



**TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI *ECHINUM* TÜRLERİNİN
YARA İYİLEŞTİRİCİ AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nuraniye ERUYGUR

**DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2014

Nuraniye ERUYGUR tarafından hazırlanan "Türkiye'de Yetişen Bazı *Echium* Türlerinin Yara İyileştirici Aktivitesinin Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Farmakognози Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Prof. Dr. Osman Üstün

Farmakognози AD - Gazi Üniv.



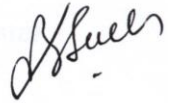
Başkan : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Prof. Dr. Bilge SEVER

Farmakognози ABD - Gazi Üniv.



Üye : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Farmakognози / Gazi



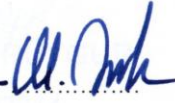
Üye : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Prof. Dr. Mustafa ARK

Farmakoloji / Gazi



Üye : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Prof. Dr. Tayfun ERGÖZ

Farmakognози / Hıfızecilik Bilimleri



Tez Savunma Tarihi: 22.1.2014

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.



Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

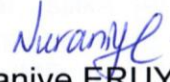
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Nuraniye ERUYGUR

08/09/2014

TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI *ECHİUM* TÜRLERİNİN YARA İYİLEŞTİRİCİ
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora tezi)

Nuraniye ERUYGUR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
EYLÜL 2014

ÖZET

Bu çalışmada ülkemizde yabani olarak yetişen 4 *Echium* türünden (*E.italicum* L, *E.vulgare* L, *E.angustifolium* Miller, *E.parviflorum* Moench) biyolojik aktivite ve kimyasal yönden araştırılmıştır. Biyolojik aktivite yönlendirmeli izolasyon ve yapı tayini çalışmalarının yapıldığı araştırmamızda, oda ısısında kurutulmuş ve toz edilmiş bitkinin kök ve toprak üstü kısımlarından farklı polaritedeki çözücülerle hazırlanan ekstreleri ile silika jel sütunda fraksiyonlandırılan ana fraksiyonları DPPH, Fe iyonu şelasyon, TFC, TPC yöntemiyle antioksidan aktivite ve çizgisel insizyon yara modeli yöntemiyle yara iyileştirici aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Bu aktivite denemelerinde aktif olduğu saptanan fraksiyonlar, silika jel kolon kromatografisi ve preparatif İ.T.K. gibi yöntemlerle saflaştırılmıştır. Elde edilen bileşiklerin yapıları, spektroskopik yöntemler (TOF LC-MS, ¹H NMR ve ¹³C NMR) kullanılarak aydınlatılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda naftokinon yapısında şikonin pigmenti olan 2-metil-n-butil şikonin + izovaleril şikonin, Asetil şikonin ve deoksişikonin elde edilmiştir. Yapılan literatür tarama çalışmaları şikonin türevi bileşiklerin yara iyileştirici aktiviteye sahip olduğu ve çalışma sonuçlarımızın da türlerin halk arasındaki kullanımı ile uyum göstermekte olduğunu ortaya koymaktır.

Bilim Kodu : 1017
Anahtar Kelimeler : *Echium*, Biyolojik aktivite, Yara iyileştirici, Miktar tayini
Sayfa Adedi : 196
Danışman : Prof. Dr. Osman ÜSTÜN

INVESTIGATION OF WOUND HEALING ACTIVITY OF SOME
*ECHIU*M SPECIES GROWING IN TURKEY

(Ph. D. Thesis)

Nuraniye ERUYGUR

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

September 2014

ABSTRACT

In this study, four *Echium* species namely: *E.italicum* L, *E.vulgare* L, *E.angustifolium* Miller, *E.parviflorum* Moench, growing in Turkey, has been investigated by biological activity and chemical approaches. In the studies where biological activity guided isolation and structure elucidation investigations are conducted, total extracts with various polarity were prepared from plant material dried at room temperature and powdered, as well as the main fractions of the extract fractionated on a column of silica gel, were subjected to the DPPH free radical scavenging assay, Fe-chelating effect, Total Phenol Concentration and Total Flavonoid Concentration antioxidant activity test and wound healing activity test by Linear Incision wound model. Fractions which displayed wound healing activity have been purified by preparative TLC and Silica gel column chromatography. The structures of the compounds obtained were elucidated by using spectral techniques (TOF LC-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR). As a result of these studies, the shikonin derivatives, 2-methyl-n- isobutyrylshikonin + isovalerylshikonin, acetylshikonin and deoxyshikonin were isolated. According to the research reports, there have been many studies on wound healing and other related biological activities on these shikonin derivatives. These results are accordance with our study results and the folkloric use.

Science Code : 1017
Key Words : *Echium*, Biological activities, Wound healing, Quantification
Page Number : 196
Supervisor : Prof. Dr. Osman ÜSTÜN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sayın danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Osman ÜSTÜN'e gösterdiği destek ve anlayış için çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarımda bilgisinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Ekrem SEZİK'e, çalışmalarım süresince özellikle laboratuvar çalışmalarım sırasında gösterdiği bilimsel yardımlar, anlayış ve ilgi için Farmakognozi Anabilim Dalındaki tüm değerli öğretim üyeleri ve yardımcılara, çalışmalarımın hayvan deney kısımlarında desteğini esirgemeyen Veteriner Dr. Ayşe DEMİREL'e, Histopatolojik analizlerinin yapılmasında olanak sağlayan Ankara üniversitesi Veteriner fakültesi Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Osman KUTSAL'a ve Dr. Gözde YÜCEL'e, NMR spektrumlarımın çekilmesinde ve her konuda yardımlarını gördüğüm Uzman Dr. Erhan SÜLEYMANOĞLU'na ve proje çalışma arkadaşım F.Funda DEMİRİSOY'a, LC-TOF-MS spektrumların çekilmesinde yardımcı olan Farmasötik kimya anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Murat ŞÜKÜROĞLU'na, YBSK analizlerinin yapılmasında olanak sağlayan Analitik kimya anabilim dalındaki Doç. Dr. Uğur TAMER'e teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince bana uzaktan manevi destek ve ilgilerini hiç eksik etmeyen, beni sonsuz sabırla bekleyen aileme, bana maddi ve manevi destek ve motivasyon veren, her zaman yanımda olan sevgili eşim Adilcan ERUYGUR'a ve biricik oğlum Kutluk'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmalarıma mali destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma projesi Fonu(02-2010/2011)na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Botanik Kısım	3
2.1.1 <i>Boraginaceae</i>	3
2.2. Kimyasal Kısım.....	20
2.2.1. <i>Echium</i> türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar	20
2.3. <i>Echium</i> Türleri ve Etnobotanik.....	51
2.4. <i>Echium</i> Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları	52
2.4.1. Antioksidan etki	52
2.4.2. Anti-inflamatuar etki	53
2.4.3. Antiproliferatif etki	53
2.4.4. Antidepresan etki	53
2.4.5. Anksiyete karşı ve sedatif etki	54
2.4.6. Antiviral etki.....	55
2.4.7. Antibakteriyel etki.....	55
2.4.8. Analjezik etki	56
2.4.9. Diğer etkileri	56
2.5. Toksisitesi	57
2.6. Yara.....	60
2.6.1. Yara iyileşmesi tipleri	60
2.6.2. Bazı farmakolojik etkilerin yara iyileşmesindeki önemi.....	61
2.7. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler.....	65

	Sayfa
2.7.1. Büyüme faktörleri	65
2.7.2. Beslenme faktörleri	66
2.7.3. Yaranın lokalizasyonu ve kanlanması	66
2.7.4. Diyabet	66
2.7.5. Radyoterapi ve kemoterapi	66
2.7.6. Genetik ve immunolojik bozukluklar	66
2.7.7. Steroid kullanımı	67
2.8. Yara İyileşme Evreleri	68
2.8.1. İnflamasyon fazı	68
2.8.2. Hücrel göç ve proliferasyon fazı	70
2.8.3. Yeniden modelleme fazı	71
2.9. Yaranın Çeşitleri	71
2.9.1. Mekanik travmalara bağlı yaralar	71
2.9.2. Fiziksel travmalara bağlı yaralar	72
2.9.3. Kimyasal travmalara bağlı yaralar	72
2.9.4. Biyolojik etkilere bağlı yaralar	72
2.10. Yara İyileştirici Aktivitenin Ölçülmesi	72
2.10.1. <i>In vitro</i> yöntemler	72
2.10.2. <i>In vivo</i> yöntemler	74
3. GEREÇ VE YÖNTEM	79
3.1. Gereç	79
3.1.1. Kullanılan Bitkiler	79
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Çözücüler	80
3.2. Yöntem	80
3.2.1. Kimyasal çalışmalar	80
3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları	87
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	101
4.1. Fitokimyasal Çalışma Sonuçları	101
4.1.1. <i>Echium</i> türlerin İTK ile incelenmesi	101
4.1.2. <i>E.italicum</i> L. kök kloroform ekstresinden izole edilen bileşiğin yapı tayinine ilişkin bulgular	104
4.1.3. <i>Echium</i> türlerindeki bazı şikonin türevlerinin YBSK ile miktar tayinleri	124

	Sayfa
4.2. Biyolojik Aktivite Deney Bulguları	137
4.2.1. Antioksidan aktivite incelenmesi	137
4.2.2. İnsizyon yara iyileştirici aktivite deney bulguları	141
4.2.3. Hidroksiprolin miktar tayinine ait bulgular	143
4.2.4. Histopatolojik analizlere ait bulgular	144
5. TARTIŞMA.....	147
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	153
KAYNAKLAR	155
EKLER.....	173
EK.1. Etik Kurul İzin Belgesi	174
ÖZGEÇMİŞ	176

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Echium</i> türlerinde bulunan naftokinonlar (Şikonin türevleri) -1	21
Çizelge 2.2. <i>Echium</i> türlerinde bulunan naftokinonlar (Şikonin türevleri) – 2.....	22
Çizelge 2.3. <i>Echium</i> türlerinde bulunan naftokinonlar (Alkanin türevleri) – 3.....	23
Çizelge 2.4. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri - 1	24
Çizelge 2.5. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri(Devamı) - 2	25
Çizelge 2.6. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 3	26
Çizelge 2.7. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 4	27
Çizelge 2.8. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri(Devamı) - 5	28
Çizelge 2.9. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri(Devamı) - 6	29
Çizelge 2.10. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 7	30
Çizelge 2.11. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 8	31
Çizelge 2.12. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 9	32
Çizelge 2.13. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 10	33
Çizelge 2.14. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı)- 11	34
Çizelge 2.15. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 12	35
Çizelge 2.16. <i>Echium</i> türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 13	36
Çizelge 2.17. <i>Echium</i> türlerinde bulunan antosiyaninler- 1.....	37
Çizelge 2.18. <i>Echium</i> türlerinde bulunan antosiyaninler- 2.....	38
Çizelge 2.19. <i>Echium</i> türlerinde bulunan flavonoitler-1	39
Çizelge 2.20. <i>Echium</i> türlerinde bulunan flavonoitler-2	40
Çizelge 2.21. <i>Echium</i> türlerinde bulunan fenolik bileşikler.....	41
Çizelge 2.22. <i>Echium</i> türlerinde bulunan yağ asitleri-1.....	42
Çizelge 2.23. <i>Echium</i> türlerinde bulunan yağ asitleri-2.....	43
Çizelge 2.24. <i>Echium</i> türlerinde bulunan yağ asitleri-3.....	43
Çizelge 2.25. <i>Echium</i> türlerinde bulunan yağ asitleri– 4.....	44
Çizelge 2.26. <i>Echium</i> türlerinde bulunan yağ asitleri–5.....	44
Çizelge 2.27. <i>Echium</i> türlerinde bulunan yağ asitleri –6.....	45
Çizelge 2.28. <i>Echium</i> türlerinde bulunan yağ asitleri –7.....	45
Çizelge 2.29. <i>Echium</i> türlerinde bulunan yağ asitleri –8.....	46
Çizelge 2.30. <i>Echium</i> türlerinde bulunan amino asitler- 1	47
Çizelge 2.31. <i>Echium</i> türlerinde bulunan amino asitler- 2	48
Çizelge 2.32. <i>Echium</i> türlerinde bulunan amino asitler- 3	49

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.33. <i>Echium</i> türlerinde bulunan diğer bileşikler	50
Çizelge 2.34. Yara iyileşmesinde görev alan hücreler	65
Çizelge 2.35. Yara iyileşmesinde görev yapan büyüme faktörleri.....	65
Çizelge 2.36. <i>In vivo</i> yara modelinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	76
Çizelge 3.1. Çalışmamızda kullanılan bitkilere ait bilgiler.....	79
Çizelge 3.2. Çalışmamızda kullanılan kimyasal madde/Çözücülere ait bilgiler	80
Çizelge 3.3. <i>E.italicum</i> L. ve <i>E.vulgare</i> L. bitkilerinden farklı çözücülerle elde edilen ekstrahelerin verimleri (%)	82
Çizelge 3.4. <i>E.italicum</i> L, <i>E.vulgare</i> L, <i>E.angustifolium</i> Miller, <i>E.parviflorum</i> Moench bitkilerinin ekstraksiyon verimleri.....	84
Çizelge 3.5. <i>E.italicum</i> kök kloroform ekstresinin kolon kromatografisinde toplanan fraksiyonların çözücü sistemleri ve verimi	86
Çizelge 3.6. YBSK analiz koşulları.....	95
Çizelge 4.1. 2-metil-n-butiril şikonin (Madde 1[M1]'in) ¹ H-NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) ve ¹³ C-NMR(CDCl ₃ , 75 MHz) Spektral Değerleri	107
Çizelge 4.2. İzovalerilşikoinin(Madde 1[M2]'in) ¹ H-NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) ve ¹³ C-NMR(CDCl ₃ , 75 MHz) Spektral Değerleri	107
Çizelge 4.3. 2-metil-n-butiril şikonin'in ¹ H ve ¹³ C NMR spektral değerleri	108
Çizelge 4.4. İzovalerilşikoinin'in ¹ H ve ¹³ C NMR spektral değerleri.....	108
Çizelge 4.5. Asetilşikoinin (Madde 2'in) ¹ H-NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) ve ¹³ C-NMR(CDCl ₃ , 75 MHz) Spektral Değerleri.....	114
Çizelge 4.6. Deoksişikoinin (Madde 3'ün) ¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz) ve ¹³ C-NMR(CDCl ₃ , 100 MHz) Spektral Değerleri	122
Çizelge 4.7. Standart şikonin türevi bileşiklerin retansiyon zamanları.....	126
Çizelge 4.8. Şikonin'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri	127
Çizelge 4.9. Şikonin'e ait doğru denklemi, R ² , LOD, LOQ ve % BSS değerleri	127
Çizelge 4.10. Asetilşikoinin'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri	128
Çizelge 4.11. Asetilşikoinin'e ait doğru denklemi, R ² , LOD, LOQ ve % BSS değerleri	129
Çizelge 4.12. Deoksişikoinin(DS)'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri	130
Çizelge 4.13. Deoksişikoinin'e ait doğru denklemi, R ² , LOD, LOQ ve % BSS değerleri	130

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.14. Dimetilakrilşikonin(DMAS)'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri	132
Çizelge 4.15. Dimetilakrilşikonin(DMAS)'e ait doğru denklemi, R^2 , LOD, LOQ ve % BSS değerleri.....	132
Çizelge 4.16. 2-metil-n-butirilşikonin (MBS) ve İzovalerilşikonin (IVS)'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri.....	134
Çizelge 4.17. 2-metil-n-butirilşikonin (MBS) ve İzovalerilşikonin (IVS)'e ait doğru denklemi, R^2 , LOD, LOQ ve % BSS değerleri.....	134
Çizelge 4.18. <i>Echium</i> türlerinin köklerinden hazırlanan etanol ekstrelerindeki şikonin türevi bileşiklerin miktar tayini sonuçları (% a/a)	137
Çizelge 4.19. <i>Echium</i> türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstrelerinintotal fenol miktarları	138
Çizelge 4.20. Gallik asite ait konsantrasyon ve absorbands ortalama değerleri ..	138
Çizelge 4.21. <i>Echium</i> türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstrelerin toplam flavonoit miktarları	139
Çizelge 4.22. Kersetinin kalibrasyon çözeltisi ve absorpsiyon değerleri	139
Çizelge 4.23. <i>Echium</i> türlerinden hazırlanan etanol ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü etkileri (% Süpürücü etki $\pm$ Standart Sapma)	140
Çizelge 4.24. <i>Echium</i> türlerinden hazırlanan etanollü ekstrelerin demir-iyonu şelasyon etkileri(% Şelasyon etki $\pm$ Standart sapma)	141
Çizelge 4.25. Türkiye'de halk arasında yara iyileştirici amaçla kullanılan bazı <i>Echium</i> türlerinden hazırlanan ekstrelerin çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkisi	141
Çizelge 4.26. Türkiye'de yetişen 4 <i>Echium</i> türünün kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstrelerin çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkisi	142
Çizelge 4.27. <i>Echium italicum</i> L. kök kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkisi	142
Çizelge 4.28. <i>Echium italicum</i> L. kök kloroform ekstresinden elde edilen bileşiklerin çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkisi	143
Çizelge 4.29. <i>E.italicum</i> L. kök ve <i>E.vulgare</i> L. kök ekstreleri, <i>E.italicum</i> L. kök kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonlar ve saf maddelerden hazırlanan merhemlerle tedavi edilen dokulardaki hidroksiprolin miktarları	143
Çizelge 4.30. Dört <i>Echium</i> türünün kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen etanollü ekstrelerinden hazırlanan merhemlerle tedavi edilen dokulardaki hidroksiprolin miktarları	144

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Echium italicum</i> L. bitkisinin karelere göre yayılışı	7
Şekil 2.2. <i>E.italicum</i> L. bitkisinin Türkiye'deki yetiştiği yerler	8
Şekil 2.3. <i>E.vulgare</i> L. bitkisinin karelere göre yayılışı	11
Şekil 2.4. <i>E.vulgare</i> L. bitkisinin Türkiye'de yetiştiği yerler	12
Şekil 2.5. <i>E.angustifolium</i> Miller bitkisinin karelere göre yayılışı	14
Şekil 2.6. <i>E.angustifolium</i> Miller bitkisinin yetiştiği yerler.....	15
Şekil 2.7. <i>E.parviflorum</i> Moench bitkisinin karelere göre yayılışı	18
Şekil 2.8. <i>E.parviflorum</i> Moench bitkisinin yetiştiği yerler.....	19
Şekil 2.9. Yara iyileşmenin zamana göre evreleri	69
Şekil 3.1. <i>E.italicum</i> ve <i>E.vulgare</i> kök ve toprak üstü kısımlarının ekstraksiyonu	81
Şekil 3.2. <i>E. italicum</i> L. köklerinden kloroform ekstresinin hazırlanması ve BAYF yöntemine göre fraksiyonlanması	83
Şekil 3.3. <i>Echium</i> 4 türünün kök ve toprak üstü kısımlarından etanol ekstratlarının hazırlanması	84
Şekil 3.4. Hidroksiprolin miktar tayininde kullanılan yöntemin prensibi	89
Şekil 3.5. DPPH serbest radikal.....	91
Şekil 3.6. Sinyal/Gürültü oranına göre LOD ve LOQ.....	100
Şekil 4.1. <i>E.italicum</i> L. ve <i>E.vulgare</i> L. kök ve herbalarından hazırlanan hekzan, aseton ve su ekstratlarının İTK görünümü	101
Şekil 4.2. <i>E.italicum</i> L. ve <i>E.vulgare</i> L. kök ve herbalarından hazırlanan kloroform ekstresinin İTK görünümü;	101
Şekil 4.3. <i>E.italicum</i> L. ve <i>E.vulgare</i> L. kök ve herbalarından hazırlanan Etanol ekstresinin İTK görünümü;	101
Şekil 4.4. <i>Echium</i> 'un 4 türünün kök ve toprak üstü kısımları etanol ekstratlarının İTK görüntüsü	102
Şekil 4.5. <i>Echium</i> 'un 4 türünün kök ve toprak üstü kısımları etanol ekstratlarının UV 366 nm altındaki İTK görüntüsü	102
Şekil 4.6. 4 <i>Echium</i> türünün toprak üstü ve kök kısımlarının Etanol ekstresinin standart maddelerle beraber İTK görünümü	103
Şekil 4.7. <i>E.italicum</i> L. kök kısımlarından bileşiklerin izolasyon şeması	103
Şekil 4.8. 2-metil-n-butiril şikonin	104
Şekil 4.9. İzovaleril şikonin.....	104
Şekil 4.10. 2-metil-n-butirilşikonin ve izovalerilşikonin (Madde 1'in) ¹ H-NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 300 MHz)	109

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. 2-metil-n-butirilşikoinin ve izovalerilşikoinin(Madde 1'in) ^{13}C -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 75 MHz)	110
Şekil 4.12. 2-metil-n-butirilşikoinin'in kütle spektrumu	111
Şekil 4.13. İzovalerilşikoinin'in kütle spektrumu	112
Şekil 4.14. Asetilşikoinin	114
Şekil 4.15. Asetilşikoinin (Madde 2'in) ^1H -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 300 MHz)	115
Şekil 4.16. Asetilşikoinin (Madde 2'in) ^{13}C -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 75 MHz)	116
Şekil 4.17. Asetilşikoinin'in kütle spektrumu	117
Şekil 4.18. Deoksişikoinin (Madde 3'ün) ^1H -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)	120
Şekil 4.19. Deoksişikoinin (Madde 3'ün) ^{13}C -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 100MHz)	121
Şekil 4.20. Deoksişikoinin	122
Şekil 4.21. Deoksişikoinin'nin kütle spektrumu	123
Şekil 4.22. Şikoinin türevi karşım çözeltilisinin 200-800 nm dalga boyundaki UV spekturmu	124
Şekil 4.23. Standart karşım çözeltilisinin YBSK ile ayrımı (her biri 50 ppm)	125
Şekil 4.24. Şikoinin'e ait YBSK kromatogramı (50 ppm).....	126
Şekil 4.25. Şikoinin'e ait kalibrasyon eğrisi	127
Şekil 4.26. Asetilşikoinin'e ait YBSK kromatogramı (6.25 ppm).....	128
Şekil 4.27. Asetilşikoinin'e aitkalibrasyon eğrisi	128
Şekil 4.28. Deoksişikoinin (DS)'e ait YBSK kromatogramı (6.25 ppm)	129
Şekil 4.29. Deoksişikoinin (DS)'e ait kalibrasyon eğrisi.....	130
Şekil 4.30. Dimetilakrilşikoinin (DMAS)'e ait YBSK kromatograı (6.25 ppm)	131
Şekil 4.31. Dimetilakrilşikoinin (DMAS)'e aitkalibrasyon eğrisi.....	131
Şekil 4 32. 2-metil-n-butirilşikoinin (MBS) ve İzovalerilşikoinin (IVS)'e ait YBSK kromatograı (1000 ppm)	133
Şekil 4.33. 2-metil-n-butirilşikoinin (MBS)'e ait kalibrasyon eğrisi	133
Şekil 4.34. İzovalerilşikoinin (IVS)'e ait kalibrasyon eğrisi.....	134
Şekil 4.35. <i>E.angustifolium</i> Miller bitkisinin etanol ile hazırlanmış kök ekstresinin 520 nm dalga boyundaki YBSK kromatogramı	135
Şekil 4.36. <i>E.italicum</i> L. bitkisinin etanol ile hazırlanmış kök ekstresinin 520 nm dalga boyundaki YBSK kromatogramı	135
Şekil 4.37. <i>E.vulgare</i> L. bitkisinin etanol ile hazırlanmış kök ekstresinin 520 nm dalga boyundaki YBSK kromatogramı	136

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.38. <i>E.parviflorum</i> Moench bitkisinin etanol ile hazırlanmış kök ekstresinin 520 nm dalga boyundaki YBSK kromatogramı	136
Şekil 4.39. Gallik asite ait kalibrasyon eğrisi	138
Şekil 4.40. Kersetinin standart çözeltisine ait kalibrasyon eğrisi	139

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Echium italicum</i> L.	6
Resim 2.2. <i>Echium vulgare</i> L.	10
Resim 2.3. <i>Echium angustifolium</i> Miller	13
Resim 2.4. <i>Echium parviflorum</i> Moench.....	17
Resim 4.1. Kontrol grubun derisine ait histolojik görüntü	145
Resim 4.2. Asetilşikonin grubun derisine ait histolojik görüntü	145
Resim 4.3. Deoksişikonin grubun derisine ait histolojik görüntü.....	145
Resim 4.4. 2-metil-n-butirilşikonin ve İzovalerilşikonin grubun derisine ait histolojik görüntü	146
Resim 4.5. Deney grubunun karaciğerine ait histolojik görüntü	146

SEMBOLLER, KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
¹ H-NMR	Proton Nükleer Magnetik Rezonans
¹³ C-NMR	Karbon Nükleer Magnetik Rezonans
IC ₅₀	%50 İnhibisyon Sağlayan Konsantrasyon
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
GAZI	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
GUE	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
AEF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
HE	Hematoksilen-Eozin
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
CDCL ₃	Dötro kloroform
EtOAC	Etil asetat
MeOH	Metanol
NO	(Nitric Oxide) Nitrik Oksit
Fr.	Fraksiyon
SRB	Sulforhodamine B
Y-BOCS	Yale-Brown Obsesyon Kompulsiyon Ölçeği
HAM-A	Hamilton Anksiyete Değerlendirme Ölçeği
CPE	Viral Sitopatik Etki
GLA	Gamma-Linolenik Asit
ALA	Alfa-linolenik Asit
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz

Kısaltmalar	Açıklama
ALP	Alkalın Fosfataz
PA	Pirolizidin Alkaloit
HPLC	Yüksek Basıncılı/Performanslı Sıvı Kromatografisi
ESI-MS	Elektrosprey İyonizasyon-Kütle Spektrometresi
PDGF	Trombositlerce Salınan Büyüme Faktörü
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
IL	İnterlökinler
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
IFN	İnterferon
PGE	Prostaglandin E
Ferrozin	3-(2-Piridil)-5,2,4-triazin Disodyum Tuzu
GA	Gallik Asit
EDTA	EtilendiaminTetra Asetik Asit
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
TS	Gerilme kuvveti
BAYF	Biyolojik Aktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama
S	Şikonin
DS	Deoksişikoinin
AS	Asetilşikoinin
DMAS	Dimetilakrilşikoinin
MBS	2-metil-n-butirilşikoinin
IVS	İzovalerilşikoinin

1. GİRİŞ

Bitkiler birçok yerde olduğu gibi, hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Türkiye, değişik iklim ve coğrafi koşullara sahip olması nedeniyle bitki örtüsünün zenginliğinin yanında, yüzyıllar boyunca pek çok medeniyeti de barındırmıştır. Bunun sonucu olarak ülkemiz günümüze kadar uzanan zengin bir halk ilacı kültürüne de sahiptir. Nesilden nesile aktararak günümüze kadar gelen folklorik bilgilerin kaydedilmesi ve halk ilacı olarak kullanılan doğal kaynakların özellikle bitkilerin bilimsel olarak değerlendirilmesi gereklidir. Ancak, ilaç araştırmaları için önemli kaynak oluşturan, geleneksel halk ilaçları ile ilgili çalışmalar yeterli düzeydedir.

Günümüzde, özellikle modern tıp bilgi ve hizmetlerinden uzak veya modern tıptan çeşitli nedenlerle yeterince yararlanamayan insanlar, yörelerinde yetişen bitkilerle belirli hastalık veya rahatsızlıkların tedavisinde kullanmaktadır. Ayrıca sentetik ilaçların pahalı olması ve yan etkilerinin bulunması nedeniyle tıbbi bitkilere olan talep artmaktadır. Ancak yurdumuzda bitkisel drogların veya ekstrelerinin ilaç olarak kullanımı yeterli düzeyde değildir. Ülkemizde kullanılan ilaçların sadece %6'sı yüksek bitkilerden elde edilmektedir. Bu oran Almanya'da %16, Rusya'da ise %33 düzeyindedir[1]. Ülkemizde potansiyel bir zenginlik kaynağı oluşturan bitkilerimizden yeteri kadar faydalanılmamaktadır.

Türkiye'de halk arasında toprak altı kısımlarının zeytinyağı veya tavada ısıtılarak eritilen terayağı içerisinde bekletildikten sonra yaralar üzerine sürülerek kullanılan *Echium* türleri üzerinde şimdiye kadar çok az biyoaktivite ve kimyasal çalışmalar yapılmasına karşın, bu cinsin yara iyileştirici aktivitesi üzerinde etkiden sorumlu olabilecek madde/maddeler üzerinde aydınlatıcı bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada, ülkemizde Havaciva, Engerek otu, Sığırdili, Kızılcık dikenini gibi yerli isimlerle bilinen 4 *Echium* türünden hazırlanan etanollü veya farklı polaritedeki ekstraktlar üzerinde yapılacak, yara iyileştirici biyolojik aktivite taramaları (insizyon yara modeli) sonucu etkili fraksiyonlarını ortaya çıkarmak ve biyoaktivite ile yönlendirilen fraksiyonlama (BAYF) yöntemi ile etkili fraksiyon ve/veya bileşiklerin tespit edilmesi ve böylece ülkemizin zengin florası değerlendirilerek *Echium* türlerinden yeni, aktif ilaç moleküllerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Kısım

2.1.1. *Boraginaceae*

Hodangiller (*Boraginaceae*), Lamiales takımına ait bir familyadır. Dünyada 100 cins ve 2000 kadar türle tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde yayılmış bir familyadır. Türkiye'de 34 cins ve 300'den fazla türü bulunmaktadır. Genellikle otsu, bazen çalimsı veya tırmanıcı bitkilerdir. Yapraklar basit, stipulsuz ve alternattır. Bitkinin gövdesi ve yaprakları genellikle sert tüylerle kaplıdır; Çiçekler hermafrodit, aktinomorf, nadiren zigomorf. Kaliks 5 sepallı, sepaller serbest veya bileşik; korolla 5 petallı, petaller bileşiktir. Androkeum 5 stamenli, stamenler korollaya bileşik, stamenler petallerin karşısındadır; Ginekeum 2 bileşik karpelli, 4 lokuluslu, stilusginobazik, ovaryum üst durumludur; Meyve nuks, drupa veya şizokarptır.

Taksonomik Sınıflandırma:

Âlem *Plantae*

Altalem *Tracheobionta*

Bölüm *Magnoliophyta*

Sınıf *Magnoliopsida*

Altsınıf *Asteridae*

Takım *Lamiales*

Familya *Boraginaceae*

Cins *Echium*

Echium cinsinin özellikleri

Tek yıllık veya çok yıllık sert dikenli-kılsı (setoz) tüylü; taban yapraklar genellikle rozet şeklinde, saplı; gövde yaprakları çok sayıda, üst kısım sapsız ve genellikle hafifçe amplexikaul; çiçek durumu çok sayıda brakteye sahip simozlerden oluşur, başak benzeri panikula veya thyrsoid; Kaliks $\pm$ tabana doğru loplulu, meyvede

büyüyen; Korolla $\pm$ zigomorfik, genişlemiş huniden dara doğru veya trumpet şeklinde, Mavimsi, morumsu, kırmızımsı, sarımsı veya beyazımsı renktedir. Tüpün boğaza ait uzantıları eksik olup, tabanında tüy kümeleri veya halkaları vardır; dudak belirgin bir şekilde eğik veya değil; Stamenler korollanın içinde veya bir kısmı korollanın dışına çıkmıştır. Filamentler tüp içine eşit olmayan şekilde yerleşmiş; stilustam veya iki loblu. Nutlet 4, ovoid, yumurtamsı üçköşeli, oblong-bipiramidal veya küresele yakın, geniş lekeli, gagası dik veya eğik, yanal sıkıştırılmış, pürüzsüz veya buruşuk, tüberkülat, scrobiculat veya ağ şeklinde[2].

Echium cinsinin P.H.Davis'in "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı kitabının 6. cild'inde Türkiye'de kayıtlı 9 türü bulunmaktadır. Bu türlerin teşhisinde kullanılacak tayin anahtarları aşağıdaki gibidir[2]:

1. Stamenler korolla tüpünün içinde.

2. Kalın(kuvvetli) oldukça batıcı, iki yıllık, 100 cm'e kadar. Korolla 40 mm'ye kadar, beyazımsı, leylak, pembemsi-kahverengi çizgili, nutletsler hemen hemen düz.

1. *orientale*

2. İnce (tığ gibi), ince kılsı, tek veya iki yıllık, 30cm'e kadar. Korolla 8-14 mm. Soluk veya koyu mavi, nutletsler tüberkülat

3. Çiçek açma döneminde kaliks 6-8 mm, meyve da 15 mm'ye kadar, korolla gök mavisinden beyaza kadar

9. *parviflorum*

3. Çiçek açma döneminde kaliks 5-7 mm, meyve da 10 mm'ye kadar, korolla koyu maviden mavi-viyole'ye kadar

8. *arenarium*

1. Bir veya daha fazla stamen korolla tüpünün dışında

4. Stilus bölünmemiş, stigma beli belirsiz iki loplu, loplar 0-5 mm'yi geçemez. Korolla şarap kırmızısından koyu kırmızıya kadar

2. *russicum*

4. Stilus yaklaşık 1 mm kadar bölünmüş, stigma tam, korolla şarap kırmızısı değil.

5. Korolla $\pm$ daralan huni şeklinde, tüp belirgin olarak uça doğru genişlemez. Leylak, pembemsi, beyazımsı soluk mavi veya krem renkli (kuruduğunda genellikle kahverengi)

6. Infloresans $\pm$ piramidal, genellikle gövdenin üçte biri aşağısından itibaren çok dallanmış. Sap üzerindeki dikenler kuruduğunda sarımsı, filamentler soluk kahverenginden portakal sarıya kadar

4. *italicum*

6. Infloresans çiçek tam olarak açtığında silindirik şekilde, $\pm$ sivri uçlu; sap üzerindeki dikenler kuruduğunda beyazımsı, filamentler koyu kırmızı.

3. *glomeratum*

5. Korolla $\pm$ geniş olarak huni şeklinden trumpet şekline kadar, tüp uça doğru belirgin şekilde geniş. Koyu mavi, mor, kırmızımsı, mor veya mavimsi mor (nadiren beyaz)

7. Taban yapraklar $\pm$ geniş ovat'tan daralan eliptik'e kadar. Yaprak ayası birden bire daralmakta, belirgin yan damarlı, korolla hemen hemen tüysüz veya damar ve kenarları boyunca seyrek sert tüylü

6. *plantagineum*

7. Taban yapraklar lanseolat'tan oblanseolat'a kadar veya linear, yan damarlar fark edilmeyecek şekilde belirsiz, korolla $\pm$ aynı biçimde kısa yumşak tüylüden tüylüye kadar

8. Çok yıllık, bitki $\pm$ sık yoğun şekilde beyazımsı'dan grimsi'ye kadar, $\pm$ batıcı tüylü, korolla genellikle kırmızımsı'dan kırmızımsı mor'a kadar

7. *angustifolium*

8. İki yıllık, bitki belirgin şekilde grimsiden beyazımsı'ya kadar, tüyler seyrekten orta sıklığa kadar, yatık, korolla koyu mavi, kırmızımsılık yok

8. *vulgare*

***Echium italicum* L. bitkisinin botanik özellikleri**



Resim 2.1. *Echium italicum* L.

İki yıllık, yoğun sert tüylü, dikenler kurduğunda sarımsı, sapı dik, 90cm'ye kadar. Yoğun yayık tüylüden dik yayık sert tüylüye kadar. Yapraklar çoğu sert dikenli, uçlu liear'dan daralmış oblong'a kadar. Bazal yapraklar 25(-35) × 2(- 4,5) cm, kısa petiyol içine azalmış durumda. Sapı küçük, sapsızdan altsapsıza kadar; Çiçeği genellikle piramidal, alt dalları sapın yaprak koltuklarından çıkmış, bazen dar veya başak şeklinde; Kaliks çiçek içinde 6-8 mm, meyve içinde ise 12 mm. Korolla soluk mavi, leylak, pembemsi veya beyazımsı, 7-9.5 mm'ye kadar, dar huni şeklinde, dış kısmı seyrek tüylü veya tüysüz. stamenler uzun dışarı sarıkmış. Filamentler soluk kahverengi'den turuncu'ya kadar. Stiluslar 2' ye bölünmüş, 1 mm. Fındıksı meyveleri 4×2 mm, oblong, buruşuk tüberkülat ve ağ gibi, keskin gagası ve yükselmiş çıkıntılı omuzlarıyla eğilmiş durumdadır[2].

İlk ve son çiçeklenme zamanı: 5 ve 8. ay

Habitat: kireçtaşı yamaçlar, tarlalar, tahrip edilmiş arazi...

Minimum yükseklik: 0

Maksimum yükseklik: 1950 m

Element: Akdeniz

Türkiye dağılımı: Türkiye geneli

Genel dağılımı: Orta ve Güney Avrupa, Güney Batı Asya

E.italicum L. bitkisinin sinonimleri

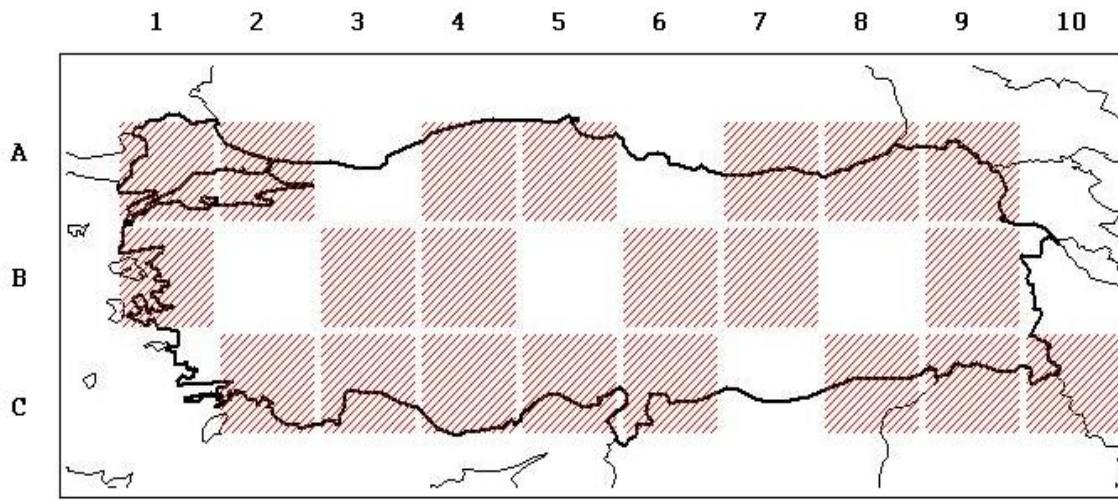
E. altissimum Jacq., Fl. Austr. 5:35, App. t. 16 (1778);

E. asperimum auct. non. Lam. (1792);

E.pyramidatum DC., Prodr. 10:23 (1846);

E. italicum L. var. *biebersteinii* Lacaita in J. Linn. Soc. (Bot.) 44:405(1918). Ic: Bonnier, Fl. Compl. Fr., Suisse et Belg. 8: t. 422 f. 1983 (1926); Hegi, III. Fl. Mittel-Eur. 5(3): f. 3141 (1927).

E.italicum L. bitkisinin Türkiye'deki yayılışı



Şekil 2.1. *Echium italicum* L. bitkisinin karelere göre yayılışı

A1(E) Edirne: İpsala'nın 1 km batısında, 40 m, Kukkonen 8400

A1(A) Balıkesir: Marmara adası, A.Baytop (ISTE 13711)

A2(E) İstanbul: Halkalı, 2 viii 1897, Azn.

A2(A) Bursa: Ulu Dağ 11 vii 1971, Shmida & Lev-Aril

A4 Ankara: Ankara'nın 10 km Kuzeyinde, M. & D. Zohary 876

A5 Samsun: Bafra, Karaköy Çiftlik, 30 m, Tobey 345

A7 Trabzon: Trabzon'un 10 km güney batısı, 150 m, Walton 1

A8 Çoruh: Ortaköy yakını (Grossheim 7: map 326).

A9 Erzurum: Olur yakını (Grossheim 7: map 326).

B1 İzmir: Bergama, 400 m, Dudley {D. 34834}

B3 Eskişehir: Mihaliççik'tan Sarıyar barajına doğru 900 m, D. 37218

B4 Konya: Ilgın'dan Zaferiye'ye 8 km, 1060 m, K. & E.Buttler 2002

B6 Malatya: Hekimhan, 1300 m, Stn. & Hend. 5431

B7 Erzincan: Keşiş Dağı. Yukarı Çimin, 1700 m, D. 31724

B9 Bitlis: Tatvan, 1890 m, Tong 39

C2 Denizli: Honaz Da, Tozluca, 1490 m, Tuzlaci.

C3 Antalya: Antalya'dan Finike'ye doğru, 800 m, Khan et al. 238

C4 Konya: Konya'dan Çumra'ya doğru, Küçük Köy, 980 m, Helbaek 2549

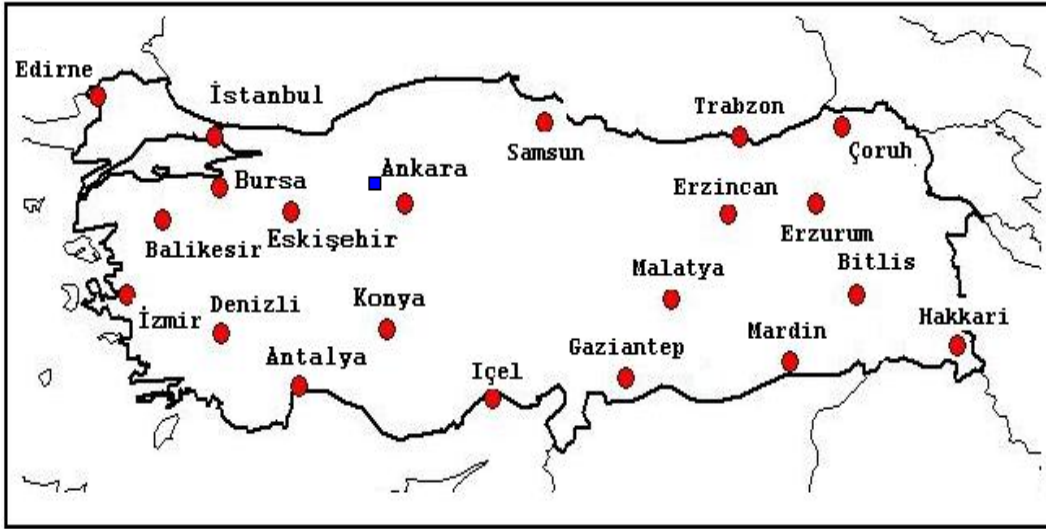
C5 İçel: Gülek Tepe, 1200 m, Siehe 1896:460

C6 Gaziantep: Gaziantep, Aysoy325

C8 Mardin: Mardin, Sint. 1888:1162

C9 Mardin: Cizre, 350 m, D. 42536

C10 Hakkâri: Gevar Ovası, Yüksekova'dan 2-3 km, 1950 m, D. 45761 Is: Lesvos, Rech. 5853; Khios, Platt 276 Samos, v 1966, Jakobsen; Kos, Rech. 7916 Rodhos, Fiori 379.



Şekil 2.2. *E.italicum* L. bitkisinin Türkiye'deki yetiştği yerler

Not: ● Bitkilerin "Flora of Turkey and The East Aegean Islands" 6.cildi'nde kayıtlı ve incelenen herbaryum örneklerinin toplanma yerleri

■ Çalışmamızda kullanılan *E.italicum* L. bitkisinin toplandığı yer

E.italicum L. bitkisinin herbaryum kayıtları

Kepekli boğazı (ANK 49)(!), Ankara Hacıkadın deresi, AnkaraKeskin Hasandede Palamutözü mevki (ANK 1995)(!), Aksaray: Kızılkaya köyü Musular mevki

1150m(GAZI 89) (!),Kırıklareli: Demirköyü İğnenda, bulanık derenin denize döküldüğü alan (GAZI 3492,3432)(!), Eskişehir: Türkmen dağı Aşağı Kalabak (ANK 2035)(!),Antalya: Manavgat Akseki yolu, Akseki'ye 28km kala yol kenarı(AEF 26020)(!), Nevşehir: Ortahisar,1200m (GAZI 4808) (!),Nevşehir: Nevşehir-Avanos 1150m (GAZI 5055)(!), Kayseri, Pınarbaşı Sakız yolu B.Gümüştün köyü,1550m (AEF 26496)(!), Kayseri: Pınarbaşı-Halitbey Ören köyü, (AEF 21497)(!), Ankara'nın kuzeyi, Kızılcahamam yakını, Kurtboğazı (AEF 9017)(!), Ankara Kızılcahamam soğuk su milli parkı (GAZI 1094)(!),Ankara: Akyurt-Kalecik arası, tepelik yokuşu(Kalecik'e 24km kala) (AEF 16448)(!), Ankara:Çubuk,Pegeek köyü-Hasanoğlan arası,1200m (AEF 16447)(!),Ankara: Haymana-Yenice Güzelcekale Tekin tepe 1200m (GAZI 6218)(!), Adana: Osmaniye-Kadirli arası (AEF 9020)(!), Adana: Hasanbeyli, Almanpınarı, karşık orman,1100m (GAZI 2448)(!), Kahramanmaraş: Göksun Değirmendere Korugaz Dağı, Meryemçil koruma alanı 1750-2000m(GAZI 1579)(!), Kahramanmaraş: Göksun- Değirmendere Püren geçiti koruma alanı, 1700-1900m taşlı yamaçlar (GAZI 1481)(!), K.maraş: Engizel Dağı Aksu mahallesi çevresi 1000m (GAZI 3036)(!), Kırıkkale: Delice Büyükavşar köyü, Büyükhemit mevkii (GAZI 1404)(!), Kırıkkale: Böbrek dağı, Müsellim köyü yokuş 1000m (GAZI 1914)(!), Muğla: Ortaca, Dalyan-Eskiköy(GAZI 9346)(!), Afyon: Dazkırı, Sarıkavak köyü girişi, yol kenarı 840m (GAZI 1285)(!),

E.italicum L. bitkisinin halk arasındaki adları

Türkçe adı: Engerekotu [3], Ayıkulağı, Bal çiçeği, Tilkikuyruğu, sığırdili [4], öküzdili, Sorma, Sormuk [5], kesiotu, havaciva, goriz, kurt kuyruğu [6], kızılçık diken [7], Kangal, Kuşkonmaz otu [8]

Diğer dillerdeki adları: Italian viper's bugloss, Pale Bugloss, Viperina

***Echium vulgare* L. bitkisinin botanik özellikleri**



Resim 2.2. *Echium vulgare* L.

