ml hacminde depilasyon alanını nemlendirme şeklinde uygulandı. Oral GB günde iki

eşit doza bölünerek çelik gavaj ile verildi. Farelere depilasyondan 1 gün sonra başlanarak medikasyon verilmeye/uygulanmaya başlandı ve 28 gün boyunca devam edildi. Güvenilirliği değerlendirmek için her fare fiziksel görünümdeki anormallikler, davranışsal değişimler, gıda ve su alımı vs gibi özelliklerdeki anormallikler açısından günlük olarak gözlemlendi. Süreç boyunca topikal ve sistemik uygulanan ürün gruplarındaki kıl folikülü gelişimi diğer gruplarla karşılaştırılarak makroskopik şekilde gözlemlendi. Depilasyondan sonra 0, 7, 10, 14, 21, 28. günler farenin sırt kısmı dijital kamera ile fotoğraflandı. Görüntüler bilgisayara aktarıldıktan sonra “Kıl çıkma yüzdesi=(Kıllı alan:Depilasyon alanı)x100” formülü ile kantitatif olarak ölçüme kör 3 hekim tarafından değerlendirildi. Yirmisekizinci günde tüm farelere 30 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin karışımı kas içine uygulanarak anestezi sağlandı ve her fare derisinden iki adet 6 mm’lik punch biyopsi materyali temin edildi. Materyaller %10 formaldehit içinde kurutuldu, daha sonra alkol ve ksilen kullanılarak dehidrate edildi ve parafin içine gömüldü. Otomatik doku işlemci kullanılarak bir mikrotom ile 3,5 mikron kalınlığında biri transvers biri longitudinal olacak şekilde kesitlendi, hematoksilin ve eozin ile boyama yapıldı. Longitudinal kesitlenmiş örnekler folikül morfolojisini gözlemlemek, KF morfogenezinin farklı aşamalarını sınıflandırmak ve subkütan dokudaki folikül sayısını tespit etmek için kullanıldı. Transvers kesitlenmiş örnekler KF sayılarının ve çap ortalamasının saptanması için kullanıldı. Histopatolojik inceleme patoloji hekimi tarafından ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ni-u; Nikon, Tokyo, Japonya) ile yapıldı. Veriler temsili bölgeden x100 sabit büyütmede değerlendirildi. Bulgular, kabul edilen kıl evresi morfolojik kılavuzu ile analiz edildi (3). KF ortalama çapı, anagen kıl/telogen kıl oranı, subkütan doku folikül sayısı, KF ortalama uzunluğu mikroskop altında ölçüldü.

Sonuçlar ortalama ± standart sapma değeri şeklinde sunuldu. Veriler tek faktörlü varyans analizi’ni (One-Way ANOVA) takiben LSD çoklu karşılaştırma testi ile analiz edildi. İstatiksel analiz için IBM SPSS Statistics Version 25 programı kullanıldı. p<0.05 değeri istatiksel anlamlı olarak değerlendirildi.

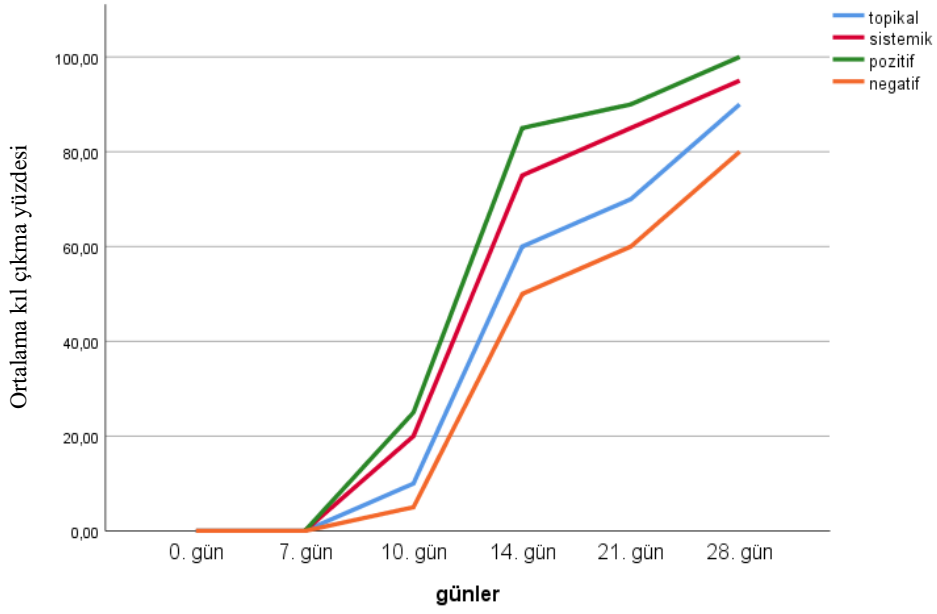
4. BULGULAR

Depilasyondan sonra gözle görülür ilk değişiklikler 8. günde pozitif kontrol grubunda fark edildi. Günler içinde kıl büyümesi tüm gruplarda daha gözle görülür hale geldi. Makroskopik morfolojik gözlemde pozitif kontrol grubu diğer gruplardan, topikal ve sistemik tedavi grubu negatif kontrol grubundan daha çok ve daha hızlı kıllanma gösterdi (Şekil 6). Kıl çıkma yüzdesi, negatif kontrol grubunda tüm diğer gruplardan çok düşüktü (Şekil 7).



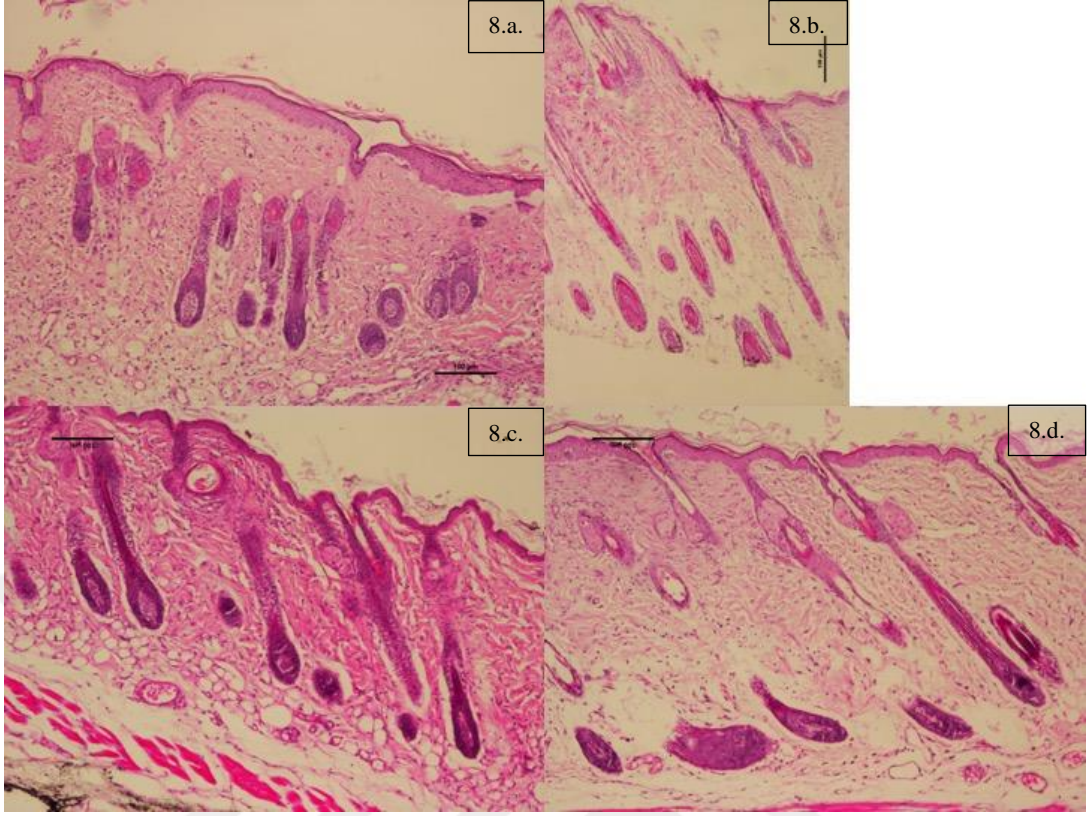
Şekil 6. Deney gruplarında kıl büyümesi makroskopik görünümü

- 6.a., 6.f., 6.j., 6.ö. 0. günler.
- 6.a., 6.f., 6.j., 6.ö. 7. günler.
- 6.a., 6.f., 6.j., 6.ö. 10. günler.
- 6.a., 6.f., 6.j., 6.ö. 14. günler.
- 6.a., 6.f., 6.j., 6.ö. 21. günler.
- 6.a., 6.f., 6.j., 6.ö. 28. günler.



Şekil 7. Günlere göre kıl çıkma yüzdesi (Kıl çıkma yüzdesi= [Kıllı alan:Depilasyon alanı] x100.