İki yılda veya tek yılda bir meyve verir. Dalları genellikle basittir. Eğer hayvanlar tarafından otlanırsa veya hasara maruz kalırsa dallanır, 30-50 cm, seyrek veya yoğun yayık kılsı tüylüdür. Yapraklar beyaz sert tüylerle kaplıdır; Bazal yapraklar 120 x 11 mm, linear mırzaksıdan dar oblong'a kadar, subakut, kısa yaprak sapının içine azalmış durumdadır; sapı kısa, dar mırzaksı, sapsız; çiçek durumu çeperleri oblong ve ilk başta başak benzeri, simozlar antezden sonra belirgin uzanmış haldedir. Kaliks antezdeyken 5-6 mm, meyvede ise 10 mm'ye kadar büyüyerek kapanır. Korolla belirgin mavi, 14-18 mm, geniş infundibular, puberulous ve damarların dış kısmı seyrek sert tüylerle kaplıdır. Stamenler çoğunlukla dışarı çıkmış. Filamentler morumsu mavi. Stilus 1mm olarak ikiye ayrılmış. Meyve 2.5 x 1.5 mm, belirgin dorsal ve ventral omurgası ve dar keskin gagasıyla düzensiz scrobiculate- ağsı durumundadır[2].

Ömür: İki yıllık veya Monokarpik

İlk çiçeklenme zamanı: 5

Son çiçeklenme zamanı: 9

Habitat: Piceae ve Abies ormanı, yol kenarları, çalılık

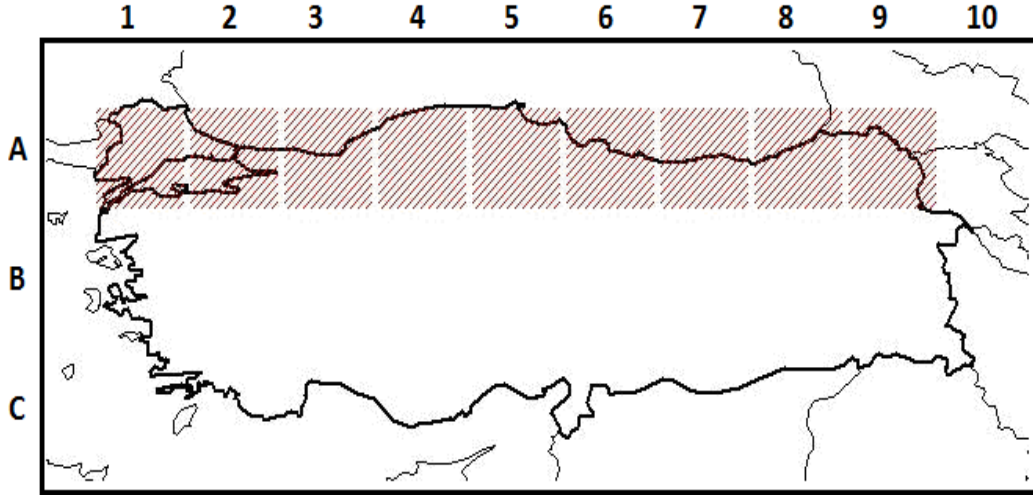
Maksimum yükseklik: 2440 m

Element: Avrupa-Sibirya

Türkiye dağılımı: Türkiye'nin kuzeyi

Genel dağılımı: Avrupa, Güney Batı ve Orta Asya

Bulunduğu kareler: A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9



Şekil 2.3. *E. vulgare* bitkisinin karelere göre yayılışı

E. vulgare L. bitkisinin sinonimleri

Echium argenteum Pau

Echium granatense Coincy

Echium hispanicum Asso

E. vulgare L. bitkisinin Türkiye'deki yayılışı

Çoğu Türkiye'nin kuzey adaları olmak üzere aşağıdaki karelere yayılmıştır:

A1(E) Kırklareli: Sergen'e doğru, A.Baytop (ISTE 29925)

A2(E) İstanbul: Hissar, 17 v 1915, Nicolaidis

A2(A) Bursa: Ulu Dağ, 11 vii 1971, Shmida & Lev-Aril

A3 Bolu: Gerede'nin 26 km batısında, 1100 m, Sorger 71-64-6

A4 Kastamonu: Küre'den İnebolu'ya doğru, 730 m, D. 21601

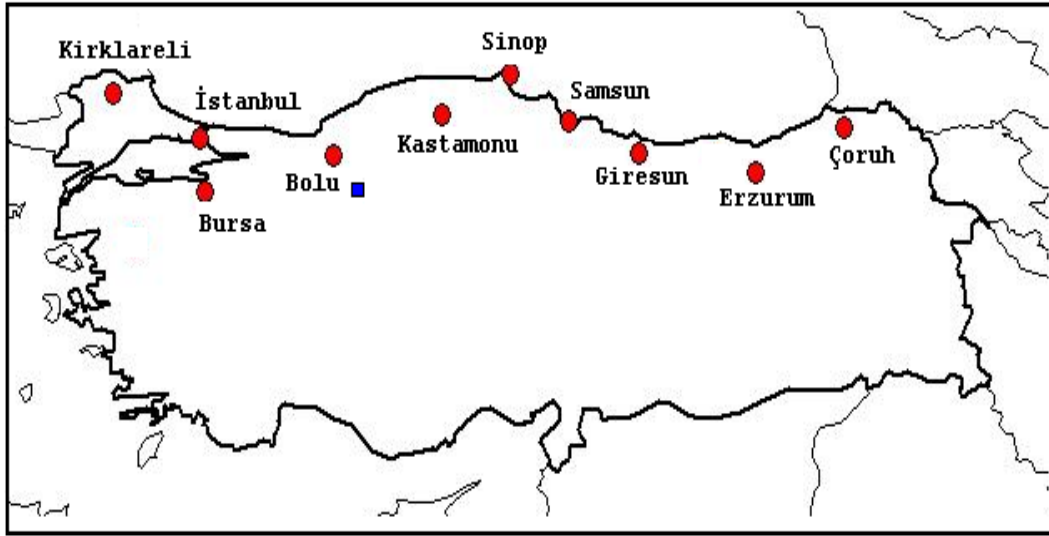
A5 Sinop: Yenikonak'tan Gökçeada'ya doğru 5 km, Jenkins 2212

A6 Samsun: Samsun, s.L, A. & T.Baytop (ISTE 15249)

A7 Giresun: Aşağı Tamdere, 1600 m, D. 20685

A8 Erzurum: Oltu'dan Tortum'a doğru 48 km, 1470 m, D. 47572

A9 Çoruh: Yalnızçam Dağı, 2440 m, Tong 424! Is: Kalimnos, Fors.-Maj. 761 (verification needed).



Şekil 2.4. *E. vulgare* L. bitkisinin Türkiye'de yetiştirildiği yerler

Not: ● Bitkilerin “Flora of Turkey and The East Aegean Islands” 6.Cildi’nde kayıtlı ve incelenen herbaryum örneklerinin toplama yerleri

■ Çalışmamızda kullanılan *E. vulgare* L. bitkisinin toplandığı yer

E. vulgare L. bitkisinin Herbaryum Kayıtları

İstanbul, Çamlıca(ANK 83)(!); Arduç(ANK 921)(!);Bolu Düzce Gümüşova-yanıksayvant köyü,(ANK 620)(!); Bolu, Semen Dağları, Bürünük- Çatakören yaylası arası,(ANK 10530)(!); Bolu Mudurnu (ANK 9183)(!);Kastamonu Ilgaz Dağı Bostan köy, (ANK 10974)(!);Ankara: Kızılcahamam Işıkdagi, 1400m (AEF 6792, 6317)(!), Gerede- Aktaş ormanı karaçam yol kenarı (ANK 320)(!);Sinop: Ayancık-Çangaldağı (AEF 1728)(!), Samsun, Boğra yolu TİGEM arazisi yol kenarı (AEF 16711)(!), Samsun’dan Merzigan’a 17km kala (AEF 16713)(!), Kastamonu Saka d. Yol kenarı, (ANK 111)(!); İnebolu- Adana çıkışı (ANK 2807)(!);Çankırı-Işıkdagi P.silvestiris açıklıklarında (ANK 3058)(!); Bartın-Akçasu, kurt pınarı mevki (ANK 1110)(!);Kastamonu: Tosya Sehiler köyü Sehi deresi Gavusun çiftliği; (ANK 3802)(!), Kastamonu Karaçomak barajı civarı (ANK 19)(!), Kastamonu Azdavay, Pınarbaşı arası(ANK 852)(!),Gümüşhane, Şiran, Çilhoroz tepesi 1650-1850m (ANK 1260)(!); Gümüşhane Şiran Tomara şelalesi, 1260-1500m, (ANK 1137)(!), Gümüşhane Yeşilköy (ANK 1563)(!); Artvin-Alaca dağı D.Yamaş Köprübaşı-Saçinka yolu, (ANK 818)(!); Artvin: Hopa-Borçka yolu,17.km,550m (AEF 13798)(!), Çoruh(Artvin): Borcka-Hopa (ANK 29833)(!); Kars, Digor deresi Erkek köyüne doğru,(ANK 12561)(!); Trabzon, Çaykara (ANK 32511)(!), Giresun: Dereli-

Şebinkarahisar arası 1000m (AEF 20129)(!), Giresun: Yavuzkema1'a 5km kala (AEF 16717)(!), Rize: Çamlıhemşin, at-Hisaroik arası, karşık orman, derim metamorfik vadi,1200-1600m (AEF 18856)(!), Erzurum'dan 88km Kop dağı, Ulak dağı ayırı (AEF 9015)(!),Kars: Aspaay-ıldu yolu kenarı (GAZI 2583)(!), Kırkılareli: İğneada: Demirköy 10km(GAZI 3537)(!),Amasya: Akdağ, Akören köyü (GAZI 2744)(!),

Echium vulgare L. bitkisinin adları

Türkçe yerli adı: Havacıva, Pişikkuyruğı, Sorma, Sormuk [5]

Diğer dillerdeki adları: Viper's Bugloss [9], Lisicji rep, Volovski, jezik [10]

***Echium angustifolium* Miller bitksinin botanik özellikleri**



Resim 2.3. *Echium angustifolium* Miller (1024 X 768)

Yoğun beyazımsı sert tüylü, çok yıllık odunsu bitki. Gövdesi bir veya birkaç, 13-60 cm, yoğun sert tüylü veya yok, sert tüyler çoğunlukla sivri ve yayık. Yaprak dardoğrusal, mızraksı, oblongveya dareliptik. Bazal yapraklar genellikle antezde buruşmuş, çiçekler ilk başta birkaç ve yoğun simoz, meyve verirken ise gevşek;

korolla mavi, morumsu, leylak veya kırmızımsı, 13-18(-22) mm, $\pm$ geniş infundibular, tüp düzenli sert tüylerle kaplı; Anter dışa doğru uzun çıkmış veya değil, Stilus 1 mm olarak ikiye bölünmüş. Meyveler 2.5 x 2 mm, geniş omuzları ve sivri eğik gagası oblong-çift piramidal şeklinde, kaba buruşuk tüberkülat.

Ömür: Çok yıllık

İlk çiçeklenme zamanı: 3

Son çiçeklenme zamanı: 8

Habitat: kıyı kumulları, kumlu yamaçlar, kıyılar, makiler, çalılıklar, bozkırlar

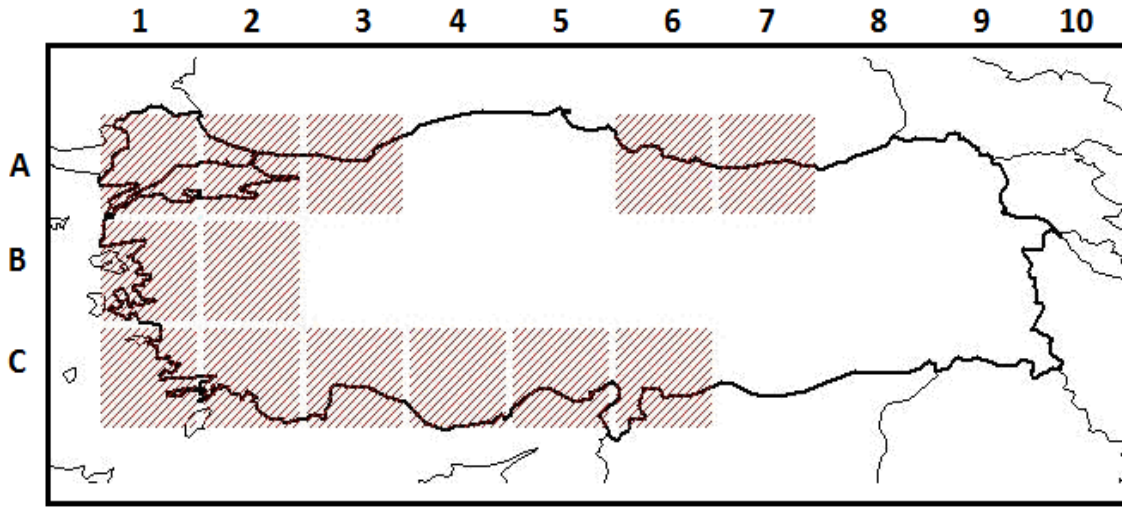
Maksimum yükseklik: 870 m

Element: Doğu Akdeniz

Türkiye'deki dağılımı: Trakya ve Anadolu'nun kıyı çevreleri

Genel dağılımı: Kuzey Afrika, Yunanistan, Ege, Kıbrıs, Filistin

Bulunduğu kareler: A1 A2 A3 A6 A7 B1 B2 C1 C2 C3 C4 C5 C6



Şekil 2.5. *E.angustifolium* Miller bitkisinin karelere göre yayılışı

E. angustifolium Miller bitkisinin sinonimleri:

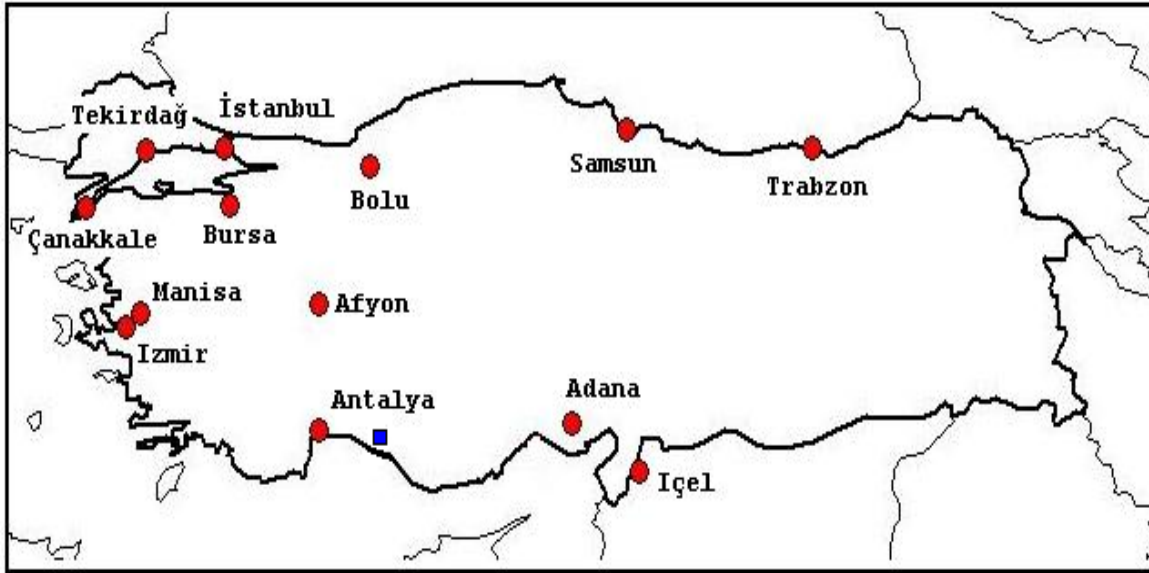
E. creticum auct. non L. (1753);

E. sericeum Vahl, Symb. 2:35 (1791).

E. angustifolium Miller bitkisinin Türkiye'deki dağılımı:

Avrupa'da Türkiye ve Anadolu'nun dış kısımları olmak üzere aşağıdaki bölgelerde yetişmektedir:

- A1(E)** Tekirdağ: Tekirdağ'ın güneyi, 5.5 km, 50 m, Jalas 2235
- A1(A)** Çanakkale: Çanakkale'nin 6 km güneyi, 5 m, Sorger 68-3-5
- A2(E)** İstanbul: Silivri'den Tekirdağ'a doğru, s.l., D. 39205
- A2(A)** Bursa: Ulu Dağ, 11 vii \914, Shmida&Lev-Ari
- A3** Bolu: Mudurnu, Tarcan (ISTE 4263).
- A6** Samsun: Kirazlık, s.l., Tobey 887
- A7** Trabzon: Polathane, Trabzon'un 20 km batısı, 19 m, Kukkonen 8150
- B1** İzmir: İzmir'in 30 km batısı, 3 m, Sorger 68-9-4
- B2** Manisa: Salihli'den Turgutlu'ya doğru 8 km, 120 m, Buttler & Erben 17222
- C1** İzmir: Kuşadası, s.l., Sorger 65-12-5
- C2** Afyon: Çardak'ın 3 km doğusu, Acı Göl
'ün kuzeyi, 870 m, K. & E. Buttler 19954
- C3** Antalya: Antalya'dan Serik'e doğru, T. Baytop (ISTE 11187)
- C4** İçel: Mut'un 11 km güneybatısında, 400 m, Sorger 71-20-4
- C5** Adana: Yumurtalık'tan batıya doğru 2 km, s.l., McNeill 811
- C6** Adana: Toprakkale, 90-120 m, K. & E. Buttler 17904 Is: Lesbos, Cand.; Khios, Aucher 2399! Samos, Rech. 2083; Kos, Rech. 7994 Rodhos, Miramare beach, s.l., D. 40271



Şekil 2.6. *E.angustifolium* Miller bitkisinin yetiştiği yerler

Not: ● Bitkilerin “Flora of Turkey and The East Aegean Islands” 6.Cildi’nde kayıtlı ve incelenen herbaryum örneklerinin toplama yerleri

■ Çalışmamızda kullanılan *E.angustifolium* Miller bitkisinin toplandığı yer

E. angustifolium Miller. bitksinin herbaryum kayıtları

Kastamonu çiğil köyü (ANK 849)(!), Gümüşhane Şiran Örenkale köyü mevki 1540-1580m (ANK 1513)(!), Mersin, Silicke(ANK)(!), İzmir: Deniz kenarı,(ANK)(!), Denizli, Pamukkale (ANK 19922)(!), Antalya: Manavgat-Gündoğdu orman sitesi yanındaki kumlu alan (AEF 26023)(!), Antalya: Manavgat Çolaklı tatil bölgesi deniz kenarı(AEF 26021)(!), Adana karataş sahil Eskibeleri üzerinden (AEF 10126)(!), İçel: Tarsus, Egemen köyü (AEF 9019)(!), Ankara: Kızılcahamam soğuksu milli parkı kızcapınar mevki 1400m, orman açıklığı (GAZI 1164)(!),Ankara:Kızılcahamam Soğuksu milli parkı Çakmaklının tepesi orman açıklığı (GAZI 1095)(!), Amasya: Yük Başaklık KüçükGeiçeyini mevkii 1200m (GAZI 1433)(!), Samsun: Bafra Kaşuk köyü, Kiman gölü çalılıklar arasındaki kumullar (GAZI 9674)(!),

E. angustifolium Miller bitksinin adları

Türkçe yerli adı: Kızılçık dikenî, Kızılçık otu [11]

Diğer dillerdeki adları: Hispid Viper's-bugloss.

***Echium parviflorum* Moench bitkisinin botanik özellikleri**



Resim 2.4. *Echium parviflorum* Moench

Yüzükoyun yükselen tek veya iki yıllık bitki. Birden çok gövdeli, 10-35 cm, yayık ve dik sert tüylü veya değil; Yapraklar orta derecede yayık sert tüylü ve belirgin yoğunlukta sert kıllı, yuvarlaklaşmış; Bazal yapraklar 35-120 × 10-30 mm, dar eliptik'ten spatül'e kadar, belirgin saplı; Sapı küçük, üst kısmı sapsız. Simozlar alt yaprak saplarının koltuklarından yükselmiştir. Kaliks antezde 5-8 mm, meyvede is 12-15 mm, lobları tabanında 4 mm genişliğindedir. Korolla gökyüzü mavisinden beyaza kadar, 12-14 mm, korolla tüpü kırvrılmış yerler ve tepe kısmı dışında yoğun saç kıllı, loblar tüysüz veya değil. Stamenler hepsi içeride. Stiluslar 0,5 mm olarak ikiye ayrılmış. Meyveler geniş piramidal, çift bombeli, 2,5 × 2 mm, kaba tüberkülat.

Ömür: Tek veya İki yıllık

Çiçeklenme zamanı: 3- 4

Habitat: kayalık kireçtaşı yamaçlar, çimenlik yerler, yakınları

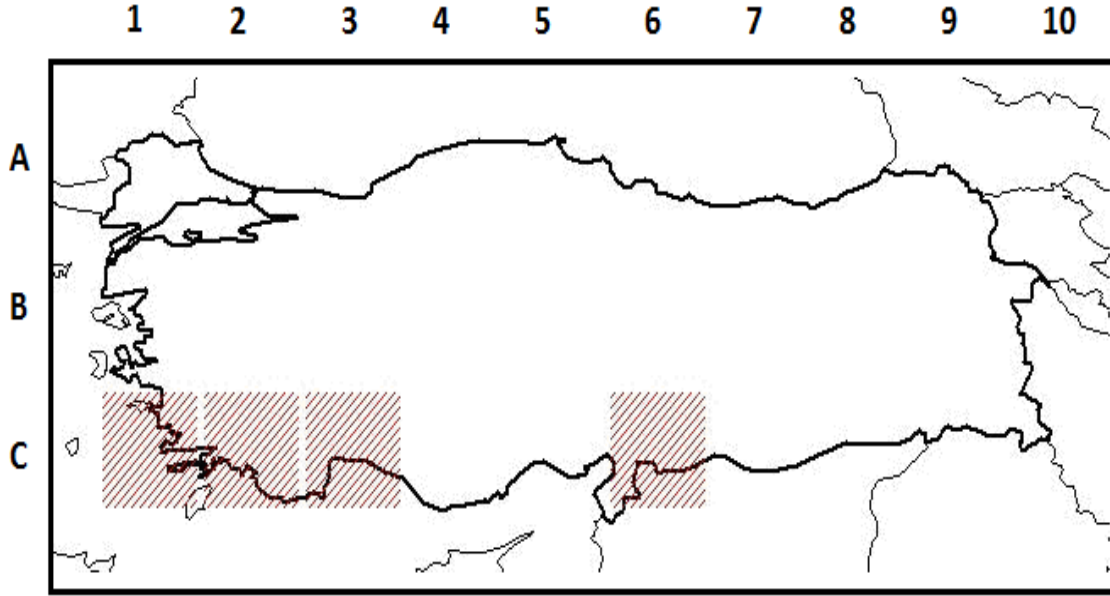
Maksimum yükseklik: 0-50 m

Element: Akdeniz

Türkiye'deki dağılımı: Güney Anadolu

Genel dağılımı: Kuzey Afrika Kıyıları ve Portekiz'den Yunanistan'a kadar olan Güney Avrupa, Batı Suriye

Bulunduğu kareler: C1 C2 C3 C6



Şekil 2.7. *E.parviflorum* Moench bitkisinin karelere göre yayılışı

E. parviflorum Moench bitkisinin Türkiye'deki dağılımı

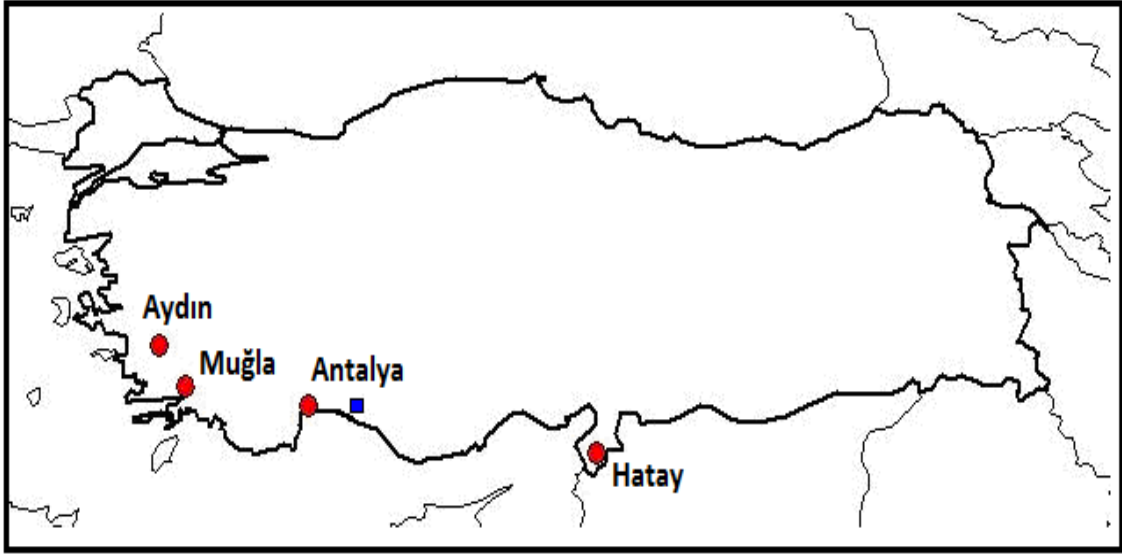
Bu tür çoğunlukla anadolu'nun güney kısımlarında yetişmektedir.

C1 Aydın: Priene, 50m, D.40845

C2 Muğla: d. Fethiye, kaya, 50 m, D.25441

C3 Antalya: Antalya, 5m, D.25626

C6 Hatay: Alexandrette (Iskenderum), Rogers 8569 **Is:** Ikaria, Ag. Kyrikos, 10m, D.40650! Fournoi, Rech.4539; **Kos**, d'Urv.; Kandleousa, *Papatsou* 625; Rodhos,1965, *Danish Exped.*



Şekil 2.8. *E.parviflorum* Moench bitkisinin yetiştiği yerler

Not: ● Bitkilerin “Flora of Turkey and The East Aegean Islands” 6.Cildi’nde kayıtlı ve incelenen herbaryum örneklerinin toplama yerleri

■ Çalışmamızda kullanılan *E.parviflorum* Moench bitkisinin toplandığı yer

E. parviflorum Moench bitkisinin herbaryum kayıtları

Antalya: Manavgat- Gündoğdu orman sitesi yanındaki kumlu alan (AEF 26024)(!),
Antalya: Manavgat çorakı köyü petrokent sitesi kumlu alan (AEF 19348, GAZI 9348)(!),
Antalya: Kemer (AEF 5224)(!),
Antalya: Manavgat Çolaklı sahil(Sunal Otel önü) (AEF 26022)(!),
Urfa: Urfa-Hilvan arası, 35.km, tepelik 800m (AEF 19674)(!),

E. parviflorum Moench bitkisinin sinonimleri

E.calycinum Viv.in Ann. Bot.(Lyon)1:164(1802). Ic: Fl. Graeca 2: t.183 .(1816),
E.creticum; Fiori, Ic. Fl. Ital. f.2785(1901)

E. parviflorum Moench bitkisinin adları

Diğer adları: Small-flowered Viper's Bugloss

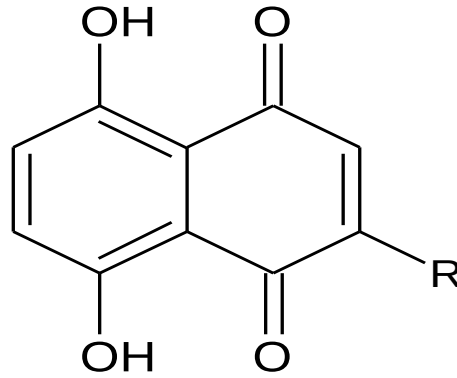
2.2. Kimyasal Kısım

Bu kısımda, *Echium* türlerinin fitokimyasal bileşimi üzerinde yapılan çalışmalar kimyasal gruplarına göre kategorilere ayrılarak derlenmiştir.

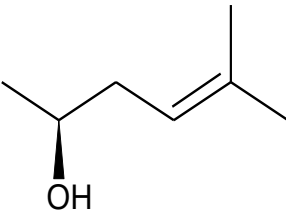
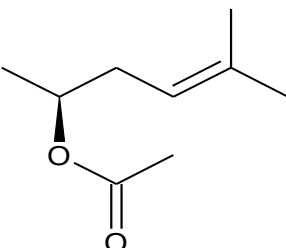
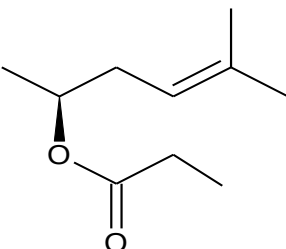
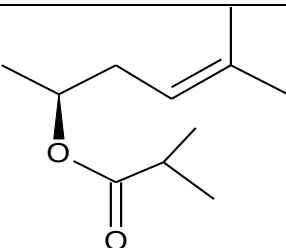
2.2.1. *Echium* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar

Yapılan literatür çalışmalarda, *Echium* türlerinin başlıca naftokinon, flavonoit, pirolizidin alkaloidleri, uçucu yağ ve sabit yağ yönünden zengin olduğunu göstermektedir. Fitokimyasal maddeler gruplarına göre aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

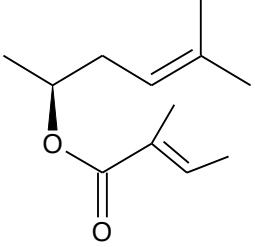
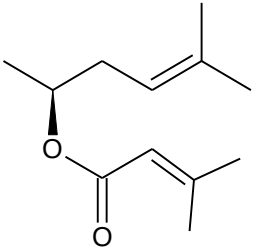
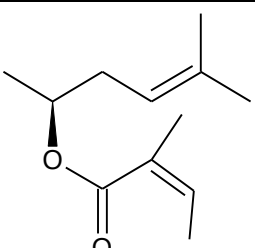
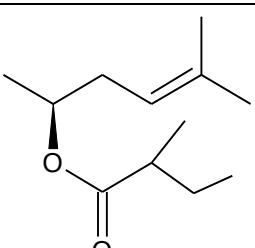
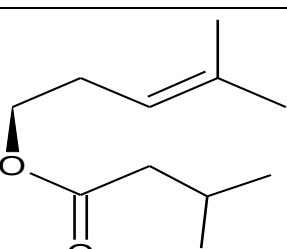
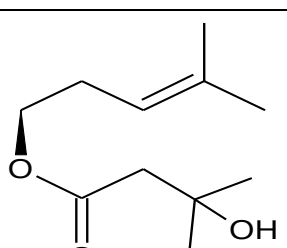
Naftokinonlar



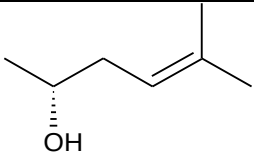
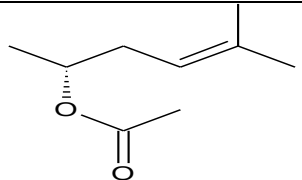
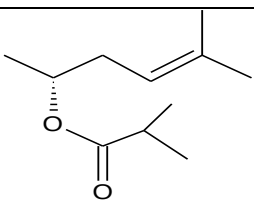
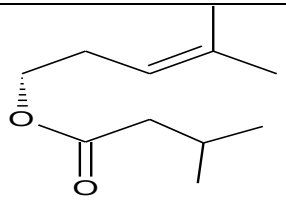
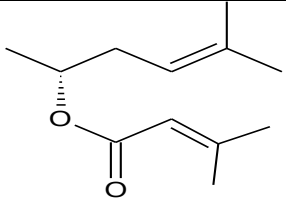
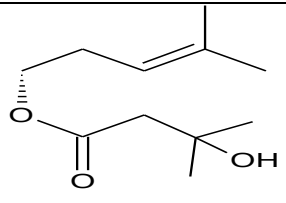
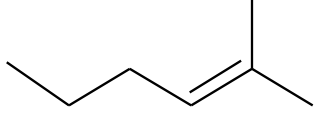
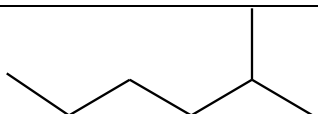
Çizelge 2.1. *Echium* türlerinde bulunan naftokinonlar (Şikonin türevleri) -1

Bileşik	R	Bitki türü ve Kaynağı
Şikonin		Kök: <i>E. italicum</i> L.[12, 13,14] <i>E. lycopsis</i> . [13, 15] <i>E. rubrum</i> [13, 16, 17] <i>E. vulgare</i> [13,18] <i>E. plantagineum</i> L. [17,19] <i>Echium</i> [20] Kültür: <i>E. italicum</i> L. [21] <i>E. lycopsis</i> . [22]
Asetilşikonin		Kök: <i>E. italicum</i> L. [23] <i>E. pycnanthum</i> pomel [24] <i>E. vulgare</i> [13,18] Kültür: <i>E. italicum</i> L. [21,25]
Propiyonilşikonin		Kök: <i>E. italicum</i> L. [23]
İzobutirilşikonin		Kök: <i>E. italicum</i> L. [23] <i>E. pycnanthum</i> pomel [24] <i>E. vulgare</i> [13,18]

Çizelge 2.2. *Echium* türlerinde bulunan naftokinonlar (Şikonin türevleri) – 2

Bileşik	R	Bitki türü ve Kaynağı
Tigililşikönin		Kök: <i>E. italicum</i> L. [23]
3,3-dimetilakrilşikönin		Kök: <i>E. italicum</i> L. [23,26] <i>E. vulgare</i> . [13, 18]
Angelil şikonin		Kök: <i>E. italicum</i> L. [23] <i>E.pycnanthum</i> pomel [24]
2-metil-n-butiril şikonin		Kök: <i>E. italicum</i> L. [23] <i>E.pycnanthum</i> pomel [24] <i>E. vulgare</i> L. [13,18]
İzovaleril şikonin		Kök: <i>E. italicum</i> L. [23] <i>E.pycnanthum</i> pomel [24] <i>E. vulgare</i> L. [13, 18]
β-hidroksi izovaleril şikonin		Kültür: <i>E. lycopsis</i> . [13, 22]

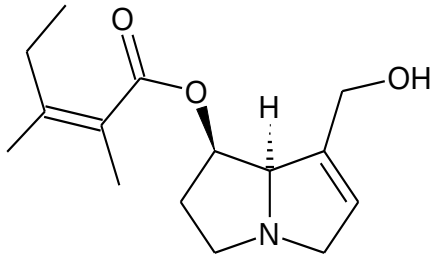
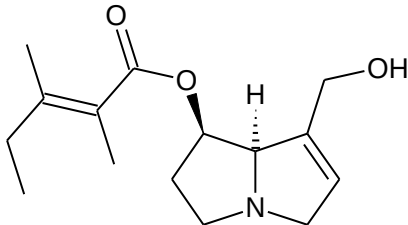
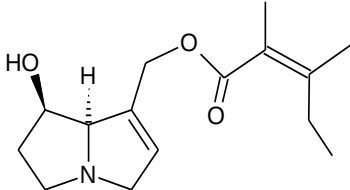
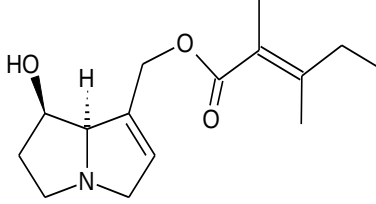
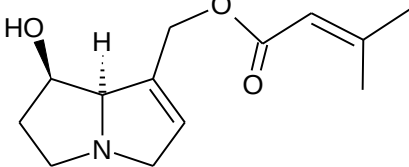
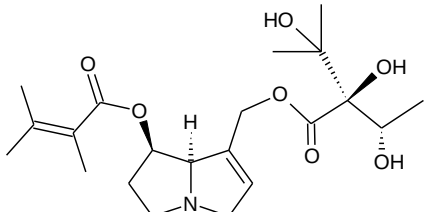
Çizelge 2.3. *Echium* türlerinde bulunan naftokinonlar (Alkanin türevleri) – 3

Bileşik	R	Bitki türü ve Kaynağı
Alkanin		<i>Echium</i> [20] Kültür: <i>E. italicum</i> L. [21]
Alkanin asetat		Kültür: <i>E. italicum</i> L. [21]
İzobutrilalkanin		Kültür: <i>E. lycopsis</i> [13,22]
İzovalerylalkanin		Kültür: <i>E. lycopsis</i> [13,22]
β,β -dimetilakrilalkanin (Arnebin-1)		Kültür: <i>E. lycopsis</i> [13,22]
β -hidroksi izovalerylalkanin		Kültür: <i>E. lycopsis</i> . [13,22]
Deoksialkannin, deoksişikoinin, (arnebin-7)		Kök: <i>E. vulgare</i> L. [13, 18]
Alkanan		Kök: <i>E. vulgare</i> L. [13, 18]

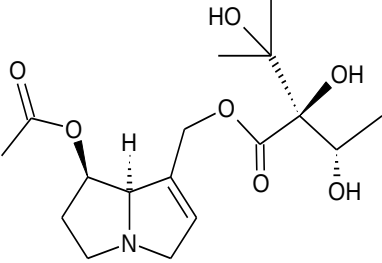
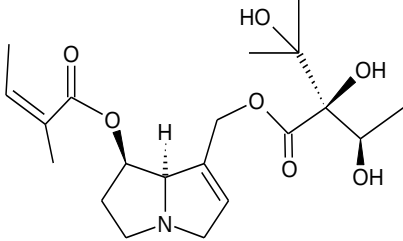
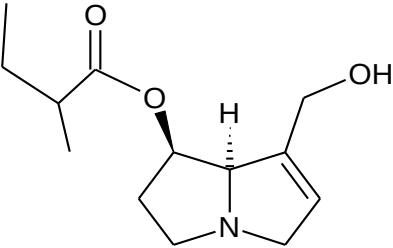
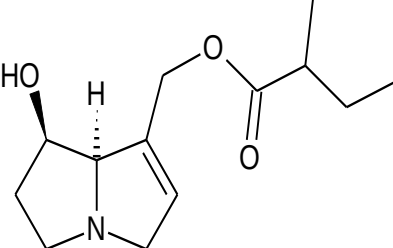
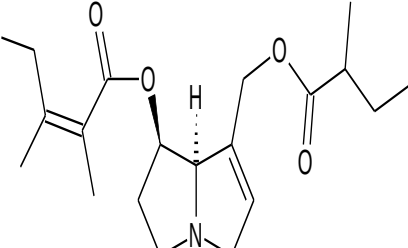
Pirolizidin AlkaloitleriÇizelge 2.4. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri - 1

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Ekimidin		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. rauwolfii</i> [28, 29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. pininana</i> [30] <i>E. wildpretii</i> [31] <i>E. plantagineum</i> [32, 33] <i>E. italicum</i> L. [33] <i>E. angustifolium</i> Miller. [34] <i>E. sericeum</i> [35] <i>E. amoenum</i> Fisch. & Mey. [36] Bal/ polen: <i>E. vulgare</i> L. [37, 39-40] <i>E. plantagineum</i> L. [38,39]
Asetilekimidin		<i>E. vulgare</i> L. [27] Bal/polen: <i>E. vulgare</i> L. [37,39-40] <i>E. plantagineum</i> L. [38,39]
Retronesin		<i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. italicum</i> L. [41]

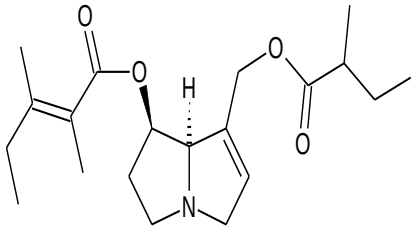
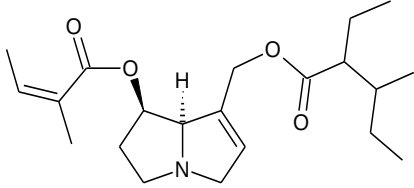
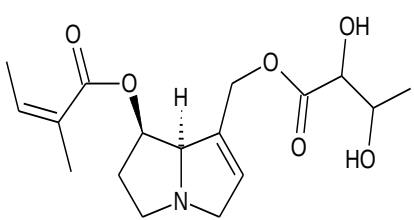
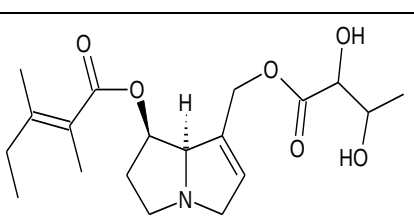
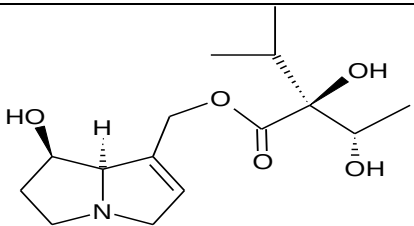
Çizelge 2.5. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 2

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
7-angeloyilretro nesin		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. glomeratum</i> [42] <i>E. amoenum</i> Fisch. & Mey. [36]
7-tigloylretrone sin		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. amoenum</i> Fisch. & Mey. [36]
9-angeloylretro nesin		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. glomeratum</i> L. [42] Bal polen: <i>E. vulgare</i> L. [37]
9-tigloylretrone sin		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> L. [27]
9-senecioyil retronesin		<i>E. vulgare</i> L. [27]
Ekihumilin		<i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. humile</i> [43]

Çizelge 2.6. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 3

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Uplandisin		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> L. [27,23] <i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. plantagineum</i> [33] Bal/polen: <i>E. vulgare</i> L. [37] <i>E. plantagineum</i> L. [38,39] <i>E. vulgare</i> [40,39]
Ekimidin izomer		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> [27] <i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. amoenum</i> Fisch. & Mey. [36]
7-(2-metilbutril) retronesin		<i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. humile</i> [43] <i>E. tuberculatum</i> [44]
9-(2-metilbutril) retronesin		<i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. tuberculatum</i> [44]
7-angeloyil -9-(2-Metilbutiril)retro nesin		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. tuberculatum</i> [44]

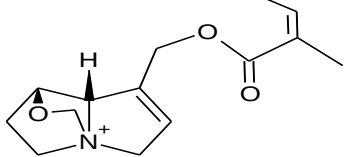
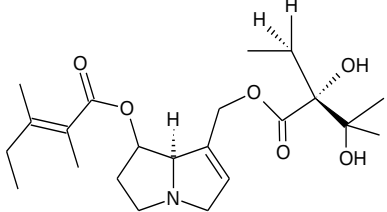
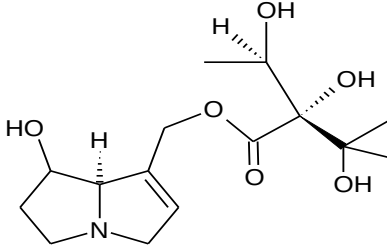
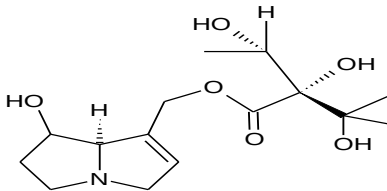
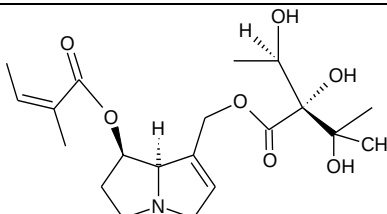
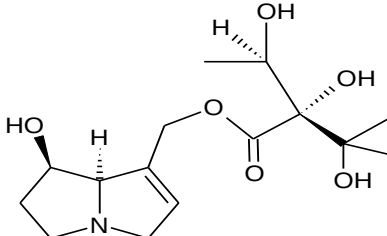
Çizelge 2.7. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloidleri (Devamı) - 4

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
7-tigloyl-9-(2-methylbutyryl) retronecine		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. tuberculatum</i> [44]
7-angeloyl-9-(2,3-dimetilbutiril) retronesin		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. tuberculatum</i> [44]
7-angeloyl-9-(2,3-dihidroksibutiril) retronesin		<i>E. setosum</i> [27] <i>E. vulgare</i> L. [27] <i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. tuberculatum</i> [44]
7-tigloyl-9-(2,3-dihidroksibutiril) retronesin		<i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. tuberculatum</i> [44]
likopsamin		<i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. humile</i> [43] <i>E. plantagineum</i> L. [33] Bal: <i>E. plantagineum</i> L. [38]

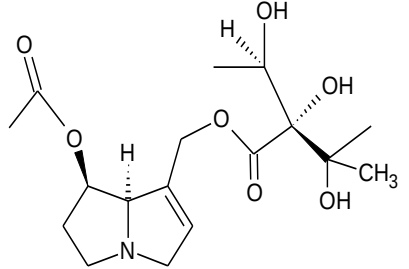
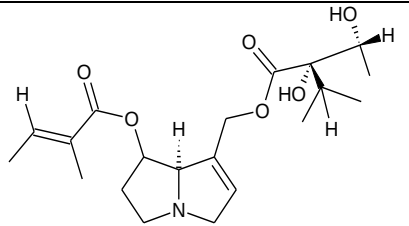
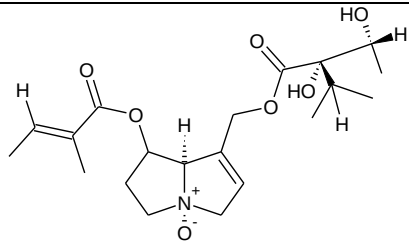
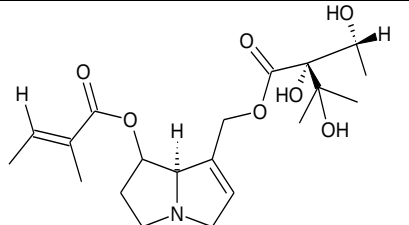
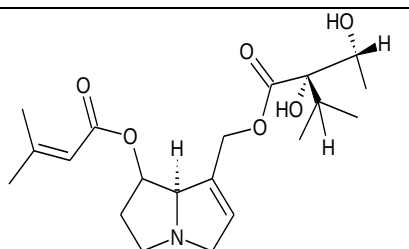
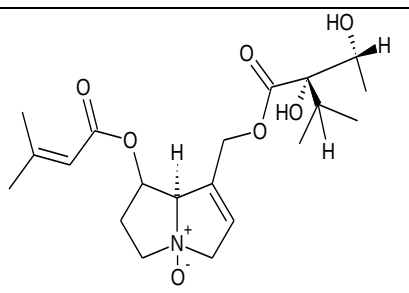
Çizelge 2.8. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 5

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
7-asetillikopsamin		<i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29] <i>E. humile</i> [43] <i>E. plantagineum</i> L. [45,33] Bal: <i>E. plantagineum</i> L. [38,39] <i>E. vulgare</i> L. [39]
7-angeloyillikopsamin		<i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29]
7-tigloyillikopsamin		<i>E. rauwolfii</i> [28,29] <i>E. horridum</i> [28,29]
(7S, 8R)-petranin		<i>E. glomeratum</i> [42]
(7S, 8S)-petranin		<i>E. glomeratum</i> [42]
(7R, 8R)-petranin (3a)		<i>E. glomeratum</i> [42]

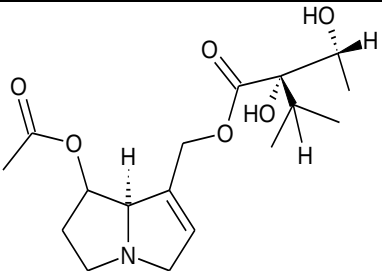
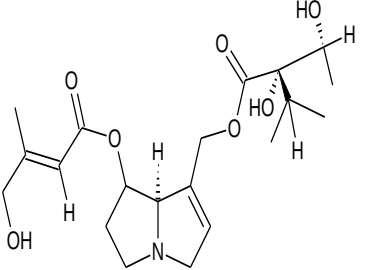
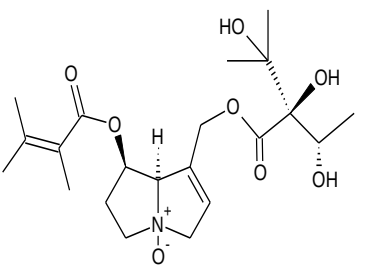
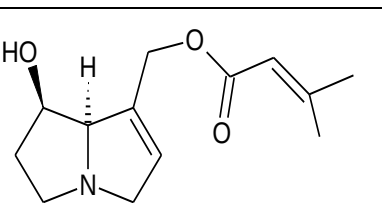
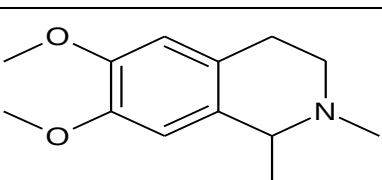
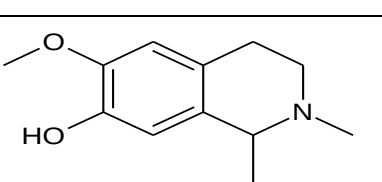
Çizelge 2.9. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloidleri (Devamı) - 6

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
(7R, 8S)-petranin (3b)		<i>E. glomeratum</i> [42]
Ekiuplatin		Bal / polen: <i>E. vulgare</i> L. [37, 40]
Leptantin		Bal / polen: <i>E. vulgare</i> L. [37, 39-40] <i>E. platagineum</i> L. [39]
Ekimiuplatin		Bal / polen: <i>E. vulgare</i> L. [37, 39-40] <i>E. platagineum</i> L. [39]
Ekivulgarin		Bal / polen: <i>E. vulgare</i> L. [37, 39-40] <i>E. platagineum</i> L. [39]
Vulgarine		Bal/ polen: <i>E. vulgare</i> L. [37, 39-40] <i>E. platagineum</i> [39]

Çizelge 2.10. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 7

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
7- O -asetilvulgarin		Bal/polen: <i>E. vulgare</i> L. [37, 39- 40] <i>E. plantagineum</i> [39]
Miyoskorpın		<i>E. pininana</i> [30]
Miyoskorpın-N-oksit		<i>E. pininana</i> [30]
Hidroksi miyoskorpın		<i>E. pininana</i> [30]
Ekiupinin		<i>E. pininana</i> [30]
Ekiupinin-N-oksit		<i>E. pininana</i> [30]

Çizelge 2.11. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 8

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
7-Asetilintermedin		<i>E. pininana</i> [30] <i>E. plantagineum</i> L. [45,33] Bal: <i>E. plantagineum</i> L. [38]
Piknantin		<i>E. humile</i> [43]
Ekihumilin N-oksit		<i>E. humile</i> [43]
9-senecioyilretron esin		<i>E. humile</i> [43]
Karnegin		<i>E. humile</i> [43]
Orkarnegin		<i>E. humile</i> [43]

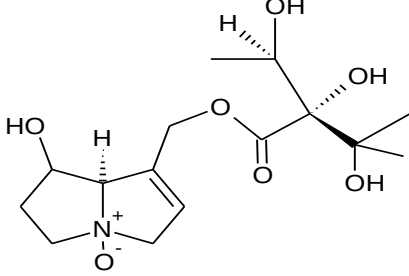
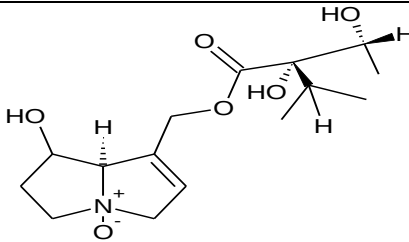
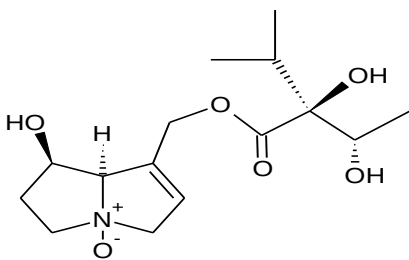
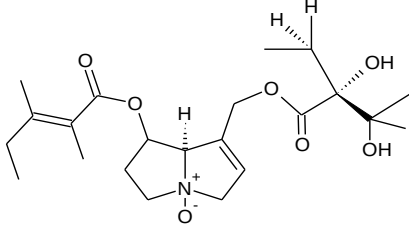
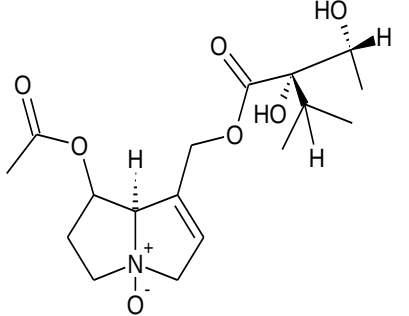
Çizelge 2.12. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 9

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
7-(2-Metilbutiril)-9-ekimidinilretronesin		<i>E. humile</i> [43]
7-(2-Metilbutiril)-9-(2,3-dihidroksibutiril) retronesin		<i>E. humile</i> [43]
9-seneciyoil likopsamin		<i>E. humile</i> [43]
Ekiumin		<i>E. italicum</i> L. [41] <i>E. plantagineum</i> L. [32,33] Bal: <i>E. plantagineum</i> L. [38]
Intermedin		Bal: <i>E. plantagineum</i> L. [38]
Ekimidin N-oksit		<i>E. wildpreti</i> [31] <i>E. plantagineum</i> L. [45] <i>E. angustifolium</i> Miller [34] Bal: <i>E. vulgare</i> L. [40]

Çizelge 2.13. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 10

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Ektivulgarin N-oksit		Bal: <i>E. vulgare</i> L. [40]
7-O-asetilvulgarin		Bal: <i>E. vulgare</i> L. [40]
7-O-asetilvulgarin N-oksit		Bal: <i>E. vulgare</i> L. [40]
Vulgarine N-oksit		Bal: <i>E. vulgare</i> L. [40]
Ekimiplatın N-oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45] Bal: <i>E. vulgare</i> L. [40]
Uplandisin N-oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45] Bal: <i>E. vulgare</i> L. [40]

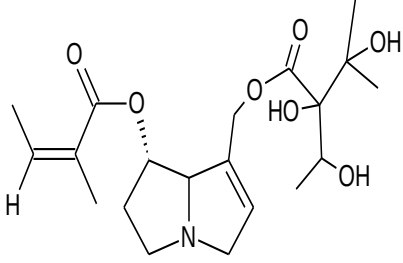
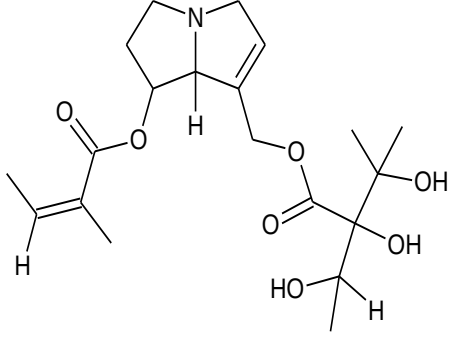
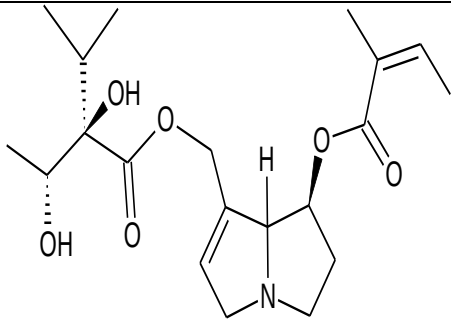
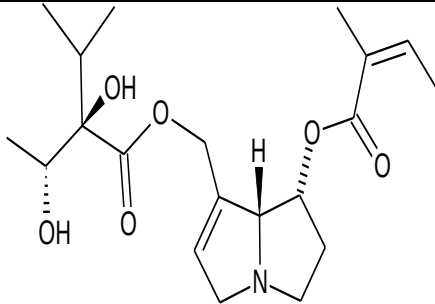
Çizelge 2.14. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı)- 11

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Leptatin N-oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45] Bal: <i>E. vulgare</i> L. [40]
İntermedin N-oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45]
Likopsamin- N -oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45]
Ekiuplatin- N -oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45]
7- O - Asetilintermedin N –oksit (ekiumin tipi)		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45]

Çizelge 2.15. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 12

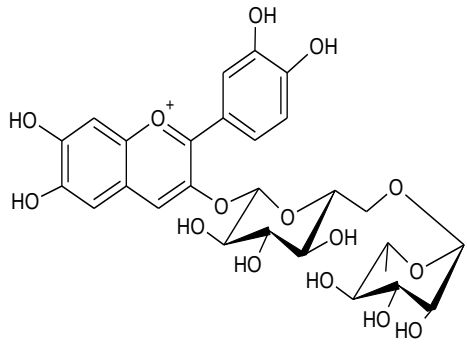
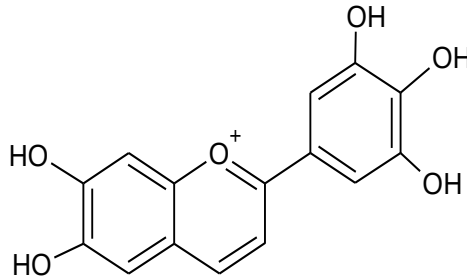
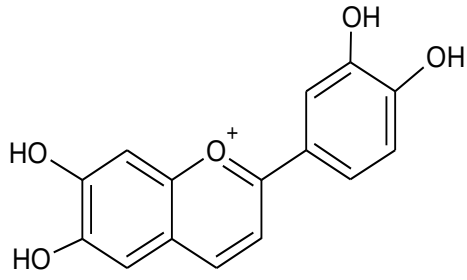
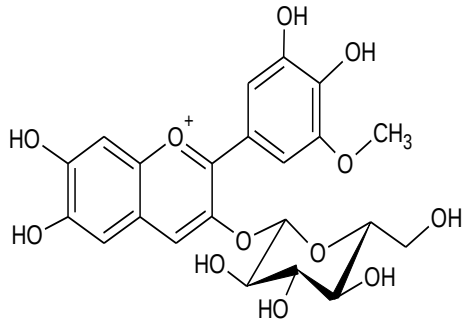
Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
7- O – asetillikopsamin- N -oksit (ekiumin tipi)		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45]
9- O- Angelilretronesin N -oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45]
3'- O – asetilekimidin N - oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45]
Ekiumin-N -oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45]
3'- O – asetilekiumin- N - oksit		Yaprak ve çiçek: <i>E. plantagineum</i> L. [45]

Çizelge 2.16. *Echium* türlerinde bulunan pirolizidin alkaloitleri (Devamı) - 13

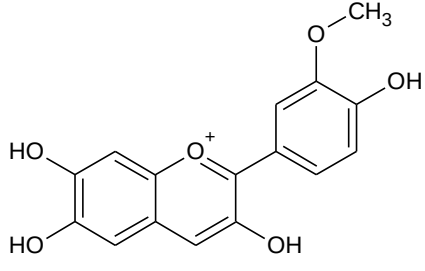
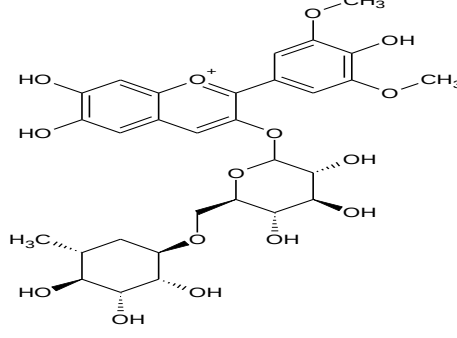
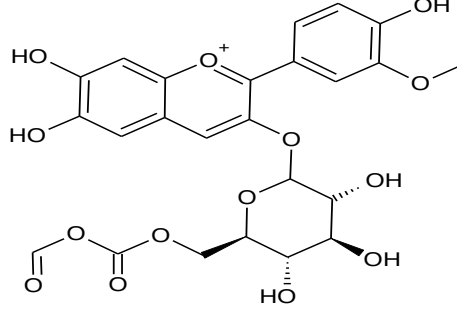
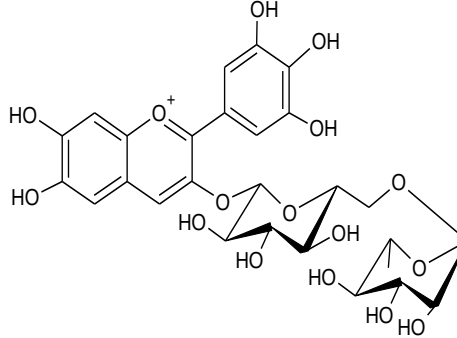
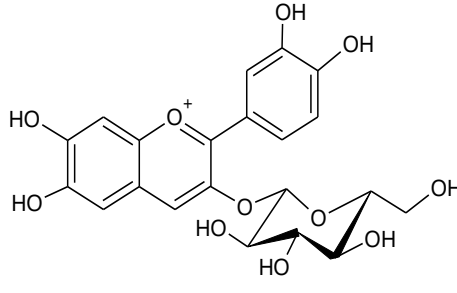
Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Asperumin		<i>E. vulgare</i> L. [46,33]
Heliosupin		<i>E. vulgare</i> L. [46,33,47]
Simlandin		<i>E. sericeum</i> [35]
Simfitin		<i>E. sericeum</i> [35]

Antosiyaninler

Çizelge 2.17. *Echium* türlerinde bulunan antosiyaninler- 1

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Petunidin-3-O-rutinozid		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Delfinidin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Siyanidin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Petunidin-3-O-glukozid		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]

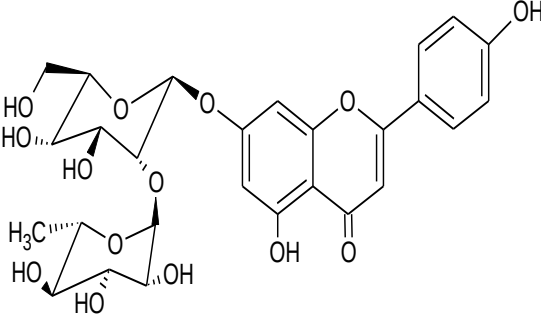
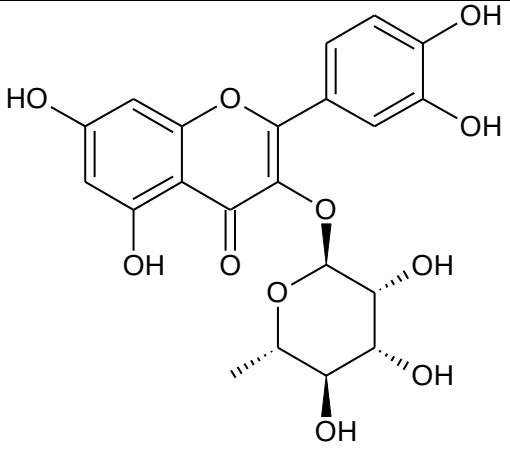
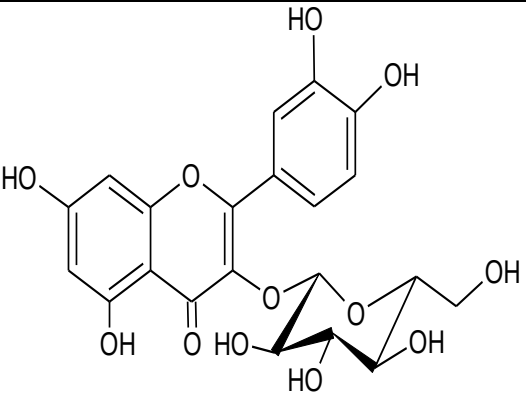
Çizelge 2.18. *Echium* türlerinde bulunan antosiyaninler- 2

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Peonidin		Arı poleni: <i>E.plantagineum</i> L. [48]
Malvidin-3-O-rutinozit		Arı poleni: <i>E.plantagineum</i> L. [48]
Siyanidin-3-(6"-malonilglukozit)		Arı poleni: <i>E.plantagineum</i> L. [48]
Delfinidin-3-O-rutinozit		Arı poleni: <i>E.plantagineum</i> L. [48]
Siyanidin-3-O-glukozit		Arı poleni: <i>E.plantagineum</i> L. [48]

FlavonoitlerÇizelge 2.19. *Echium* türlerinde bulunan flavonoitler-1

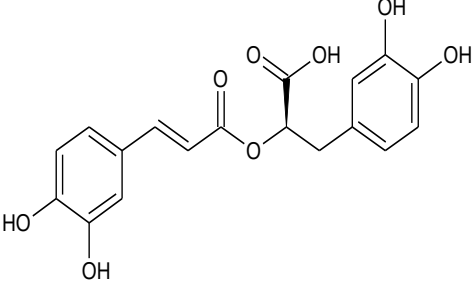
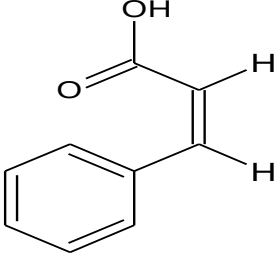
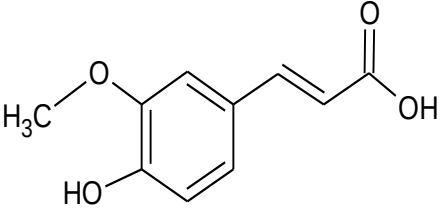
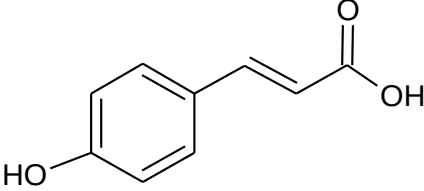
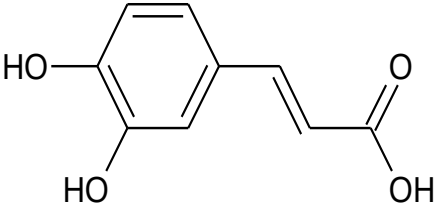
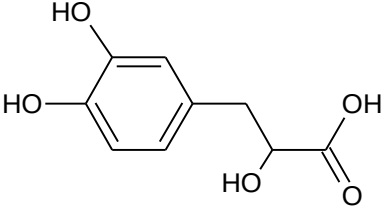
Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Kemferol 3-O-neohesperidozit		Çiçekli toprak üstü kısım: <i>E. vulgare</i> L. [49,50]
Kempferol glikozit 3-		Arı poleni: <i>Echium</i> [51]
Apigenin		<i>Echium sericeum</i> [52]
Apigenin-7-O-ramnozit		<i>Echium sericeum</i> [52]

Çizelge 2.20. *Echium* türlerinde bulunan flavonoitler-2

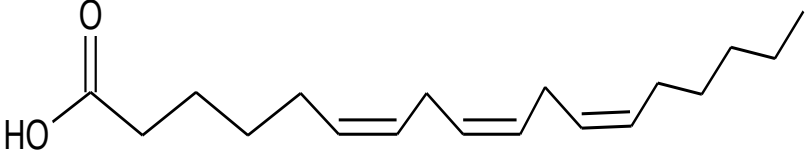
Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Luteolin-7-O-rutinozit		<i>Echium sericeum</i> [52]
Kersetin-3-O-ramnozit		<i>Echium sericeum</i> [52]
Kersetin-3-O-glukozit		Arı poleni: <i>Echium</i> [51]

Fenolik bileşikler

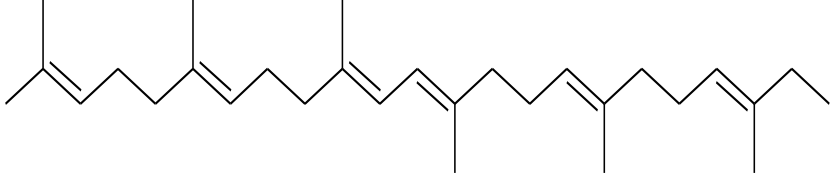
Çizelge 2.21. *Echium* türlerinde bulunan fenolik bileşikler

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Rosmarinik asit		Petal: <i>Echium amoenum</i> Fisch. and C. A. Mey [53] Çiçekli toprak üstü kısım: <i>E.vulgare</i> [49, 50]
Cis-sinamik asit		Toprak üstü kısım: <i>E.vulgare</i> [54]
Ferulik asit		Toprak üstü kısım: <i>E.vulgare</i> [54]
P-kumarik asit		Toprak üstü kısım: <i>E.vulgare</i> [54]
Kafeik asit		Toprak üstü kısım: <i>E.vulgare</i> [54]
3-(30,40-dihidroksifenil)-(2R)-laktik asit		Çiçekli toprak üstü kısım: <i>E.vulgare</i> [49, 50]

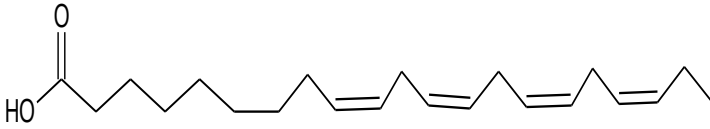
Yağ asitleriÇizelge 2.22. *Echium* türlerinde bulunan yağ asitleri-1

Bileşik	Gamma linolenik Asit(18:3ω6)
Formül	
Bitki ve Kaynağı	
Tohum: <i>E. plantagineum</i>, <i>E.giganteum</i>, <i>E.aculeatum</i>, <i>E.triste</i>, <i>E.leucophaeum</i>, <i>E.wildpretii</i>, <i>E.simplex</i>, <i>E.virescence</i>, <i>E.fastuosum</i>, <i>E.svetenii</i>, <i>E.nervosum</i>, <i>E.candicans</i>, <i>E.acanthocarpum</i>, <i>E.onosmifolium</i>, <i>E.clithyrsum</i>, <i>E.hierrense</i>, <i>E.auberium</i>, <i>E.decasnei</i>, <i>E.strictum</i> [55], <i>E.candicans</i>, <i>E.acanthocarpum</i>, <i>E.onosmifolium</i>, <i>E.clithyrsum</i>, <i>E.hierrense</i>, <i>E.auberium</i>, <i>E.decasnei</i>, <i>E.strictum</i>, <i>E.webbii</i>, <i>E.bodspaguei</i>, <i>E.candicans</i>, <i>E.hierrense</i>, <i>E.onosmafolium</i>, <i>E.bethencourtianum</i>, <i>E.acanthocarpum</i>, <i>E.callithysum</i>, <i>E.brevirame</i>, <i>E.pininana</i>, <i>E.auberianum</i>, <i>E.decaisnei</i>, <i>E.asperimu</i>, <i>E.boissieri</i>, <i>E.creticum</i>, <i>E.flavum</i>, <i>E.sabulicola</i> [56], <i>E.vulgare</i> [56,57], <i>E. pitardii</i> var. <i>pitardii</i>, <i>E. p.</i> var. <i>macrantha</i>, <i>E. bonnetii</i> var. <i>bonnetii</i>, <i>E. b.</i> var. <i>fuerteventurae</i>, <i>E.brevirame</i>, <i>E. x bondspranguei</i>, <i>E. virescens</i> var. <i>angustissimum</i>, <i>E.webbii</i>, <i>E.bethencourtianum</i>, <i>E.handiense</i>, <i>E.gentianoides</i> Sect. <i>Simplicia</i>, <i>E. pininana</i>, <i>E. wildpretii</i> ssp. <i>Trichosiphon</i>, <i>E. Decaisnei</i> [58] <i>E.fastuosum</i> [59,60], <i>E.pitardii</i>, <i>E.gentianoides</i> [61], <i>E.plantagineum</i> L. [62,63,64,65,66], <i>E. italicum</i> L. [64,67,68], <i>E. asperimum</i>, <i>E. boissieri</i>, <i>E. creticum</i>, <i>E. flavum</i>, <i>E.humile</i>, <i>E. sabulicola</i>, <i>E.vulgare</i> [69,70] <i>E.fastuosum</i> [71,72], <i>E.plantagineum</i> L. [62], <i>E.virescens</i> [73], <i>E.arenarium</i> Guss. <i>E.flavum</i> Desf. <i>E.gaditanum</i> Boiss. <i>E.horridum</i> Batt. <i>E.humile</i> ssp. <i>pycnanthum</i>, <i>E.petiolatum</i> Barratte, <i>E.sabulicola</i> Pomel [65], <i>E.pitardii</i> [74], <i>E. lusitanicum</i>, <i>E.russicum</i> [75], <i>E. rubrum</i> [67], <i>E.amoenum</i> Fisch & C.A. Mey[68] Kök kültürü: <i>E.acanthocarpum</i> [73]	

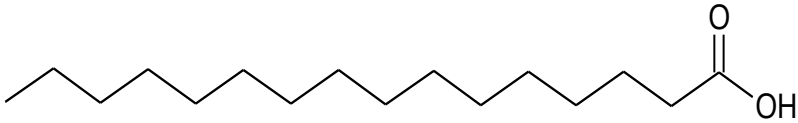
Çizelge 2.23. *Echium* türlerinde bulunan yağ asitleri-2

Bileşik	Skualen
Formül	
Bitki ve Kaynağı	
Tohum: <i>E.plantagineum</i>, <i>E.giganteum</i>, <i>E.aculeatum</i>, <i>E.triste</i>, <i>E.leucophaeum</i>, <i>E.wildpreti</i>, <i>E.simplex</i>, <i>E.virescence</i>, <i>E.fastuosum</i>, <i>E.svetenii</i>, <i>E.nervosum</i>, <i>E.candicans</i>, <i>E.acanthocarpum</i>, <i>E.onosmifolium</i>, <i>E.clithyrsum</i>, <i>E.hierrense</i>, <i>E.auberium</i>, <i>E.decasnei</i>, <i>E.strictum</i>, <i>E.webbii</i>, <i>E.bodspraguei</i>, <i>E.candicans</i>, <i>E.hierrense</i>, <i>E.onosmafolium</i>, <i>E.bethecourtianum</i>, <i>E.acanthocarpum</i>, <i>E.callithysum</i>, <i>E.brevirame</i>, <i>E.pininana</i>, <i>E.auberianum</i>, <i>E.decaisnei</i>, <i>E.asperimu</i>, <i>E.boissieri</i>, <i>E.creticum</i>, <i>E.flavum</i>, <i>E.sabulicola</i>, <i>E.vulgare</i> [56]	

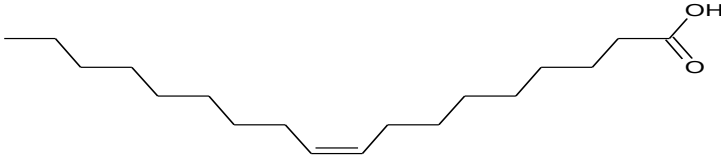
Çizelge 2.24. *Echium* türlerinde bulunan yağ asitleri-3

Bileşik	Stearidonic acid(18:4ω3)
Formül	
Bitki ve Kaynağı	
Saçlı kök kültürü: <i>E. Acanthocarpum</i> [49] Tohum: <i>E.vulgare</i>, <i>E.simplex</i> DC [57], <i>E.fastuosum</i> [59], <i>E.plantagineum</i> L. [62,63,65,66], <i>E. asperimum</i>, <i>E. boissieri</i>, <i>E. creticum</i>, <i>E.flavum</i>, <i>E. humile</i>, <i>E.sabulicola</i>, <i>E.vulgare</i> [69], <i>E.plantagineum</i> L., <i>E.italicum</i> L. [64,67,68], <i>E.virescens</i> [73], <i>E.arenarium</i> Guss. <i>E. flavum</i> Desf. <i>E. gaditanum</i> Boiss. <i>E. horridum</i> Batt. <i>E. humile</i> ssp. <i>pycnanthum</i>, <i>E. petiolatum</i> Barratte, <i>E. sabulicola</i> Pomel. [65], <i>E.pitardii</i> [74], <i>E. vulgare</i> L. [70], <i>E.lusitanicum</i>, <i>E.russicum</i> [75], <i>E.rubrum</i> [67], <i>E.amoenum</i> Fisch & C.A. Mey [68], <i>E.fastuosum</i> [72]	

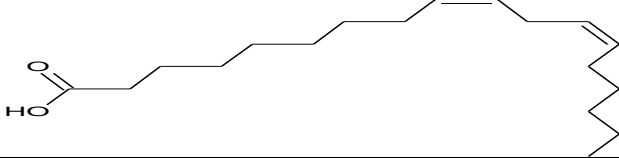
Çizelge 2.25. *Echium* türlerinde bulunan yağ asitleri– 4

Bileşik	Palmitik asit(16:0)
Formül	
Bitki ve Kaynağı	
Saçlı kök kültürü: <i>E.acanthocarpum</i>[49] Tohum: <i>E. pitardii</i> var. <i>pitardii</i>, <i>E. p.</i> var. <i>macrantha</i>, <i>E. bonnetii</i> var. <i>bonnetii</i>, <i>E. b.</i> var. <i>fuerteventurae</i>, <i>E. brevirame</i>, <i>E. x bond-spranguei</i>, <i>E. virescens</i> var. <i>angustissimum</i>, <i>E.webbii</i>, <i>E. bethencourtianum</i>, <i>E.handiense</i>, <i>E.gentianoides</i> Sect. <i>Simplicia</i>, <i>E. pininana</i>, <i>E. wildprettii</i> ssp. <i>trichosiphon</i>, <i>E.decaisnei</i>[58], <i>E. fastuosum</i> [59,72], <i>E. virescens</i>[73], <i>E. arenarium</i> Guss. <i>E.flavum</i> Desf. <i>E. gaditanum</i> Boiss. <i>E.horridum</i> Batt. <i>E. humile</i> ssp. <i>pycnanthum</i>, <i>E. petiolatum</i> Barratte, <i>E. sabulicola</i> Pomel. [65], <i>E. plantagineum</i> L. [62,65,66], <i>E. vulgare</i> L.[70], <i>E. lusitanicum</i>, <i>E.russicum</i>[75], <i>E. italicum</i> [67,68], <i>E. rubrum</i> [67], <i>E.amoenum</i> Fisch & C.A. Mey[68] Kök kültürü: <i>E. acanthocarpum</i>[73]	

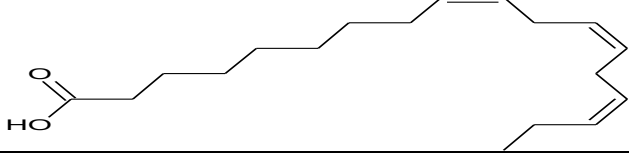
Çizelge 2.26. *Echium* türlerinde bulunan yağ asitleri–5

Bileşik	Oleik asit(18: 1 ω9)
Formül	
Bitki ve Kaynağı	
Saçlı kök kültürü: <i>E.acanthocarpum</i>[49,73] <i>E.vulgare</i>, <i>E.simplex</i> DC[57] Tohum: <i>E. pitardii</i> var. <i>pitardii</i>, <i>E. p.</i> var. <i>macrantha</i>, <i>E. bonnetii</i> var. <i>bonnetii</i>, <i>E. b.</i> var. <i>fuerteventurae</i>, <i>E.brevirame</i>, <i>E. x bond-spranguei</i>, <i>E. virescens</i> var. <i>Angustissimum</i>, <i>E.Webbii</i>, <i>E.bethencourtianum</i>, <i>E.handiense</i>, <i>E.gentianoides</i> sect. <i>simplicia</i>, <i>E. pininana</i>, <i>E. wildprettii</i> ssp. <i>Trichosiphon</i>, <i>E.Decaisnei</i> [58], <i>E.fastuosum</i> [59,72], <i>E.plantagineum</i> L. [62], <i>E.asperum</i>, <i>E.boissieri</i>, <i>E.creticum</i>, <i>E. flavum</i>, <i>E. humile</i>, <i>E.sabulicola</i>, <i>E.vulgare</i>[69], <i>E.plantagineum</i> L., <i>E.italicum</i> L. [64,67,68] ,<i>E.virescens</i>[73], <i>E.arenarium</i> Guss. <i>E.flavum</i> Desf. <i>E.gaditanum</i> Boiss. <i>E.horridum</i> Batt. <i>E.humile</i> ssp. <i>pycnanthum</i>, <i>E.petiolatum</i> Barratte [65], <i>E. plantagineum</i> L. [65,66], <i>E.sabulicola</i> Pomel. <i>E.vulgare</i> L. [70], <i>E.lusitanicum</i>, <i>E.russicum</i> [75], <i>E. rubrum</i> [67], <i>E. amoenum</i> Fisch & C.A. Mey[68]	

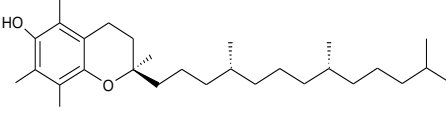
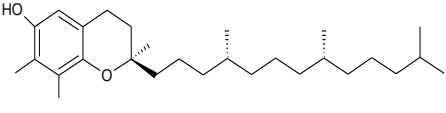
Çizelge 2.27. *Echium* türlerinde bulunan yağ asitleri –6

Bileşik	Linoleik asit (18:2 ω 6)
Formül	
Bitki ve Kaynağı	
Saçlı kök kültürü: <i>E.acanthocarpum</i>[49,73], <i>E.vulgare</i>, <i>E.simplex</i> DC[57] Tohum: <i>E. pitardii</i> var. <i>pitardii</i>, <i>E. p.</i> var. <i>macrantha</i>, <i>E. bonnetii</i> var. <i>bonnetii</i>, <i>E. b.</i> var. <i>Fuerteventurae</i>, <i>E.brevirame</i>, <i>E. x bond-spranguei</i>, <i>E. virescens</i> var. <i>angustissimum</i>, <i>E.webbii</i>, <i>E.bethencourtianum</i>, <i>E.handiense</i>, <i>E.gentianoides</i> Sect. <i>Simplicia</i>, <i>E. pininana</i>, <i>E. wildpretii</i> ssp. <i>Trichosiphon</i>, <i>E.decaisnei</i> [58], <i>E.fastuosum</i> [59,72], <i>E.plantagineum</i> L. [62,64], <i>E. asperrimum</i>, <i>E.boissieri</i>, <i>E. creticum</i>, <i>E. flavum</i>, <i>E. humile</i>, <i>E.sabulicola</i>, <i>E.vulgare</i> [69], <i>E. italicum</i> L. [64,67,68], <i>E.virescens</i> [73], <i>E. arenarium</i> Guss. <i>E.flavum</i> Desf. <i>E. gaditanum</i> Boiss. <i>E. horridum</i> Batt. <i>E.humile</i> ssp. <i>Pycnanthum</i>,. <i>petiolatum</i> Barratte [65], <i>E. plantagineum</i> L. [65,66], <i>E. sabulicola</i> Pomel. [65] <i>E. vulgare</i> L. [70], <i>E.lusitanicum</i>, <i>E.russicum</i> [75], <i>E. rubrum</i> [67], <i>E. amoenum</i> Fisch & C.A. Mey [68]	

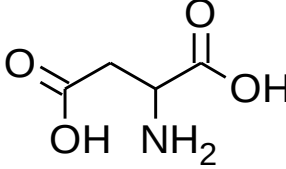
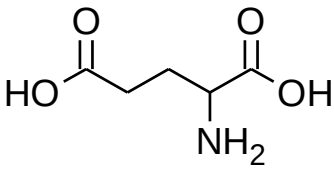
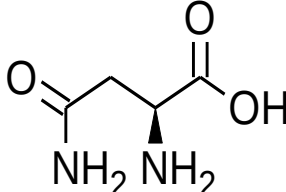
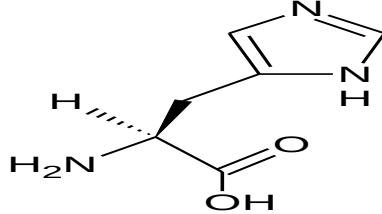
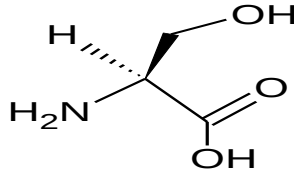
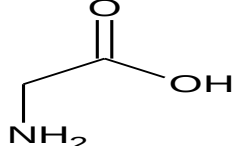
Çizelge 2.28. *Echium* türlerinde bulunan yağ asitleri –7

Bileşik	Alfa-Linolenik asit(18:3 ω 3)
Formül	
Bitki ve Kaynağı	
Saçlı kök kültürü: <i>E.acanthocarpum</i>[49] <i>E.vulgare</i>, <i>E.simplex</i> DC[57] Tohum: <i>E. pitardii</i> var. <i>pitardii</i>, <i>E. p.</i> var. <i>macrantha</i>, <i>E. bonnetii</i> var. <i>bonnetii</i>, <i>E. b.</i> var. <i>fuerteventurae</i>, <i>E. brevirame</i>, <i>E. x bond-spranguei</i>, <i>E. virescens</i> var. <i>angustissimum</i>, <i>E.webbii</i>, <i>E. bethencourtianum</i>, <i>E.handiense</i>, <i>E.gentianoides</i> Sect. <i>Simplicia</i>, <i>E. pininana</i>, <i>E. wildpretii</i> ssp. <i>Trichosiphon</i>, <i>E.decaisnei</i> [58], <i>E. fastuosum</i> [59,60,72], <i>E.plantagineum</i> L. [62,64], <i>E.fastuosum</i> [69], <i>E.italicum</i> L. [64,67,68], <i>E.virescens</i> [73], <i>E.arenarium</i> Guss. <i>E.flavum</i> Desf. <i>E.gaditanum</i> Boiss. <i>E.horridum</i> Batt. <i>E.humile</i> ssp. <i>pycnanthum</i>, <i>E.petiolatum</i> Barratte, <i>E.plantagineum</i> L. [65,66], <i>E. sabulicola</i> Pomel. [65] <i>E. vulgare</i> L.[70] <i>E.lusitanicum</i>, <i>E.russicum</i>[75], <i>E. rubrum</i> [67], <i>E. amoenum</i> Fisch & C.A. Mey [68] Kök kültürü: <i>E.acanthocarpum</i>[73]	

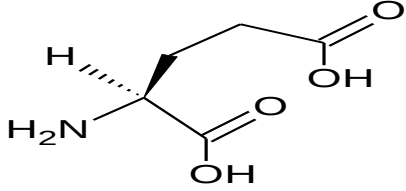
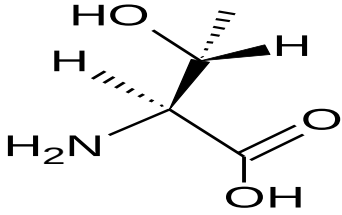
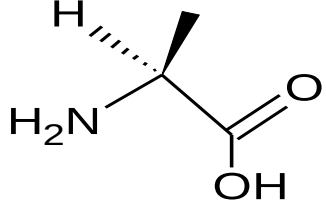
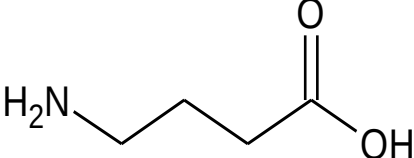
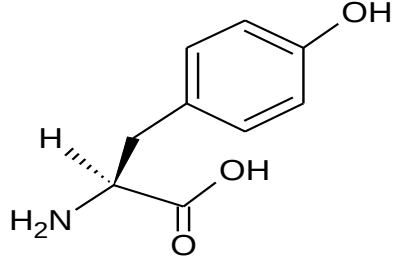
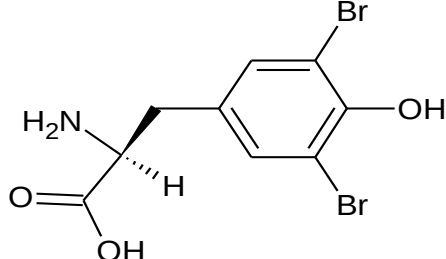
Çizelge 2.29. *Echium* türlerinde bulunan yağ asitleri –8

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Stearik asit (18:0)		Tohum: <i>E.vulgare</i>, <i>E.simplex</i> DC [57], <i>E.virescens</i> [73], <i>E.arenarium</i> Guss. <i>E.flavum</i> Desf. <i>E.gaditanum</i> Boiss. <i>E.horridum</i> Batt. <i>E.humile</i> ssp.<i>pycnanthum</i>, <i>E.petiolatum</i> Barratte, <i>E.plantagineum</i> L. [65], <i>E.sabulicola</i> Pomel [65], <i>E.vulgare</i> L. [70] <i>E.lusitanicum</i>, <i>E.russicum</i>[75] <i>E.italicum</i> [67,68], <i>E.rubrum</i> [67], <i>E.amoenum</i> Fisch & C.A.Mey [68], <i>E.fastuosum</i> [72] Kök kültürü: <i>E.acanthocarpum</i>[73]
Alfa-tokoferol		Tohum: <i>E.vulgare</i>, <i>E.simplex</i> DC [57]
Gamma-tokoferol		Tohum: <i>E.vulgare</i>, <i>E.simplex</i> DC [57]

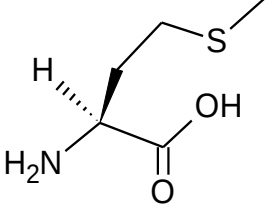
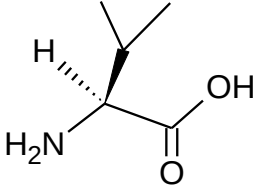
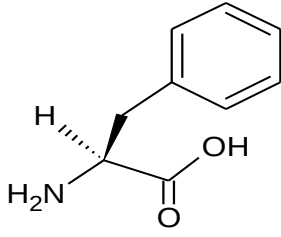
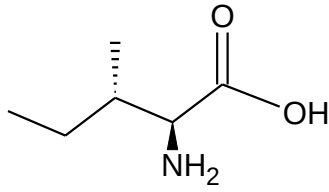
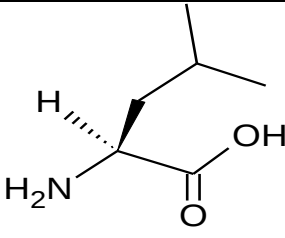
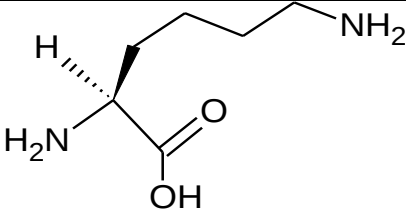
Amino asitlerÇizelge 2.30. *Echium* türlerinde bulunan amino asitler- 1

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Aspartik asit		Arı poleni: <i>E.plantagineum</i> [48] <i>Echium vulgare</i> [50] Saçlı kök kültürü: <i>E.acanthocarpum</i> [49]
Glutamik asit		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Asparagin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Histidin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Serin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Glisin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]

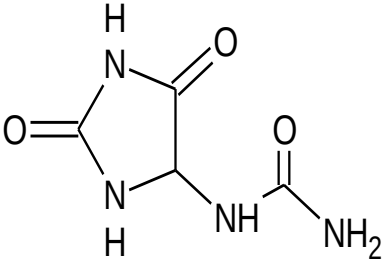
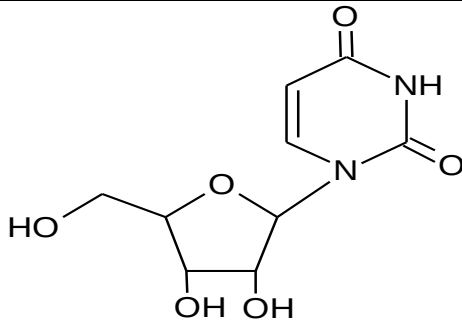
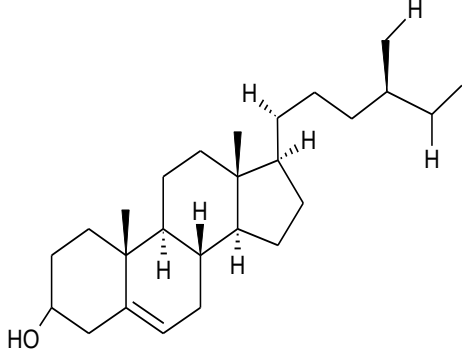
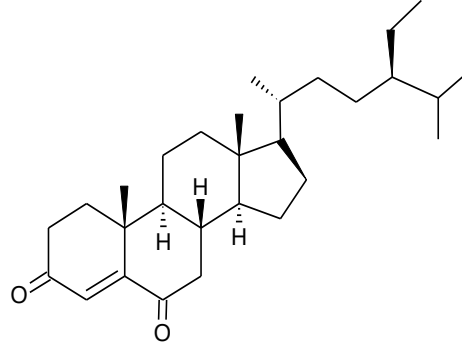
Çizelge 2.31. *Echium* türlerinde bulunan amino asitler- 2

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Glutamin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Trionin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Alanin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
γ-amino butrik asit		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Trozin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
3,5-dibromo tirozin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]

Çizelge 2.32. *Echium* türlerinde bulunan amino asitler- 3

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Metionin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Valin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Fenil alanin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
İzolösin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Lösin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]
Lizin		Arı poleni: <i>E. plantagineum</i> L. [48]

Diğer bileşiklerÇizelge 2.33. *Echium* türlerinde bulunan diğer bileşikler

Bileşik	Formül	Bitki ve Kaynağı
Allantoin		Toprak üstü kısım: <i>E. vulgare</i> L. [76]
Uridin		Çiçekli toprak üstü kısım: <i>E. vulgare</i> L. [50,76] Saçlı kök kültürü: <i>E. acanthocarpum</i> [49]
β -sitosterol		Kök: <i>E. vulgare</i> L. [77]
Stigmast-4-ene-3,6-dione		Kök: <i>E. vulgare</i> L. [77]

2.3. *Echium* Türleri ve Etnobotanik

Türkiye’de, *E. italicum*, *E. vulgare*, *E. angustifolium*, *E. parviflorum*, *E. plantagineum*, *E. orientale*, *E. russicum*, *E. glomeratum* ve *E. arenarium* olmak üzere 9 türü yetişmektedir. Yapılan etnobotanik çalışmalar sonucunda, *E. italicum* L. bitkisinin çayı idrar arttırıcı, terletici ve yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır[78]. Bubitkinin toprak üstü kısımlarının dekoksyonu yatıştırıcı ve terletici olarak kullanılmıştır[79]. Yaprakları ezilerek haricen çıbanların olgunlaşmasında, herbası ise ezilerek un ile lapa haline getirilerek romatizma ağrılarının giderilmesinde ve yara pıhtılarının dağılmasını sağlamak amacıyla haricen kullanılmıştır[80]. *E. italicum* L. bitkisinin kök kabukları tavada tereyağı ile kızdırılarak merhem haline getirilip haricen yara tedavisinde, kökü ise rendelenerek tereyağıyla tavada kızdırarak karıştırıp, tülbenkten süzülerek hazırlanan merhem yaraların iyileşmesinde haricen kullanılmıştır[81-82]. *E. italicum* L. bitkisinin tüm kısmı bal ve nektar üretiminde kullanılmıştır[6]. Ankara civarında halk arasında *E. italicum* L. bitkisinin köklerinden elde edilen dekoksyonu arı balmumu veya pamuk yağıyla karıştırılarak merhem hazırlanıp, kesik ve yaralara uygulanmıştır[7]. *E.italicum* L. bitkisinin gövdesi Ankara’nın Haymana bölgesinde halk tarafından Kangal adıyla tazeyken yenilmektedir[83]. Akdeniz çevrelerinde halk arasında *E. italicum* L. bitkisinin külü haricen yara iyileştirici olarak kullanılmıştır[8]. *E. italicum* L. bitkisi orta Ege bölgelerde toprak üstü kısımları yem olarak kullanılmaktadır[4].