Depilasyon sonra 28. günde yapılan histopatolojik analizde negatif kontrol grubunda kılların çoğu bulbusun dermiste olması ve dermal papillanın genişlemiş olması ile karakterize erken anagen safhadaydı. Tersine diğer gruplarda bulbusun en büyük hacimde olması, dermal papillanın daha ince olması, kıl foliküllerinin derin subkutiste bulunması ve yeni gelişen kıl shaftının sebace glandın hemen alt seviyesine ulaşması ile karakterize en az anagen evre 3c-4 safhalarındaydı. Longitudinal cilt kesitlerinden elde edilen KF morfolojileri Şekil 8’de gösterilmektedir. Sistemik tedavi grubunda topikale göre bulbus daha derinde ve foliküller daha büyük gözlendi. Folikül çaplarını ve sayılarını belirlemek için kullanılan transvers cilt kesitleri Şekil 9’da gösterilmektedir.



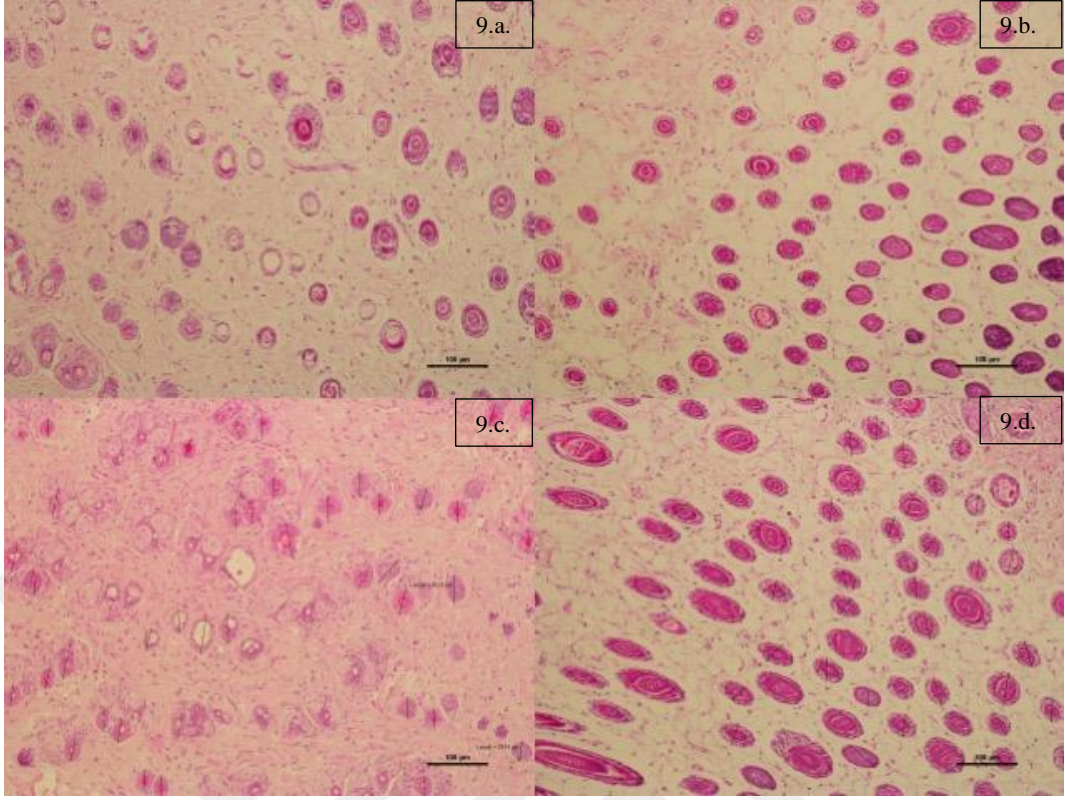
Şekil 8. Deney gruplarında kıl folikülü morfolojileri (x100 büyütme, ışık mikroskopu).

8.a. Negatif kontrol grubu.

8.b. Pozitif kontrol grubu.

8.c. Topikal GB grubu.

8.d. Sistemik GB grubu.



Şekil 9. Deney gruplarında kıl folikülü sayı ve çapları (x100 büyütme, ışık mikroskobu).

9.a. Negatif kontrol grubu.

9.b. Pozitif kontrol grubu.

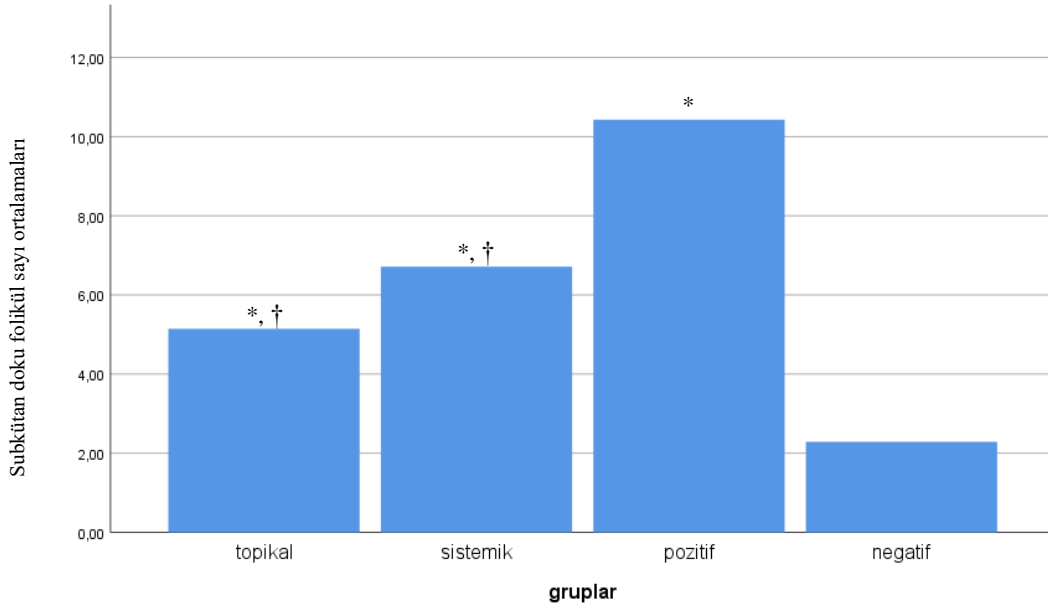
9.c. Topikal GB grubu.

9.d. Sistemik GB grubu.

Tüm deney gruplarında negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında subkutan dokuda daha çok sayıda folikül vardı. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Sistemik GB grubundaki subkutan doku folikül sayısı, topikal GB grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksekti ($p < 0.05$) (Tablo I ve Şekil 10).

Tablo I. Gruplara göre histopatolojik bulgular (ortalama \pm standart sapma).

| | Topikal | Sistemik | Negatif | Pozitif |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| Subkütan doku folikül sayısı | 5,14 \pm 0,69 | 6,71 \pm 1,11 | 2,28 \pm 1,11 | 10,42 \pm 1,51 |
| Kıl folikülü çapı (μ m) | 40,55 \pm 1,62 | 41,40 \pm 1,34 | 38,05 \pm 1,58 | 45,59 \pm 3,35 |
| Kıl folikülü uzunluğu (μ m) | 393,33 \pm 11,24 | 565,54 \pm 28,39 | 325,36 \pm 26,01 | 590,71 \pm 46,7 |
| Anagen kıl/telogen kıl oranı | 3,27 \pm 0,68 | 5,16 \pm 1,20 | 2,59 \pm 0,39 | 5,44 \pm 0,92 |



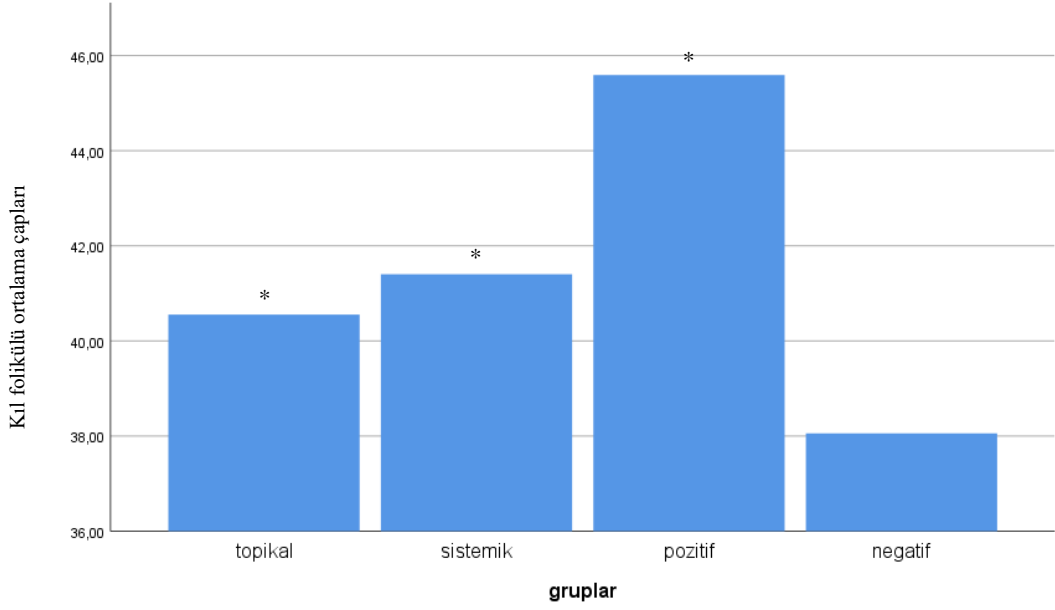
Şekil 10. Gruplara göre subkütan doku folikül sayıları.

* Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

† Topikal ve sistemik gruplar karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Tüm deney gruplarında negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KF ortalama çapı daha büyüktü. Diğer deney grupları ile negatif kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). KF ortalama çapı topikal

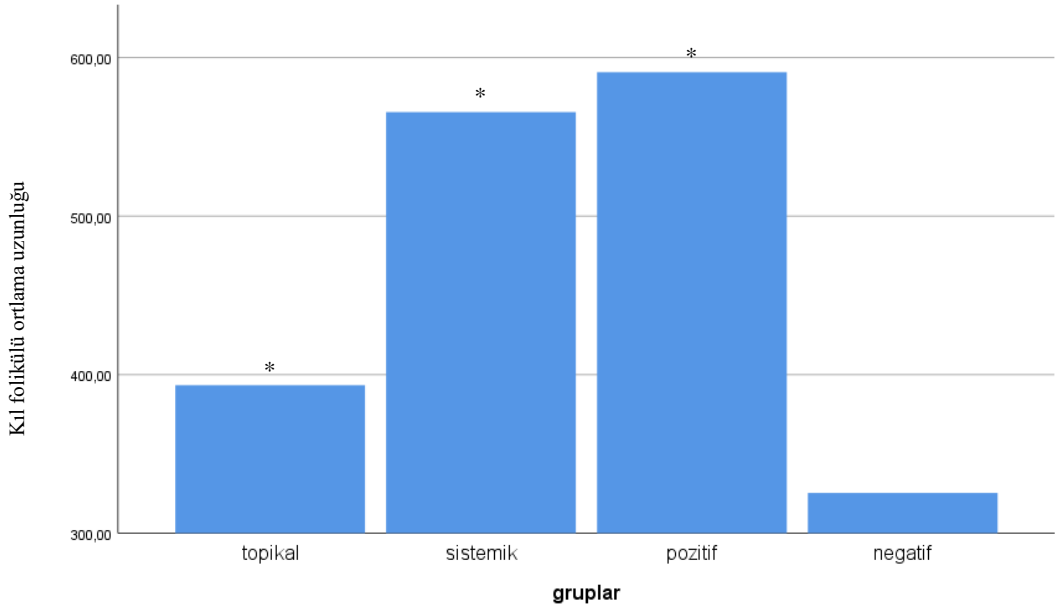
GB grubunda $40,55 \pm 1,62$; sistemik GB grubunda $41,40 \pm 1,34$ mikron olarak bulundu. Topikal ve sistemik GB grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$) (Tablo I ve Şekil 11).



Şekil 11. Gruplara göre kıl folikülü ortalama çapları.

* Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$.

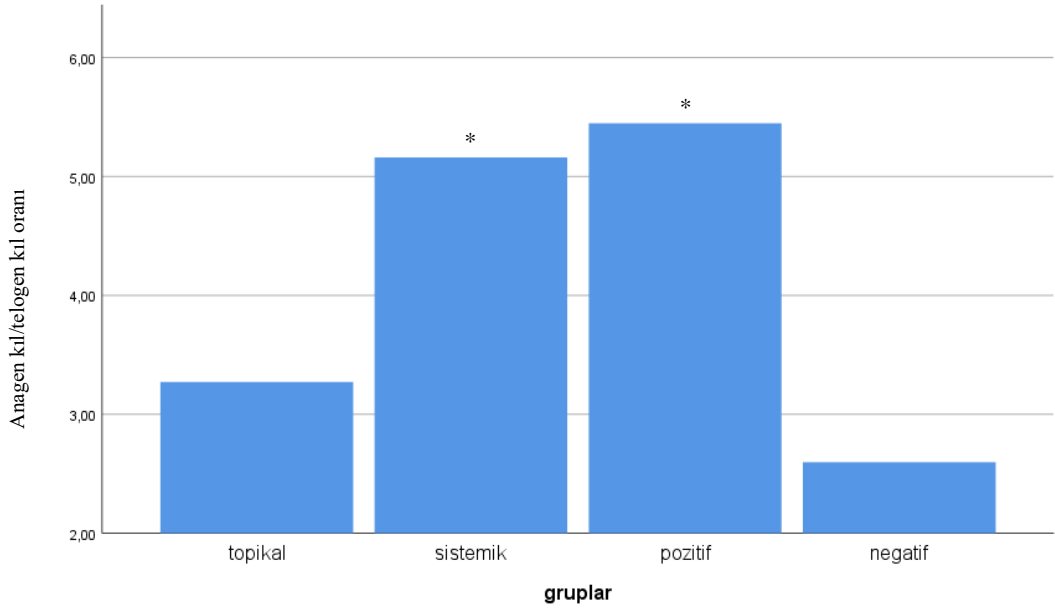
KF ortalama uzunluğu, sistemik GB grubu ve pozitif kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermedi ($p > 0,05$). Tüm gruplarda negatif kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$) (Tablo I ve Şekil 12).



Şekil 12. Gruplara göre kıl folikülü ortalama uzunluğu.

* Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

Anagen kıl/telogen kıl oranı topikal GB, sistemik GB, pozitif kontrol ve negatif kontrol grubunda sırası ile $3,27 \pm 0,68$; $5,16 \pm 1,20$; $2,59 \pm 0,39$; $5,44 \pm 0,92$ olarak bulundu. Sistemik GB grubu ve pozitif kontrol grubunda, hem topikal GB grubu hem negatif kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek orandaydı ($p < 0.05$). Sistemik GB grubu ile pozitif kontrol grubu arasındaki fark anlamlı değildi ($p > 0.05$). Ayrıca topikal GB grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki fark da anlamlı değildi (Tablo I ve Şekil 13).



Şekil 13. Gruplara göre anagen kıl/telogen kıl oranı.

* Negatif kontrol veya topikal GB grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada GB topikal ve sistemik kullanımının Swiss Albino cinsi farelerde kıl büyümesini olumlu etkilediği makroskopik morfolojik değerlendirme ve histopatolojik bulgularla gösterilmiştir.

Kobayashi ve ark. tarafından GB'nin C3H farelerde kıl büyümesini olumlu etkileyebileceği bildirilmiştir. Ancak bu çalışma sonucu sadece makroskopik gözleme dayalıdır, histopatolojik değerlendirme yapılmamıştır (31). Literatür taramasında bunun dışında GB'nin kıl üzerine etkileri ile ilgili bir yayın bulunmamaktadır. Bu bakımdan çalışmamız literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır.

GB'nin kıl büyümesine olumlu etkisi, içeriğinde bulunan bileşenlerin her birinden kaynaklanmış olabilir. Avrupa'da satışı bulunan 50'den fazla GB ilaç ve gıda takviyesi içeriğinin yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) ve LC-kütle spektrometrisi ile gösterildiği bir çalışmada, GB içeriğinde en çok bulunan flavonların sırası ile kersetin, kempferol ve izoramnetin olduğu; terpen lakton olarak değişen oranlarda ginkgolid A, B, C ve bilobalid bulunduğu bildirilmiştir (32). Bu moleküllerin ayrı ayrı etkileri ile ilgili pek çok yayın mevcuttur.

Kersetin elma, çilek, üzüm, soğan, çay, domates gibi pek çok meyve ve sebze ile birçok tohum, fındık, çiçek ve yaprakta bulunan flavonoidlerden biridir (33). Takekoshi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada C3H/HeN cinsi farelerin bukkal bölgesindeki kıl folikülleri izole edilerek kültüre edilmiştir. Kültür ortamına eklenen kersetin arttıkça sentezlenen melanin miktarının arttığı, kersetinli ortamda melanin üretiminin kontrol grubuna göre çok yüksek olduğu, kersetinin kıl folikülü melanositlerinde tirozinaz protein sentezini artırarak melanogenezi stimüle ettiği masson-fontana ve immünohistokimyasal boyamalarla gösterilmiştir (34). Pigmente türlerde dermal papillada melanin granülleri telogen safhada gözükmezken, anagen safhaya geçişle beraber gözükür ve anagen fazın bir belirteci kabul edilir. Katagen evredeki değişimlerden biri kıl matriksinde

melanin granüllerinde dramatik azalmadır(3). Kıl büyümesi ve melanogenezin bu sıkı bağlantısı düşünüldüğünde melanogenezi indüklemiş maddelerin aslında kıl büyümesini de olumlu etkileyeceği anlaşılmaktadır. Bu durumda kersetinin melanogenez gibi kıl büyümesini de olumlu etkileyeceği çıkartılabilir. Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda yapılan in vivo bir çalışmada sıçanlara 20 gün boyunca subkütan testosteron uygulanarak AGA modeli oluşturulmuş ve floresan işaretleme yapılmış kersetin salan hibrid nanopartiküller hazırlanmıştır. Sonrasında hazırlanan solüsyon, alopesi modeli gelişmiş farelerin temizlenmiş cildine 20 gün boyunca mikropipet yardımı ile topikal olarak uygulanıp adeziv bantla kapatılmıştır. Çalışma sonunda diseke edilen cilt ışık mikroskopu ve floresan mikroskopla incelendiğinde kersetin uygulanan grupta anagen kıl/telogen kıl oranının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, kersetinin KF proksimal bölgesinde biriktiği ve bu birikimin KF hücrelerinin apoptozunu inhibe ettiği anlaşılmıştır (35). Başka bir çalışmada spontan alopesi areatası bulunan C3H/HeJ fareler randomize şekilde ikiye ayrılmış, bir gruba salin diğere kersetin çözeltisi 8 gün boyunca subkütan enjekte edilerek 6 hafta boyunca kıl çıkışı gözlenmiştir. İlk grupta hiçbir farede kıl çıkışı olmazken, kersetin uygulanan gruptaki tüm farelerde lezyon bölgesinde kıl çıkışı olmuştur. Kontrol grubunda kıl foliküllerinin içinde veya çevresinde gözlenen büyük lenfosit infiltratları kersetin ile tedavi edilen fare derisinde gözlenmemiştir. Aynı çalışmada kersetinin alopesi areata gelişimini önlemede etkisini araştırmak için ısı indüklü alopesi areata geliştirme amaçlı protokol uygulanan fareler iki gruba ayrılmış, 8 gün boyunca intraperitoneal yolla bir gruba salin bir gruba kersetin enjeksiyonu uygulanmıştır. Kontrol grubunda beklendiği gibi farelerin %24'ü dorsal bölgede alopesi geliştirirken, kersetin verilen grupta hiçbir farede alopesi gelişmemiştir. Histolojik incelemede kontrol grubunda KF içinde veya etrafında görülen lenfosit sızıntıları, kersetin verilen grupta tespit edilmemiştir. Ayrıca Western-Blot analizle hem spontan hem ısı indüklü alopesi areata lezyonlarında artmış bulunan inflamatuvar cevapla ilişkili bir protein olan ısı şok proteini 70'in kersetin verilen gruplarda düştüğü bildirilmiştir. Bu sonuçlar kersetinin mevcut alopesi areata lezyonlarını tedavi etmede ve alopesi areata gelişimini önlemede etkin olduğunu ve inflamatuvar cevabı azaltabileceğini göstermiştir (36).

Kempferol çay, brokoli, propolis, fasülye, pırasa, domates ve pek çok yenilebilir bitki içeriğinde bulunur (37). Miyata ve ark. tarafından aktif bileşenlerinden birinin kempferol olduğu HPLC ile doğrulanan brezilya propolisi, C57BL/6N farelere depilasyon sonrası 3 hafta boyunca topikal olarak uygulanmıştır. Kempferol içeren propolis uygulanan gruptaki fareler kontrol grubuna göre hem makroskopik gözlemede hem histolojik incelemede anagen faza daha erken ve daha fazla miktarda girmiştir (38). Bir hücre kültür çalışmasında kempferol, insan KF dermal papilla hücrelerinin çoğalmasını arttırmıştır (39).

İzoramnetin, kersetinin metillenmiş bir metabolitidir. Sprague–Dawley cinsi farelerde yapılan bir çalışmada farelere 3 gün üst üste kontrol solüsyonu veya izoramnetin oral yolla verilmiş, sonrasında her farenin aynı ayak altına ödem yaptığı bilinen kırmızı deniz yosunundan elde edilen jelleştirici bir polisakkarit olan karajenan subkütan yolla enjekte edilmiştir. İmmünohistokimyasal incelemede inflamasyona yanıt olarak artan COX-2 ekspresyonunun izoramnetin verilen grupta kontrole göre belirgin azaldığı görülmüştür (40). Başka bir yayında intraperitoneal karbontetraklorür enjeksiyonu ile karaciğer fibrozisi indüklenen farelere kontrol solüsyonu yada izoramnetin haftanın 5 günü oral yolla 4 hafta boyunca verilmiştir. İzoramnetin verildiği grupta serum ALT, AST düzeylerini önemli şekilde azaltmıştır ve karaciğerin histopatolojik incelemesinde hepatik dejenerasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kollajen birikimini anlamlı şekilde önlemiştir. Western blot inceleme hepatik stellat hücrelerde TGF- β /Smad sinyal yolağını inhibe ettiğini göstermiştir. Sonuç olarak izoramnetin karaciğer fibrozisini anlamlı şekilde zayıflatmıştır (41).

Hem kersetin hem izoramnetin vazodilatör etkilidir (42). Terpenlerin antioksidan davranışlarından dolayı karaciğer ve böbrek hastalıkları, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma süreci, kanser, diyabet gibi pek çok oksidatif stres ilişkili durumda koruma sağladığı kanıtlanmıştır (43). Tüm bu çalışmalar, sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Sonuçlarımız, AGA'daki patolojik bulguların GB aktif bileşenlerinin etkileri ile önlenileceği ve tedavi edilebileceğini öngörmektedir. AGA'da meydana gelen değişimlerden biri etkilenen hastalarda kıl döngüsünde androjene bağlı değişikliklere ek olarak mikroskopik foliküler inflamasyonun mevcut olmasıdır ve etkilenmiş bireylerde dermal papilla hücrelerinde oksidatif stres artmıştır (44,45). Histopatolojide klasik bulgularına ek olarak periinfundibular bölgede hafif dereceli lenfohistiositik hücre infiltrasyonu görülebilir (5,7). Bir çalışmada etkilenen hastaların plazma örneklerinde toplam antioksidan aktivitenin azalmış ve bir lipid peroksidasyon göstergesi olan malondialdehit düzeylerinin artmış olduğu bulunmuştur (45). KF minyatürizasyonunun olası mekanizmalarından birinin dermal papilla hücrelerinde apoptoz olduğu düşünülmektedir (5). Uyarılmış vazokonstriksiyonun saç büyümesini azaltabileceği ve saç kaybını indükleyebileceği öne sürülmüştür (46). TGF- β dış kök kılıfında reseptörü bulunan ve katagen fazı indükleyen moleküllerdendir (1,3,47). Bu nedenle TGF- β inhibisyonu katagen faza girmeyi zorlaştırabilir. KF büyümesi ve melanogenez sıkı ilişkilidir (47). Dolayısı ile KF büyümesinin bozulması melanin granülleri üretiminin de bozulması anlamına gelir. GB'nin, saç kaybının bu mekanizmalarını önleyerek etki etmesi olası gözükmektedir.

Sonuç olarak GB'nin aktif bileşenlerinin antiinflamatuvar, vazodilatör ve antiapoptotik özellikleri sayesinde kıl büyümesini olumlu etkilediğini düşünmekteyiz. Bu etkilerin moleküler mekanizmalarının yeni çalışmalarla incelenmesine ihtiyaç mevcuttur.

GB ticari formları imalat sürecindeki farklı koşullar ve işleme süreçleri nedeni ile etkinlik ve güvenlik farkı göstermektedir. Sabit kalitede, standardize edilmiş GB formu olan EGb761; %24 flavonol glikozidleri, %6 terpen trilaktonlar ve %0,0005'ten az oranda ginkgolik asit içerir (14,20). Çoğu randomize kontrollü araştırmada standardizasyon amaçlı EGb761 kullanılmaktadır (20). Ülkemizde deneysel kullanım amaçlı EGb761 satışı bulunmamaktadır. Çalışmamızda 10 ml'sinde 1200 mg standart GB yaprak ekstraktı içeren ticari bir form kullanıldı. GB yaprak ekstraktı, kurumuş ginkgo yaprakları aseton-su karışımı ve diğer

uygun çözücülerle tercih edilen bileşenlerin zenginleştirilmesi, istenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılması esasına dayanan çok basamaklı işlemler sonucu elde edilir (14). Çoğu kıl çalışmasında içeriğinden emin olunmayan bitki ekstraktları yüksek performanslı likid kromatografi metodu ile çalışılarak içeriği tespit edilmiştir (47,48). Çalışmamızda kullandığımız GB yaprak ekstresi içeriğini maddi nedenlerle HPLC ile gösterememiş olmamız, çalışmamızın kısıtlılıklarındandır.

GB yan etkileri ilgili vaka bildirimleri mevcut olsa da derlemelerde güvenli bir ajan olarak değerlendirilmiştir. Bent ve ark. tarafından GB'nin kanama riskini arttırabileceği bildirilmiş olsa bu yayınlar vaka bildirimleri şeklindedir (49). Bir çalışmada 12 hafta süre ile günde iki kez 60 mg/gün oral GB kullanımı trombosit sayısı, aPTT ve INR düzeylerinde anlamlı değişiklik oluşturmamıştır (50).