E. plantagineum L. bitkisinin toprak üstü kısımları idrar söktürücü ve terletici, dekoksyonu ise çay olarak kullanılmıştır[84]. Çankırı ilinde *E. angustifolium* Miller bitkisinin kökleri tereyağıyla beraber merhem halinde yara tedavisinde kullanılmıştır[11].

Anadolu’doğu kesimlerinde *E. italicum* L. (Engerek otu) yaprak ve kökünden hazırlanan lapa, haricen yara tedavisinde ve anti-enflamatuvar olarak, *E.russicum* (Havaciva) ve *E.vulgare* (havaciva) kökü lapa haline getirilerek haricen uygulamak suratiyle yaraları iyileştirmek için kullanılmıştır[85].

E. russicum J F Gmellin ve *E. vulgare* kökleri batı Anadolu’da halk arasında rendelenmiş kökleri tavada tereyağıyla karıştırıp homojen kırmızımsı merhem elde

edilip, ellerdeki çatlaklara ve yaralara karşıtopikal olarak kullanılmıştır. İnsan ve evcil hayvanlara da kullanıldığı tespit edilmiştir[86].

İtalya'da halk arasında, *E. vulgare* L. bitkisininçiçek ve yaprakları idrar söktürücü olarak kullanılmıştır[9]. *E. italicum* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarının dekoksasyonu depüratif, idrar söktürücü, solunum yolu enfeksiyonlarında yumuşatıcı, nemlendirici, terletici olarak kullanılmıştır[87].

E. amoenum Fisch. C.A.Mey çiçeklerinin infüzyonu ve dekoksasyonu İran'daki Türkmen halkı arasında yatıştırıcı, sınır sistemi rahatlatıcı, grip gibi hastalıklarda kullanmışlardır[88]. *E. amoenum* Fisch. & C.A. İran'nın kuzeyinde halk arasında Gulgozan adıyla çiçeklerinin dekoksasyonu ve infüzyonu boğaz ağrısı, sinir sistemine, sindirici ve rahatlatıcı olarak kullanıldığı saptanmıştır[89].

Sırbistan'da *E. vulgare* L. toprak üstü kısımları ekspektoran ve laksatif olarak ve ishala karşı çay olarak kullanılmıştır[10]. *E. vulgare* L. doğu Sırbistan'da ekstre şeklinde kan temizleyici ve yara iyileştirici olarak kullanıldığı, çiçekli dalları ve yapraklarının ise öksürük kesici, afrodizyak, deri yumaşatıcı, göğüs hastalıkları için ve yara iyileştirici olarak kullanıldığı, tüm bitkinin ise yılan ısırıklarına karşı kullanıldığı tespit edilmiştir[90]. Bir derleme çalışmasında *E. arenarium* Guss yapraklarının Sudan'da tümör ve çıbanlara karşı kullanıldığı saptanmıştır[91].

2.4. *Echium* Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.4.1. Antioksidan etki

Ferreira ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *E. vulgare* poleninin de bulunduğu balın, fenolik asit bileşiklerince zengin olduğu ve belirgin bir antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir[92].

Diğer bir çalışmada, *E. amoenum* Fisch & C.A. Mey çiçek dekoksasyonunun insan üzerindeki antioksidan aktivitesi klinikte kandaki lipid peroksidasyon seviyesi, total antioksidan kapasitesi ve total tiyol molekülerine bakılarak değerlendirilmiş ve belirgin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu saptanmıştır[93].

Nićiforović, N ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *E. rubrum* ve *E. vulgare* toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin yüksek miktarda

flavonoit içerdği ve güçlü hidroksil radikal süpürücü ve demir iyonu şelasyon yapıcı özelliği gösterdiği saptanmıştır[94].

2.4.2. Anti-inflamatuar etki

Abed ve onun arkadaşları yaptığı bir çalışmada, *E. amoenum* petallerinden hazırlanan sulu alkol ekstresinin, sıçanlarda *seruleyin* ile oluşturulan deneysel pankreatit modelinde, antienflamatuar ve antioksidan etkilerinden dolayı pankreatit hastalığını hafiflettiği saptanmıştır[95].

2.4.3. Antiproliferatif etki

Uysal, Handan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *E. amoenum* Fisch. & C.A. Mey metanol ve kloroform ekstrelerinin etilmetansülfonat'a karşı antitumör aktivitesi incelenmiş ve her iki ekstrenin antitumör aktiviteye sahip oldukları, kloroform ekstresinin metanol ekstresine göre daha aktif olduğu tespit edilmiştir[96].

Yapılan diğer bir çalışmada, İtalya'daki 16 yenilebilir bitki *in vitro* antiproliferatif etki yönünden SRB metodu kullanarak taranmış ve *E. vulgare* %19.42 bioluminesans inhibisyon gösterdiği saptanmış ve bu insan sağlığına olan toksik etkisiyle ilişkilendirilmiştir[97].

Schismus barbatus, *E. sericeum*, *Arnebia hispidissima* bitki ekstrelerinin doymamış prolizidin alkaloidleri içerdği ve *in vitro* Ehrlich ascites carcinoma hücre hattına sitotoksik etki gösterdiği, diğer bitki ekstrelerinin ise doymuş alkaloidler içerdiklerinden karsinoma hücrelere olan *in vitro* sitotoksikitesinin daha az olduğu tespit edilmiştir[98].

2.4.4. Antidepresan etki

Bir çalışmada *E. vulgare* toprak üstü kısımlarından hazırlanan sulu ve alkol ekstrelerinin farede anksiyete etkisi incelendiğinde, sulu ekstresinin daha düşük dozda etkili olduğu, alkol ekstresinin ise daha yüksek dozda antidepresan etki gösterdiği bulunmuştur[99].

Sayyah Mehdi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *E. amoenum* çiçeğinin sulu ekstresinin antidepresyon çift kör randomize klinik çalışmasında, plasebo'ya göre belirgin seviyede hafiften orta dereceye kadar olan depresyonun semptomlarını hafiflettiği, yan etkilerinin ise plasebo ile fark olmadığı tespit etmiştir[100].

Aynı tür üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise, sulu ekstresi klinik olarak 44 hastada obsesif konvulsif bozukluk üzerindeki etkisi araştırılmış, plasebo ve *E. amoenum* sulu ekstresi (500 mg/gün) rastgele bölünen gruplara 1, 2, 4 ve 6 hafta boyunca verilmiş ve süre sonunda, hastalar Y-BOCS ve HAM-A'ya göre değerlendirildiğinde, ekstre uygulanan gruplarda, plasebo alan gruplara göre obsesif konvulsif bozukluk semptomlarının belirgin derecede azaldığı gözlenmiştir[101].

2.4.5. Anksiyete karşı ve sedatif etki

E. amoenum çiçeğinin sulu ekstresi sıçanlarda plus-maze anksiyete modeli üzerinde denenmiş ve belirgin derecede antianksiyete aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir[102].

Geleneksel İran tıbbında *E. amoenum* bitkisinin anksiyeteye ve timoleptik tedavide kullanıldıkları ve randomize klinik çalışmada anksiyete ve depresyona karşı plasebo'ya göre etkili olduğu değerlendirilmiştir[103].

Hosseinzadeh ve Shahandeh tarafından yapılan bir çalışmada, *E. italicum* bitkisinden hazırlanan alkol ve sulu ekstrenin anksiyeteye karşı ve sedatif etkisi fareler üzerinde incelenmiş ve her iki ekstrenin etkili olduğu tespit edilmiştir[104].

Diğer bir çalışmada, *E. amoenum* sulu ekstresinin klinik çalışmayla belirgin bir obsesif konvulsif bozukluğa karşı belirgin etkiye sahip olduğu saptanmıştır[101].

E. amoenum bitkisinin sulu alkol ve sulu infüzyon ekstrelerinin fareler üzerinde in vivo olarak, rotarod motor koordinasyon modeli ve yükseltilmiş çoklu labirent anksiyete modeli kullanarak incelendiğinde, sulu ekstresinin belirgin bir anksiyeteye karşı etki gösterdiği tespit edilmiştir[105].

M. R. Heydari ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *E. amoenum* metanol ekstresinin farelerde Pikrotoksin ile indüklenen felç'e karşı etkili olduğunu tespit etmiştir[106].

S. Gholamzadeh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *E. amoenum* petallerinden elde edilen sulu ekstresinin anksiyete aktivitesi, sıçanlarda yükseltilmiş çoklu labirent anksiyete modeli kullanılarak incelenmiş ve belirgin aktivite gösterdiği, referans grup olan Diazepam'a göre aktivitenin düşük olduğu saptanmıştır[107].

Yapılan diğer bir çalışmada ise *E. amoenum* çiçek alkol ekstresinin yükseltilmiş çoklu labirent anksiyete modeli kullanarak farelerde 50 mg/kg dozda denendiğinde pozitif sonuç alınmış ve anksiyete etkisinin yanı sıra Diazepam'a göre daha düşük sedatif etki gösterdiği saptanmıştır[108].

Diğer bir çalışmada, Bulgaristan'da yetişen 21 bitkinin etanol ekstresinin fare ve sıçanlar üzerinde antikonvülsan etkisi taranmıştır ve hiçbir bitkinin Korazol ve striknin konvülsiyonuna etkisi yokken, *E. vulgare* gibi bazı bitkiler elektrik stimülasyonlu konvülsiyona karşı etki gösterdiği saptanmıştır[109].

2.4.6. Antiviral etki

Farahani'nin yaptığı çalışmada *E. amoenum* L. çiçekli kısmının sulu ekstresinin HepII hücre hattında CPE metodu kullanarak sitotoksitesine bakılmış ve sitotoksiste göstermediği, sitopatik aktivite inhibisyon metoduyla yapılan antiviral incelemede ise virus ekiminden sonraki bir saat süresince antiviral etki gösterdiği saptanmıştır[110].

2.4.7. Antibakteriyel etki

E. amoenum çiçeğinden hazırlanan sulu ekstrelerin in vitro antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiş ve konsantrasyona bağlı olarak *Staphylococcus aureus* 8327 suşlarına karşı antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır[111].

F.karakaş ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *E. vulgare*'nin metanol ekstresi hiçbir etki göstermezken, sulu ekstresinin bazı bakterilere karşı etkili olduğu tespit edilmiştir[112].

Diğer bir çalışmada ise, *E. italicum* yaprak, dal ve çiçeğinin etanol ekstresi deri ve yumuşak doku enflamasyonunun yaygın nedeni olan *Staphylococcus aureus*'a karşı denenmiş ve hiçbir etki gözlenmemiştir[113].

Echium lycopsis, *E. spinescens*, and *E. vulgare* ekstrelernin *Staphylococcus aureus* and enteric bacilli, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* bakterilerine karşı belirgin antibiyotik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmiştir[114].

E. lycopsis kallus kültüründen izole edilen Ekinon ve Ekinofuran bileşenlerinin gram pozitif bakterilerine karşı etkili olduğu ve bu etkinin biyogenetik olarak ilişkili olan şikonin ve alkanin'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir[115].

Rusya'da yapılan bir çalışmada, *E. rubrum* kökünden izole edilen şikonin ve diğer bitkiden izole edilen naftokinon bileşiklerinin 3 maya türü üzerinde orta derecede etkili oldukları ve 3 çeşit laktik asit ve 4 çeşit asetik asit bakterilerine karşı test edildiğinde, sülfürik dioksit' ten daha üstün antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir[116].

2.4.8. Analjezik etki

Echium amoenum Fisch & C.A. Mey. Petallerinden hazırlanan metanol ekstresi erkek albino fareler üzerinde formalin ve hot-plate testi kullanarak analjezik aktivitesi araştırılmış ve sabit analjezik potansiyeline sahip olduğunu tespit etmiştir[117].

2.4.9. Diğer etkileri

Bell ve Strachan'nın yaptığı bir çalışma, *Echium* yağı ve balık yağı ile beslenen *Gadus morhua* L. lar birbiri ile karşılaştırılmış ve *Echium* yağı ile beslenen grupta belirli derecede araşidonik asit üretiminin azaldığı ve böylece immünolojik parametrelerin yükseldiği, *Echium* yağının balık yağına alternatif olarak kullanabileceklerini göstermiştir[118].

Diğer bir çalışmada ise, *Echium* yağıyla beslenen *Sparus aurata* L. larda lipit metabolizmasının belirli derecede etkilendiği, GLA gibi doymamış yağ asitlerinin miktarında belirli artış olduğu saptanmıştır[119].

Miller Matthew R ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *E. plantagineum*'dan elde edilen Sterişidonik asit, balık yağıyla karşılaştırıldığında, Atlantik salmon balığının kas dokusundaki omega-3 uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin biyosentezi ve yıkımı arasında denge sağladığı saptanmıştır[120].

Diğer bir çalışmada, *E. vulgare* etanol ekstresinin *in vivo* olarak elektroşok ile indüklenen kasılma nöbetlerine karşı antikonvulsif etkili olduğu saptanmıştır[121].

Yang, Qing ve Shea, T Michael 'in yaptığı *in vivo* çalışmada, *Echium* yağı ve balık yağı ile beslenen sıçanlarda lipit profiline bakıldığında, *Echium plantagineum*'dan elde edilen *Echium* yağ ile beslenen gruptaki sıçanların dokularındaki n-3 ve n-6 uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin arttığını ve karaciğer, beyin, ileum vekanserumlarındaki araşidonik asit seviyesinin yüksek olduğunu saptamıştır[122].

Zhang, Ping ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *in vivo* olarak *Echium* yağı (araşidonik asit ile zenginleştirilmiş) besin takviyesi uygulanan farelerde normal besin yağı verilmiş farelere göre, plazma trigliserit miktarında düşüş gözlenmiş ve *Echium* yağının, balık yağına göre botanik kaynaklı bir alternatif olabileceği ileri sürülmüştür[123].

2.5. Toksisitesi

E. amoenum'un kurutulmuş çiçeklerinden hazırlanan sulu ekstresinin sıçanlar üzerindeki hepatotoksisitesine bakılmış ve iki hafta boyunca sulu ekstrelerle beslenen sıçanlarda karaciğer dokusunun anilin aminotransferaz(ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalın fosfataz (ALP) parametrelerinde hiçbir toksisiteye rastlanmamıştır[124].

Diğer bir çalışmada ise, *E. amoenum*'un kurutulmuş viyole-mavi petallerinden hazırlanan dekoksiyonunun 29 gün boyunca uygulanan sıçanlarda karaciğer fonksiyon testleri ve histopatolojik incelemelerinde, hiçbir hepatotoksik belirtiler gözlemlenmemiştir[125].

E. plantagineum içeren pellet yemler yetişkin ve sütten kesilmiş sıçanlara %20-40 oranında sürekli veya kesilerek 14-280 gün verildiğinde, düşük miktarda, tipik pirolizidin alkaloitlerinden zehirlenme nedenli akut nekroz ve kronik karaciğer

bozukluğundan dolayı yüksek mortalite gösterdiği, yüksek miktarda ise *Echium* ile beslenen sıçanlarda daha kısa sürede, daha ağır zehirlenme tablosu meydana geldiği saptanmıştır[126].

Koyun, tavşan, keçi gibi küçükbaş hayvanlar piroller gibi reaktif metabolitlerin düşük hepatik üretimine ve yüksek detoksifiye enzimlerinin aktivitesine sahip olmaları nedeniyle pirolizidin alkaloitlerinin toksisitesine karşı oldukça dayanıklıdır. *Echium* ve *Helitropium* bitkilerinde yaygın bulunan pirolizidin alkaloitlerinin diesterleri lümende 1-metil metabolitine dönüştüğünü, *Senecio* türlerinde bulunan makro siklik pirolizidin alkaloitlerinin metabolizma sonucu detoksifiye edilemeyeceğini, yüksek miktarda pirolizidin alkaloitlerine maruz kalma sonucu, karaciğerde bakır'ın yükseltgenip Çinko'nun indirgeneceği ve Demir metabolizmasının bozulacağı ileri sürülmüştür[127].

Diğer bir derleme çalışmasında, *E. plantagineum*'un insan ve hayvanlarda çeşitli zehirlenmelere neden olduğu belirtilmiştir[128].

10 gruba ayrılmış koyunlara 12 hafta, 4 dönem boyunca %20-80 oranında *E. plantagineum* içeren kontrollü besinler verildiğinde, yüksek oranda *Echium* içeren besinle beslenenlerde orta derecede karaciğer harabiyeti olduğu, *Echium*'un içerdiği pirolizidin alkaloitlerinin koyun lümeninde büyük bir kısmının bozunduğu, karaciğerdeki mikrozomal enzimler tarafından pirolizidin metabolitlere dönüştüğü tespit edilmiştir[129].

Güney Avustralya'da yapılan bir çalışmada, *E. plantagineum* ile beslenen Merinos cinsi koyunlarda Kronik Bakır zehirlenmesi nedeni hemolitik kriz nedeniyle ölümcül sarılık salgını olduğu, karaciğerlerinin yüksek bakır içerdiğini ve bunun hepatotoksik pirolizidin alkaloitlerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür[130].

HPLC-ESI-MS kullanarak *E. vulgare*, *E. plantagineum* gibi pirolizidin alkaloitleri taşıyan bitkilerin çiçeklerinden toplanan taze polenlerinden, bazı doymuş ve 1,2-dehidropirolizidin alkaloitlerin çoğunun N-oksit türevi halinde bulunduğu saptanmıştır ve insanların tüketiminesunulan arı polenlerinin üretiminde, içeriğindeki hepatotoksik pirolizidin alkaloitlerinin miktarının azaltılması gerektiği ileri sürülmüştür[131].

Diğer bir çalışmada, Melez koyunlar taze *E. plantagineum* ile beslendirilmiş ve kontrol gurubuna normal saman ve yem ile beslendirilmiş. Çalışma sonunda *Echium* diyeti uygulanan gruplarda kilo kaybı ve karaciğer toksisitesi nedeni ölümle meydana geldiği, bunun histolojik kanıtı olarak da karaciğerde pirolizidin alkaloitine bağlı aşırı derecede bakır birikimi, Bakır/mobidyum oranının yüksekliğinden kaynaklanan karaciğer toksisitesi oluştuğu ileri sürülmüştür[132].

Avustralya'da yapılan diğer bir çalışmada, Koyunlar 19 ay boyunca *E. plantagineum* yetişen arazilerde otlandırılmış ve normal beslenen koyunlarla karşılaştırılmış. Sonuç olarak yüksek miktarda bu bitki ile beslenen koyunlarda belirgin bir şekilde kilo kaybı, yününün az olması gibi belirtiler ve bakır kaynaklı karaciğer harabiyeti oluştuğu ortaya konulmuştur[133].

Avustralya'daki güney galler tarım bölge veteriner laboratuvarının verdiği rapora göre, *E. plantagineum* and *Heliotropium europaeum* bitkileriyle otlanan hayvanlarda yüksek oranda ölüm ortaya çıktığı, *Echium* bitkisi ile otlananlarda hepatojenik kronik bakır zehirlenmesi teşhisi konulduğu ve bu tablonun primer pirolizidin alkaloit zehirlenmesinden daha ağır olduğu, yetişkin melez koyunların en kolay etkilenen ırk olduğu belirtilmiştir[134].

E. plantagineum'un çiçekleri, poleni, bitki kalıntıları, tüyleri ve kurutulmuş bitki kısımları duyarlı insanlarda alerjik nezle ve değişik semptomlara yol açabileceği ortaya konulmuştur[135].

E. plantagineum'un alerjenitesinin araştırıldığı çalışmada, Avustralya'nın kırsal alanında 60 denek üzerinde gerçekleştirilmiş ve test sonuçlarına göre solunum yolu alerjileri deneklerin %60'ın üzerinde pozitif çıkmış ve *E. plantagineum* polenlerinin diğer otların tozlaşma zamanından yaklaşık bir ay öncesi atmosferde zirveye ulaştığı ve IgE yanıtını uyardığı saptanmıştır[136].

2.6. Yara

Yara, herhangi bir ajanın fiziksel bir hasar yaratmasıyla vücuttaki normal canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanmaktadır[137]. Yara iyileşmesi travma ile başlatılan sistematik, hücresel ve biyokimyasal olayların yeni doku oluşumu ile sonuçlanmasıdır. Yara iyileşmesi, inflamatuvar hücrelerin, kan faktörlerinin ve diğer doku hücrelerinin etkileşimleriyle gelişen kompleks bir olgudur.

Yara iyileşmesinin temel prensibi doku hasarını en aza indirmek, yeterli doku perfüzyon ve oksijenlenmesini, bunun yanı sıra dokunun düzgün beslenmesini ve nemlenmesini sağlamaktır. Yara kısmi ve tam kalınlıkta yaralar olarak sınıflandırıldığı gibi akut ve kronik yara, açık ve kapalı yara olarak da ayrılmaktadır. Yara açık ise deri altı dokular da açıkta kalır ve atmosferle temas halindedir. Bu durumdan doku ve hücreler olumsuz etkilenirler. Kısa sürede deri ile kapatılmazsa enfeksiyon, doku kuruluğu, eritrosit, lökosit, protein, immun madde v.s. kaybı gibi bazı olumsuz faktörler yara iyileşmesini etkiler[138]. En çok bulunan yara semptomları yara bölgesinde fiziksel hasarlar, kanama, duyu ve fonksiyon kaybı, yara çevresinde kızarıklık, acı, zonklama hissi, bölgedeki dokularda büzüşme ve akıntıdır[139]. Yara çeşitli nedenlerle meydana gelebilir. Bunlar, fiziksel ve kimyasal yanma, basınç, hayvan ısırığı yada sokması, diyabet hastalığı gibi metabolik bozukluklar, travma, ilaç etkileşimleri, ya da beslenme yetersizlikleri gibi sebepler olabilir[140].

2.6.1. Yara iyileşmesi tipleri

- 1) Primer İyileşme
- 2) Sekonder İyileşme
- 3) Tersiyer İyileşme

Primer İyileşme: Belirgin bakteriyel kontaminasyon ve doku kaybının olmadığı durumlarda yara kenarlarının direk yaklaştırılarak kapanması sonucu meydana gelen iyileşmedir. Yara kapaması suturasyon, stapler, strip tape gibi materyaller ile yapılır. Bu iyileşme tipinin geç primer kapanan formuda vardır. Burada hasara uğramış dokuyabancı cisim, bakteriyel kontaminasyona bağlı enfeksiyondan

korunmak için bir süre kapatılır. Yara, bu dönemde steril şartlarda günde 2 kez nemli izotonik pansumanla kapatılmalıdır. Peroksit ve iyot bileşikleri kullanılmaktan kaçınılmalıdır. Çünkü canlı dokuda en az bakteri kadar hasar yaparlar. Açık bırakılan yarada anjiogenez ile doku kanlanması ve oksijenizasyonu artar. Olay yerine gelen lökositler, bakterileri kendilerine çekerler ve tahrip ederek uzaklaştırırlar. Daha sonra yara dudakları yaklaştırılarak kapatılır[141].

Sekonder İyileşme: Yara alanında granülasyon dokusunun gelişmesi, yara alanını doldurması beklenerek, spontan rejenerasyon ve reepitelizasyonun gelişmesi ile meydana gelen iyileşmedir.

Sekonder iyileşme ile primer iyileşme arasındaki farklar:

- Sekonder iyileşmede çok fazla debris ve fibrin doku vardır. Sonuçta iltihabi reaksiyon daha yoğundur. Bunların ortadan kaldırılması daha uzun sürer, dolayısıyla enflamatuvar evre süresi uzamıştır.
- Sekonder iyileşmede daha fazla granülasyon dokusu meydana gelir.
- Sekonder iyileşmede daha fazla kontraksiyon olur ve belkide bu primeri sekonder iyileşmeden açıkça farklandıran en iyi niteliklidir. Bu duruma özellikle eklem üzerindeki defektlerde dikkat edilmelidir.

Tersiyer iyileşme (Gecikmiş primer iyileşme): Sekonder iyileşmeye bırakılan yaranın şartla uygun hale geldiğinde suture edilerek kapatılması. Bu tip iyileşme sonunda primer kapamada ulaşılan gerilme kuvvetine eşit değerler elde edilir.

2.6.2. Bazı farmakolojik etkilerin yara iyileşmesindeki önemi

Anti-enflamatuvar etki

Akut enflamatuvar yanıt, yaranın erken aşamalarında, doku büyümesi ve tamiri için gerekli olan faktörleri üretir[142]. Fakat uzun süreli, kronik enflamasyon matriks sentezi ve yara kapanmasını engelleyerek, yara kapanmasını geciktirmekte ve yara ağrısının artmasına neden olmaktadır[143]. Bu nedenle, anti-enflamatuvar etkiden faydalanarak yara iyileşmesini kolaylaştırmak ve hasta konforunu geliştirmek mümkündür. Ayrıca geleneksel kitaplarda ve

hayvan deney çalışmalarında, anti-enflamatuar etkisi bulunan ekstrelerin aynı zamanda yara iyileştirici etkinliğe sahip olduğuna işaret etmektedir[144].

Antioksidan aktivite

Yara yatağı etrafında serbest radikallerin üretimi, lipit, protein, kolajen, proteoglikan ve hyaluronik asidin yıkımı yoluyla, yara iyileşmesinde gecikmeye katkıda bulunabilir. Kayda değer bir antioksidan aktivite gösteren maddeler, bu yüzden, canlı bir dokuyu koruyabilir ve yara iyileşmesini kolaylaştırabilir[145].

Antimikrobiyal aktivite

Çok sayıda mikroorganizmalar mevcut olduğunda, yara iyileşmesi gecikebilir[146]. Bu nedenle, yaranın bakteri yükünü azaltmak, yara iyileşmesinin kolaylaştırılması için hem de lokal iltihaplanma ve doku tahribini azaltmak için gereklidir. Ayrıca yaralı bölgenin enfeksiyonu önleyen ideal bir ajan doğrudan patojenleri yok eder ve bağışıklık sistemini uyarır[147].

Analjezik aktivite

Açık yaralar ağrı ve daha sonrasında sakatlık oluşturabilir, bu nedenle analjezik aktiviteye sahip ajanlar kullanarak ağrıyı azaltmak ve hasta konforunu sağlamak mümkündür[148].

Yara iyileşmesinde spesifik moleküller ve hücre biyolojisi ile yakın ilişkileri nedeniyle üç faktör üzerinde durulabilir: doku makrofajları, kolajen tip III ve fibronektin. Bu üç faktör, yara iyileşmesinde granülasyon fazının başlamasında ve gelişiminde önemli rol oynarlar.

Makrofajlar: Makrofajlar, dolaşan monositlerin farklılaşmasıyla gelişirler. Granülasyon dokusu oluşumunun başlamasında ve gelişiminde kritik bir rol oynarlar. Leibovich ve Ross, deneysel yaralarda monositopeni oluşturulduğunda, granülasyon dokusu oluşumu, fibroplazi ve kolajen depolanımının azaldığını ve iyileşmenin geciktiğini göstermişlerdir[149-150]. Makrofajlar, ayrıca bakterilerin yok edilmesi ve yabancı cisim debridmanı yanında, vazoaktif medyatörler, proteaz gibi enzimler, kemotaktik ve büyüme faktörleri gibi biyolojik aktif maddeleri de üretirler[149]. Büyüme faktörleri yeni

kan damarlarının proliferasyonu, epidermal hücrelerin ve fibroblastların uyarılmaları yoluyla iyileşmeye katkıda bulunurlar[151].

Fibronektin: Yara iyileşmesi bir biriyle kompleks oluşturmuş beş fazda ele alınabilir; koagülasyon, inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu ve matriks formasyonu-yeniden yapılanma. Fibronektin bu fazların hepsinde fonksiyon görmektedir[152]. Fibronektin granülasyon dokusunun temel taşlarından[153]. Yapısı ve bağlanma özellikleri nedeniyle fibronektin, geçici yapılanmayı sağlayabilir, böylece fibroblastların, kolajenin, endotelial hücrelerin ve keratinositlerin göçüne yardımcı olur.

Kolajen: Normal derideki olgun bir skarda kolajen yapısı Tip I ve Tip III'den oluşmakta, bunlar arasında da Tip I ağır basmaktadır. Erken granülasyon dokusunda ise bunun aksine Tip III kolajen ön plandadır. Bu erken Tip III kolajen fibrilleri fibronektin temel yapılanımını desteklerler. Fibriler kolajen demetlerinin agregasyonu ve moleküller arası çaprazbağlanmaları, iyileşmekte olan dokunun giderek sertleşmesine ve gerilme direnci kazanmasına önayak olur[154].

Yaralanma sonrası ortaya çıkan doku defekti fibrin, eritrosit ve lökosit içeren kan pıhtısı ile dolar. İyileşme erken dönemde inflamasyon ile başlar. Makrofajlar mikroorganizmaları, ölü parankim hücreleri ve nötrofillerin nekrotik debrislerini ortadan kaldırır. Genellikle 3-5. güne kadar, bazen ise 24 saat gibi çok kısa bir süre sonra fibroblastlar ve vasküler endotel hücreleri proliferasyon olarak yara iyileşmesinin temel özelliği olan özel bir tip dokuyu, "granülasyon dokusu" nu meydana getirirler. Granülasyon deyimi, yara yüzeyindeki dokunun pembe granüler görünümünden gelmektedir. Her bir granül yeni bir kapillar vasküler yumağı temsil eder. Eski damarlardan tomurcuklanma yoluyla yeni damarlar oluşur. İnterendotelial bağlantıların gevşek olması nedeniyle bu damarlar geçirgendirler, protein ve kırmızı kürelerin ekstraselüler aralığa çıkmasına izin verirler. İyileşen yaralarda akut inflamasyon son bulduğu halde görülen ödemin sebebi bu geçirgenliktir.

Granülasyon dokusundaki proliferasyon fibroblastlar artmış miktarda granüler endoplazmik retikulum içerir ve histolojik kesitlerde iri ve tombul yapıda

izlenirler. Fibroblastların görevi proteoglikan ve kolajen sentezlemektir. Bazısı ise çentikli nükleus yapısı, periferde yoğunlaşan sitoplazmik fibril demetleri ve kontraktil proteinler gibi düz kas hücre özellikleri kazanırlar ve myofibroblast olarak isimlendirilirler.

Granülasyon dokusunda hemen her zaman bulunan makrofajlara ek olarak uygun kemotaktik stimulus varlığında nötrofiller, eozinofiller, mast hücreleri ve lenfositler de görülür. İyileşme ilerledikçe kolajende artım, fibroblast ve damar sayısında azalma gerçekleşir. Damarların büyük kısmında trombozis ve dejenerasyongelişir. Sonuçta, granülasyon dokusu inaktif görünümde iğsi şekilli fibroblastlar, yoğun kolajen demetleri, elastik doku fragmanları, ekstrasellüler matriks ve az sayıda damardan oluşan skar dokusuna dönüşür.

Yaralanmayı hemen takiben trombositler, hasarlanan dokuya yapışıp pıhtılaşma faktörleri ve granülleri içindeki büyüme faktörlerini salgırlar. Ortaya çıkan vazodilatasyonu vazokonstriksiyon takip eder. Fibrin olgunlaştıkça yaralanan bölge kurumuş pıhtı ile hem daha fazla sıvı ve elektrolit kaybını, hem de çevreden gelebilecek kontaminasyonu önler. Trombositlerce salgılanan büyüme faktörleri iyileşme olayını başlatır[140]. Kısa bir süre içinde lökositler çevredeki kan damarlarının endoteline yapışmaya (marjinasyon) ve damar duvarı içinden geçmeye (diapedez) başlarlar. Lökositleri yara bölgesine çeken; hasarlanan doku, bakteri ve inflamatuvar ürünlerin oluşturdıkları kemotaktik sinyallerdir.

Lökositlerin ana görevi; yaralanan bölgeden bakteri ve yabancı cisimleri uzaklaştırıp enfeksiyon gelişimini engellemektir. Bu sürede epitelyal hücreler pıhtının altına doğru hareket eder ve çoğalarak epitel yüzeyini yeniden oluşturmaya başlarlar. Doku iyileşmesinin bir sonraki aşaması, makrofajlar ile karakterizedir. Makrofajlar sadece debris, bakteri ve konağın dejenere hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılmasından sorumlu değil ayrıca zengin bir büyüme faktörü kaynağıdır. Makrofajlar yara iyileşmesi olayında hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve matriks komponentlerinin düzenli bir şekilde davranmalarını sağlayan orkestra yönetmenleridir.

Çizelge 2.34. Yara iyileşmesinde görev alan hücreler

Yara iyileşmesinde evreler	Yaralanmadan sonrakigünler	Görev alan hücreler ^[140]
Homeostaz	Hemen	Trombositler
İnflamasyon	1-4. gün	Nötrofiller-makrofajlar
Proliferasyon, Granülasyon, Kasılma	4-21. gün	Makrofaj, lenfosit, fibroblastlar, nörositler, keratinositler
Remodelizasyon	21. gün -2 yıl	Fibrositler

2.7. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yara iyileşmesini etkileyen faktörler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

2.7.1. Büyüme faktörleri

Büyüme Faktörleri aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir^[155].

Çizelge 2.35.Yara iyileşmesinde görev yapan büyüme faktörleri

Büyüme faktörü	Kaynağı	Görevleri
Trombositlerce salınan Büyüme Faktörü (PDGF)	Trombositler, makrofajlar, endotel hücre, fibroblastlar	Fibroblast proliferasyonu,
Transforme edici Büyüme Faktörü beta (TGF- α)	Trombosit, nötrofil, lenfosit, makrofajlar	Fibroblast proliferasyonu,
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Trombositler, tükürük, idrar, anne sütü, plazma	Epitel hücre ve fibroblast
İnterlökinler (IL- 1, IL-2)	Makrofajlar, lenfosit, birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu,
Tümör Nekroz Faktör alfa (TNF-a)	Makrofaj, mast hücresi, T lenfositler	Fibroblast proliferasyonu
Transforme edici Büyüme Faktörü beta (TGF- β)	Aktif makrofajlar, trombosit, keratinosit	Epitel hücre ve fibroblast

2.7.2. Beslenme faktörleri

Yara iyileşmesi için vücudun bazı besin maddelerine ihtiyacı vardır. Protein, karbohidratlar, lipitlerin yanı sıra çinko özellikle A, E, C, D ve K vitaminlerine gerek duyulmaktadır. Örneğin çinko, yara geriliminin sağlanmasında ve kolajen sentezi sırasında lizin oksidaz aktivitesinde görev alırken, K vitamini kanın pıhtılaşmasında işlev yapmaktadır[156].

2.7.3. Yaranın lokalizasyonu ve kanlanması

Doku geriliminin az olduğu yaralar çabuk iyileşmektedir. İskemik doku ise geç iyileşme göstermektedir. Kolajen sentezinde görev yapan lizin ve prolinin hidroksilasyonu için oksijen gereklidir. Bilindiği gibi reaktif oksijen türleri hücre ve dokular üzerindeki etkilerinden dolayı yaralara da zarar verirler. Reaktif oksijen türlerini deaktif hale getiren ve uzaklaştıran serbest radikal süpürücü enzimler yara iyileşmesi sürecinin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Akut cevabın bir parçası olan inflamasyonda nötrofiller yara bölgesine akın etmektedir. Ancak bu hücrelerde solunum patlaması olayı gerçekleştiğinde serbest radikaller açığa çıkmaktadır. Yara oluşumuna bağlı fagositik olmayan hücreler de NADPH+ oksidaz mekanizması ile serbest radikalleri meydana getirirler. Böylece yara bölgesi hem oksijen hem de nitrojen içeren reaktif türler ve onların türevleri ile zengin hale gelmiş olur. Bu radikallerin varlığı oksidatif strese ve dolayısıyla peroksidasyonuna DNA'da kırılmalara, serbest radikal süpüren enzimlerde dahil bazı enzimlerin inaktivasyonuna neden olur[156].

2.7.4. Diyabet

Yara gerilimi ve hidroksprolin düzeyini azaltıcı etkisi vardır. Diyabetik bireylerde yaralar güç iyileşmektedir.

2.7.5. Radyoterapi ve kemoterapi

Protein sentezinin inhibisyonu, fibroblast proliferasyonunda azalmaya neden olan ajanlardır.

2.7.6. Genetik ve immunolojik bozukluklar

EhlerDanlos sendromunda tip üç kolajenin eksikliği görülmektedir. Morfan sendromunda ise kolajenlerin yapısında bozukluk vardır.

2.7.7. Steroit kullanımı

Steroid kullanımı ile protein sentez hızını azaltmakta, enflamatuvar cevabı yavaşlatmakta, anjiogenezi inhibe etmekte, fibroblast gelişimi ve epitelizasyon hızı azalmaktadır.

Yara iyileşmesinin temel özellikleri bütün dokularda aynı olmasına rağmen her dokuda farklı iyileşme özellikleri görülebilir. Bunun yanında yara iyileşmesine etki eden pek çok faktör tanımlanmıştır. Bunlar arasında; insizyonun tipi, kapamanın şekli, kullanılan dikiş materyalleri, cinsiyet, yaş, ameliyatın acil şartlarda yapılıp yapılmadığı, cerrahın deneyimi, şişmanlık, kronik sistemik hastalıklar (diabet, böbrek yetmezliği, sarılık) olup olmaması, anemi, malnutrisyon, yara enfeksiyonu, kullanılan ilaçlar (özellikle kortikosteroidler ve antineoplastikler), radyasyon tedavisi sayılabilir[157].

Yara iyileşmesinin değişik basamaklarında çeşitli hücre tipleri, sitokinler, koagülasyon faktörleri, büyüme faktörleri, kompleman aktivasyonu ve matriks proteinleri değişen oranda görev alırlar. İlk iki dönemde yara alanında dolaşımın düzenlenmesi ve pıhtı gelişimi ile kan kaybı azalır ve biyolojik moleküllerin devreye girmesiyle iyileşme kolaylaştırılmış olur. Üçüncü basamak olan fibroplazi ve granülasyon döneminde fibroblast proliferasyonu ile dördüncü basamakta reepitelizasyon ve yara iyileşmesinin son basamağı olan beşinci basamakta da karşımıza çıkan kolajen fibrillerinin üretilmesi yeni iyileşen yaranın sağlamlaşmasında görev alırlar[158].

Bağ dokusunun en önemli yapısal protein komponenti kolajendir. Yara iyileşme süreci, birçok basamaktan geçen çok dinamik bir olay olduğundan kolajenin hangi dönemde görev aldığını söylemek zor olabilir. Birden fazla mekanizmanın söz konusu olduğu ileri sürülmektedir.

Klinik uygulamada, kolajen değişik amaçlarla kullanılabilir. Jel veya sellüloz şeklindeki kolajenin hemostatik etkili oluşu hemofili tanısı alan hastalarda kullanımında tercih nedeni olmaktadır. Lif şeklindeki kolajen sütür maddesi olarak kullanılabilir. Saflaştırılmış tipl sığır kolajeninin steril süspansiyonu, kırışıklıkların ve akne sekellerini tedavisinde yer almaktadır [159]. Kolajenin yara iyileşmesindeki açıklığa kavuşan etki mekanizmaları aşağıda özetlenmiştir [160].

1. Hemostatik etki
2. Trombositlerle etkileşim
3. Fibronektin ile etkileşim
4. Eksüda artışı
5. Hücresel komponent (özellikle makrofaj) artışı
6. Fibroblast proliferasyonuna destek

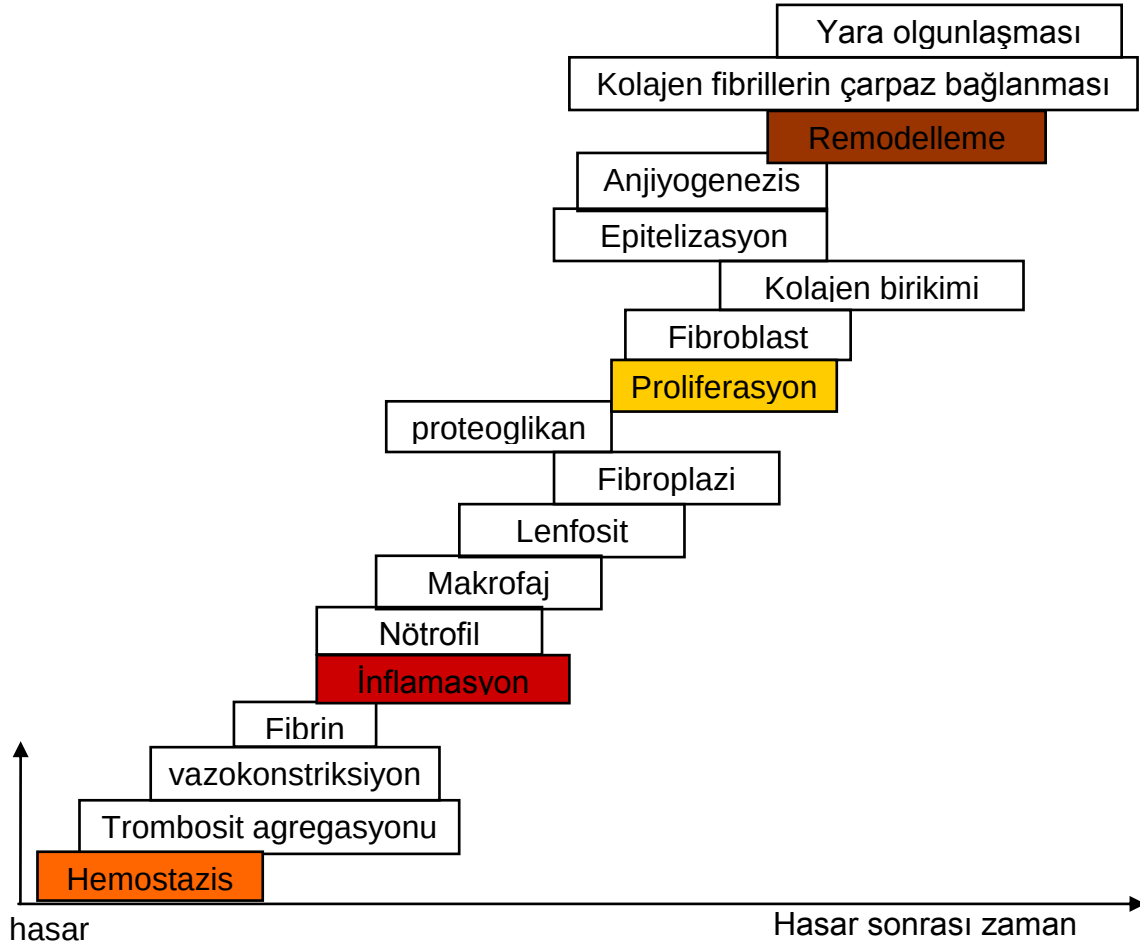
2.8. Yara İyileşme Evreleri

Yara iyileşmesinin aşamaları bir biriyle çakışır fakat açık bir şekilde anlamak için doğrusal bir şekilde tarif edilebilir. Yara iyileşmesini karakterize eden üç faz şunlardır: (1) inflamasyon fazı, (2) hücresel göç ve proliferasyon ve (3) yeniden modellemedir.

Hemostaz: Tüm ağır travmalar vasküler hasara yol açar, bu da hemostaza neden olan moleküler ve hücresel yanıtları meydana getirir. Hemostazis gerçekleştikten sonra yara iyileşme süreci başlar. Hemostazis için vazokonstriksiyon, trombosit agregasyonu ve pıhtılaşma kaskadlarından kaynaklanan fibrin birikmesi katkıda bulunur. Hemostatik süreç pıhtı oluşumuyla sonlanır[160]. Vazokonstriksiyon epinefrin ve norepinefrin gibi vazoaaktif aminlerin ve tromboksan gibi prostoglandinlerin salınımıyla gerçekleşir.

2.8.1. İnflamasyon fazı

İnflamasyon iyileşme için gerekli, travma ve yabancı cisimlerle doku harabiyetine karşı vücudun oluşturduğu immun bir yanıttır. Vasküler permeabilite, dolaşımdan yara ortamına hücrelerin kemotaksisi, sitokin ve büyüme faktörlerinin lokal salınımı, migratör hücrelerin aktivasyonu ile karakterizedir[161]. Travmaya karşı organizmanın fiziksel cevabı, travmanın tipi ve kaynağına bakılmaksızın inflamasyon ile başlar. Bu cevabın erken dönemde en önemli elemanı kan damarlarıdır. Vazokonstriksiyon ve hemostazı takiben plazma ve doku kaynaklı yangı medyatörleri ile lokal vazodilatasyon ve vasküler permeabilitede artma meydana gelir.



Şekil 2.9. Yara iyileşmenin zamana göre evreleri

İnflamatuar medyatörlerinden doku imidazol dipeptidleri, stres periyodunda histamine dönüşür. Histamin, arteriol, kapiller ve venüllerde albumin, globülin ve fibrinojene geçirgenliği artırır. Kapillar sistemde histamine nazaran 200 defa daha etkin rol oynayan serotonin ise hepatik ve pulmonal endotel hücrelerden açığa çıkarak trombositler ve mast hücreleri tarafından depolanır, travmada serbestle ştirilir. Histamin ve serotonin aynı zamanda ortamdaki norepinefrini parçalayarak vazodilatasyonda etkin rol oynarlar[162].

Makrofajların aktivasyonu yara iyileşmesi açısından temel oluşturur ve matriks sentezi ve anjiogenez açısından bu durum önemlidir. Makrofaj aktivasyonu sitokinlerin salınımına yolaçar ve bunlar da fibroplazi ve anjiogenezisi düzenler. Aktive makrofajlar ayrıca lenfositler ve trombositler gibi diğer hücreleri de sitokinler yolu ile aktive ederler, böylece çok çeşitli faktörler salınmaya başlar.

Bunlar arasında trombositlerden salınan büyüme faktörleri (PDGF), tumor growth factor (TGF)- β , epithelial growth factor (EGF), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-6, fibronectin, b-fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), interferon (IFN), kolajenaz, arginaz, prostaglandin E2 (PGE2) bulunmaktadır[161].

Trombositlerin damar endoteline yapışması, bir membran enzimi olan fosfolipaz A2'yi aktive ederek hücreler arası arakidonik asitin serbest bırakılmasına yol açar. Burada meydana gelen endoperoksitler, prostaglandin G2 ve H2 biyolojik olarak daha aktif olan tromboksan A2, prostaglandin D2, E2, F2 alfa ve prostasikline çevrilir. Yangıda özellikle prostaglandin E1 ve E2 konsantrasyonu artar. Tromboksan A2 ve prostasiklinin stabil yıkım ürünlerinden 6-oxo- prostaglandin F1 alfa yangının ana belirtilerinin oluşmasında önemlidir. Prostaglandin E2 monositlerin, prostaglandin E2 ile birlikte tromboksan B2 ise polimorf nükleer lökositlerin kemotaksisinde önemli rol oynarlar. Ayrıca prostaglandin F2-alfa DNA ve hiyalüronik asit sentezini stimüle eder[162].

2.8.2. Hücresel göç ve proliferasyon fazı

Yarada granülasyon dokusu oluşumu ile karakterizedir. Bu fazda fibroblastlar ve endotel hücreleri esas hücrelerdir. Fibroblastlar, çevre dokulardan yara bölgesine doğru göç ederler. Endotel hücreler ise yaranın kenarındaki sağlam venüllerden proliferer olur ve angiogenez yolu ile yeni kapillerler oluştururlar. Özellikle trombositlerden ve aktive makrofajlardan salınan büyüme faktörleri ve sitokinler bu hücre tiplerinin proliferasyonundan sorumludur[161]. Prolifere olan fibroblastlar 4–6. günden itibaren kollagen üretmeye başlarlar. Kollagen yapımı ve yıkımı denge halindedir. Daha sonra triple helix formunda bir molekül olan kolajen oluştuktan sonra intramoleküler bağlarla stabilize olur, dayanıklı bir yapı kazanır ve doku yaşlandıkça kollagen bağlar daha stabil hale geçer.

Protein sentezi ve toplanması ve yaraların kontraksiyonu yara hasarından 4-5 gün sonra başlar[163]. kolajen skar dokusundaki proteinin %50'ni teşkil eder, bu yüzden yara iyileşmesi için çok önemlidir[164]. Fibroblastlar kolajen ve tamir sürecinde sürekli yenilenen proteinlerin sentezinden sorumludur. Kolajen sentezi TGF-b, PDGF ve EGF faktörleri tarafından stimüle edilir[165].

kolajensentezi bundan başka hasta ve yaş, tansiyon, stress ve basınç gibi faktörlerden etkilenir[166]. Kolajen sentezi yara hasarından sonraki 2-4.haftada maksimum seviyeye ulaşır sonra sentezlenme hızı yavaşlar. Başlangıçta, yara matrisinin esas bileşenleri fibrin ve fibronektindir. Fakat daha sonra protein sentezinin hızlanmasıyla, yara matrislerindeki fibrinin yerini kolajen ve proteoglikan gibi proteinler alır. Proteoglikanlar olgunlaşan matrislerin en önemli bileşenleridir ve bu iyileşme fazında sentezlenir[167].

2.8.3. Yeniden modelleme fazı

Bu fazın esas özelliği yarada kolajen depolanmasıdır. Klinik açıdan bakıldığında bu durum yara iyileşmesinin en önemli fazıdır. Zayıf kolajen depolanmasının sonucu olarak pek çok iyileşme bozukluğu, klinik olarak belirgin hale gelebilir. Söz gelimi diabetteki depolanma bozukluğu, azalmış inflamasyonun bir sonucudur[161,168].

2.9.Yaranın Çeşitleri

Yaralar oluşum mekanizmasına göre başlıca yara çeşitleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir[169-170].

2.9.1. Mekanik travmalara bağlı yaralar

a) Künt travmatik yaralar

Abrazyon / sıyrık

Kontüzyon / Bere

Laserasyon / yırtık

Kemik kırıkları

b) Kesici alet yaraları

c) Kesici-Delici alet yaraları

d) Kesici-Ezici alet yaraları

e) Delici alet yaraları

f) Ateşli silah yaraları

2.9.2. Fiziksel travmalara bağlı yaralar

- a) Isı yaraları
- b) Işıık yaraları
- c) Elektrik yaraları
- d) Barotravma yaraları
- e) Elektrik yaraları

2.9.3. Kimyasal travmalara bağlı yaralar

- a) Asit
- b) Baz

2.9.4. Biyolojik etkilere bağlı yaralar

- a) Hayvan ısırık yaraları
- b) Böcek sokmalarına bağlı yaralar
- c) Toksinler

2.10. Yara İyileştirici Aktivitenin Ölçülmesi

2.10.1. *İn vitro* yöntemler

Doku onarımı birçok kimyasal olayları kapsayan, anjiyogenez reepitelizasyon, granülasyon dokusunun oluşumu ve hücre dışı matriks yeniden şekillenmesi ile karakterize olan karmaşık bir süreçtir. Bu adımlar, esas olarak dermal fibroblastlar ve keratinositler tarafından gerçekleştirilir büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörleri ve matris moleküller de dahil olmak üzere biyolojik olarak aktif moleküller tarafından orkestra edilir. Bu nedenle, fibroblastlar *in vitro* çalışmaların temelini oluşturur[171].

İn vitro deneyler, ajanların etkisini belirli hücre tipleri üzerinde incelemek için mükemmel yöntemlerdir. *İn vivo* çalışmalara nazaran ucuz, hızlı ve aynı anda çeşitli koşullar ya da örneklerin taranması için kullanılabilir, fakat yara iyileşmenin karmaşık süreçlerinde içerdii tüm faktörleri replike etmede yetersiz kalır. Şunu

değirmek gerekir ki *in-vitro* testler aynı anda birden fazla ajanlar veya örneklerinin taranması için ideal yöntemlerden sayılır.

Canlı hücreler üzerinde yapılan testler

Kültüre alınmış fibroblast hücreleri, büyüme faktörleri, epiderma hücreleri üzerinde test numunelerinin yara iyileştirici aktivitesi olup olmadığına dair bilgi verir. En çok kullanılan yöntemler Cıvciv Koryoallantoik membran (CAM) testi, Fibroblast kültür testi ve Keratinosit tayini yöntemleridir.

Cıvciv Koryoallantoik membran (CAM) testi:

Bu test bitkisel ekstraların anjiogenik aktivitesinin belirlenmesi amacı ile yapılır. Dokuz günlük fertilize cıvciv yumurtaların kabuklarında 1.0 cm'lik küçük bir pencere açılır ve test örnekleri yüklenen sterilmeliselüloz diski CAM üzerindeki iki büyük damarın kesişim noktasına yerleştirilir. Pencere bant ile kapatılır ve yumurtalarnemli ortamda 37°C'de 72 saat boyunca inkübe edilir. Daha sonra, yumurta açılır ve test numunesi, referans olarak 10 uL 1000 AU / ml bFGF (Fibroblast Büyüme Faktörü) ve kontrol numunesi ile muamele edilen Cıvciv Koryoallantoik membran üzerinde gelişenyeni damar oluşumlarıkarşılaştırılarak değerlendirme yapılır.

Fibroblast testi ve Keratinosit tayini

Bu yöntemlerde test örneklerinin yara iyileşmesi sürecinde çok önemli rol oynayan fibroblast ve keratinositlerin gelişimi ve proliferasyonu üzerindeki etkisi araştırılır.

Enzim deneyleri

Hücreler arası matriks hyalüronik ast gibi proteoglikanlar ve bunlarla iç içe geçmiş olan kolajen, elastin ve fibronektin gibi metallo proteinlerden oluşur. Kolajen hücrelere destekleyici bir iskelet yapısı oluştururken, elastin doku için gerekli olan esnekliği, hyalüronik asit ise suyu tutarak matriks sistemin devamlılığını sağlar[172].

Hyalüronidaz, kolajenaz ve elastaz, hücre dışındaki matriks proteinlerinin enzimatik yıkımına neden olan metallo proteaz enzimlerdir. Sağlıklı dokularda bu

enzimlerin sentezi ve degradasyonu denge halindedir. Ancak dengenin bozulması durumunda bağ dokusundaki makro-moleküller kontrolsüz yıkıma uğrar ve yara iyileşme süreci de uzar. Ayrıca bu enzimler TGF- β , PDGF, fibronektin, α -1 antiproteaz ve α -2 makroglobin'in yıkımına da neden olarak, kronik yaraların patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadırlar[173].

Yukarıda bahsedilen yöntemlerin yanı sıra yara iyileşme sürecine katılan kolajen, elastin, hyaloüronik asit yıkımlarına neden olan kolajenz, elastaz ve hyaloüronidaz enzimlerinin inhibisyon aktivitesini ölçülmesine dayalı çalışmalar da yapılmaktadır[174,175].

2.10.2. *In vivo* yöntemler

Yara iyileştirici aktiviteyi belirlemek amacıyla yapılan *in vivo* deneylerde ucuz olmaları, temininin kolay olması, beslenme açısından maliyetinin düşük olması ve yara iyileşme sürecinin insanlara oranla daha hızlı olması gibi avantajlarla fare, rat, tavşan gibi küçük memli hayvanlar tercih edilir. Sık kullanılan yara modelleri aşağıda özetlenmiştir.

In vivo yöntemlerde kullanılan başlıca yara modelleri

Eksizyon yara modeli

Eksizyon yara modeli yaranın iyileşme sürecinde oluşan kontraksiyonunu, epitelizasyonu ve biyokimyasal parametreleri incelemek amacıyla kullanılır. Hayvanın sırt dorsal bölgesinde vertebral kolonun sağ veya sol tarafında biyopsi punch ile belirli dairesel alan (2-5 cm²) ve derinlikte yara oluşturulur. Oluşan yara açık bırakılır. Test numuneleri topikal olarak uygulanır. Belirli aralıklarda fotoğrafı çekilerek belli programlara dayalı yara alanının ölçülmesi esasına dayanır. Yara alanın küçülmesi yaranın kontraksiyonu ve yara iyileşmenin göstergesi olur[176,177].

İnsizyon yara modeli

Hayvanlar anestezi altındayken traşlanmış sırt dorsal bölgelerinde steril bistüri yardımıyla linear kesi oluşturulur ve kesi ortasından cerrahi iplikle sütur atılır. Test numuneleri test süresi boyunca hayvanlara oral veya topikal olarak uygulanır. Deney sonunda hayvanlar anestezi altında öldürülür ve yara oluşturulan bölge

derisi çıkartılarak biyokimyasal ve histolojik çalışmalar gerçekleştirilir ve tansiyomtre ile derinin gerilim kuvveti ölçülür. Gerilimi ne kadar yüksekse deri o kadar dayanıklı ve yaranın sağlamlığı anlama gelir. Bu kuvvet de deri yapısındaki kolajen dokular arasındaki etkileşme kuvveti ve çarpaz bağlanmadan ileri gelmektedir[177].

Ölü alan yara modeli

Bu yara modelinde anestezi altındaki hayvanın sırt kısmının lomber bölgesine 2.5X 0.5cm boyutlarındaki propipilen tüpler subkutan olarak implant edilir. Deney süresi boyunca test numuneleri uygulanır, süre sonunda tüp üzerinde oluşan granülasyon dokusu çıkarılır ve ağırlığı ölçülerek yara iyileştirici aktivitesi belirlenir[178].

Yara yanık modeli

Oluşturmak istenen yanığın derecesine göre çeşitli sıcaklıklara kadar ısıtılmış metal levhaların belirli sürelerde anestezi altındaki deney hayvanlarının sırt kısımlarına bastırılması ile yanık yaraları oluşturulur. Diğer bir yöntem ise metal bir silindir içine 80°C'ye kadar ısıtılarak eritilmiş mum dökülmesidir. Mum soğuyup katılaştıncaya yara bölgesinden çıkarılır. Yara yanığı oluşturulan deney hayvanları anestezi etkisi geçtikten sonra kafeslerine tek tek alınır ve test numunesi oral veya topikal olarak yara üzerinde oluşan kabuğu düşünceye kadar uygulanır. Bu sürenin sonunda % yara kontraksiyonu, hidroksiprolin tayini ve epitelizasyon zamanının saptanması yöntemleri ile yara iyileştirici aktivite değerlendirilmesi yapılır[171].

Sıçanlarda oluşturulan *in vivo* yara modelinin istatistiksel değerlendirilmesi aşağıdaki çizelgede sunulmuştur[179].

Çizelge 2.36. *In vivo* yara modelinin istatistiksel değerlendirilmesi

Oluşturulan <i>in vivo</i> yara modeli	% Araştırmada kullanılma oranı
İnsizyon modeli	38,18
Eksizyon modeli	38,18
Ölü alan yara modeli	18,18
Geciktirilmiş yara modeli	18,18
Ameliyat veya cerrahi yara modeli	16,36
Yanık modeli	12,72
Dairesel yara	3,64
Yaşlanma	3,64
Dermonekroz	1,82

*In vivo yara modellerinde yara iyileşmesinin değerlendirilmesi**Yara alanının ölçülmesi*

Yara alanı belli gün aralıklarında fotoğraf makinesi ile görüntüsü alınır. Daha sonra çekilen fotoğraflar üzerindeki yara alanı milimetrik grafikkağıdıyla ölçülür.

$$\% \text{ Yara kontraksiyonu} = \frac{\text{İyileşmiş yara alanı}}{\text{Total yara alanı}} \times 100$$

Yara kontraksiyonunun ölçülmesi

Yaranın kontraksiyonu yaranın kapanması ve fonksiyonel bariyerlerin yeniden yapılanmasında katkıda bulunur. Deney hayvanlarında yara oluşturulan günden başlayarak yarada epitelizasyonun tamamlandığı güne kadar yara alanları ölçülür. Yara kontraksiyonu orijinal yara alanı boyutunun % azalman miktarı olarak aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\% \text{ Yara kontraksiyonu} = \frac{(\text{Başlangıçtaki yara alanı} - \text{n.gündeki yara alanı})}{\text{Başlangıçtaki yara alanı}} \times 100$$

Epitelizasyon süresinin tayini

Yara kabuğunun hiç iz bırakmadan düşmesi epitelizasyonun tamamlanması anlamına gelir ve bu periyodun bitmesi için geçen süre kaydedilir.

Yara gerilim kuvvetinin ölçülmesi (Tensile Strength)

Dermal yara iyileşmede en önemli evrelerinden biri dokuda artarak gelişen biyomekanik dirençtir. Derinin bu mekanik özelliği dermişi fonksiyonel özelliğın oluşturan kolajenin yapısı ve elastik fibrin ağlarından ileri gelmektedir. İyileşmiş yaranın kopma kuvveti derinin iki parçaya ayrılması için gereken minimum kuvvete eşittir. Derinin kopma kuvveti yara dokusunun gerilim kuvvetinin göstergesidir ve yaranın iyileşme derecesini belirler. Gerilim kuvveti genellikle kolajen fibrin ağlarının içeriğı, organizasyonu ve fiziksel özellikleri ile ilişkilidir[171].

Hidroksiprolin miktar tayini

Yapısında hidroksiprolin bulunan kolajen hücreler arası dokunun en önemli bileşenidir. Kolajenin aist hidrolizi ile peptitler ve serbest hidroksiprolin açığa çıkar. Açığa çıkan hidroksiprolin kloramin-T, perklorik asit ve belli reaktiflerle oluşturduğu renk şiddetinin belli dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbansının ölçülmesidir[180]. Oluşan bu bileşenlerin absorbansı ölçülerek, önceden L-hidroksiprolin standart çözeltisinden yararlanarak oluşturulan kalibrasyon denkleminde faydalanarak granülasyon dokusunda oluşan kolajen miktarı saptanır.

Histopatolojik incelemeler

Ötanizden sonra hayvanlardan çıkarılan dokular %10'luk Formaldehit solüsyonu içinde saklanır. Dokular parafin blok yapıldıktan sonra, mikrotom yardımıyla ince kesitler alınarak Hematoksilen, Eozin gibi belli histolojik boyalarla boyanarak mikroskopik incelemeye alınır. Görüntüleri alınarak değerlendirilir ve yaranın iyileşme süreci hakkında bilgi edinilir[176].

Diğer analizler

Yara iyileşme sürecinin değerlendirilmesinde heksozamin ve total protein tayinleri ile mukopolisakkarit, DNA ve kolajen ölçümleri gibi biyokimyasal analizler de yapılmaktadır[171].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan bitkiler

Yapılan literatür çalışmalarıyla, etnobotanik kaynaklarda kaydedilen halk arasında yara iyileştirici amaçlarla kullanıldığı belirlenen *E. italicum* L., *E. vulgare* L., *E. angustifolium* Miller ve *E. parviflorum* Moench bitkilerinin toplandığı yer, tarih, herbaryum numarası ve tayin eden kişi gibi bilgiler Çizelge 3.1.de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmamızda kullanılan bitkilere ait bilgiler

Bitki adı	Familya	Yerli adı	Toplandığı yer	Toplama tarihi	Teşhisi yapan kişi	Herbaryum No
<i>E. italicum</i> L.	Boraginaceae	Engerek otu	Kürcü köyü girişi ve Kızılcahamam' dan Bolu'ya doğru 8. Km sağdaki yol kenarı arazide	26.7.2012	Prof.Dr. Osman Üstün	GUE 2991
<i>E. vulgare</i> L.	Boraginaceae	Engerek otu	2 Sey hamamı içine doğru 2 km açık alan	26.7.2012	Prof.Dr. Osman Üstün	GUE 2992
<i>E. angustifolium</i> Miller.	Boraginaceae	Kızılıcik diken	Antalya Manavgat güneydoğu orman sitesi yanı kumlu sahil	14.7.2012	Prof.Dr. Osman Üstün Doç.Dr. Gülderen Yılmaz*	AEF 26023
<i>E. parviflorum</i> Moench	Boraginaceae	-	Antalya Manavgat güneydoğu orman sitesi yanı kumlu sahil	14.7.2012	Prof.Dr. Osman Üstün Doç.Dr. Gülderen Yılmaz*	AEF 26024

*: Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim dalı

3.1.2. Kullanılan kimyasal madde ve çözücüler

Çizelge 3.2. Çalışmamızda kullanılan kimyasal madde/Çözücülere ait bilgiler

Kimyasal madde	Satın alındığı Firma ve Kodu	Kimyasal madde	Satın alındığı Firma ve Kodu
Asetik asit	Merck 117950	β , β -dimetil akrilşikonin	Shanghai pureone Biotech Co. Ltd [24502-79-2]
Gallik asit	Sigma-Aldrich27645-R	Şikonin	Shanghai pureone Biotech Co. Ltd [20120503]
Propilen glikol	Sigma-AldrichW294004	Asetilşikonin	Shanghai pureone Biotech Co. Ltd [24502-78-1]
Sıvı parafin	Kimetsan (KIM-VL/01CP/110718)	Ketamin	Alfamine [1203065-01]
Glikol stearat	Zhongzhou chem 111-60-4	Ksilazin	BaVet Bsilazin [11D124]
DPPH	Sigma-AldrichD9132	Kloroform	Merck1024452500
FeSO ₄	Sigma-Aldrich 31236	Metanol	Merck 67-56-1
Ferrozin	Sigma-Aldrich 82950	n-Hekzan	Merck Art. 4368
Folin Ciocalteu Fenol	Sigma-Aldrich F9252	Aseton	Merck M100013.2500
Karboksimetil selüloz	Merck 9004-32-4	Etanol	Merck 1.009.862.500
Madecassol®	Bayer [parti No: TRT01JA]	Sodyum hidroksit	Merck 1310-73-2
Silika jel 70-230 mesh, 60A ^o	Sigma-Aldrich 28.862-4	Sodyum karbonat	Merck 497-19-8
Kersetin	Merck 6151-25-3	Sülfürik asit	Merck 109074
Kloramin-T	Sigma-Aldrich 23270	Hidroksiprolin	Sigma-Aldrich H54409
p-dimetilamino benzaldehit	Sigma-Aldrich 39070	Sodyum Asetat	Sigma-Aldrich W302406
EDTA	Sigma-Aldrich E9884	Perklorik asit	Merck 1.00519.2514

3.2.Yöntem

3.2.1. Kimyasal çalışmalar

Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama

İlk toplama materyalimiz olan *E.italicum* L. ve *E.vulgare* L. bitkisinin halk arasındaki kullanımını göz önünde bulundurarak, tüm kimyasal bileşik gruplarının ekstre edilmesini sağlamak amacıyla, non-polardan polara doğru çözücülerle (n-hekzan, kloroform, aseton, etanol, su) 40°C'de su banyosunda maserasyon

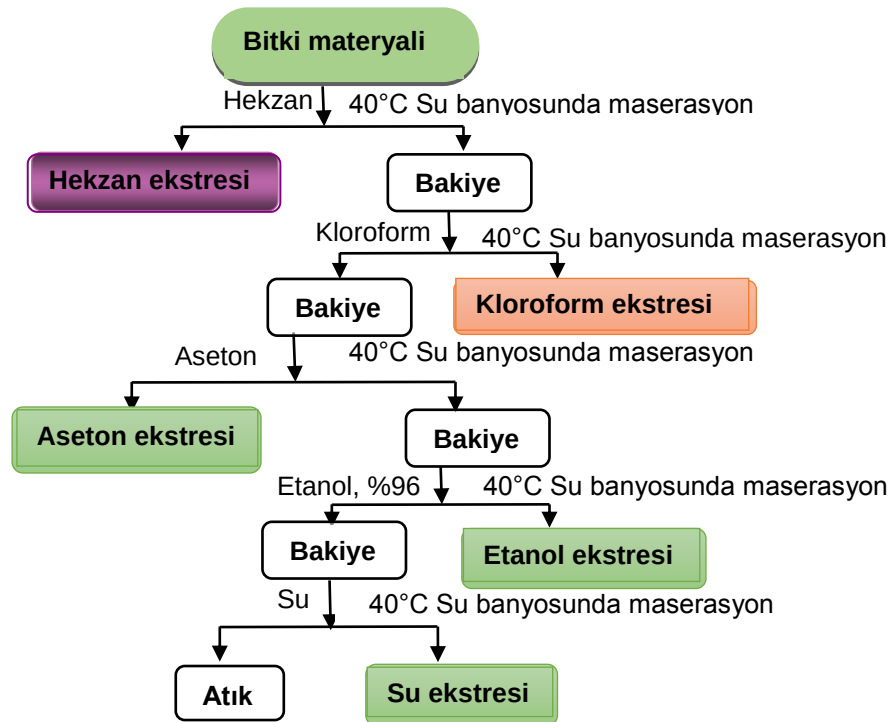
yöntemleriyle ekstre edilerek *in vivo* öndeneme biyolojik aktivite çalışmaları uygulandı(Ekstraksiyon-1).

Sonraki topladığımız iki tür ilave olarak dört *Echium* türü kök ve toprak üstü kısmı olmak üzere, %96'lık etanol'de 40°C'de su banyosunda maserasyon yöntemiyle ekstre edilmiştir ve insizyon yara modeli üzerindeki yara iyileştirici aktivitesine bakılmıştır(Ekstraksiyon-3).

Ekstraksiyon-1

Farklı polaritedeki ekstraktlarının elde edilmesi

Gölgede kurutulmuş bitki kısımları kök ve toprak üstü kısımları olmak üzere, ayrı ayrı toz edilerek, polaritesi düşük olan n-Hekzan'dan başlayarak, 40°C'de su banyosunda maserasyon yöntemiyle iki gün arayla beş defa ekstre edildi. Süzgeç kağıdıyla süzülerek alçak basınç altında rotavaporda 40°C sıcaklıkta yoğunlaştırıldı ve kurutuldu. Sonra sırasıyla kloroform, aseton, etanol ve su ile aynı ekstraksiyon işlemi uygulandı. Sulu ekstraktlar rotavaporda iyice yoğunlaştırıldıktan sonra, liyofilizatörde kurutuldu. Ekstraksiyon şeması Şekil 3.1'de, elde edilen ekstraktların verimleri aşağıdaki çizelge 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *E.italicum* ve *E.vulgare* kök ve toprak üstü kısımlarının ekstraksiyonu-1

Çizelge 3.3. *E.italicum* L. ve *E.vulgare* L. bitkilerinden farklı çözücülerla elde edilen ekstrelerin verimleri (%)

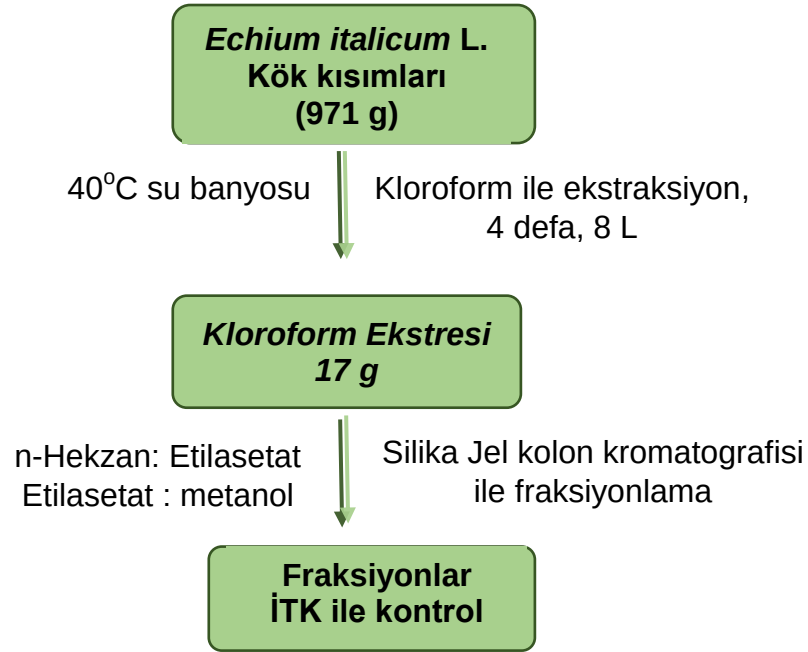
Ekstre adı Bitki	Hekzan	Kloroform	Aseton	Etanol	Su
<i>E. italicum</i> L. toprak üstü kısım	1,85	0,38	0,88	0,64	9,26
<i>E. italicum</i> L. kök	2,92	0,52	0,84	0,72	6,31
<i>E. vulgare</i> L. toprak üstü kısım	2,25	0,51	0,98	0,97	9,33
<i>E. vulgare</i> L. kök	0,52	0,43	1,11	1,01	4,86

Ekstraksiyon-2

E.italicum L. köklerinden kloroform ekstresinin hazırlanması

Yapılan yara iyileştirici aktivite çalışma sonucuna göre *E. italicum* L.kök ekstreleri içerisinde kloroform ve su ekstresi aktif çıkmıştır. *E. italicum* L. bitkisinin halk arasındaki kullanımı ve daha çok non-polar bileşiklerin etkili olduğunu göz önüne alındığında, çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki aktivitesini değerlendirilerek kloroform ekstresi üzerinden fraksiyonlama ve izolasyon çalışmalarına karar verilmiştir.

E.italicum kökleri (971 gr), uygun şartlar altında kurutulup toz edildikten sonra tam tartılınmıştır. Kloroform ile oda sıcaklığında 3 gün boyunca 40°C su banyosunda maserasyon yöntemiyle ekstre edilmiştir. Her ikişer gün arayla gün sonunda, çözücü numune karışımı süzülerek, drog üzerine taze kloroform ilave edilmiştir. Birleştirilen süzüntüler rotavaporda uçurularak çözücüsünden kurtarılmış ve ekstre elde edilmiştir(Şekil 3.2).

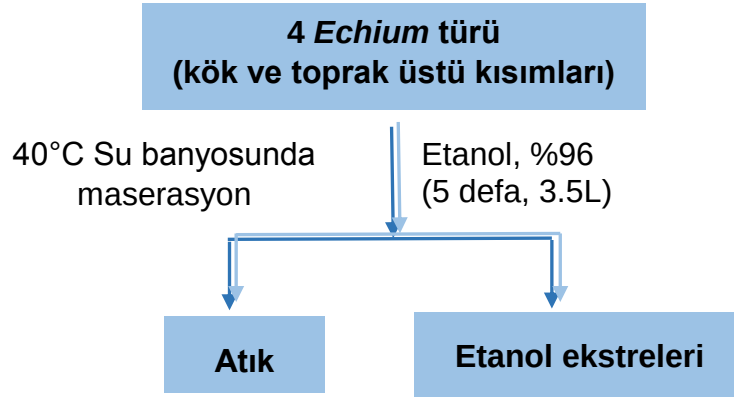


Şekil 3.2. *Echium italicum* L. köklerinden kloroform ekstresinin hazırlanması ve BAYF yöntemine göre fraksiyonlanması

Ekstraksiyon-3

Echium'un 4 türünün toprak üstü kısım ve köklerinden etanol ekstresinin hazırlanması

Sonraki sene topladığımız iki tür ilave olarak toplam dört *Echium* türü biyolojik aktivite yönünden aktif olan bitki kısımlarını tespit etmek amacıyla, kurutulmuş bitkilerin kök ve herba olarak iki kısma ayrılmıştır ve az miktarda aynı ekstraksiyon işlemleri uygulanmıştır. Bitkilerin kurutulmuş kısımları (100'er gr) üzerine 750mL etanol ilave ederek, 40°C su banyosunda iki gün bekletildi. Sonra süzülen ekstreler alçak basınç altında, rotavaporda 40°C sıcaklıkta yoğunlaştırıldı. Bu işlem beş kez tekrarlandı. En sonunda yoğunlaştırılan ekstreler birleştirilerek, farklı renklerde etanol (EtOH) ekstreleri elde edildi.



Şekil 3.3. *Echium* 4 türünün kök ve toprak üstü kısımlarından etanol ekstraktlarının hazırlanması

Çizelge 3.4. *E.italicum* L, *E.vulgare* L, *E.angustifolium* Miller, *E.parviflorum* Moench bitkilerinin ekstraksiyon verimleri

Bitki adı	Kullanılan	Kullanılan Çözücü	Verim(%)
<i>E. italicum</i> L.	Herba	Etanol (%96)	4,61
	Kök		3,23
<i>E. vulgare</i> L.	Herba		5,68
	Kök		2,67
<i>E. angustifolium</i> Miller.	Herba		3,25
	Kök		5,08
<i>E. parviflorum</i> Moench	Herba		8,08
	Kök		2,63

Aktif Alt Ekstrelerin Kromatografik Yöntemler ile Ayırımı

Çalışmalarımızda normal faz, silika jel kaplı alüminyum tabakalı hazır plaklar kullanılmıştır.

Plak Özellikleri: Kieselgel 60 F254 0.2 mm; Merck; Art.5735

Çözücü Sistemleri:

- 1.n-Hekzan: Etilasetat (85:15)
- 2.n-Hekzan: Etilasetat:Asetik asit (85:15:1)
3. Kloroform: Metanol (99:1)
4. Petroleteri: Aseton: Kloroform: Asetik asit (220:7.2:4.8:1.2)

Plaklar UV lambası altında 254 ve 366 nm dalga boylarında incelendi.

Revelatörler:

%5 H₂SO₄ Reaktifi (t°C)

E. italicum L. kök kloroform alt ekstresinin silika jel kolon kromatografisi ile fraksiyonlanması

E. italicum L. ve *E. vulgare* L. bitkisinden farklı çözücülerle elde edilen ekstrele uygulanan biyolojik aktivite deneyinde *E.italicum* L. kök kloroform ekstresinin yara iyileşmesine katkı sağladığı tespit edilmiştir. Bu amaçla sonraki çalışmamızda, ekstrenin aktif olan fraksiyonunu ayırmak planlanmıştır. Bu ekstrenin alt fraksiyonlarını elde etmek üzere kolon kromatografisi yöntemlerine başvurulmuştur. Silika jel kolonda artan polaritede çözücü sistemiyle elüsyon sonucu fraksiyonlar elde edilmiştir. Kullanılan kolon sistemine ait bilgiler aşağıda verilmiştir.

Kullanılan kolon sistemi

Kolon Boyutları: 4 x 20 cm

Adsorban: Silika jel 60 (0,063-0,02 mm) , 60A°

Çözücü Sistemi: n-Hekzan: Etilasetat; Etilasetat: MeOH

Akış Hızı:1.5-2 ml/dk

Kolona tatbik edilen ekstre miktarı: 17 g EİK CHCl₃ ekstresi

Toplanan Fraksiyon Miktarı: 25 ml

E. italicum kökleri uygun şartlar altında kurutulup toz edildikten sonra tam tartım alınarak (1179g), 10 L kloroform ile 2'şer gün arayla 6 defa ekstre edildi. Süzülen ekstreler alçak basınç altında, rotavaporda 40°C sıcaklıkta yoğunlaştırılarak koyu kırmızı renkte kloroform (CHCl₃) ekstresi elde edildi (EİKK=17g). Elde edilen estre üzerinde yine silika jel kolon kromatografisi ile fraksiyonlama yapıldı.

Silika jel kolonun kurulması

Silika jel kolon kromatografisi için; 250 g civarında silika jel 60 (0,063-0,200 mm, 70-230 mesh, Merck 1.07734.1000) 5 cm çaplı, 50cm uzunluğundakicam

kolonuna, hekzan ile önceden süspande ederek alt kısmı pamuk ile kapatılmış cam kolona hava kabarcıkları kalmayacak şekilde kolon kenarlarından huniyle yavaşça vurularak yaş doldurma yöntemiyle doldurulmuştur. Kolondaki adsorbanın iyice yerleşmesi için kolon ağzı kapatılarak bir gece bekletildi. EİKK ekstresi Hekzan: etilasetat = 9:1 çözücü karışımıyla çözünerek kolona uygulanmıştır. n-hekzan, etil asetat, metanol gradient elüsyonu ile fraksiyonlar toplanmıştır.

Fraksiyonlanacak olan ekstre yaş yöntemle kolona tatbik edildi. 17 g numune aynı çözücüde iyice çözünmesi sağlandı. Kolon artan polaritede elüsyon çözeltisiyle: n-Hekzan ~ Etilasetat (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10), Etilasetat ~ Metanol (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 0:10) elüle edilerek, alttan fraksiyonlar 25'şer mL toplandı. Kolondan alınan fraksiyonlar İTK ile kontrol edildi. İTK analizleri sonucunda aynı madde gruplarını içerdiği bulunan fraksiyonlar birleştirildi. Kolon kromatografisi sırasında elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü oranları aşağıdaki Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. *E.italicum* kök kloroform ekstresinin kolon kromatografisinde toplanan fraksiyonların çözücü sistemleri ve verimi

Fraksiyon	Çözücü oranları	Verimi %
1-11	n-hekzan	5,10
12-67	n-hekzan:etil asetat (9:1)	33,24
68-71	n-hekzan:etil asetat (8:2)	0,72
72-84	n-hekzan:etil asetat (7:3)	1,25
85-110	n-hekzan:etil asetat (6:4)	2,60
111-120	n-hekzan:etil asetat (5:5)	1,46
121-130	n-hekzan:etil asetat (4:6)	1,47
131-139	n-hekzan:etil asetat (3:7)	0,69
140-150	n-hekzan:etil asetat (2:8)	3,27
151-155	n-hekzan:etil asetat (1:9)	1,67
156-166	Etil asetat	0,93
167-185	Etil asetat: Metanol (9:1)	1,61
186-192	Etil asetat: Metanol (8:2)	6,20
193-198	Etil asetat: Metanol (7:3)	1,52
199-211	Etil asetat: Metanol (6:4)	3,13
212-223	Etil asetat: Metanol (5:5)	1,86
224-228	Metanol	2,18

Silika jel kolon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlar üzerinde gerçekleştirilen biyolojik aktivite çalışmaları sonuçları değerlendirilerek izolasyon çalışmalarına Fr.30-70 üzerinden devam edilmesine karar verildi.

İzole edilen bileşiğin yapı tayini

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

BAYF ile izolasyon çalışmaları sonucunda izole edilen bileşiklerin yapılarını tayin etmek amacıyla ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında Bruker Varian Mercury 300 MHz NMR cihazı ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında Mercury 400 MHz NMR cihazı kullanarak 25°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Çözücü olarak CDCl_3 (Dötörokloroform) kullanıldı.

3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları

Deney protokolü

Deney hayvanları

Deneylerde Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen 25-30 g ağırlığında erkek *Swiss albino* fareler kullanıldı. Hayvanların ortama adapte olabilmesi için deneye başlamadan önce laboratuvar şartlarında en az üç gün beklendi. Bu bekleme süresince hayvanlar standart pellet yem ve su ile beslendiler, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık uygulaması yapılan laboratuvar da sıcaklığında barındırıldılar. Deneylerde her grupta 6 hayvan kullanıldı.

Test numunelerinin hazırlanması

Test numunelerinden hazırlanan merhemler; 10 mg/g ekstre/fraksiyon içerecek şekilde Madecassol® pomat' ın bazı olan glikol sterarat: 1,2 propilen glikol: sıvı parafin (3:6:1) kullanılarak hazırlandı. Sonuçların karşılaştırılması amacıyla, standart yara iyileştirici madde olarak; referans madde grubundaki her deney hayvanının yarası üzerine haricen 0,5'er gr Madecassol® pomat uygulandı.