Literatür taramasında insanlarda uzun süre kullanım sonuçları ile ilgili bir yayın bulunmamaktadır. Ancak fare ve sıçanlarda 2 yıl boyunca GB takviyesi verildiğinde hem erkek hem dişi farelerde hepatoselüler adenom, hepatoselüler karsinom ve hepatoblastom riskini arttırdığı, hem fare hem sıçanlarda tiroid bezinde kanserojen potansiyeli olduğu tespit edilmiştir (51). Çalışma bulguları GB kullanımı ile ilişkili riskin değerlendirilmesinde bir bilgi boşluğunu doldursa da, bu sonuçlar hayvan deneylerinden üretildiği için insanlar üzerinde doğrudan bir risk öngörmez.

İnsan hepatik hücrelerinde GB yaprak ekstresi maruziyeti, herhangi bir önemli genotoksik, sitotoksik etkiye veya gen ekspresyonunda anlamlı değişikliklere yol açmamıştır (52). Ayrıca başka bir çalışmada farelerde akut toksisite testinde 21.5 g/kg GB ile mortalite olmadığı, subkronik toksisite testinde 91 günlük beslenmede advers etki gözlenmeyen en yüksek seviyesi 2g/kg olarak tespit edilmiştir (29). İnsan için önerilen dozun 120-240 mg/g olduğu düşünüldüğünde güvenlik aralığının geniş olduğu anlaşılmaktadır.

Erkek Wistar sıçanlarında streptozosin ile indüklenen diyabet çalışmasında GB, serum glukoz seviyesini düşürmüş ve antihiperlipidemik etki göstermiştir (53). Metformin tedavisinin yetersiz geldiği tip 2 diyabet hastalarında yapılan randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada GB HbA1c, açlık serum glukozu ve insülin seviyelerini anlamlı olarak düşürmüştür (54). AGA ve diyabette hedef organa kan akımı bozukluğu, inflamasyon artışı, oksidan stres artışı gibi benzer patogenetik mekanizmaların işlenmesi ve GB'nin her iki hastalık üzerinde etkili olması nedeni ile diyabeti ve AGA'sı olan hastalarda öncelikli tercih edilebilir.

Behçet hastalarından elde edilen eritrositlerde, oksidatif hasarın bir göstergesi olan malondialdehid seviyesi GB kullanılarak azaltılabilmektedir (55). Sınırlı, yavaş yayılan vitiligosu olan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada günde üç kez 40 mg/gün GB oral tüketiminin basit, güvenli ve oldukça etkili bir tedavi olduğu gösterilmiştir (56). Kısıtlı bir pilot çalışmada günde iki kez 60 mg oral GB kullanımının vitiligo yüzey alanını ve yayılımını anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (50). Vitiligo tedavisinde muhtemel etkisi antioksidan ve immünmodülatör özelliklerinden kaynaklanmaktadır (56).

Kısıtlı veriler GB'nin primer tinnitus tedavisinde etkili olduğunu göstermemiştir. Bununla beraber tinnitusta spesifik bir tedavi mevcut değildir ve tinnitus yönetiminde plasebo etkinin yeri güçlüdür (57).

Literatürde GB zehirlenmesi ile ilgili vaka bildirimleri mevcuttur (14). Bu bildirimler çok az sayıda olup, durum sadece nöbet yatkınlığı olan kişilerde etkilenmiş beyin bölgesine kan akımının artması ve nöromodülasyon bozukluğunun tetiklenmesi ile meydana gelmiş olabilir. Gingko tohumu zehirlenmesinde tonik-klonik nöbet, kusma ve bilinç kaybı görüldüğü belirtilmiştir (14). Demans ve AGA'nın yaşla görülme sıklığının arttığı, yaşlı bireylerde kronik hastalık sayısının yüksek olması ve çoklu ilaç kullanım ihtimali düşünüldüğünde yan etkilere karşı dikkatli olunmalıdır. Risk grubu hastalar risk artışı açısından bilgilendirilmelidir (49). Bununla beraber yaşa bağlı maküla

dejenerasyonu olan hastalarda yapılan çalışmalarda katılımcı yaşları ileri olmasına rağmen yan etki bildirilmemiştir (25). Bir diğer çalışmada en çok 240 mg/gün dozunda standartlaştırılmış GB (EGb 761) kullanımının klinik olarak anlamlı bir ilaç etkileşim potansiyeli gösterilememiştir (28).

Çalışmamızda Swiss albino cinsi erkek fareler kullanılmıştır. Temel olarak pigmente ve pigmente olmayan murin cinsleri ve insan KF gelişimi benzer biyolojik özelliklere sahiptir (3). Ancak melanogenezin anagen safha ile korele gitmesi, melanositlerin kıl yenilenmesindeki rolü ve inflamatuvar hücrelerin öncelikli hedefi olma hipotezleri düşünüldüğünde; pigmente cins fare kullanmamış olmamız çalışmamızın makroskopik morfolojik değerlendirme kısmını renk değişimi açısından eksik bırakmıştır. İnsan KF'nin immün sistemi çökertilmiş fareye greftlenmesi ile daha değerli in vivo çalışmalar yapılabilir. Sonuçlarımız bu tip yeni çalışmaların önünü açmaktadır. Etik nedenlerle yapılması zor olsa da, en doğru sonuç insanlarda topikal ve sistemik kullanımının histopatolojik sonuçlarının değerlendirilmesi ile elde edilecektir.

Ek olarak, deney protokolümüzdeki 28 günlük gözlem süreci boyunca hiçbir fare grubunda ölüm yada morbidite görülmemiştir. Tüm fareler, deney sonlandırılmadan önce aktif ve bakımlı gözükmekteydi.

Chung ve ark. tarafından balık nanesi, yine bir nane türü olan *Perilla frutescens* var. *acuta* ve yeşil çaydan oluşan bitkisel karışımın C57BL/6 farede kıl büyümesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, doku örneklerinde histopatolojik analize ek olarak kıl büyümesini sırasıyla stimüle ve inhibe ettiği bilinen IGF-1 ve TGF- β 1 proteinleri Western-Blot analizle çalışılmıştır. Böylece hem karışımın kıl büyümesini olumlu etkilediği şeklinde sonuçlanan histopatolojik veriler desteklenmiş hem etki mekanizması hakkında fikir yürütülebilmiştir (47). Bir diğer çalışmada Çin geleneksel tıbbında saç beyazlaşması veya dökülmesini tedavi amaçlı kullanılan 9 bitki, depilasyon sonrası 28 gün boyunca topikal testosteron peşine topikal şekilde uygulanmıştır. Farelerin serum ve doku örneklerinde testosteron, dihidrotestosteron ve östrojen

seviyeleri ELİSA kiti ile ölçülmüş, histopatolojik analize ek olarak 5- α redüktaz aktivitesi immünfloresan mikroskopla değerlendirilmiştir (48). Bizim deney protokolümüzde farelerde testosteron indüklü AGA modeli oluşturulmaması, az sayıda deney hayvanı kullanılması, histopatolojik verilere ek olarak serum testleri ve başka analizler yapılmaması, etki mekanizmasının moleküler değişimlerle gösterilememesi çalışmamızın kısıtlılıklarındandır. Bu tip çalışmalardan anlaşılacağı üzere, geleneksel tıpta uzun yıllardır kullanılan ve etkisi gözlenen bitkilerin etki ve güvenlikleri ile ilgili kanıt düzeyi yüksek araştırmalara büyük ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamızda GB'nin topikal veya sistemik uygulanması, KF ortalama çapı açısından anlamlı farklılık göstermemiştir. Bu durum topikal uygulamada emiliminin yeterli miktarda iyi olması, topikal uygulama sonrası gelişen lokal vazodilatasyon sonucu ajanın büyük kısmının hedef dokuya ulaşması ve sistemik dolaşıma geçen miktarın az olması; oral yolla verildiğinde enterohepatik eliminasyona uğrayarak kıllı deriye ulaşan miktarının az olması, gelişen sistemik vazodilatasyon sonucu ajanın hedef organa ulaşan konsantrasyonun düşmesi, sistemik dolaşımda pek çok doku tarafından paylaşılması, hedef organ reseptör ekspresyonlarının dokular arası farklılık göstermesi gibi nedenlerden kaynaklanmış olabilir.

Hem sistemik hem topikal GB grupları subkütan doku folikül sayısı, anagen kıl/telogen kıl oranı, kıl folikülü ortalama uzunluğu, kıl folikülü ortalama çapı parametrelerinin tümünde negatif kontrol grubundan yüksek değerlere sahipti. Bu fark sadece anagen kıl/telogen kıl oranı parametresinde, topikal GB grubunda yüksek olmakla beraber, negatif kontrol grubu ile topikal GB grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi. Diğer tüm değerlendirmelerde istatistiksel olarak anlamlı idi. Bu durum GB'nin kıl büyümesini olumlu etkilediğini kanıtlamaktadır.