Biyolojik aktivite deneyleri

In vivo aktivite deneyleri

Yara oluşturma modelleri

Çizgisel insizyon yara modeli

Farelere intraperitoneal yolla 0,2cc Ketazol® enjeksiyonu ile genel anestezi yapıldı. Sırt kısımlarının orta hattında bistüri ile bir 1 cm'lik çizgisel insizyon yarası oluşturuldu. Cerrahi ipek iplikle eşit tam ortasından 1 adet dikiş atıldı. 14 gün boyunca günde iki defa 500'er mg ekstre/fraksiyon içeren merhem formölasyonları haricen yaralara uygulandı. 10. gün sonunda dikişler alındı. 15. gün hayvanlar Ketazol® anestezisine alındı. Toksik deneyleri için bazı organları alındı. Yara oluşturulan bölgeler yara kenarlarının 1'er cm uzağından cerrahi makasla kesildi. Yaralardan tensiometre ile gerilim kuvveti ölçüldü ve histopatolojik incelemeler için kullanıldı.

Çizgisel insizyon yara modelinde yüzde gerilme kuvveti hesaplanırken aşağıdaki formöl kullanılmıştır.

$$\%Gerilme\ kuvveti = (TS_{Ekstre} - TS_{Taşıyıcı}) / TS_{Ekstre} \times 100$$

TS_{Taşıyıcı}: Baz merhem uygulanan grubun gerilme kuvveti ortalaması

TS_{Ekstre}: Test numunesi uygulanan grubun gerilme kuvveti ortalaması

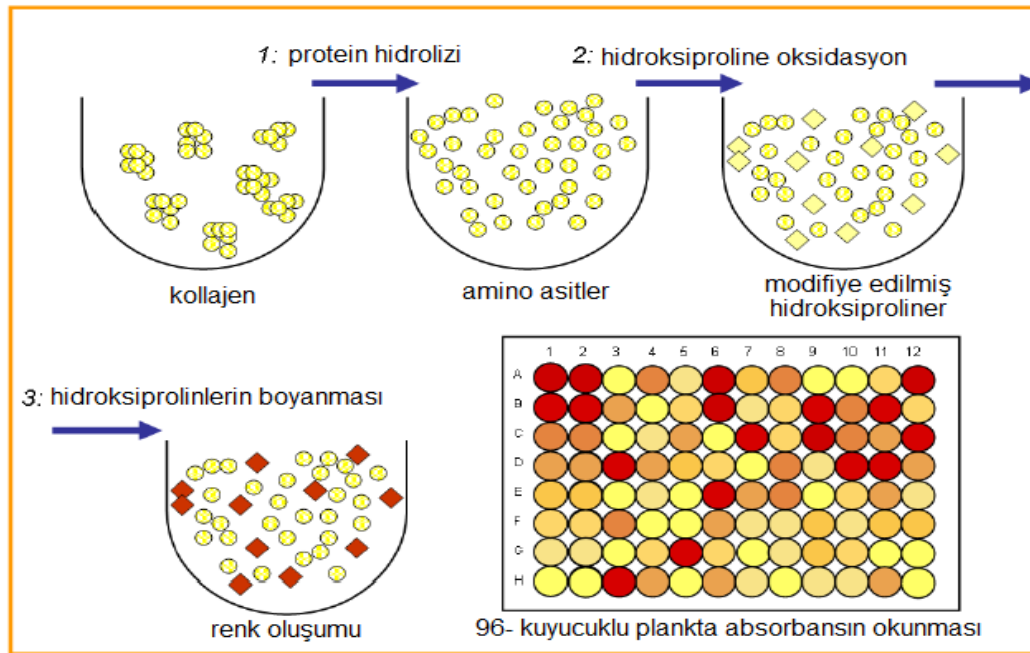
Histopatolojik incelemeler

Histopatolojik incelemeler için derinin tüm katmanlarını içeren uygun büyüklükteki örnekler %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edildi. Tespit edilen ve kasetlere yerleştirilen dokular, 6-8 saat süreyle eşme suyunda yıkandı. Doku takip cihazı kullanılarak 60-90 'ar dakika % 50, 70, 80, 90, 96 ve Absolut etil alkol, ksilol ve parafin serilerinden geçirildi. Parafin dispenser cihazında parafine gömme işlemi gerçekleştirilerek bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 4-6 mikron kalınlığında mikrotomdan alınan kesitler su banyosunda lam üzerine yerleştirilerek etüvde bekletildi. Kesitler Harris'in Hematoksilen-Eozin boyama yöntemine göre boyandı ve ışık mikroskobunda incelendi.

Kolajen bağ dokunun saptanması

Hidroksiprolin Tayini

Ekstraselüler matriks elemanlarından biri olan kolajen hücrelere destekleyici bir iskelet oluşturan ve yara iyileşmesinde rol oynayan ana yapısal bir proteindir. Dokulardaki kolajen miktarı kolajenin yapısında bulunan hidroksiprolinin ölçümü ile belirlenir. Kolajen yapısında yer alan her üç aminoasitten birini oluşturan hidroksiprolin düzeyleri kolajen metabolizmasının dolaylı bir göstergesidir ve hidroksiprolinin oksidasyonu sonucu oluşan pirol bileşiğinin p-dimetilaminobenzaldehit ile verdiği renkli kompleksin 560 nm de verdiği absorbansın okunması temeline dayanır[180]. Hidroksiprolin miktarının fazla olması dokuda kolajenin fazla olduğunu gösterir. Bu amaçla Woessner tarafından geliştirilen yöntem çeşitli modifikasyonlar yapılarak çalışılmıştır.



Şekil 3.4. Hidroksiprolin miktar tayininde kullanılan yöntemin prensibi

Hidroksiprolin standartının ölçümü için 5 mg hidroksiprolin 50 ml 0,001 N HCl'de çözülerek hazırlanan stok çözeltisinden bir seri dilüsyon çözeltileri (0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 1,5 µg/ml; 2 µg/ml; 2,5 µg/ml ve 5 µg/ml) hazırlandı. Her çözeltiden 2 ml tüplere alındı. Diğer taraftan ölçümü yapılacak dokular tartıldı, ağzı kapaklı pyrex tüplere konuldu. Üzerine 5 ml 6 N HCl ilave edildi. 130°C'de 3 saat hidroliz edildi.

İndikatör olarak birkaç damla %0,02'lik metil kırmızısı eklendi. Çözeltinin rengi sarıya dönene kadar pH 6-7 arasında olana kadar 2.5 N NaOH eklendi.

Tampon(Buffer) : Sitrik Asit monohidrat (50 g), Glasiyal asetik asit (12 ml), Sodyum asetat trihidrat (120 g) ve Sodyum hidroksit (34 g), 250ml 1-propanol ile dözüldükten sonra, yaklaşık 600 ml distile su içinde karıştırılarak çözdürüldü. Önceden kalibrasyonu yapılmış pH metre kullanılarak 1N HCl ve 1N NaOH ilavesi ile pH 6,0'ya ayarlandı. Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Metil red indikatörü: 2 mg Metil red, 100ml distile suda çözdürülerek % 0,02'lik solüsyon hazırlandı. Solüsyon ışığa hassas olduğu için alüminyum folyo ile kapatılmış erlen içinde buzdolabında saklandı.

Kloramin -T: 0,05 M solüsyon hazırlamak için 1,138 g Kloramin T, 100 ml tampon solüsyonu ile çözülerek elde edildi. Solüsyon günlük hazırlandı.

p-dimetilaminobezaldehit (p-dAB): %10'luk solüsyon; yaklaşık 35 ml %60'lik perklorik asit içinde 10 g p-dAB çözdürülmesi ve solüsyonun izopropanol ilavesiyle 100 ml'ye tamamlanması ile elde edildi. Solüsyon günlük hazırlandı.

Hem standart hem de test çözeltilerinden 2 ml alındı. 1ml taze hazırlanmış Kloramin T eklendi. 20 dk oda ısısında bekletildi. 1 ml taze hazırlanmış p-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi eklendi. Tabakalanma kayboluncaya kadar çalkalandı. Ardından 60°C su banyosunda 20 dk bekletildi. 5 dk musluk suyunda soğutuldu. Çözeltilerin absorbansı 557 nm'de ölçüldü.

In vitro aktivite deneyleri

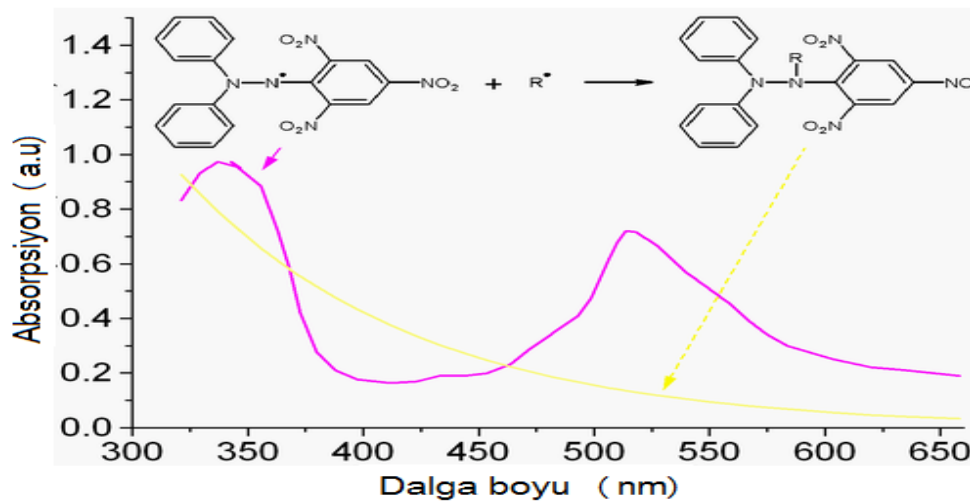
Antioksidan aktivite tayini

Yara iyileşmesinde antioksidan etkinin önemi oldukça büyüktür. Antioksidan etki sağlayan bileşikler lipid peroksidasyonunu inhibe ederek hücre hasarını önlemekte ve kolajen fibrillerin dayanıklılığını arttırmaktadır[181]. Test edilen bitkilerin antioksidan etki bakımından değerlendirilmesi yara iyileştirici etkileri hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir.

Bu nedenle çalışmamızda, antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini, demir iyonu şelasyon yapıcı etki tayini, total fenol miktar tayini ve total flavonoit miktar tayinine dayanan yöntemler kullanılmıştır.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini

Antioksidanlar enzimleri inhibe ederek veya eser elementlerle şelat yaparak reaktif oksijen türlerinin oluşumunu bastırmak suretiyle etki gösterirler. DPPH serbest radikal süpürücü etkisini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan doğal bir antioksidandır. Oda sıcaklığında kararlı serbest radikal olup, etanollü çözeltisi koyu mor renklidir ve 517nm'de çok güçlü bir absorpsiyon gösterir. Ortamda serbest radikal temizleyici varlığında, elektronlar çiftleştikten, DPPH çözeltisinin rengi açılır, absorbans kaybolur veya azalır.



Şekil 3.5. DPPH serbest radikal

DPPH %80'lik metanolde çözülerek günlük olarak taze hazırlandı ve 4°C karanlıkta muhafaza edildi. Test numuneleri Metanol ile 1 mg/ml olarak stok solüsyonları hazırlandı ve dilüsyonar 96 kuyucuklu plak üzerinde yapıldı. Sonra her kuyuya 150 µL DPPH çözeltisi ilave edildi. İyice karıştırdıktan sonra, üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak karanlıkta 30 dakika bekletildi. Sonra Elisa okuyucuda 517 nm dalga boyunda optikal dansitesi(OD) okundu. Kontrol olarak test numunesi içermeyen DPPH çözeltisinin OD değeri ölçüldü. Tüm test ve analizler üçlü paralel çalışıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak

verildi. Antioksidan aktivite sonuçları DPPH inhibisyonunun yüzdesi olarak aşağıdaki denkleme göre hesaplandı[182].

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

A_a: Kontrol grubunun absorbans değeri

A_b: Test numunesinin absorbans değeri

Demir iyonu şelasyon aktivitesi (FIC)

Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları canlı sistemde serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalizör olarak görev yapar ve Fe oksidatif reaksiyonları teşvik etmede daha etkili bir metaldır[183]. Fe iyonları, hidroperoksitlerin zararlı hidroksi radikale dönüştüğü “Fenton-tip reaksiyonları” katalizlemektedir. Hidroksil radikali ise oldukça reaktif bir tür olup, hızlı bir şekilde lipid radikallerini oluşturarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını başlatmaktadır[184].

Biyolojik sistemlerde oksijen taşınması, ATP üretimi, DNA ve klorofil sentezinde önemli role sahip olan demirin serbest formları canlı hücrelerde toksik etki yapabilmektedir. Bu toksisite sonucunda oluşan aktif oksijen türleri lipid oksidasyonunu teşvik edebilmekte veya DNA moleküllerine saldırabilmektedir. Gerçekte tüm canlı hücreler serbest demirin toksik etkisini yok eden ve demirin fazlasını toksik olmayan formlarda hücre içinde depolayan mekanizmalara sahiptir[184]. Birçok metal doğal olarak vücutta şelat oluşturmuş formda bulunur. Örneğin; Fe ferritin gibi proteinlerde veya miyoglobin ve hemoglobinin porfirin halkasında bu formda bulunmaktadır[185]. Şelat oluşumu antioksidan savunma sistemine önemli katkıda bulunmakla birlikte, vücutta travma, toksinler, hastalık gibi çeşitli nedenlerle oksidatif reaksiyonları katalizleyebilen serbest metal iyon formlarına dönüşümler gerçekleşebilmektedir. Katarakt, ateroskleroz, diyabet gibi patolojik koşullar altında metal iyonlarının serbest ve zararlı formlarda bulunduğu dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır[186].

Demir iyonu şelasyon aktivitesi ikincil antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla kullanılan yöntemlerden biridir. Esası Demir (II) ile Ferrozin'in oluşturduğu kompleksinin 562nm dalga boyundaki alçalmış absorbansının ölçülmesine

dayanır. Absorbansı ne kadar düşük olursa, o kadar iyi demir iyonu şelat yapıcı aktiviteye sahip olduğunu gösterir[187].

Referans standart olarak EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit) 500 µM, 250 µM, 100 µM, 50 µM, 10 µM konsantrasyonlarda kullanıldı. 50 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL konsantrasyonlardaki test çözeltisinden ve standart çözeltilerden 1ml alınarak üzerlerine 3,7 mL metanol ve 2 mM demir sülfat heptahidrat solüsyonundan 0,1 mL eklendi. Reaksiyon 5 mM Ferrozin solüsyonundan 0.2 mL eklenmesiyle başlandı. Karşım oda ısısında 10 dk inkübe edildikten sonra 562 nm dalga boyunda kör olarak metanol'e karşı absorbansı okundu. Her örnek için üç paralel çalışıldı[188]. Demir iyonu şelasyon aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\% \text{ Demir iyonu şelasyon aktivitesi} = (\text{Ac-As})/\text{Ac} \times 100$$

Ac: Kontrol'ün absorbans değeri (test numunesi içermeyen)

As: Test örneğinin absorbans değeri

Total fenol miktar tayini (TPC)

Total polifenol miktar tayininde kullanılaa çeşitli yöntemler arasında, Folin-Denis yöntemi en yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir[189]. Kolayca oksitlenebilen polifenoller veya hidroksillenmiş aromatik bileşikler ile fosfotungsten-polimolibdik asit arasındaki renk reaksiyonu oluşum esasına dayanır. Sonra bu yöntem Folin ve Ciocalteu tarafından, reaksiyonda çökelek oluşumunu önlemek ve reaksiyon duyarlılığını artırmak için reaktife lityum sülfat ilave edilerek modifiye edilmiştir[190]. Şimdi Folin-Ciocalteu reaktif polifenol miktarının belirlenmesi için ticari olarak mevcut olan ve çok tercih edilen bir metod haline gelmiştir[191].

Çalışmamızda 96-kuyucuklu plaka metodu kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için, 10 mg Gallik asit 100 mL distile suda çözülerek stok solüsyonu (100 µg/mL) hazırlandı. Sonra bu solüsyondan 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL standart seri dilüsyonları hazırlandı. Test çözeltisinden ve standart seri solüsyonundan 20 µL 96 kuyucuklu plağa konuldu. Sonra 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek 5dk bekletildi. 80 µL %7,5 Sodium karbonat solüsyonu eklendikten sonra, plağın kapağı kapatılarak, oda ısısında karanlıkta 2

saat beklettikten sonra, 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik mikropilaya okuyucuda absorbansı okundu. Total fenol miktarı galik asit eşdeğeri olarak mg/g cinsinden hesaplandı.

Total flavonoit miktar tayini (TFC)

Flavonoitler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit ($O\cdot$), lipid alkoksil ($RO\cdot$) ve peroksil ($ROO\cdot$), nitrik oksit ($NO\cdot$) radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α - tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonlara sahiptir[192, 193]. Flavonoitler, glikozitler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarlar, sıcak asit ve enzimlerle sırasıyla aglikon ve şekere parçalanabilirler. Fenolik antioksidanlar, lipid radikallere, hızla H^+ vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi lipid peroksi ($ROO\cdot$) ve alkoksil ($RO\cdot$) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır[194].

Test numunelerinin total flavonoit miktar tayini alüminyum klorür kolorimetrik yöntemiyle kersetin'i referans madde olarak kullanılarak gerçekleştirildi[195]. Bu metodun prensibi oluşan flavonoit-alüminyum kompleksinin 415nm'deki maksimum absorbansının ölçülmesidir[196].

%75'lik etanol'de çözülen test numunelerinden (2 mg/ml) tüplere 0,5 ml alındı, üzerine sırasıyla 1,5 mL etanol (%75), 0,1 mL %10'luk $AlCl_3$, 0,1mL 1M sodyum asetat ve 2,8 ml distile su eklenerek karıştırıldı. Karşım oda ısısında 30 dakika bekletildi ve 415 nm dalga boyunda absorbansı okundu. Kalibrasyon eğrisi kersetin'in metanol'deki 0,0625 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml seri çözeltisi oluşturuldu. Test numunelerindeki total flavonoit konsantrasyonu kersetin eşdeğeri olarak mg/g ekstre $\pm$ standart sapma olarak hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirmeler

Deney sonuçları değerlendirilirken tek yönlü "ANOVA" testini içeren "Instat" (Windows) istatistik programı ve 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:

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

Echium türlerindeki şikonin türevlerinin YBSK ile miktar tayinleri

Şikonin türevlerinin YBSK ile yapılan kalitatif ve kantitatif analizleri üzerinde yapılan literatür çalışmasında, C₁₈ kolon kullanıldığı görülmüştür. Çalışmamızda izole ettiğimiz maddelerin bitkilerdeki miktar tayini yapmak amacıyla C₁₈ kolon kullanılmıştır. İncelenen şikonin türevlerinin en kısıasürede ve en iyi şekilde ayrımının yapılabilmesi için bir dizi çözücü sistemi denenmiştir. Optimum ayırım için seçilen analiz koşulları aşağıdaverilmiştir (Bkz. Çizelge 3.6).

HPLC analiz koşulları

Çizelge 3.6. YBSK analiz koşulları

Cihaz	Agilent Technologies (Santa Clara, CA) 1200 Series
Pompa	G1311A
Kolon ısıtıcısı	G1316A
Degazör	G1322A
Manuel enjektör	G1328B
Kolon	ACE 5µ, C ₁₈ (150mm X 4,6mm)
Enjeksiyon hacmi	10µl
Kolon sıcaklığı	25 ⁰ C
Akış hızı	1ml/dk
Dedektör	G1314B serisi değişen dalga boylu UV dedektör
Çalışılan dalga boyu	520nm
Mobil faz	Asetonitril: Su (0,1M asetik asit, pH=2,82) = 70:30
Analiz süresi	20dk

Analizler için çözücü sistemi hazırlanırken YBSK saflığında asetonitrilkullanılmıştır. Bidistile su bidistile su cihazından elde edilmiştir. 0,1 M asetik asit ilavesinden sonra (pH=2,82) çözücüler Millipore süzme sistemi ile 0,45 µm filtreden süzülerek, ultrasonik banyoda 30 dk degaze edildikten sonra sisteme verilmiştir.

Kullanılan çözücüler

Asetonitril: Merck (YBSK saflığında)

Bidistille su

Analiz numunelerinin hazırlanması

Echium türlerinden yukarıda belirlildiği şekilde hazırlanan etanollü ekstrelerden 100 mg civarında tam tartım alındı, üzerlerine 15ml metanol eklenip ultrasyonda 30 dk bekletildikten sonra HPLC saflığındaki metanol ile 50 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler 0,45 µm PTFE membran filtrelerden süzüldü. Hazırlanan çözeltilerden 10 µl alınıp, üçer defa sisteme enjekte edilerek analizi yapıldı.

Miktar tayini için kalibrasyon eğrisinin oluşturulması

Analizi yapılacak olan standard maddelerden 2 mg hassas olarak tartım alınarak, balon jode üzerlerine asetonitril eklenerek 1000 ppm konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden hareketle: 1, 2, 5, 6,25, 10, 12,5, 20, 25, 50, 75, 100, 500 ppm konsantrasyonlarda standart madde çözeltileri hazırlanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için hazırlanan çözeltilerdenher biri 10 µl'lik miktarlarda 3'er defa sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası elde edilen pik alanlarının ortalaması alınarak, her bir konsantrasyona (x) karşılık gelen pik alanları ortalaması (y) kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Böylece, standart maddeler için doğru denklemi ve r^2 değeri bulunmuştur. $y=mx+n$ doğru denkleminde hareketle, ekstrelerdeki miktarları hesaplanmıştır. Şikinin türevleri için analizlerde kullanılan optimum dalga boyu 520 nm olarak belirlenmiştir.

Şikonine ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi ve doğru denkleminin hesaplanması

2.0 mg şikonin (*Shanghai Pureone Biotech Co. Ltd [20120503]*) hassas olarak tartılıp 1000 ppm konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle; 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm, 5 ppm ve 2 ppm konsantrasyonlarda şikonin çözeltileri hazırlanıp, her biri 10 µl'lik miktarlarda 3'er defa sisteme verilmiştir. Enjeksiyon sonrası elde edilen pik alanlarının ortalaması alınarak, herbir konsantrasyona (x) karşılık gelen pik alanları ortalaması (y) kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Böylece, şikonin için doğru denklemi ve r^2 değeri bulunmuştur. $Y=mx+n$ doğru denkleminde hareketle, ekstrelerdeki şikonin miktarı hesaplanmıştır. Şikonin için analizlerde kullanılan optimum dalga boyu 520 nm olarak belirlenmiştir.

Asetilşikonine ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi ve doğru denkleminin hesaplanması

2.0 mg asetilşikonin (*Shanghai Pureone Biotech Co. Ltd [24502-78-1]*) hassas olarak tartılıp 1000 ppm konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle; 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2 ppm ve 1 ppm konsantrasyonlarında asetilşikonin çözeltileri hazırlanıp, her biri 10 µl'lik miktarlarda 3'er defa sisteme verilmiştir. Enjeksiyon sonrası elde edilen pik alanlarının ortalaması alınarak, herbir konsantrasyona (x) karşılık gelen pik alanları ortalaması (y) kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Böylece, asetilşikonin için doğru denklemi ve r^2 değeri bulunmuştur. $y=mx+n$ doğru denkleminde hareketle, ekstrelerdeki asetilşikonin miktarı hesaplanmıştır. Asetilşikonin için analizlerde kullanılan optimum dalga boyu 520 nm olarak belirlenmiştir.

Deoksişikonine ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi ve doğru denkleminin hesaplanması

2.0 mg deoksişikonin (Taraşımızdan izole edilmiş ve saflığı YBSK ile kontrol edilmiştir. Saflık %98) hassas olarak tartılıp 1000 ppm konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle; 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 5

ppm ve 2 ppm konsantrasyonlarda deoksişikinin çözeltileri hazırlanıp, her biri 10 µl'lik miktarlarda 3'er defa sisteme verilmiştir. Enjeksiyon sonrası elde edilen pik alanlarının ortalaması alınarak, herbir konsantrasyona (x) karşılık gelen pik alanları ortalaması (y) kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Böylece, deoksişikinin içindoğru denklemi ve r^2 değeri bulunmuştur. $y=mx+n$ doğru denkleminde hareketle, ekstrelerdeki deoksişikinin miktarı hesaplanmıştır. Deoksişikinin için analizlerde kullanılan optimum dalga boyu 520 nm olarak belirlenmiştir.

Dimetilakrilşikinin (DMAS)'e ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi ve doğru denkleminin hesaplanması

2.0 mg dimetilakrilşikinin (*Shanghai Pureone Biotech Co. Ltd [24502-79-2]*) hassas olarak tartılıp 1000 ppm konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden hareketle; 25 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm ve 2 ppm konsantrasyonlarda dimetilakrilşikinin çözeltileri hazırlanıp, her biri 10 µl'lik miktarlarda 3'er defa sisteme verilmiştir. Enjeksiyon sonrası elde edilen pik alanlarının ortalaması alınarak, herbir konsantrasyona (x) karşılık gelen pik alanları ortalaması (y) kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Böylece, dimetilakrilşikinin için doğru denklemi ve r^2 değeri bulunmuştur. $y=mx+n$ doğru denkleminde hareketle, ekstrelerdeki dimetilakrilşikinin miktarı hesaplanmıştır. Dimetilakrilşikinin için analizlerde kullanılan optimum dalga boyu 520 nm olarak belirlenmiştir.

2-metil-n-butirilşikinin(MBS) ve İzovalerilşikinin(IVS)'e ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi ve doğru denkleminin hesaplanması

2.0 mg 2-metil-n-butirilşikinin (MBS) ve İzovalerilşikinin (IVS) karışımı (Taraflımızdan izole edilmiş, saflığı YBSK ile kontrol edilmiştir. pikin % alan toplamı %99) hassas olarak tartılıp 1000 ppm konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden hareketle; 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm ve 6,25 ppm konsantrasyonlarda MBS ve IVS çözeltileri hazırlanıp, her biri 10 µl'lik miktarlarda 3'er defa sisteme verilmiştir. Enjeksiyon sonrası elde edilen pik alanlarının ortalaması alınarak, herbir konsantrasyona (x) karşılık gelen pik alanları ortalaması (y) kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Böylece, MBS ve

IVS için doğru denklemi ve r^2 değeri bulunmuştur. $y=mx+n$ doğru denkleminde hareketle, ekstrelerdeki MBS ve IVS miktarı hesaplanmıştır. MBS ve IVS için analizlerde kullanılan optimum dalga boyu 520 nm olarak belirlenmiştir.

Analitik Metodun Validasyonu

Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı test sonuçlarından doğrudan elde edilerek ya da çok iyi tanımlanmış matematiksel derişimleri belli, belirli bir sırada verilen örnekler içinde analitin değişik konsantrasyondaki örneklerinden elde edilir. Korelasyon katsayısı (r^2) doğrusallığı veren parametrelerdir. Doğrusallığın sağlanması için " r^2 " veya " r " değerinin mümkün olduğunca 1'e yakın olması ve analitik cevap değerlerinin çizilen doğru üzerinde yer alması gerekmektedir.

Kesinlik

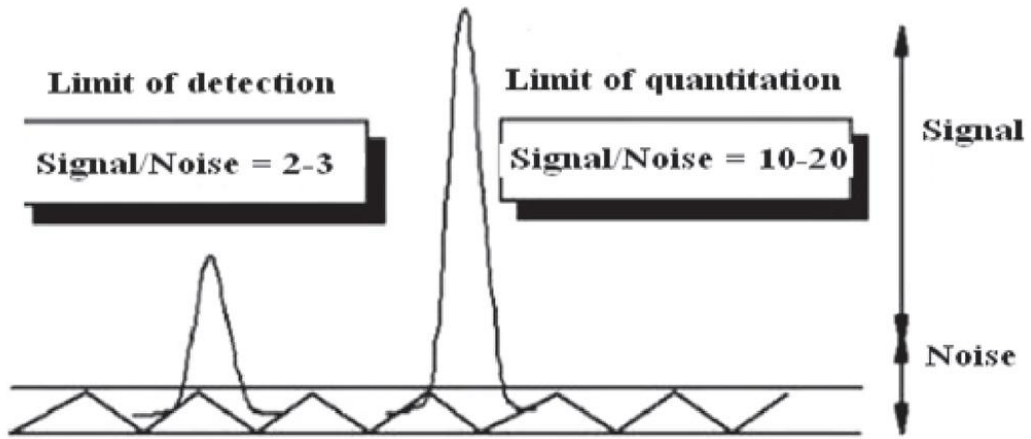
Yöntemin kesinliği, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Yöntem kesinliği, standartların onayladığı bir dizi farklı ölçümün test sonuçlarına etkisidir. Kesinlik için kabul edilen kriter analizin tipine dayanır. Sonuçlar % BSS (Bağıl Standart Sapma) olarak ifade edilir. Deney sonuçlarının % BSS sı teorik değerleri %5'inden daha fazla sapma göstermemelidir.

Tayin Sınırı (Limit of Detection- LOD)

Analitin analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur[197]. Tayin sınırının belirlenmesi aletli ve aletsiz olmak üzere yöneme göre değişir. Aletli işlemlerde bilinen en düşük konsantrasyonda analit içeren örnek sonuçlarının kör sonuçlarıyla karşılaştırılmasıyla yani sinyal/gürültü oranı ile belirlenir. Genelde sinyal/gürültü oranı 2:1 veya 3:1 olarak kabul edilir. Tayin sınırının hesaplanmasında diğer bir yöntem, kör örneklerinin analizlenerek analitikgeri zemin cevabının ölçülmesi ve bu değerin standart sapmasının 2 veya 3 gibi faktörleçarpılmasıdır.

Niceleme sınırı (Limit of Quantitation- LOQ)

Analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayinedilebilecek en düşük konsantrasyonudur. Analitin bilinen miktarlarla azaltılmasıyla hazırlanan örnekler ölçülür ve kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğa sahip en düşük miktar tespit edilir. Niceleme sınırı genelde varyasyon katsayısı ile varyasyon katsayısının % 15-20 yi aşan konsantrasyonlarıyla ifade edilir. Pek çok durumda niceleme sınırı, tayin sınırının iki, üç katıdır.

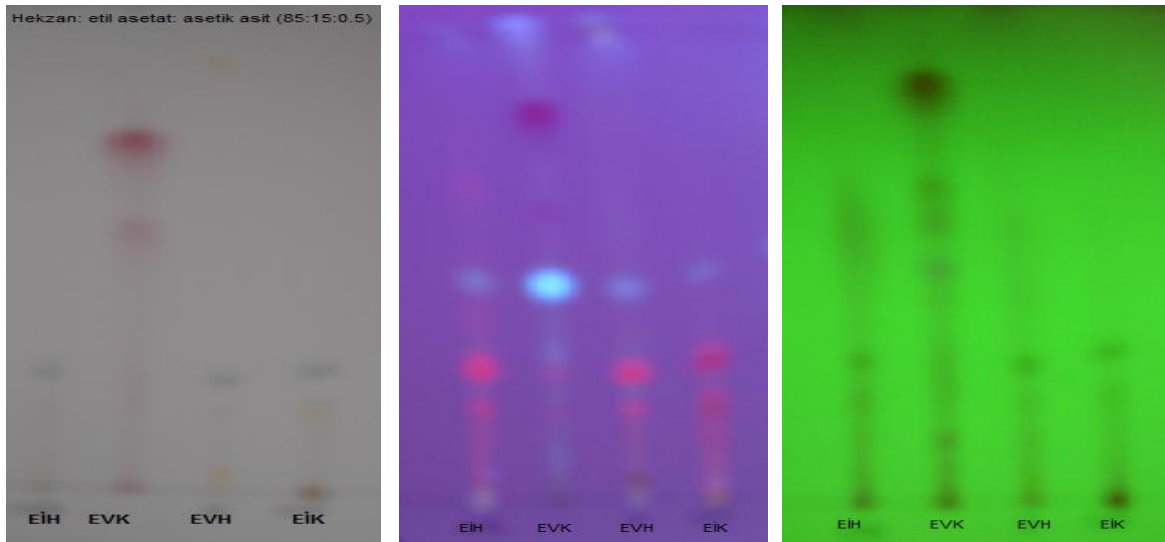


Şekil 3.6. Sinyal/Gürültü oranına göre LOD ve LOQ

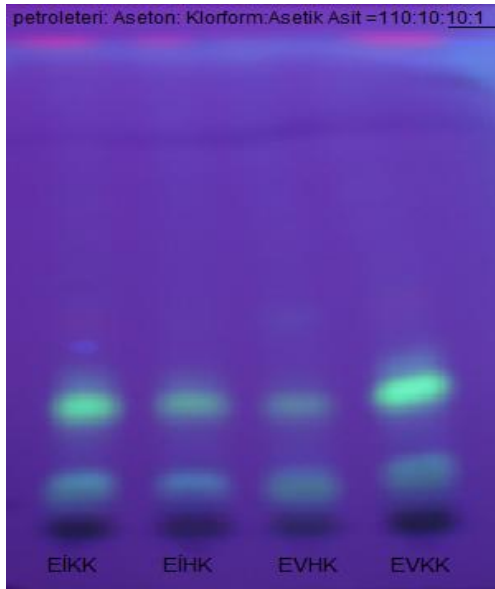
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Fitokimyasal Çalışma Sonuçları

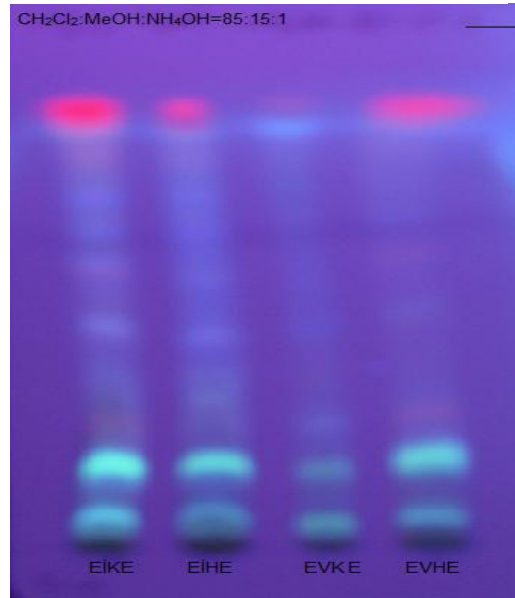
4.1.1. *Echium* türlerin İTK ile incelenmesi



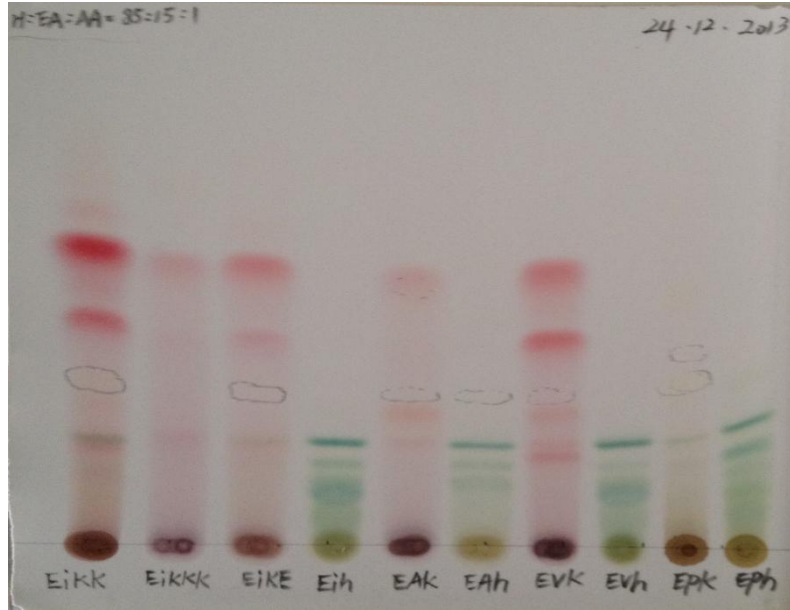
Şekil 4.1. *E.italicum* L. ve *E.vulgare* L. kök ve herbalarından hazırlanan hekzan, aseton ve su ekstraktlarının İTK görünümü (gün ışığı, UV 254 nm ve UV 366 nm)



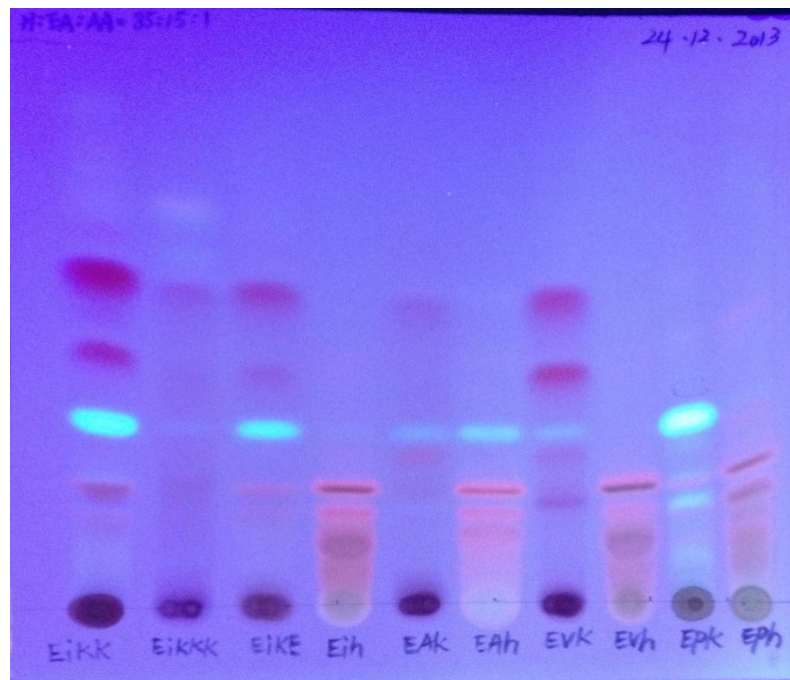
Şekil 4.2. *E.italicum* L. ve *E.vulgare* L. kök ve herbalarından hazırlanan kloroform ekstraktının İTK görünümü; UV 366nm



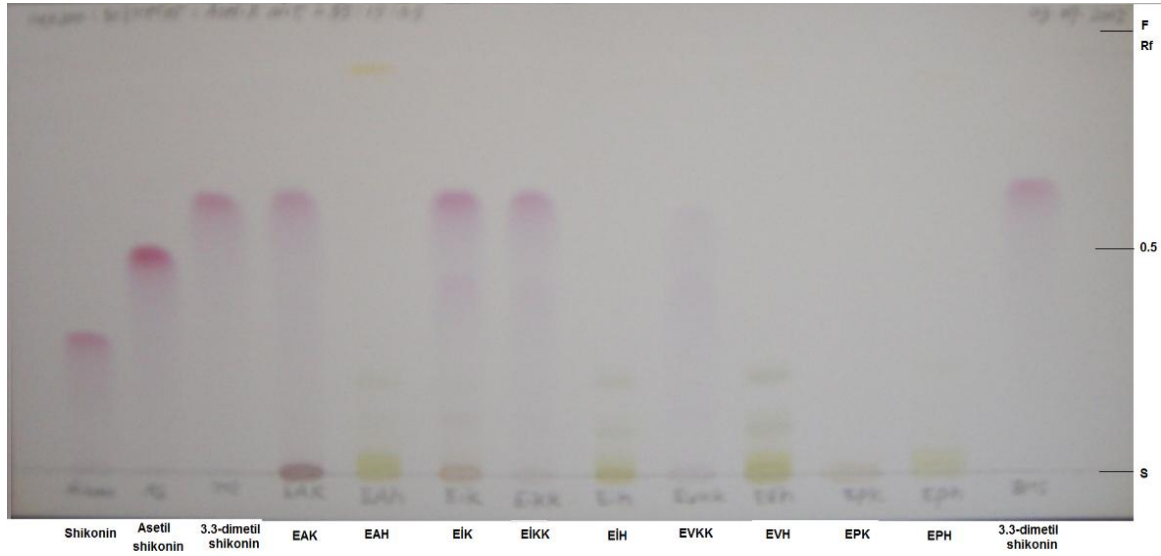
Şekil 4.3. *E.italicum* L. ve *E.vulgare* L. kök ve herbalarından hazırlanan etanol ekstraktının İTK görünümü; UV 366nm



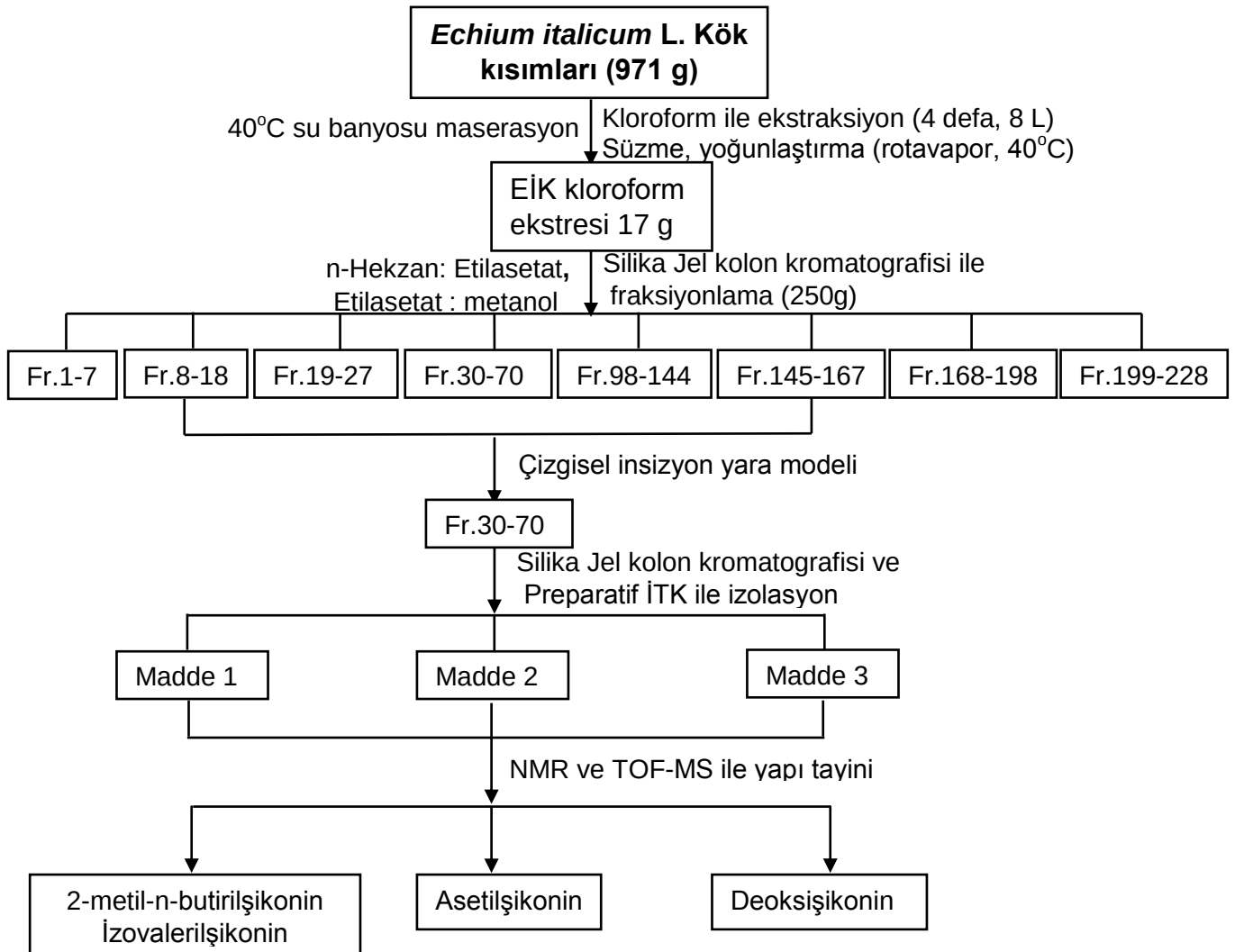
Şekil 4.4. Dört *Echium* türünün kök ve toprak üstü kısımları etanol ekstralarının İTK görüntüsü



Şekil 4.5. Dört *Echium* türünün toprak üstü ve kök kısımlarının etanol ekstresinin İTK görünümü

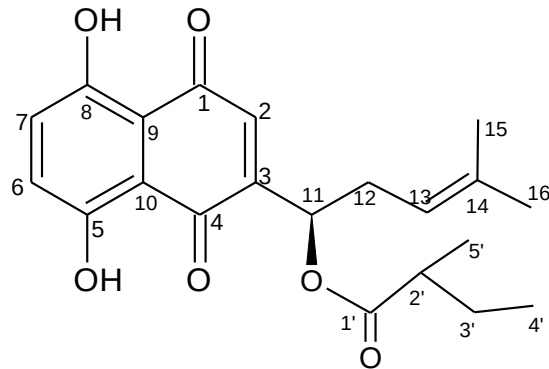


Şekil 4.6. Dört *Echium* türünün kök ve toprak üstü kısımları etanol ekstratlarının standart maddelerle beraber İTK görüntüsü

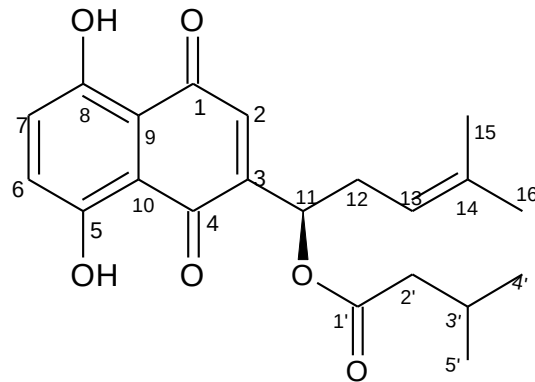


Şekil 4.7. *E.italicum* L. kök kısımlarından bileşiklerin izolasyon şeması

4.1.2. *E.italicum* L. kök kloroform ekstresinden izole edilen bileşiğin yapı tayinine ilişkin bulgular



Şekil 4.8. 2-metil-n-butirilşikoinin (M1)



Şekil 4.9. İzovalerilşikoinin (M2)

Madde1	2-metil-n-butiril şikonin + izovaleril şikonin (M1 + M2)
Formül	$C_{21}H_{24}O_6$
Molekü ağırlığı	MBS (372,41); IVS (372,42)
LC-TOF MS m/z	371,15 M ⁺ , Şekil 4.12 (2-metil-n-butiril şikonin)
LC-TOF MS m/z	371,15 M ⁺ , Şekil 4.13 (izovaleril şikonin)
¹H NMR	Şekil 4.10, Çizelge 4.1, 4.2
¹³C NMR	Şekil 4.11, Çizelge 4.1, 4.2

Madde 1: Koyu kırmızı renkli toz, hekzan, etilasetat, kloroform ve metanolde çözünür, bazik ortamda maviye dönüşür. Bileşiğin İTK analizinde maddenin kırmızı renk göstermesi, UV altında da koyu kırmızı renk gözlenmesi, %5'lik sülfürik asit revelatörü püskürttükten sonra 105°C 'de 1-2 dakika ısıtılmasından sonra rengin koyulaşması bu bileşiğin naftokinon türevi bileşik olabileceğini göstermektedir. Alkalın tanıma reaksiyonu (%25 (w/v) NaCO₃, %4 HCHO(v/v), %5 (v/v) Orto-nitrobenzen'in benzen solüsyonundan birkaç damla ve çok az miktar numune ekleyip sıcak su banyosunda bekletince, 1-4 dk içinde mavi viyole renk vermesi) pozitif sonuç vermesi naftokinon bileşiği olduğunu gösterir. Ayrıca alkali ortamda maviye, asit ilave edince kırmızıya dönüşmesi naftokinon türevi bileşik olabileceği düşünülmüştür.

Molekülün negatif iyon TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.12, 4.13) gözlenen m/z 371,1501 M⁻ ve m/z 371,1512 M⁻ sinyali, ¹H NMR (Şekil 4.10, Çizelge 4.1, 4.2) ve ¹³C NMR (Şekil 4.11, Çizelge 4.1, 4.2) spektrumları ile birlikte yorumlandığında molekül formülü C₂₁H₂₄O₆ olarak belirlenmiştir ve bu maddenin M1 ve M2 iki izomer bileşiğinin karşımı olduğu anlaşılmaktadır.

¹H-NMR spektrumunda düşük alanda gözlenen δ_H 6,95 (1H, s, J= 1,0) ve δ_H 7,18 (2H, s) sinyalleri aromatik halka üzerinde yer alan 3 farklı protona aittir. δ_H 12,45 ve δ_H 12,25' te gözlenen birer protonluk singlet sinyal ise –OH taşıyan 5. ve 8. konumdaki protonlara aittir. δ_H 6,05 ve δ_H 6,07'da gözlenen 1 protonluk triplet sinyal ise naftokinon ana halkaya komşu karbon üzerindeki (H11) protonlara aittir. δ_H 5,07 ve δ_H 5,096'da gözlenen sinyal olefinik çifte bağ taşıyan, naftokinon ana yapıya bağlı yan zincir üzerindeki (H13) protonlara aittir. δ_H 0,92-1,70 arasında gözlenen 3 proton değerindeki singletler yan zincir üzerindeki metil grubu protonlara ait olduğu düşünülmüştür. δ_H 2,48'da gözlenen multipil bandın M1 bileşiğin metil grubu bağlanan karbon üzerindeki (H2') proton sinyalini vermektedir. δ_H 2,12-2,28 arasında gözlenen çoklu pikler ve δ_H 0,92'de gözlenen 6 proton değerindeki dubletler M2 bileşiğindeki H2'~H5' proton sinyallerini vermektedir.

¹³C-NMR spektrumunda düşük alanda gözlenen δ_C 178,36 ve 176,94 karbonil grup sinyalleri naftokinon ana yapısına ait sinyalleri vermektedir. δ_C 175,1 ve 171,6

sinyalleri ise naftokinon ana halkaya bağı yan zincir üzerindeki karbonil grubu sinyalını vermektedir.

Tüm veriler birleştirilerek değerlendirildiğinde, madde 1'in 2-metil-n-butil şikonin (M1) ve izovalerilşikonin (M2)' in karşımı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler literatürde kayıtlı değerler ile uyum göstermektedir[23,24].

Albrehet ve arkadaşlarına göre [23] 2-metil-n-butil şikonin (MBS) ve izovalerilşikonin (İVS)' in ^1H (CDCl_3 , 297,8 MHz) ve ^{13}C (CDCl_3 , 74,9 MHz) NMR spektroskopik değerleri Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. 2-metil-n-butirilşikonin (Madde 1 [M1]'in) ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) ve ^{13}C -NMR(CDCl_3 , 75 MHz) spektroskopik Değerleri

H/C	Yapı	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	C	-		176,94
2	CH	6,95	d, J=1,1	131,28
3	C	-		148,54
4	C	-		178,36
5	C, OH	12,45	s	166,83
6	CH	7,18	s	132,49
7	CH	7,18	s	133,51
8	C,OH	12,25	s	167,41
9	C	-		111,6
10	C	-		111,9
11	CH	6,07	t, J=7,2	69,07
12	CH ₂	2,36-2,60	m	32,92
13	CH	5,096	t, J=6,5	117,99
14	C	-		135,68
15	CH ₃	1,59	s	25,69
16	CH ₃	1,70	s	17,85
1'	C	-		175,1
2'	CH	2,48	m	41,13
3'	CH	1,48	m	26,56
4'	CH ₃	0,92	t	11,6
5'	CH ₃	1,28	d	18,76

Çizelge 4.2. İzovalerilşikonin (Madde 1 [M2]'in) ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) ve ^{13}C -NMR(CDCl_3 , 75 MHz) spektroskopik Değerleri

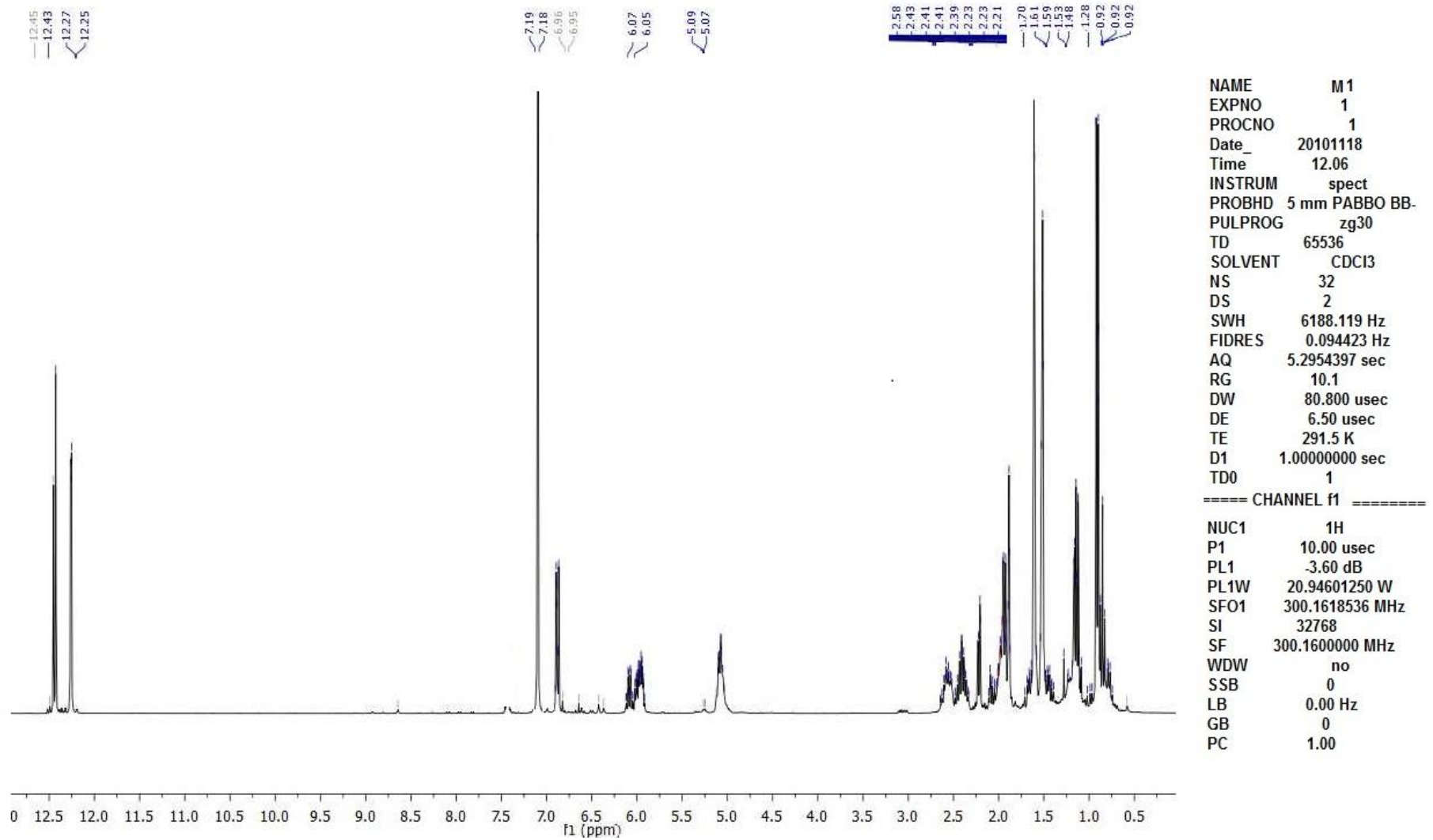
H/C	Yapı	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	C	-		177,16
2	CH	6,96	d, J=1,1	131,42
3	C	-		148,42
4	C	-		178,59
5	C, OH	12,43	s	166,23
6	CH	7,19	s	132,52
7	CH	7,19	s	132,34
8	C,OH	12,27	s	166,76
9	C	-		111,6
10	C	-		111,9
11	CH	6,05	t, J=7,2	69,14
12	CH ₂	2,457-2,58	m	43,23
13	CH	5,07	m, J=6,5	118,07
14	C	-		135,8
15	CH ₃	1,61	s	26,56
16	CH ₃	1,53	s	18,77
1'	C	-		171,60
2'	CH	2,23-2,28	d	43,23
3'	C	2,12	m	25,67
4'	CH ₃	0,92	d	22,27
5'	CH ₃	0,92	d	22,29

Çizelge 4.3. 2-metil-n-butiril şikonin'in ^1H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri [23, 24]

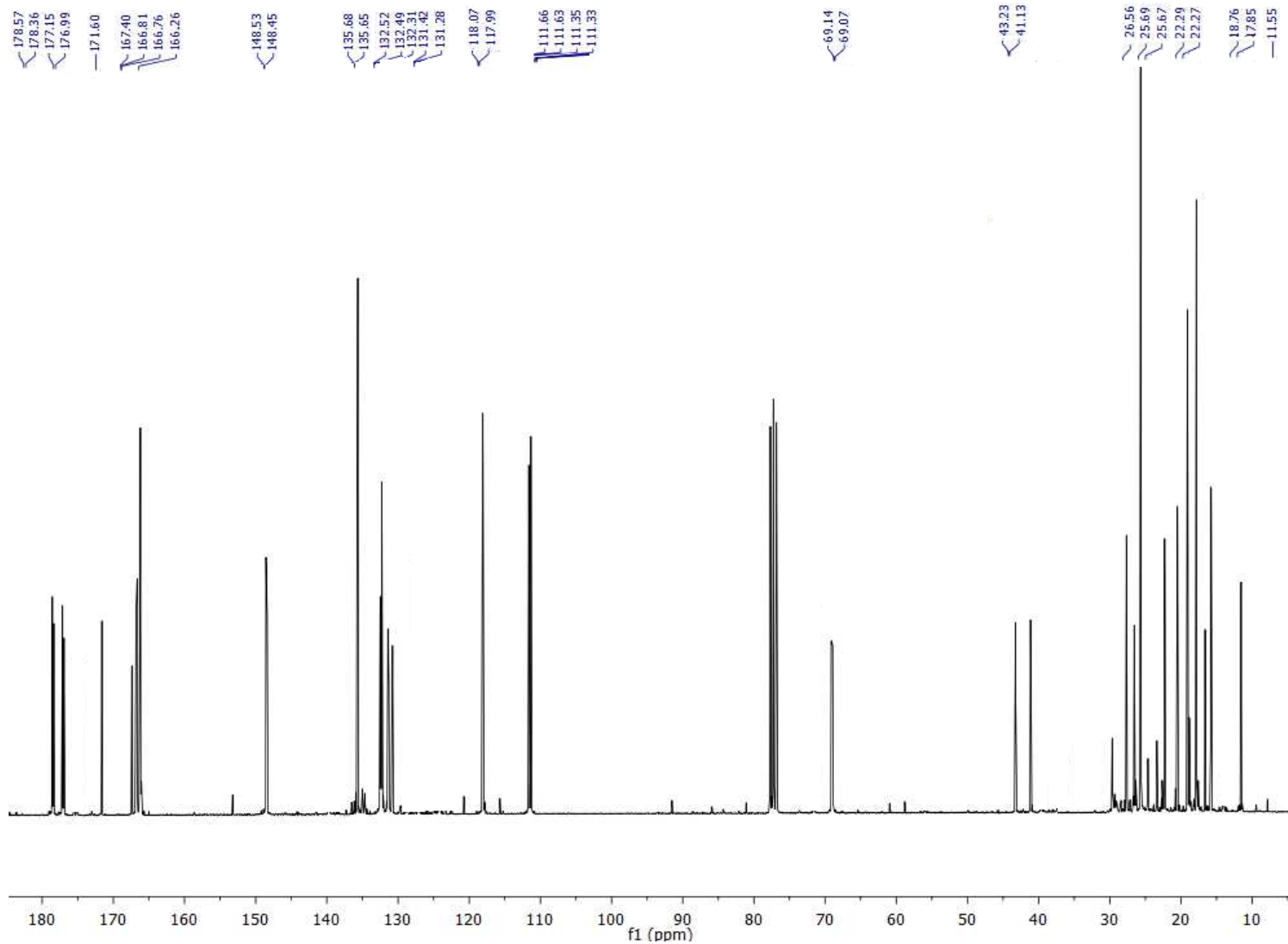
H/C	Yapı	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	C	-		176,7
2	CH	6,98	d, J=1,1 Hz	131,3
3	C	-		148,6
4	C	-		178,2
5	C, OH	12,59	s	166,9
6	CH	7,19	s	132,7
7	CH	7,19	s	132,8
8	C,OH	12,42	s	167,4
9	C	-		111,6
10	C	-		111,8
11	CH	6,04	ddd(J=1,0,4,5, 7,3Hz)	69,0
12	CH ₂	2,47, 2,62	m	33,0
13	CH	5,13	m (J=6,5)	117,8
14	C	-		135,9
15	CH ₃	1,59	d (J=1,0Hz)	25,91
16	CH ₃	1,69	d (J=1,1Hz)	17,57
1'		-		175,50
2'	CH	2,47	m	41,13
3'	C	1,50	m	26,4
4'	CH ₃	0,92	t(J=7,4Hz)	11,6
5'	CH ₃	1,20	d(J=7,0Hz)	18,4

Çizelge 4.4. İzovalerilşikoinin'in ^1H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri [23, 24]

H/C	Yapı	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	C	-		176,7
2	CH	6,99	d, J=1,1Hz	131,4
3	C	-		148,5
4	C	-		178,2
5	C, OH	12,59	s	166,9
6	CH	7,18	s	132,7
7	CH	7,18	s	132,8
8	C,OH	12,42	s	167,4
9	C	-		111,6
10	C	-		111,8
11	CH	6,04	ddd(J=1,0,4,5, 7,4Hz)	69,2
12	CH ₂	2,47, 2,61	m	33,0
13	CH	5,12	m	117,8
14	C	-		136,0
15	CH ₃	1,58	d(J=1,0Hz)	25,75
16	CH ₃	1,68	d(J=1,1Hz)	18,17
1'		-		171,62
2'	CH	2,27, 2,28	m	43,33
3'	C	2,13	m	25,8
4'	CH ₃	0,98	d(J=6,6 Hz)	22,3
5'	CH ₃	0,98	d(J=6,6Hz)	22,4

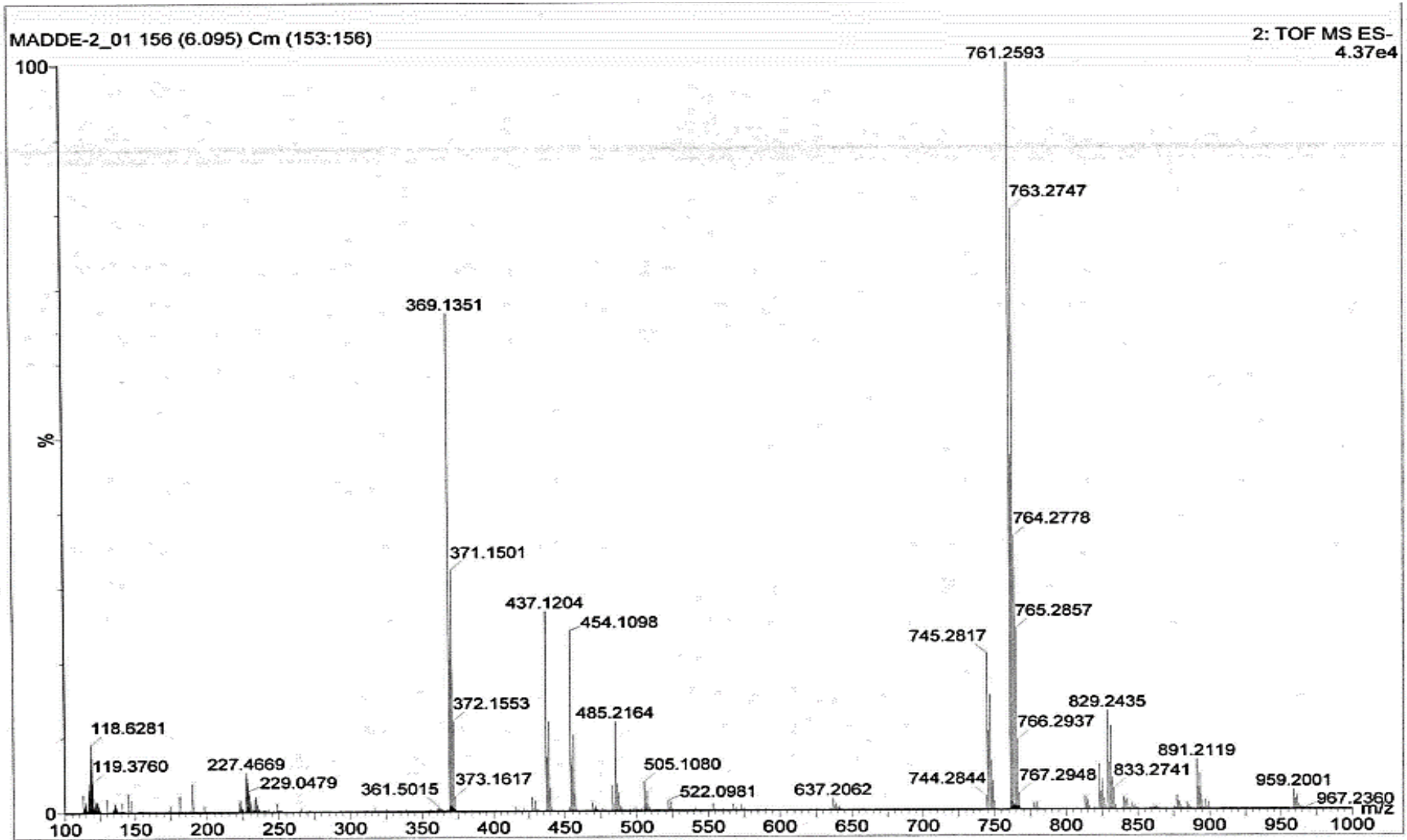


Şekil 4.10. 2-metil-n-butirilşikinin ve izovalerilşikinin (Madde 1'in) ^1H -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 300 MHz)

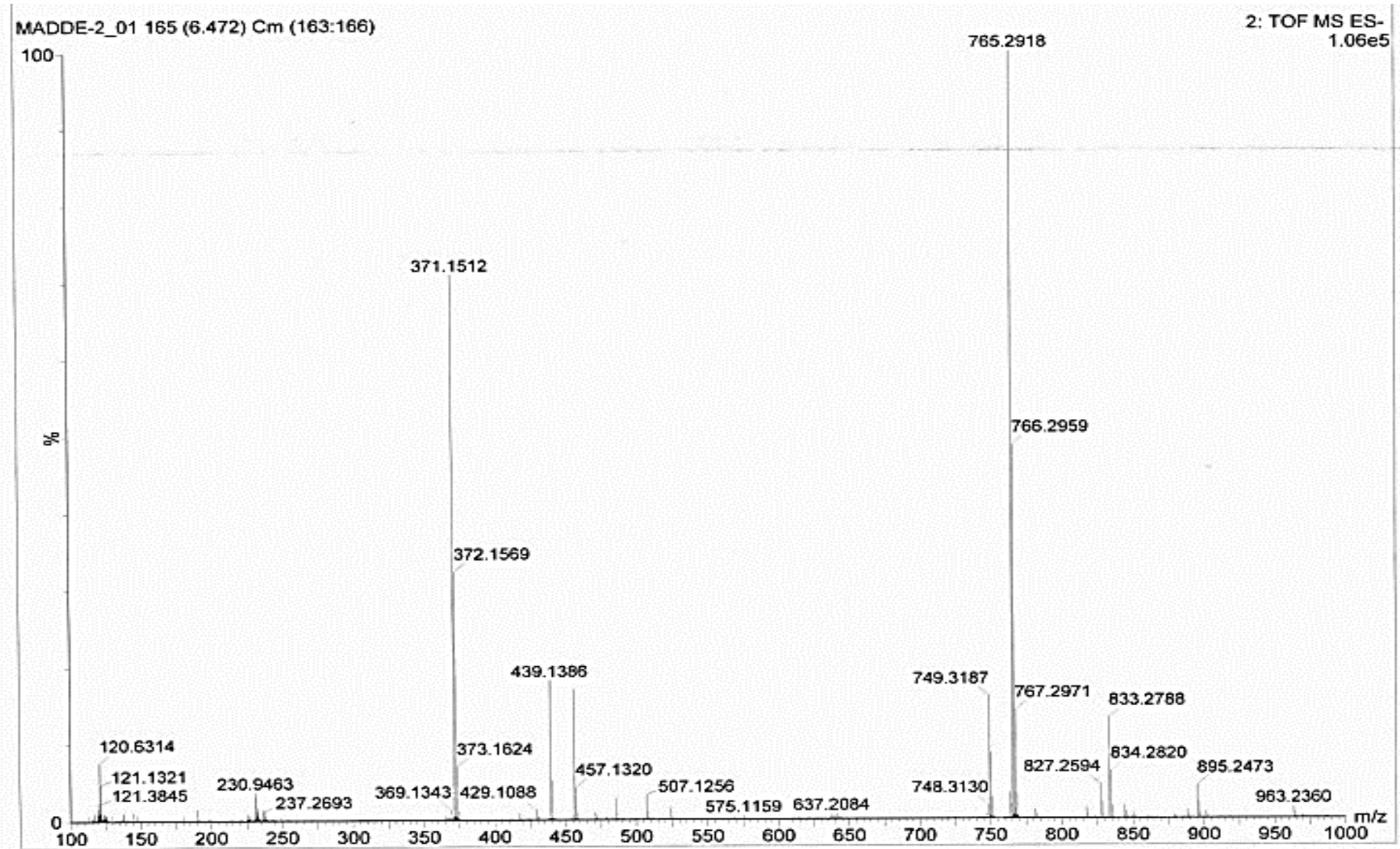


NAME M1
 EXPNO 3
 PROCNO 1
 Date 20101118
 Time 12.19
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 16384
 DS 4
 SWH 17985.611 Hz
 FIDRES 0.274439 Hz
 AQ 1.8219786 sec
 RG 5792.6
 DW 27.800 usec
 DE 6.50 usec
 TE 291.8 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TD0 1
 ===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PL1 -1.00 dB
 PL1W 36.68242264 W
 SFO1 75.4828396 MHz
 ===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 -3.60 dB
 PL12 14.46 dB
 PL13 120.00 dB
 PL2W 20.94601250 W
 PL12W 0.32741711 W
 PL13W 0.00000000 W
 SFO2 300.1612006 MHz
 SI 32768
 SF 75.4752920 MHz
 WDW EM

Şekil 4.11. 2-metil-n-butirilşikonin ve izovalerilşikonin(Madde 1'in) ^{13}C -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 75 MHz)

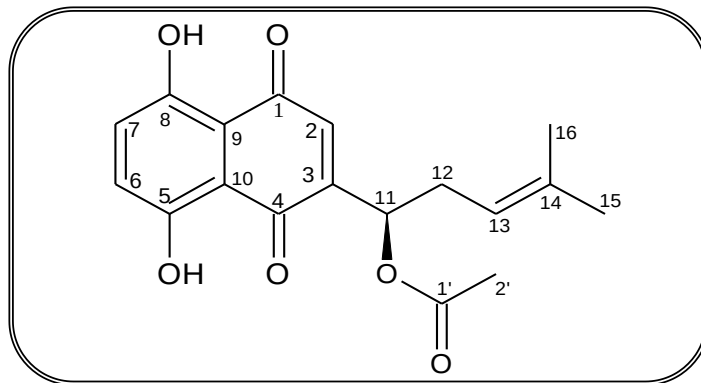


Şekil 4.12. 2-metil-n-butirilşikonin'in (M1) kütle spektrumu



Şekil 4.13. İzovalerilşikinin (M2) kütle spektrumu

Madde 2: Asetilşikoinin



Formül	$C_{18}H_{18}O_6$
Molekül Ağırlığı	330,33
1H NMR	Şekil 4.15, Çizelge 4.5
^{13}C NMR	Şekil 4.16, Çizelge 4.5
LC-TOF MS m/z	329,10 M^- , Şekil 4.17

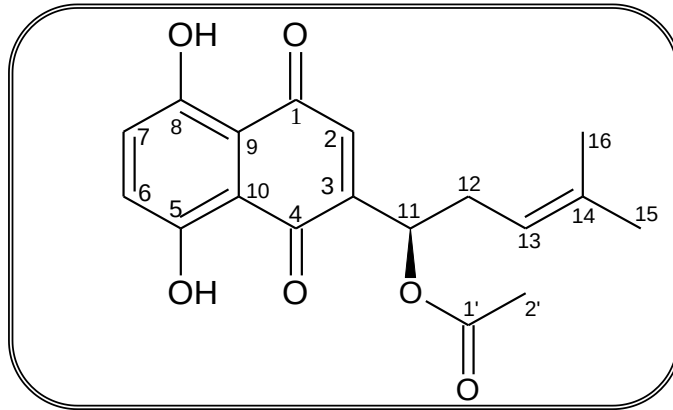
Madde 2'in n-Hekzan/ Etilasetat/ asetik asit (85:15:1) çözücü sistemi ile İTK analizinde gün ışığı ve UV altında leke kırmızı renk gösterirken, % 5'lik H_2SO_4 püskürtülen plaklara ısı uygulandığında mavi-morumsu renk almıştır. Madde kırmızı renktedir. Molekülün 1H NMR (Çizelge 4.5, Şekil 4.15) ve ^{13}C NMR (Çizelge 4.5, Şekil 4.16) spektrumları ile birlikte yorumlandığında molekül formülü $C_{18}H_{18}O_6$ olarak belirlenmiştir.

1H NMR spektrumunda en düşük alanda gözlenen δ_H 12,63 ve 12,41 sinyali iki adet fenolik -OH grubuna aittir. δ_H 5,00-7,17 arası gözlenen sinyaller literatür bilgileri ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde, bileşiğin çifte bağ taşıyan 6 üyeli siklik bir sistem olduğu anlaşılmıştır. Yüksek alan δ_H 2,14, 1,69 ve 1,59' da gözlenen üçer proton değerindeki piklerin metil grubu proton sinyaline ait olduğu düşünülmüş ve literatür bilgileri ile doğrulanmıştır.

Molekülün ^{13}C NMR spektrumunda δ_C 178,24, 176,72'da gözlenen sinyal, iki adet 6 üyeli doymamış halkadaki karbonil grubuna, δ_C 169,80 ise oksijenle bağlanmış karbonil grubuna temsil etmektedir. 167,49 ve 166,97 ppm'de görülen sinyaller – OH gurubu bağlanmış birer karbona ait olduğu (C_8 ve C_5), 130-140 ppm

arasındaki sinyallerin aromatik halka üzerindeki karbonlara, 117,7 ppm deki sinyalin ise çift bağ karbona ait olduğu sonucuna varılmıştır. Yine 15-70 ppm arasındaki sinyallerin ise alifatik karbon sinyali olduğu belirlendi.

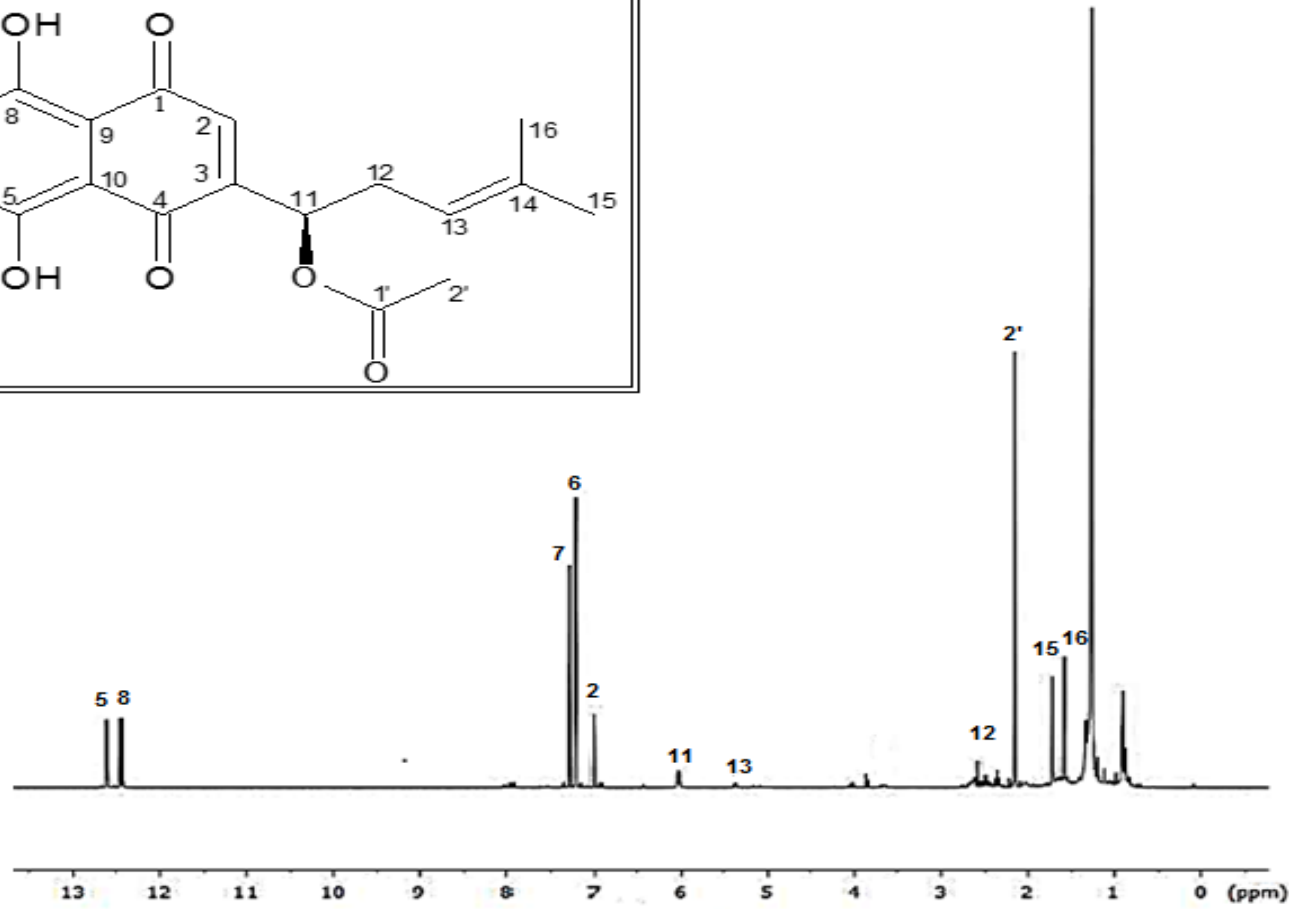
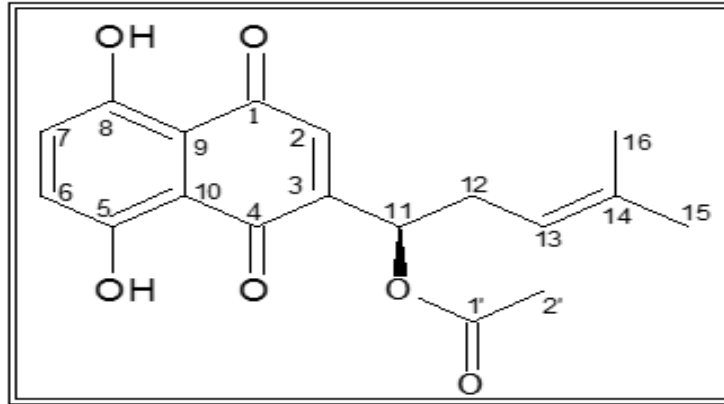
Tüm veriler birleştirilerek değerlendirildiğinde, madde 2'in yapısı Asetilşikinin olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler literatürde kayıtlı değerler ile uyum göstermektedir[198-200].



Şekil 4.14. Asetilşikinin

Çizelge 4.5. Asetilşikinin (Madde 2'in) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) ve $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) Spektroskopik Değerleri

H/C	Yapı	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	C			176,72
2	CH	6,99	d, $J=1,0$	131,47
3	C			148,23
4	C			178,24
5	C, OH	12,63	s	166,97
6	CH	7,21	s	132,75
7	CH	7,23	s	132,90
8	C, OH	12,41	s	167,49
9	C			111,59
10	C			111,59
11	CH	6,03	ddd, $J=7,0, 4,6, 1,0$	69,54
12	CH_2	2,38-2,63	m	32,81
13	CH	5,14	tm, $J=6,0$	117,67
14	C			136,15
15	CH_3	1,59	d, $J=1,0$	25,75
16	CH_3	1,69	d, $J=1,0$	17,96
1'	C			169,80
2'	CH_3	2,14	s	21,01

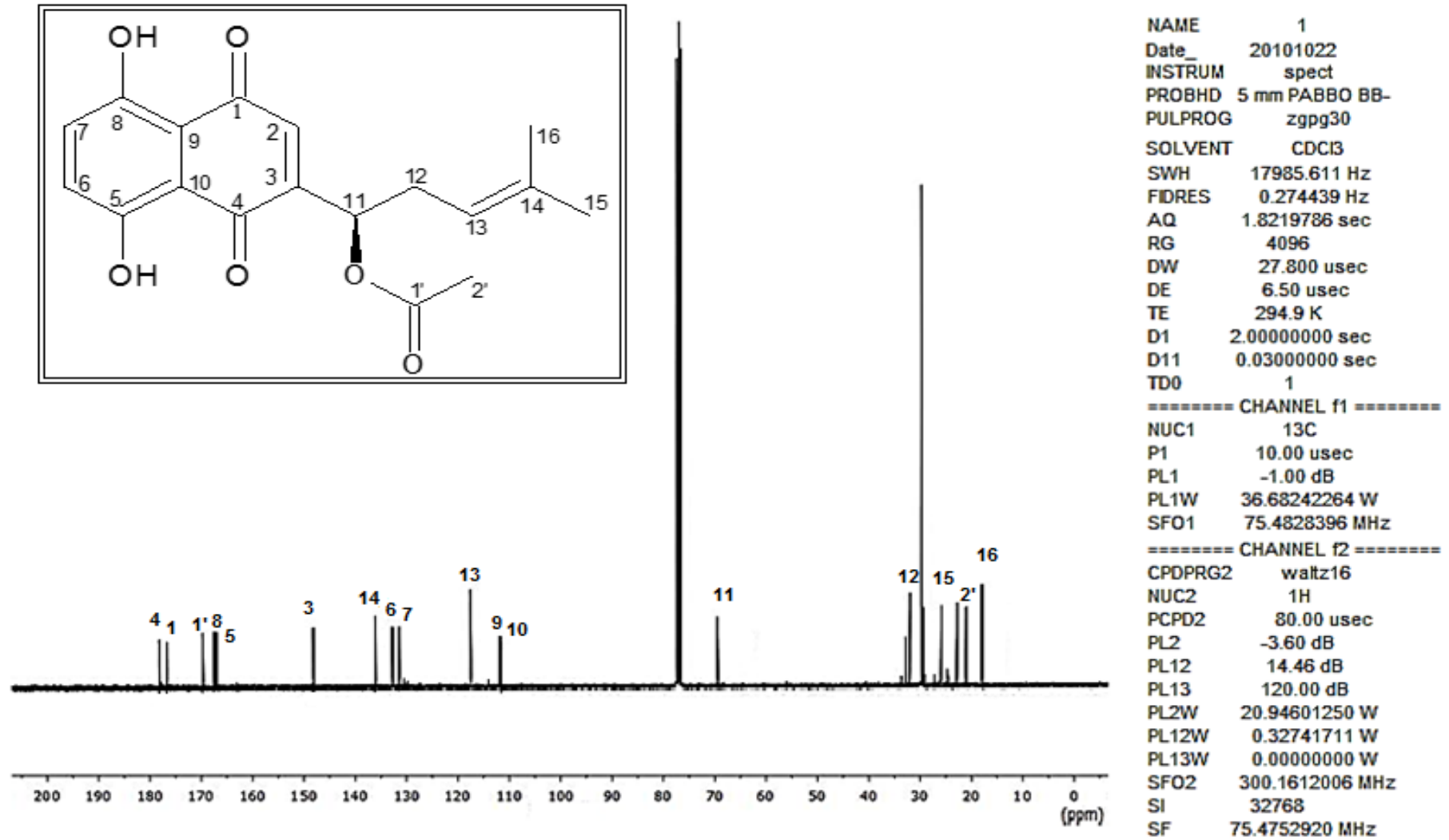


```

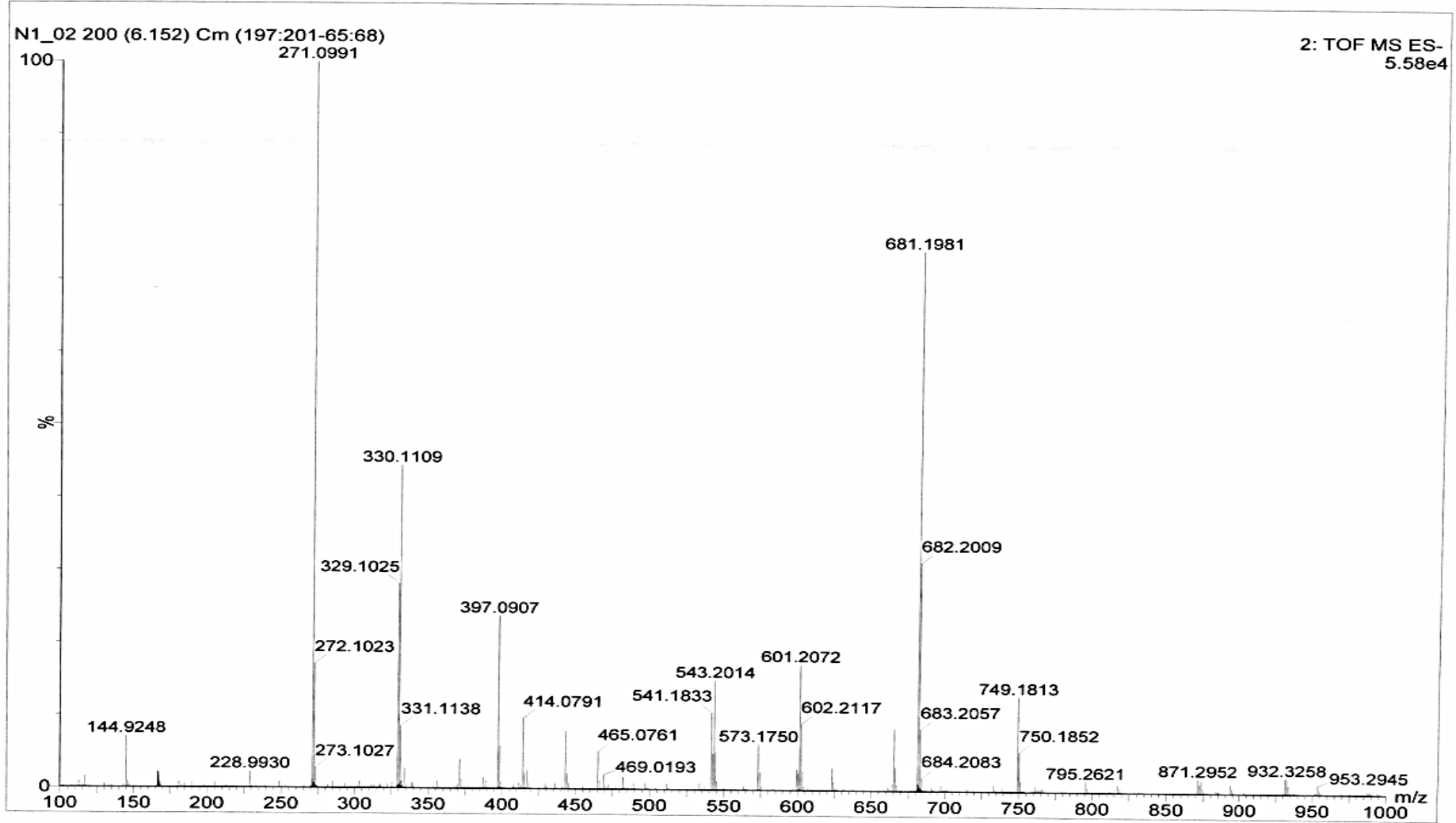
NAME      1
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20101022
Time      15.35
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB-
PULPROG   zg30
TD        65536
SOLVENT   CDCl3
NS        32
DS        2
SWH       6188.119 Hz
FIDRES    0.094423 Hz
AQ        5.2954397 sec
RG        128
DW        80.800 usec
DE        6.50 usec
TE        294.5 K
D1        1.00000000 sec
TD0       1
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        10.00 usec
PL1       -3.60 dB
PL1W      20.94601250 W
SFO1      300.1618536 MHz
SI        32768
SF        300.1600000 MHz
WDW       no
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.00

```

Şekil 4.15. Asetilşikinin (Madde 2'nin) ^1H -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 300 MHz)



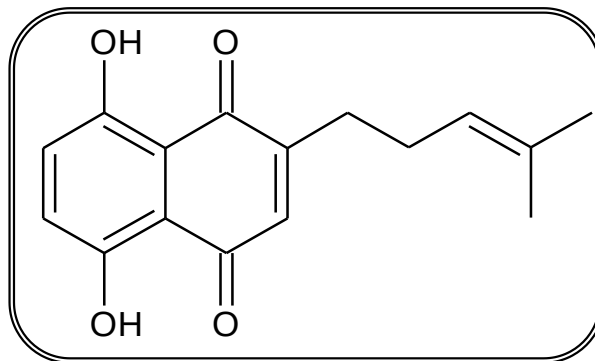
Şekil 4.16. Asetilşikinin (Madde 2'nin) ^{13}C -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 75 MHz)



Şekil 4.17. Asetilşikonin'in kütle spektrumu

Spektroskopik bulgular literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında, Madde 2'nin değerlerinin daha önce *E.pyncnanthum* Pomel'den elde edilen asetilşikinin' in spektrum değerleri ile uyumlu olduğu görülmüştür[201].