Hem KF ortalama uzunluğu hem anagen kıl/telogen kıl oranı pozitif kontrol grubu ile sistemik GB grubu arasında, pozitif kontrol grubunda daha

yüksek bulunmakla beraber, istatistiksel anlamlı farklılık göstermemiştir. Buradan GB'nin neredeyse minoksidil kadar etkili ancak güvenlik profili çok daha geniş bir ajan olduğu düşünülebilir. Ayrıca sistemik kullanımda sağladığı antioksidan etkileri, başka hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde geniş kullanım alanı olması, topikal kullanımda minoksidil kadar yoğun kontakt dermatit beklenmemesi minoksidile üstünlüğü olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda topikal uygulama sadece solüsyonla nemlendirme şeklinde yapılmış olup, emilimi veya etkinliği artıracak masaj, oklüzyon, mikroigneleme gibi teknikler kullanılmamıştır. Ayrıca GB'nin insan için etkili dozu pek çok yayında etkin bulunan doz olan 240 mg/g kabul edilmiş ve insan/fare doz çevriminde en sık kullanılan formüllerden biri uygulanarak farelere verilecek sistemik doz ayarlanmıştır. Ancak etkin doz ve insan/fare doz çevrimi ile ilgili net bir görüş birliği bulunmamaktadır. Farklı topikal uygulama şekilleri bulunan, başka ajanlarla kombine edilen ve değişik dozlarda sistemik uygulama yapılan deney grupları oluşturularak deneyin tekrar edilmesi daha doğru sonuçlar verecektir. Bununla birlikte, bu çalışma GB için kıl büyümesine ilişkin yeterli ön veri sağlamaktadır.

AGA'nın ilerleyici doğası nedeniyle, tedaviye erken başlanmalı ve süresiz olarak devam edilmelidir (44). Bugüne kadar, AGA tedavisi için etkin olduğu yüksek kanıt düzeyinde gösterilmiş tedaviler erkek ve kadın için topikal minoksidil, erkek için oral finasterid ve erkek için düşük doz lazerden ibarettir (9,58). Minoksidil etki mekanizması net bilinmemektedir. Olası vazodilatör ve antiandrojenik olduğu düşünülmektedir. Gebelikte kontrendike olması, hipertrikoz ve kontakt dermatit gibi sık görülen yan etkileri kullanımını kısıtlamaktadır (4,10). Finasterid 5- α redüktaz inhibisyonu üzerinden etkilidir. Erkeklerde seksüel yan etkileri olması, kadında hem etkin olmaması hem teratojenik bir ajan olması tedavi tercihi sırasında göz önünde bulundurulmalıdır (10,59). Mevcut tedaviler AGA'nın derecelendirilmesi, hastaların patolojik koşulları, uygulanabilirliği, maliyetleri ve riskleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Ayrıca tedavinin süreklilik gerektirmesi nedeni ile hastanın uyumu zordur. AGA'nın görülme sıklığı ve neden

olan birçok patogenetik mekanizma göz önüne alındığında bu tedavilerin pek çok birey için yeterli gelmediği veya uygun olmadığı açıktır. Güvenilir ve sistemik tedaviler tercih edilmesi, tedavi seçeneklerinin dönüşümlü kullanılması ve mevcut tedavilerin yeterli gelmediği hastalarda alternatif seçenekler sunulması tedavi başarısını artırabilir. Bu nedenle, AGA tedavisi kişiselleştirilmiş tedaviye dayanmalı ve AGA'nın farklı patofizyolojik yönlerini hedeflemelidir (44). AGA tedavisinde GB yan etki ve ilaç etkileşim ihtimalinin düşük olması, hem sistemik hem topikal kullanımının etkili olması, uygulama kolaylığı gibi nedenlerle umut verici bir ajan olarak gözükmektedir. Çalışmamız hem metod hem GB'nin kılda büyümesinin ilk kez çalışılması nedeni ile ilerideki çalışmalara yol gösterecektir.



6. SONUÇ

Çalışmamızda Swiss-Albino cins farelerde hem topikal hem sistemik GB verilen gruplarda histopatolojik değerlendirmede subkütan dokudaki folikül sayısı, anagen kıl/telogen kıl oranı, KF ortalama çapı ve KF ortalama uzunluğu parametreleri açısından negatif kontrol grubuna göre artış olduğu bulunmuştur. Bu artış, anagen kıl/telogen kıl oranı parametresinde topikal GB grubu ve negatif kontrol grubu karşılaştırması hariç tüm diğer parametrelerde istatistiksel olarak anlamlıdır.

Makroskopik morfolojik gözlem, GB'nin hem topikal uygulanması hem sistemik verilmesinin KF büyümesini olumlu etkilediğini düşündürmüştür.

GB'nin aktif bileşenlerinin etki mekanizmaları artmış kan akımı, immünmodülatör, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini içerir. AGA etyopatogenezinde bu mekanizmaların bozulduğu düşünülmektedir.

GB sistemik kullanımda güvenlik aralığı çok geniş, yan etkileri minimal bir ajandır. Çalışmamızda topikal ve sistemik kullanımda bir yan etki görülmemiştir.

ÖZET

GİNGKO BİLOBANIN FARELERDE KIL BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

AMAÇ

Saç dökülmesi hemen herkesin hayatının bir döneminde karşılaştığı bir kozmetik sorundur. Dökülme nedenleri çok çeşitli olsa da temel olarak saç döngüsü değişimi ile sonuçlanır. Bu değişim ile telogen fazdan anagen faza geçiş zorlaşır, anagen faz kısalır ve telogen kıl/anagen kıl oranı artar. Dökülme tedavisinde amaç bu değişimi tersine çevirmektir.

Ginkgo biloba (GB), günümüzde varlığını sürdüren hiçbir benzer tür bulunmayan, yaşayan fosil olarak görülen bir ağaçtır. Asya geleneksel tıbbında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Alzheimer hastalığı, senil demans, serebral yetmezlik, intermitan kladikasyon ve multi-infarakt demansta destek tedavisi amaçlı klinik kullanımı mevcuttur. Etki mekanizmaları artmış serebral kan akımı, antioksidan etkileri ve antiinflamatuvar etkilerini içerir. Kıl folikülünün (KF) anagen fazdan telogen faza geçişine neden olan faktörler olarak vazodilatasyon mekanizmalarının bozulması, oksidan stresin artması ve inflamatuvar süreçlerin tetiklenmesi suçlanmıştır. Bu bulgulardan hareketle çalışmamızda GB'nin KF üzerine topikal ve sistemik uygulama ile etkilerinin in vivo olarak araştırılması planlanmıştır. Bu sayede maddenin güvenli olup olmadığı, KF üzerine olumlu yada olumsuz etkileri, diğer olası etki ve yan etkilerinin tespiti hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya toplam 28 adet Swiss Albino cinsi 7 haftalık erkek fare dahil edildi. Tüm farelerin sırtlarında 2x4 cm'lik alana anestezi altında depilasyon uygulandı. Fareler hiç bir ürün uygulanmayacak grup negatif kontrol grubu (N=7), %2 topikal minoksidil uygulanacak grup pozitif kontrol grubu (N=7), topikal GB uygulanacak grup (N=7), oral GB uygulanacak grup (N=7) olmak

üzere randomize dört gruba ayrıldı. Farelere depilasyondan 1 gün sonra başlanarak medikasyon verilmeye/uygulanmaya başlandı ve 28 gün boyunca devam edildi. Süreç boyunca topikal ve sistemik uygulanan ürün gruplarındaki KF gelişimi diğer gruplarla karşılaştırılarak makroskopik şekilde gözlemlendi. Depilasyondan sonra 0, 7, 10, 14, 21, 28. günler farenin sırt kısmı dijital kamera ile fotoğraflandı. Görüntüler bilgisayara aktarıldıktan sonra “Kıl çıkma yüzdesi=(Kıllı alan:Depilasyon alanı)x100” formülü ile kantitatif olarak ölçüme kör 3 hekim tarafından değerlendirildi. Yirmisekizinci günde anestezi altında her fare derisinden iki adet 6 mm’lik punch biyopsi materyali temin edildi. Materyaller biri transvers biri longitudinal olacak şekilde kesitlendi, hematoksilin ve eozin ile boyama yapıldı. Longitudinal kesitlenmiş örnekler folikül morfolojisini gözlemlemek, KF morfogenezinin farklı aşamalarını sınıflandırmak ve subkütan dokudaki folikül sayısını tespit etmek için kullanıldı. Transvers kesitlenmiş örnekler KF sayılarının ve çap ortalamasının saptanması için kullanıldı. KF ortalama çapı, anagen kıl/telogen kıl oranı, subkütan doku folikül sayısı ve KF ortalama uzunluğu ışık mikroskopu ile değerlendirildi.

BULGULAR

Depilasyondan sonra makroskopik morfolojik gözlemlerde pozitif kontrol grubu diğer gruplardan, topikal ve sistemik tedavi grubu negatif kontrol grubundan daha çok ve daha hızlı kıllanma gösterdi. Kıl çıkma yüzdesi, negatif kontrol grubunda tüm diğer gruplardan çok düşüktü.

Depilasyon sonrası 28. günde yapılan histopatolojik analizde negatif kontrol grubunda kılların çoğu bulbusun dermiste olması ve dermal papillanın genişlemiş olması ile karakterize erken anagen safhadaydı. Tersine diğer gruplarda bulbusun en büyük hacimde olması, dermal papillanın daha ince olması, foliküllerin derin subkutiste bulunması ve yeni gelişen kıl shaftının sebace glandın hemen alt seviyesine ulaşması ile karakterize en az anagen evre 3c-4 safhalarındaydı. Sistemik tedavi grubunda topikale göre bulbus daha derinde ve foliküller daha büyük gözlemlendi.

Tüm deney gruplarında negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında subkutan dokuda daha çok sayıda folikül vardı. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Sistemik GB grubundaki subkutan doku folikül sayısı, topikal GB grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksekti ($p<0.05$).

Tüm deney gruplarında negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KF ortalama çapı daha büyüktü. Diğer deney grupları ile negatif kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Topikal ve sistemik GB grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

KF ortalama uzunluğu sistemik GB grubu ve pozitif kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$). Tüm gruplarda negatif kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$).

Anagen kıl/telogen kıl oranı sistemik GB grubu ve pozitif kontrol grubunda, hem topikal GB grubu hem negatif kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek orandaydı ($p<0.05$). Sistemik GB grubu ile pozitif kontrol grubu arasındaki fark anlamlı değildi ($p>0.05$). Ayrıca topikal GB grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki fark da anlamlı değildi ($p>0.05$).

SONUÇ

Çalışmamızda Swiss-Albino cins farelerde hem topikal hem sistemik GB verilen gruplarda histopatolojik değerlendirmede subkutan dokudaki folikül sayısı, anagen kıl/telogen kıl oranı, KF ortalama çapı ve KF ortalama uzunluğu parametreleri açısından negatif kontrol grubuna göre artış olduğu bulunmuştur. Makroskopik morfolojik gözlem, GB'nin hem topikal uygulanması hem sistemik verilmesinin KF büyümesini olumlu etkilediğini düşündürmüştür.

ABSTRACT

THE EFFECTS OF GINKGO BILOBA ON HAIR GROWTH IN MICE

AIMS OF THE STUDY

Hair loss is a cosmetic problem that almost everyone faces during a period of their life. Although the causes of hair loss are varied, it basically results in hair cycle changes. With this change, the transition from the telogen phase to the anagen phase becomes difficult, the anagen phase becomes shorter and the telogen hair follicle/anagen hair follicle ratio increases. The aim of the hair loss treatment is to reverse this change.

Ginkgo biloba (GB) is a living fossil tree with no similar species surviving today. It is widely used in Asian traditional medicine. Clinical use is available for the supportive treatment of Alzheimer's disease, senile dementia, cerebral insufficiency, intermittent claudication and multi-infarct dementia. Mechanisms of action include increased cerebral blood flow, antioxidant effects and anti-inflammatory effects. Factors causing the transition of hair follicle (HF) from anagen phase to telogen phase have been accused of disruption of vasodilatation mechanisms, increased oxidant stress and triggering of inflammatory processes. Based on these findings, we aimed to investigate the effects of GB on HF by topical and systemic application in vivo. In this way, it is aimed to determine whether the substance is safe, positive or negative effects on HF, and other possible effects and side effects.

MATERIALS and METHODS

A total of 28 Swiss Albino 7-week-old male mice were included in the study. Depilation was applied under anesthesia to 2x4 cm area on the dorsum of all rats. Mice were randomly divided into 4 groups as negative control group where no drugs are administered, positive control group where 2% topical minoxidil is administered, third group where topical GB is administered and last

group where oral GB is administered. The mice were started medication given/applied 1 day after depilation and went on for 28 days. HF growth was observed macroscopically throughout the process in topical and systemic product groups compared with other groups. On the 0, 7, 10, 14, 21, 28 days after depilation, the back of the mouse was photographed with a digital camera. After transferring the images to the computer, “Percentage of hair growth = (Hairy area:Depilation area) x100 ” formula was evaluated quantitatively by 3 blinded-physicians. On day 28, two 6 mm punch biopsy materials were obtained from each mouse skin under anesthesia. One of the materials was transverse sectioned, the other was longitudinally sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. Longitudinal-sectioned samples were used to observe follicle morphology, to classify different stages of HF morphogenesis, and to determine the number of follicles in subcutaneous tissue. Transverse-sectioned samples were used to determine the number of HFs and mean diameter. The mean diameter of HF, anagen hair/telogen hair ratio, subcutaneous follicle count and HF mean length were evaluated by light microscopy.

RESULTS

After depilation at macroscopic morphological observation positive control group showed more and faster hair growth than the other groups. Also both topical and systemic groups showed more and faster hair growth than the negative group. The percentage of hair growth was much lower in the negative control group than in all other groups.

Histopathological analysis on day 28 post-depilation revealed that most of the hairs in the negative control group were in the early anagen phase, characterized by bulbus in dermis and enlarged dermal papillae. In contrast, the other groups were at least anagen stage 3c-4, characterized by the largest volume of bulbus, the thinner dermal papillae, the presence of follicles in the deep subcutis, and the newly developing hair shaft reaching the lower level of the

sebaceous gland. In the systemic treatment group, bulbus was deeper and follicles were larger than the topical.

In all experimental groups there were more follicles in the subcutaneous tissue compared to the negative control group. The difference was statistically significant ($p < 0.05$). The number of subcutaneous tissue follicles in the systemic GB group was significantly higher than the topical GB group ($p < 0.05$).

HF mean diameter was larger in all experimental groups compared to the negative control group. The difference between the other experimental groups and the negative control group was statistically significant ($p < 0.05$). The difference between topical and systemic GB groups was not statistically significant ($p > 0.05$).

HF mean length did not differ significantly between the systemic GB group and the positive control group ($p > 0.05$). All groups were significantly higher than the negative control group ($p < 0.05$).

Anagen hair/telogen hair ratio was significantly higher in systemic GB group and positive control group compared to both topical GB group and negative control group ($p < 0.05$). The difference between systemic GB group and positive control group was not significant ($p > 0.05$). Also, the difference between topical GB group and negative control group was not significant ($p > 0.05$).

CONCLUSION

In our study, histopathological evaluation of Swiss-Albino rats in both topical and systemic groups revealed that there was an increase in the number of follicles in subcutaneous tissue, anagen hair/telogen hair ratio, HF mean diameter and HF mean length parameters compared to negative control group. Macroscopic morphological observation suggested that both topical administration and systemic administration of GB positively affected HF growth.

7. KAYNAKLAR

1. Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol* 2009; 19:R132-R142.
2. Oh WJ, Kloeppe J, Langan EA, KiM Y, Yeo J, Kim MJ, Hsi TC, Rose C, Yoon GS, Lee SJ, Seykora J, KiM JC, Sung YK, Kim M, Paus R, Plikus MV. A guide to studying human hair follicle cycling in vivo. *J Invest Dermatol* 2016; 136:34–44.
3. Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* 2001; 117:3-15.
4. Otberg N, Finner AM, Shapiro J. Androgenetic alopecia. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2007; 36:379–398.
5. Ramos PM, Miot HA. Female pattern hair loss: a clinical and pathophysiological review. *An Bras Dermatol* 2015; 90:529-543.
6. Tosti A, Piraccini BM. Androgenetic alopecia. *Int J Dermatol* 1999; 38:1–7.
7. Stefanato CM. Histopathology of alopecia: a clinicopathological approach to diagnosis. *Histopathology* 2010; 56:24–38.
8. Lee SW, Juhasz M, Mobasher P, Ekelem C, Mesinkovska NA. A systematic review of topical finasteride in the treatment of androgenetic alopecia in men and women. *J Drugs Dermatol* 2018; 17:457–463.
9. Wolff H, Fischer TW, Blume-Peytavi U. The diagnosis and treatment of hair and scalp diseases. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113:377–386.
10. Kelly Y, Blanco A, Tosti A. Androgenetic alopecia: an update of treatment options. *Drugs* 2016; 76:1349–1364.
11. Lang F, Hoerr R, Noeldner M, Koch E. Ginkgo biloba extract EGb761: From an ancient Asian plant to a modern European herbal medicinal product. In: Wagner H, Ulrich-Merzenich G, eds. Evidence and rational based research on chinese drugs. Vienna: Springer, 2013: 431–470.
12. Mohanta TK, Tamboli Y, Zubaidha PK. Phytochemical and medicinal importance of ginkgo biloba l. *Nat Prod Res* 2014; 28:746-752.

13. Hohmann N, Wolf EM, Rigault P, Zhou W, Kiefer M, Zhao Y, Fu CX, Koch MA. Ginkgo biloba's footprint of dynamic Pleistocene history dates back only 390,000 years ago. *BMC Genomics* 2018; 19:299.
14. Mei N, Guo X, Ren Z, Kobayashi D, Wada K, Guo L. Review of ginkgo biloba-induced toxicity, from experimental studies to human case reports. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2017; 35:1-28.
15. Yuan Q, Wang C, Shi J, Lin Z. Effects of ginkgo biloba on dementia: An overview of systematic reviews. *J Ethnopharmacol.* 2017; 195:1-9.
16. Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwel N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA, Schoenberger NE. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil* 2000; 81:668–678.
17. Rendeiro C, Rhodes JS, Spencer JP. 2015. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochem Int* 2015; 89:126–139.
18. Bressler R. Interactions between ginkgo biloba and prescription medications. *Geriatrics* 2005; 60:30–33.
19. Shi C, Liu J, Wu F, Yew DT. Ginkgo biloba extract in Alzheimer's disease: from action mechanisms to medical practice. *Int J Mol Sci* 2010; 11:107–123.
20. Diamond BJ, Bailey MR. Ginkgo biloba: indications, mechanisms, and safety. *Psychiatr Clin North Am* 2013; 36:73-83.
21. Osman NM, Amer AS, Abdelwahab S. Effects of ginkgo biloba leaf extract on the neurogenesis of the hippocampal dentate gyrus in the elderly mice. *Anat Sci Int* 2016; 91:280-289.
22. Yin B, Xu Y, Wei R, Luo B. Ginkgo biloba on focal cerebral ischemia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Chin Med* 2014; 42:769-783.
23. Yildirim N, Simsek D, Kose S, Yildirim AGS, Guven C, Yigitturk G, Erbas O. The protective effect of Ginkgo biloba in a rat model of ovarian ischemia/reperfusion injury: Improvement in histological and biochemical parameters. *Adv Clin Exp Med* 2018; 27:591-597.
24. Ahmed AI, Lasheen NN, El-Zawahry KM. Ginkgo biloba ameliorates subfertility induced by testicular ischemia/reperfusion injury in adult wistar rats:

- A possible new mitochondrial mechanism. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016:6959274.
25. Evans JR. Ginkgo biloba extract for age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 1:CD001775.
26. Zhang QS, Wang XP, Xie YN, Wu LL, Liu H. Protective effect of ginkgo biloba extract on paracetamol-induced acute hepatic injury in mice. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 2018; 34:432-435.
27. Ihl R. Ginkgo biloba extract EGb 761®: clinical data in dementia. *Int Psychogeriatr* 2012; 24: 35-40.
28. Unger M. Pharmacokinetic drug interactions involving ginkgo biloba. *Drug Metabol Rev.* 2013; 45:353-385.
29. Wang CZ, Yuan JJ, Li WJ, Zhang HY, Ye JZ. In vivo and in vitro toxicity evaluation of polyphenols extracted from ginkgo biloba l. leaves. *Molecules* 2015; 20:22257-22271.
30. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22:659-661.
31. Kobayashi N, Suzuki R, Koide C, Suzuki T, Matsuda H, Kubo M. Effect of leaves of ginkgo biloba on hair regrowth in C3H strain mice. *Yakugaku Zasshi* 1993; 113:718-724.
32. Czigle S, Tóth J, Jedlinszki N, Háznagy -Radnai E, Csupor D, Tekel'ová D. Ginkgo biloba food supplements on the european market – adulteration patterns revealed by quality control of selected samples. *Planta Med* 2018; 84:475-482.
33. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, Liu H, Yin Y. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* 2016; 8:167.
34. Takekoshi S, Matsuzaki K, Kitatani K. Quercetin stimulates melanogenesis in hair follicle melanocyte of the mouse. *Tokai J Exp Clin Med* 2013; 38:129-134.
35. Das L, Kaurav M, Pandey RS. Phospholipid-polymer hybrid nanoparticles mediated transfollicular delivery of quercetin: Prospective implement for the treatment of androgenic alopecia. *Drug Dev Ind Pharm* 2019; 45:1654-1663.
36. Wikramanayake TC, Villasante AC, Mauro LM, Perez CI, Schachner LA, Jimenez JJ. Prevention and treatment of alopecia areata with quercetin in the C3H/HeJ mouse model. *Cell Stress Chaperones* 2012;17:267-274.

37. Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11: 298–344.
38. Miyata S, Oda Y, Matsuo C, Kumura H, Kobayashi K. Stimulatory effect of brazilian propolis on hair growth through proliferation of keratinocytes in mice. *J Agric Food Chem* 2014; 62:11854–11861.
39. Taira N, Nguyen BCQ, Twata S. Hair growth promoting and anticancer effects of p21-activated kinase 1 (PAK1) inhibitors isolated from different parts of alpinia zerumbet. *Molecules* 2017; 22:132.
40. Seo K, Yang JH, Kim SC, Ku SK, Ki SH, Shin SM. The antioxidant effects of isorhamnetin contribute to inhibit COX-2 expression in response to inflammation: A potential role of HO-1. *Inflammation* 2013; 37:712–722.
41. Yang JH, Kim Sc, Kim KM, Jang CH, Cho SS, Kim SJ, Ku SK, Cho IJ, Ki SH. Isorhamnetin attenuates liver fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad signaling and relieving oxidative stress. *Eur J Pharmacol* 2016; 783:92-102.
42. Perez A, Gonzalez-Manzano S, Jimenez R, Perez-Abud R, Haro JM, Osuna A, Santos-Buelga C, Duarte J, Perez-Vizcaiono F. The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. *Pharmacol Res* 2014; 89:11-18.
43. Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. Terpene compounds in nature: A review of their potential antioxidant activity. *Curr Med Chem* 2012; 19: 5319–5341.
44. Rossi A, Anzalone A, Fortuna MC, Caro G, Garelli V, Pranteda G, Carlesimo M. Multi-therapies in androgenetic alopecia: review and clinical experiences. *Dermatol Ther* 2016; 29:424-432.
45. Prie BE, Iosif L, Tivig I, Stoian I, Giurcaneanu C. Oxidative stress in androgenetic alopecia. *J Med Life* 2016; 9:79-83.
46. Kurbel S, Kurbel B, Zanić-Matanić D. Minoxidil and male-pattern alopecia: a potential role for a local regulator of sebum secretion with vasoconstrictive effects?. *Med Hypotheses* 1999; 53:402-6.
47. Chung MS, Bae WJ, Choi SW, Lee KW, Jeong HC, Bashraheel F, Jeon SH, Jung JW, Yoon BI, Kwon EB, Oh HA, Hwang SY, Kim SW. An asian traditional

herbal complex containing *Houttuynia cordata* Thunb, *Perilla frutescens* Var. *acuta* and green tea stimulates hair growth in mice. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17:515.

48. Zhang B, Zhang R, Yin X, Lao Z, Zhang Z, Wu Q, Yu L, Lai X, Wan Y, Li G. Inhibitory activities of some traditional Chinese herbs against testosterone 5 α -reductase and effects of *Cacumen platycladi* on hair re-growth in testosterone-treated mice. *J Ethnopharmacol* 2016; 177:1-9.

49. Bent S, Goldberg H, Padula A, Avins AL. Spontaneous bleeding associated with ginkgo biloba: a case report and systematic review of the literature: a case report and systematic review of the literature. *J Gen Intern Med* 2005; 20:657-661.

50. Szczurko O, Shear N, Taddio A, Boon H. Ginkgo biloba for the treatment of vitiligo vulgaris: an open label pilot clinical trial. *BMC Complement and Altern Med* 2011; 11:21.

51. National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of ginkgo biloba extract (CAS No. 90045-36-6) in F344/N rats and B6C3F1/N mice (gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 2013; 578:1-183.

52. Grollino MG, Raschellà G, Cordelli E, Villani P, Pieraccioli M, Paximadas I, Malandrino S, Bonassi S, Pacchierotti F. Cytotoxicity, genotoxicity and gene expression changes elicited by exposure of human hepatic cells to ginkgo biloba leaf extract. *Food Chem Toxicol* 2017; 109:486-496.

53. Cheng D, Liang B, Li Y. Antihyperglycemic effect of ginkgo biloba extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biomed Res Int* 2013; 2013:162724.

54. Aziz TA, Hussain SA, Mahwi TO, Ahmed ZA, Rahman HS, Rasedee A. The efficacy and safety of ginkgo biloba extract as an adjuvant in type 2 diabetes mellitus patients ineffectively managed with metformin: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Drug Des Devel Ther* 2018; 12:735-742.

55. Köse K, Doğan P, Aşçıoğlu M, Aşçıoğlu O. In vitro antioxidant effect of ginkgo biloba extract (EGb 761) on lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in erythrocytes of Behçet's patients. *Jpn J Pharmacol* 1997; 75:253-258.

56. Parsad D, Pandhi R, Juneja A. Effectiveness of oral ginkgo biloba in treating limited, slowly spreading vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28:285-287.

57. Hilton MP, Zimmermann EF, Hunt WT. Ginkgo biloba for tinnitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 3:CD003852.
58. Adil A, Godwin M. The effectiveness of treatments for androgenetic alopecia: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2017; 77:136-141.
59. Chan L, Cook DK. Female pattern hair loss. *Aust J Gen Pract* 2018; 47:459-464.