Madde 3: Deoksişikinin



Formül	$C_{16}H_{16}O_4$
Molekül Ağırlığı	272,29
1H NMR	Şekil 4.18, Çizelge 4.6
^{13}C NMR	Şekil 4.19, Çizelge 4.6
LC-TOF MS m/z	273,1108 M^+ , Şekil 4.21

Açık kırmızı renkli katı, n-hekzan, etilasetat, klorform, metanolde çözünür, bazik ortamda maviye dönüşür. 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 12,64 (1H, s), 12,48(1H, s) 5. ve 8. Konumlardaki karboksil gurubuna ait proton sinyalleridir. 6,85(1H, s), 7,21(1H, s), 7,26(1H, s) 3 tane aromatik halka proton sinyalleridir. 5,13 (1H, t, $J = 7.2$ Hz) çifte bağ proton sinyalidir. 1,60(3H, s), 1,70 (3H, s) birer adet metil grubu proton sinyalleridir. 2,31 (2H, m) ve 2,64 (2H, t, $J = 7.2$ Hz) iki adet CH_2 sinyalleridir. Fenolik hidroksil grubunun proton sinyali kimyasal kaymasının yüksek, alçak meydana çıkması, fenolik hidroksil grupları ile 1,4- karbonil grupları arasında moleküler içi hidrojen bağı oluşturduğunu ve fenolik hidroksil gruplarının α -konumda bağlandığını gösterir. 7,21 ve 7,26 (2H, s) kimyasal kaymasının çok yakın olması C_6 -H ve C_7 -H sinyallerine ait olduğu, 6,83 (1H, s) ise C_3 -H proton sinyali olduğu, 2. konumdaki protonun ise bağlı olduğunu gösterir. 1,60(3H, s),

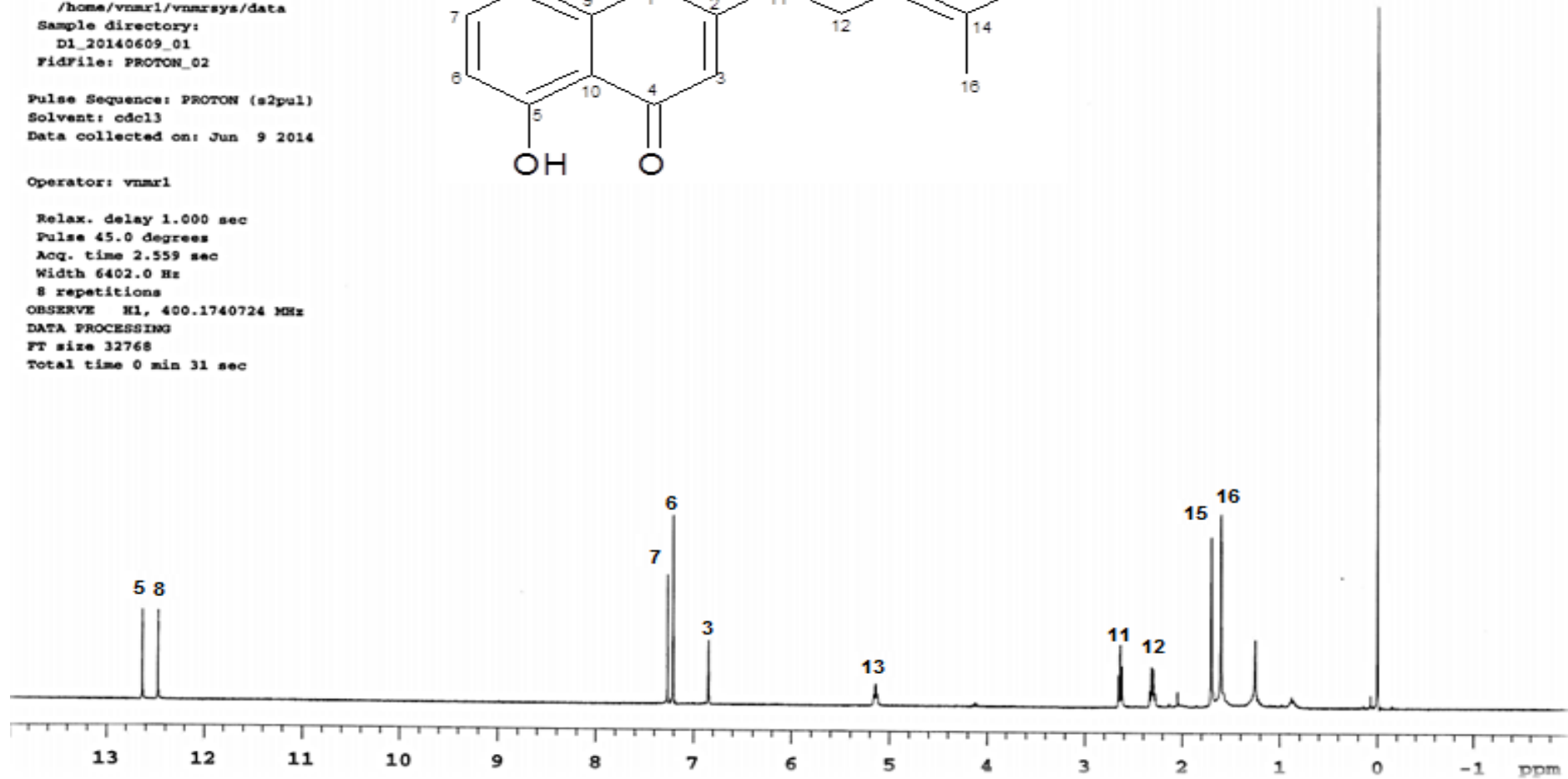
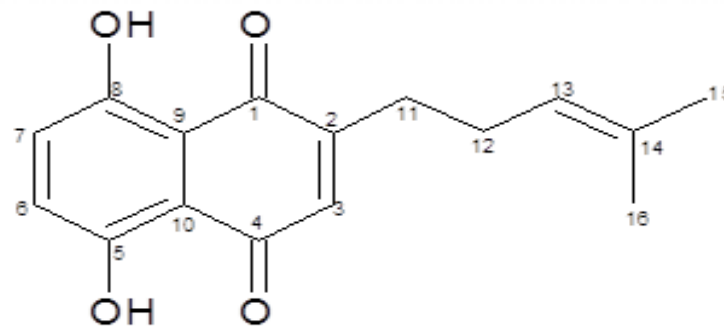
1,70(3H, s) lar ise propenil grubundaki birer adet metil grubu proton sinyalleri, 5,14 ppm olan proton sinyali triplet olduğu için bir CH₂ ile bağlanmıştır ve 3~5 arasında hiçbir proton sinyalinin görülmemesi oksijene bağlanmış karbon üzerinde proton olmadığını gösterir. Eşleşme sabiti açısından değerlendirildiğinde, iki adet CH₂: 2,64 (2H, t, J= 7,2Hz) ve 2,31 (2H, m, J= 7,2 Hz) birbirine direk bağlanır. Kimyasal kaymasına göre 2.64 (2H, t, J= 7.2 Hz) olan CH₂aromatik halkaya bağlanır, 2,31 (2H, q, J= 7,2 Hz) olan CH₂ ise 5,14 çifte bağının pik yarılmasına ve kimyasal kaymasına göre çifte bağa bağlandığı tespit edilmiştir. Bu bileşiğin fizikokimyasal özellikleri ve ¹H-NMR ve ¹³C-NMR sonuçları literatür bilgileri ile karşılaştırarak bakıldığında, Deoksişikonin olarak belirlenmiştir[199, 200]. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) g_H: 12,64(1H, OH-5), 12,48(1H, OH-8), 7,21(1H, 6-H), 7,26(1H, H-7), 6,85(1H, H-3), 5,14(1H, t, J=7,2Hz, H-13), 2,64(2H, t, J=7,2Hz, H-11), 2,27-2,33(2H, m, J=7,2Hz, H-12), 1,70(1H, s, H-15), 1,60(1H, s, H-16); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz) g_C: 17,77(q, C-16), 25,65(q, C-15), 26,52(t, C-11), 29,67(t, C-12), 111,68(s, C-10), 111,92(s, C-9), 122,31(d, C-13), 130,81(d, C-7), 131,12(d, C-6), 133,63(s, C-14), 134,52(d, C-3), 151,47(s, C-2), 162,17(s, C-5), 162,83(s, C-8), 183,07(s, C-1), 183,13(s, C-4),

Sample Name:
 D1
 Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmrsys/data
 Sample directory:
 D1_20140609_01
 FidFile: PROTON_02

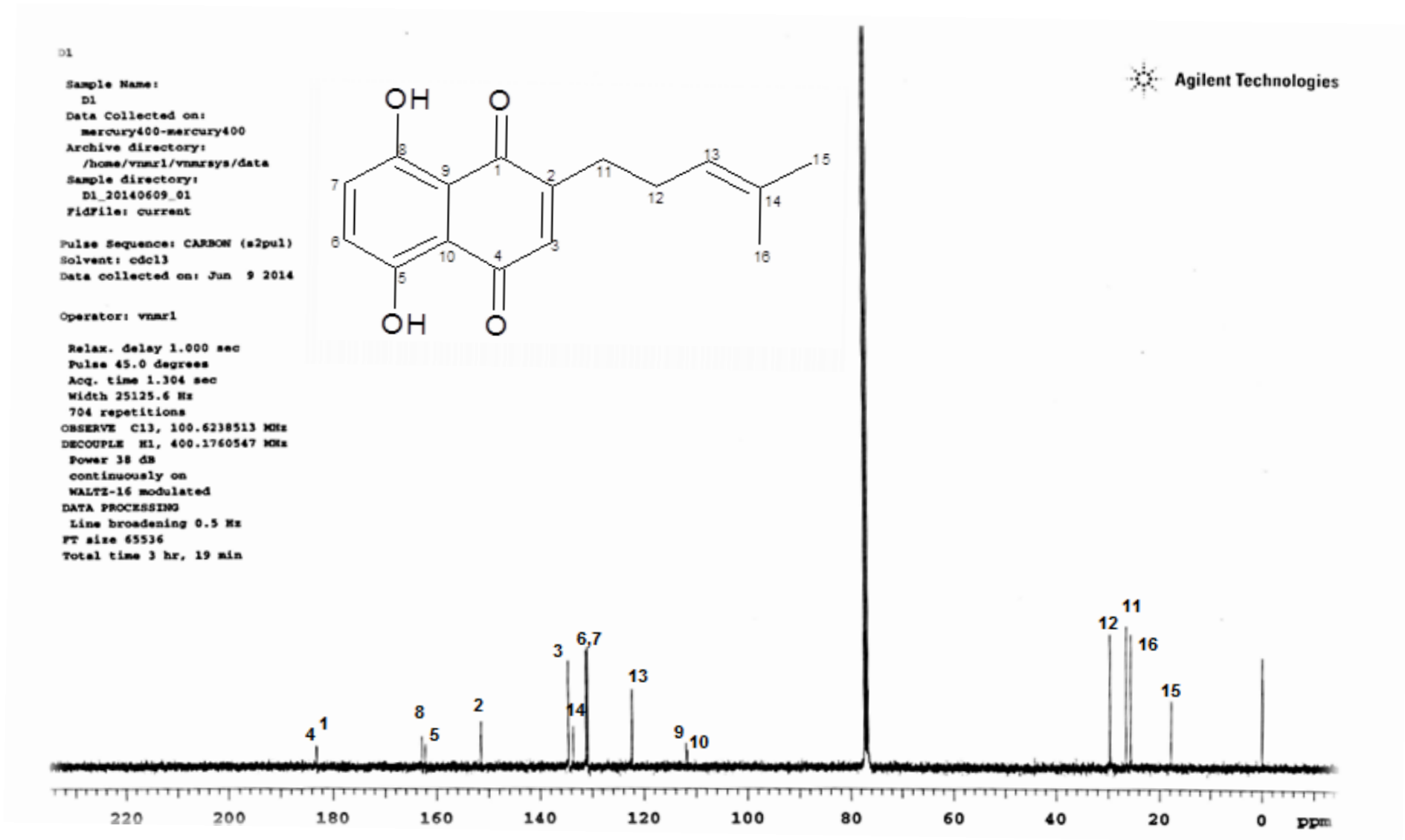
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: cdcl3
 Data collected on: Jun 9 2014

Operator: vnmr1

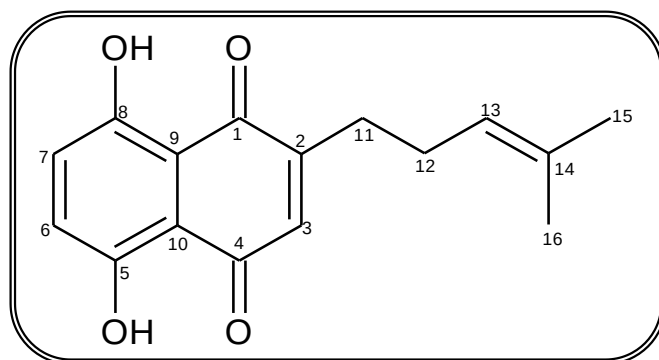
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 2.559 sec
 Width 6402.0 Hz
 8 repetitions
 OBSERVE H1, 400.1740724 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min 31 sec



Şekil 4.18. Deoksişikinin (Madde 3'ün) ^1H -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)



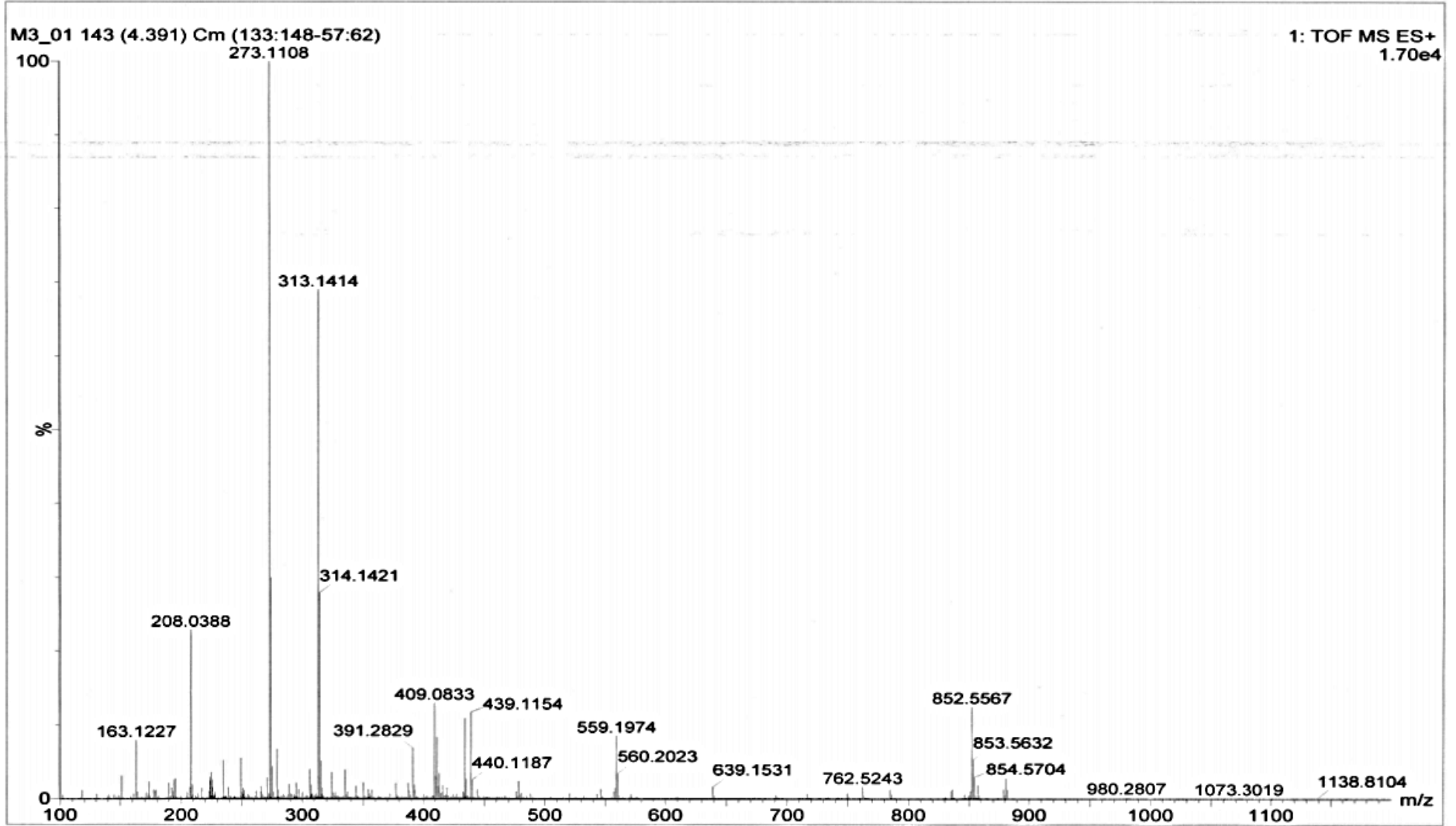
Şekil 4.19. Deoksişikonin (Madde 3'ün) ^{13}C -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 100 MHz)



Şekil 4.20. Deoksisikonin

Çizelge 4.6. Deoksisikonin (Madde 3'ün) ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) ve ^{13}C -NMR(CDCl_3 , 100 MHz) Spektroskopik Değerleri

H/C	Yapı	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	C			183,07
2	C			151,47
3	CH	6,85	t, $J=1,2$	134,52
4	C			183,13
5	C, OH	12,64	s	162,17
6	CH	7,21	s	131,12
7	CH	7,26	s	130,81
8	C,OH	12,48	s	162,83
9	C			111,92
10	C			111,68
11	CH_2	2,64	dt, $J=7,2, 1,2$	26,52
12	CH_2	2,27-2,33	m, $J=7,2$	29,67
13	CH	5,14	t, $J=7,2$	122,31
14	C			133,63
15	CH_3	1,70	s	25,65
16	CH_3	1,60	s	17,77

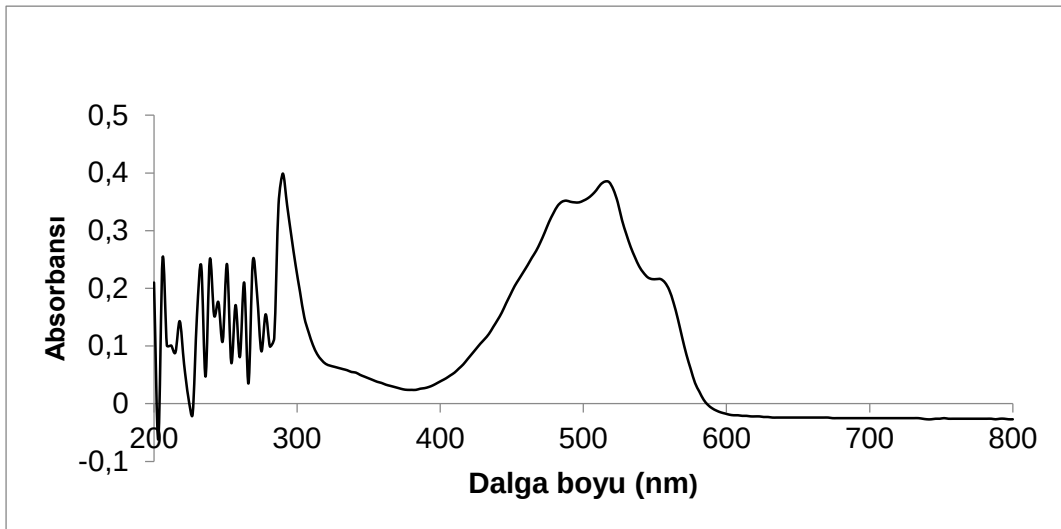


Şekil 4.21. Deoksisikonin'nin kütle spektrumu

4.1.3. *Echium* türlerindeki bazı şikonin türevlerinin YBSK ile miktar tayinleri

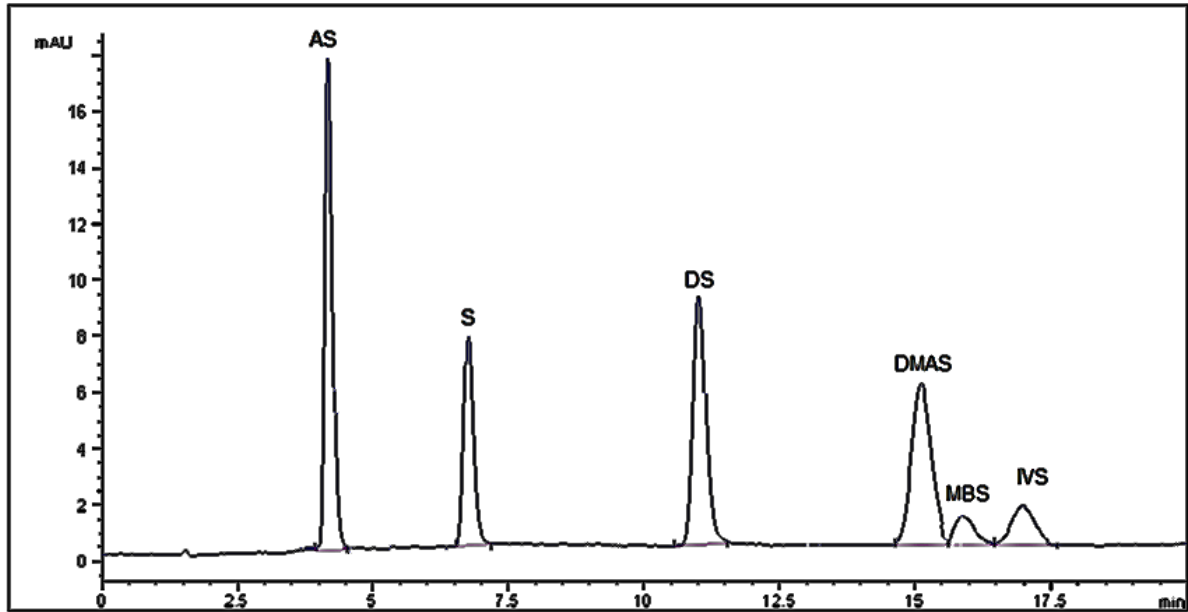
Şikonin türevlerinin YBSK ile analizlerinde genellikle, ters faz YBSK yöntemi kullanılmaktadır. Bu doğrultuda farklı tip C18 ve C8 kolonlar üzerinde su, metanol, asetonitril gibi nispeten polar çözücüler ya da çözücü sistemleri kullanılarak, izokratik veya gradient elüsyon ile analizler gerçekleştirilmektedir. Sıklıkla piklerin daha keskin ve düzgün bir şekilde ayırımını sağlamak amacıyla çözücü ortamı TFA, formik asit, asetik asit, o-fosforik asit gibi maddeler ile asitlendirilmekte ya da tampon çözeltiler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, incelenen *Echium* türlerinin kökkısımlarından ayrı ayrı ekstreler hazırlanıp, bu ekstrelerdeki şikonin, asetilşikonin, deoksişikonin, 2-metil-n- butrilşikonin, dimetilakrilşikonin ve izovalerilşikonin bileşiklerinin kalitatif ve kantitatif analizleri tarafımızca geliştirilen ters faz YBSK yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında, şikonin türevlerinin 214, 276 ve 520nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterdiği için, HPLC analizlerinde 280nm veya 520nm UV dedektör dalga boyu seçilmiştir[202]. Çalışmamızda da şikonin ve şikonin karşım çözeltsinin UV spektrumuna ve literatür bilgilerine göre, UV dedektör dalga boyu 520nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Şikonin türevi karşım çözeltsinin 200-800nm dalga boyundaki UV spektrumu

İncelenen şikonin türevlerinin en kısa sürede ve en iyi şekilde ayrımının yapılabilmesi için asetonitril: su çözücü sistemi farklı oranlarda denenmiştir. Yukarıda belirtilen optimum ayırmaulaşmak için denen en çözücü sistemin farklı oranları arasında en iyi sonuç asetonitril: su = 70 : 30 izokratik elüsyonu ile elde edilmiştir. Analizi yapılan bileşiklerin, denen en çözücü sistemlerindeki elüsyonu sırasıyla; asetilşikoinin, şikonin, Deoksişikoinin, dimetilakrilşikoinin, 2-metilbutirilşikoinin ve izovalerilşikoinin olarak saptanmıştır. Bu doğrultuda çözücü oranları denenirken, asetilşikoinin ilk olarak kolondan çıkan bileşik olduğundan, bu bileşiğin retansiyon zamanı dikkate alınarak optimum gradient elüsyon seçilmiştir. En düşük retansiyon zamanı elde edildiğinde, diğer standart bileşikler verilerek ayırımın iyi olup olmadığı gözlenmiş ve bu şekilde metot geliştirilirken daha az zaman ve çözücü harcanmıştır. Akış hızı ve kolon sıcaklığı üzerinde de farklı denemeler yapılmış ve en iyi ayırımın 1 ml/dk akış hızı ve 25°C sıcaklıkta gerçekleştiği saptanmıştır. Standart maddelerin karşım çözeltilsinin YBSK spektrumu Şekil 4.23 'te verilmiştir.



Şekil 4.23. Standart karşım çözeltilsinin YBSK ile ayrımı (her biri 50 ppm)

Not: **AS:** Asetilşikoinin; **S:** Şikonin; **DS:** Deoksişikoinin; **DMAS:** Dimetilakrilşikoinin;
MBS: 2-metilbutirilşikoinin; **IVS:** İzovalerilşikoinin

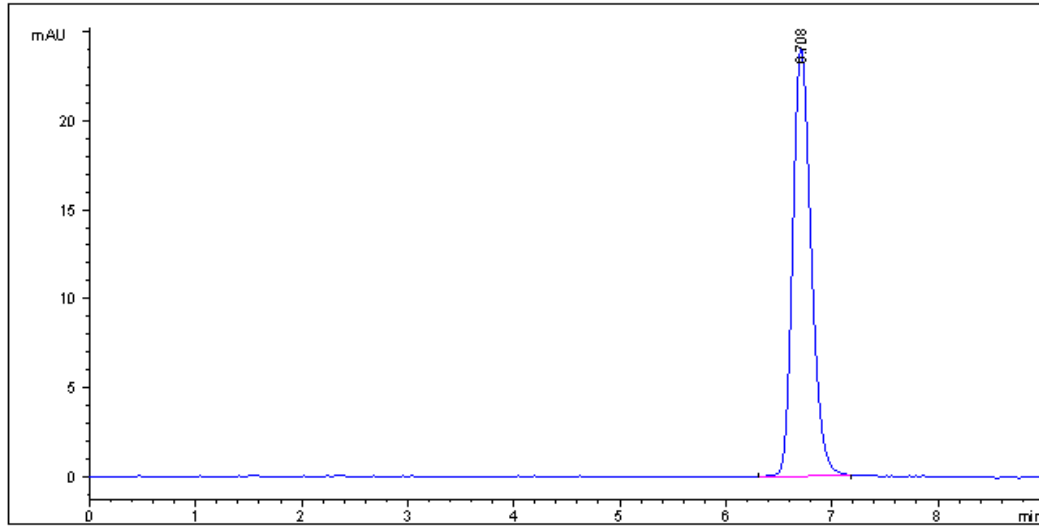
Çizelge 4.7. Standart şikonin türevi bileşiklerin retansiyon zamanları

	Asetil şikonin (1)	Şikonin (2)	Deoksi şikonin (3)	Dimetilakril şikonin (4)	2-metilbutiril şikonin (5)	İzovalerilşikonin (6)
Rt	4,176	6,752	11,006	15,059	15,672	16,584

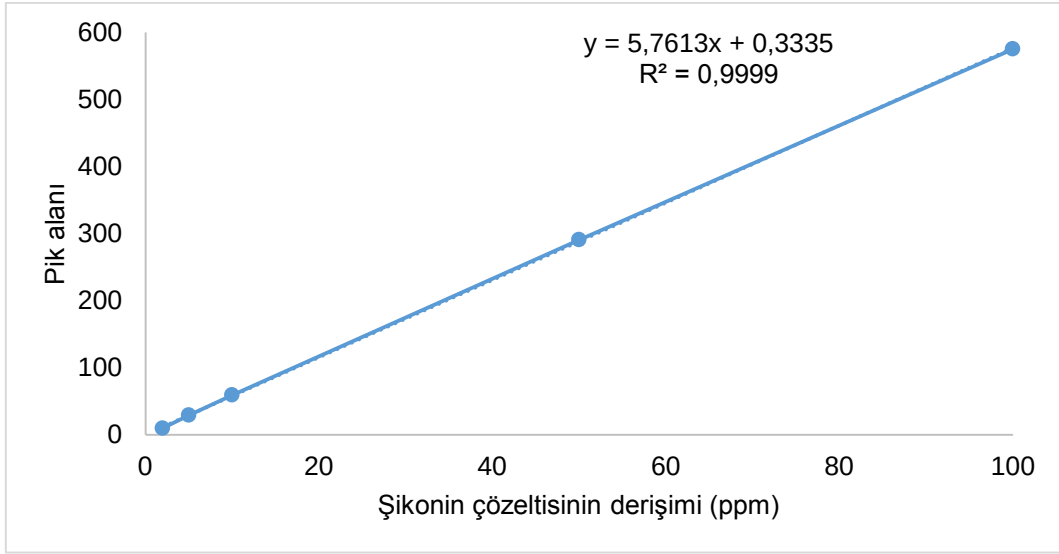
Standart bileşiklere ait kalibrasyon eğrileri ve doğru denklemleri

Şikonin'e ait kalibrasyon eğrisi ve doğru denklemi

Şikonin'e ait YBSK spektrumu Şekil 4.24'te, kalibrasyon eğrisi Şekil 4.25'te; konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri Çizelge 4.8'de; doğru denklemi, r^2 , LOD ve LOQ değerleri Çizelge 4.9'da verilmektedir.



Şekil 4.24. Şikonin'e ait YBSK kromatogramı (50 ppm)



Şekil 4.25. Şikonin'e ait kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.8. Şikonin'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri

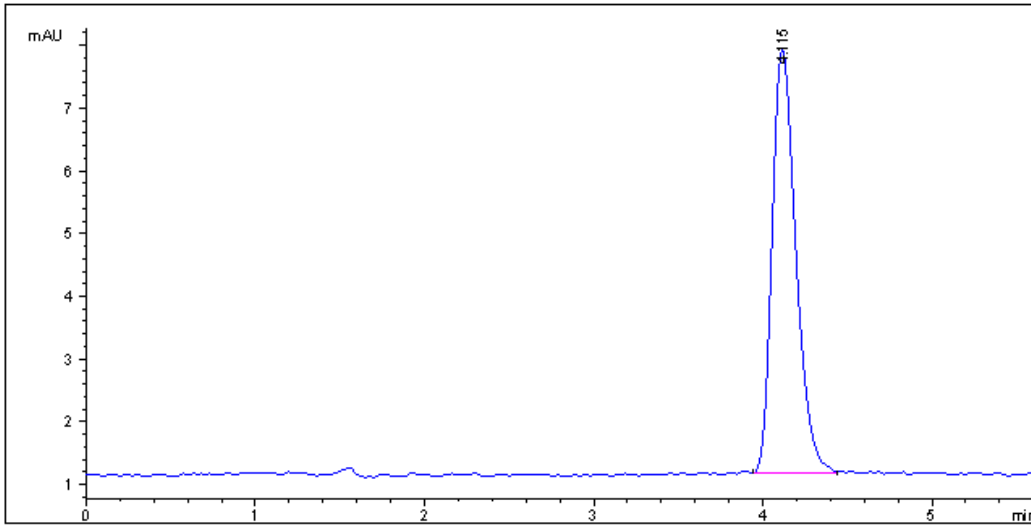
X (konsantrasyon ppm)	Y (pik alanı ortalaması, n=3)
2	9,62
5	29,074
10	59,15
50	290,74
100	575,22

Çizelge 4.9. Şikonin'e ait doğru denklemi, R^2 , LOD, LOQ ve % BSS değerleri

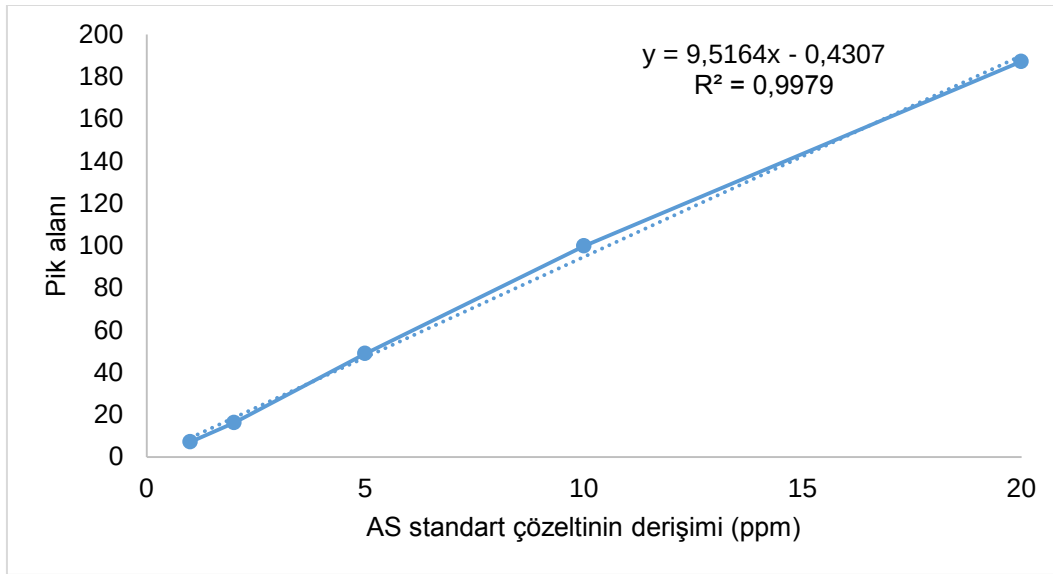
Bileşik	Doğru Denklemi	r^2	LOD(ppm)	LOQ(ppm)	% BSS
Şikonin	$y = 5,761x + 0,333$	0,999	0,55	1,65	1,12

Asetilşikonin'e ait kalibrasyon eğrisi ve doğru denklemi

Asetilşikonin'e ait YBSK kromatogramı Şekil 4.26'da, kalibrasyon eğrisi Şekil 4.27'de; konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri Çizelge 4.10'da; doğru denklemi, r^2 , LOD ve LOQ değerleri Çizelge 4.11'de verilmektedir.



Şekil 4.26. Asetilşikinin'e ait YBSK kromatogramı (6.25 ppm)



Şekil 4.27. Asetilşikinin'e ait kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.10. Asetilşikinin'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri

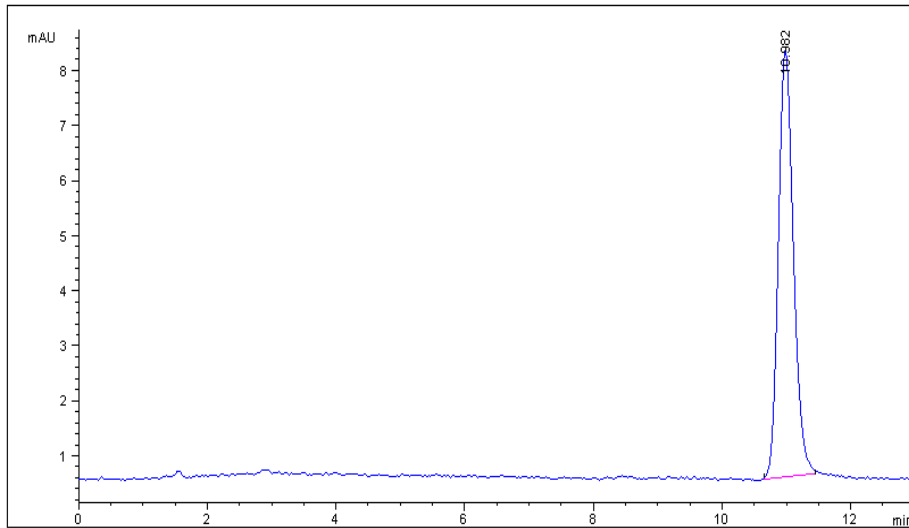
X (konsantrasyon ppm)	Y (pik alanıortalaması, n=3)
1	7,17
2	16,23
5	49,0
10	99,87
20	187,2

Çizelge 4.11. Asetilşikinin'e ait doğru denklemi, R^2 , LOD, LOQ ve % BSS değerleri

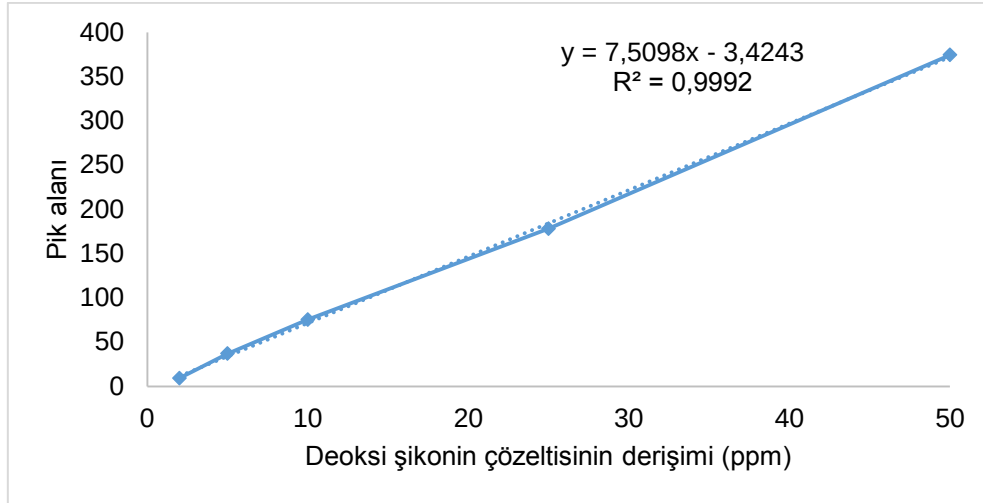
Bileşik	Doğru Denklemi	r^2	LOD(ppm)	LOQ(ppm)	% BSS
Asetil şikinin	$y = 9,516x - 0,430$	0,998	0,19	0,57	2,012

Deoksişikinin(DS)'e ait kalibrasyon eğrisi ve doğru denklemi

Deoksişikinin(DS)'e ait YBSK kromatogramı Şekil 4.28'de, kalibrasyon eğrisi Şekil 4.29'da; konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri Çizelge 4.12'de; doğru denklemi, r^2 , LOD ve LOQ değerleri Çizelge 4.13'te verilmektedir.



Şekil 4.28. Deoksişikinin(DS)'e ait YBSK kromatogramı (6.25 ppm)



Şekil 4.29. Deoksişikonin(DS)'e ait kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.12. Deoksişikonin(DS)'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri

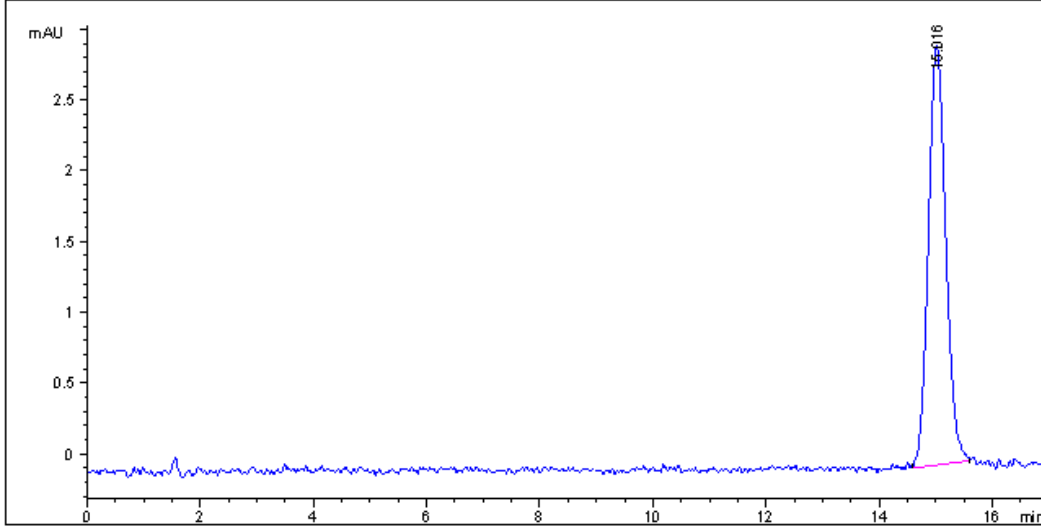
X (konsantrasyon ppm)	Y (pik alanı ortalaması, n=3)
2	9,2
5	36,85
10	75,37
25	178,1
50	374,26

Çizelge 4.13. Deoksişikonin'e ait doğru denklemi, R^2 , LOD, LOQ ve % BSS değerleri

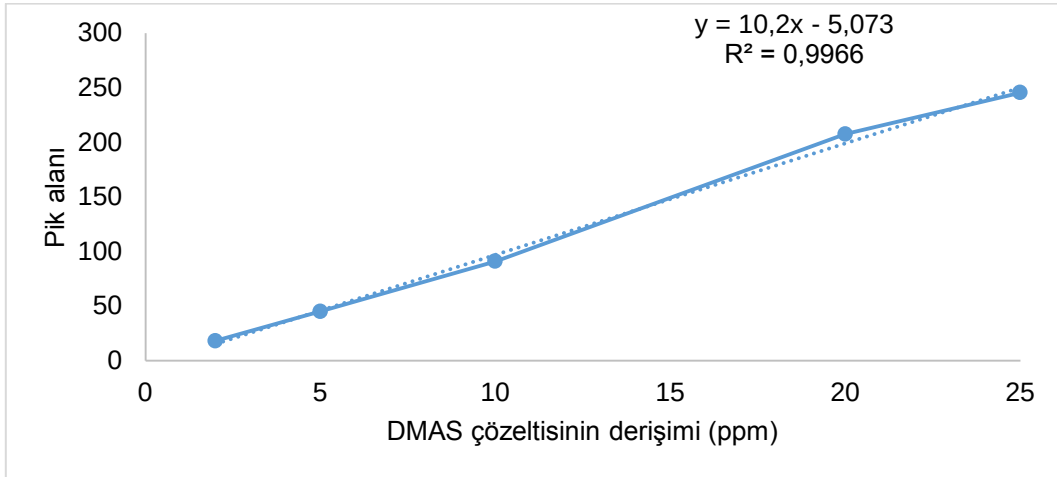
Bileşik	Doğru Denklemi	r^2	LOD(ppm)	LOQ(ppm)	% BSS
Deoksi şikonin	$y = 7,509x - 3,424$	0,999	0,65	1,95	1,464

Dimetilakrilşikonin(DMAS)'e ait kalibrasyon eğrisi ve doğru denklemi

Dimetilakrilşikonin(DMAS)'e ait YBSK kromatogramı Şekil 4.30'da, kalibrasyon eğrisi Şekil 4.31'de; konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri Çizelge 4.14'te; doğru denklemi, r^2 , LOD ve LOQ değerleri Çizelge 4.15'te verilmektedir.



Şekil 4.30. Dimetilakrilşikonin(DMAS)'e ait YBSK kromatogramı (6.25 ppm)



Şekil 4.31. Dimetilakrilşikonin(DMAS)'e ait kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.14. Dimetilakrilşikonin(DMAS)'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri

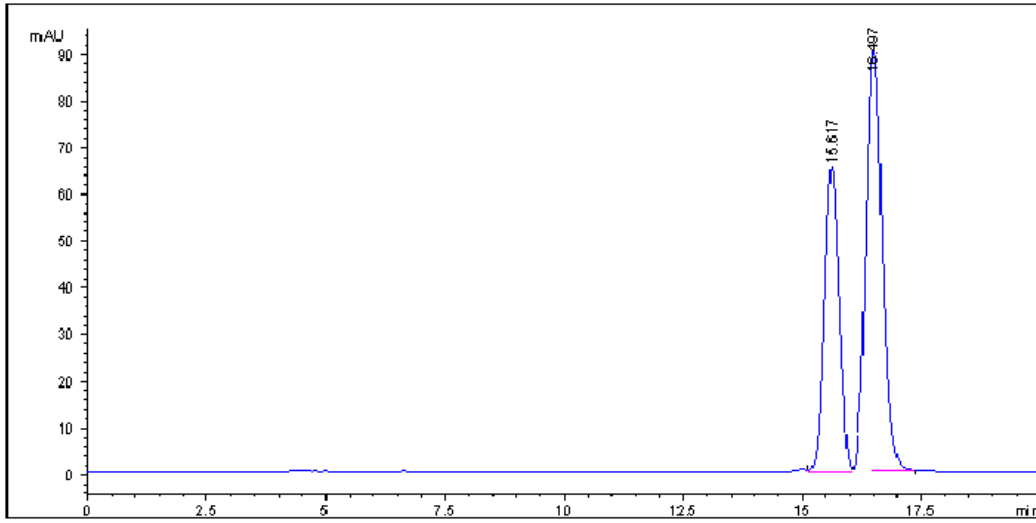
X (konsantrasyon ppm)	Y (pik alanıortalaması, n=3)
2	18,09
5	45,08
10	90,96
20	207,5
25	245,4

Çizelge 4.15. Dimetilakrilşikonin(DMAS)'e ait doğru denklemi, R^2 , LOD, LOQ ve % BSS değerleri

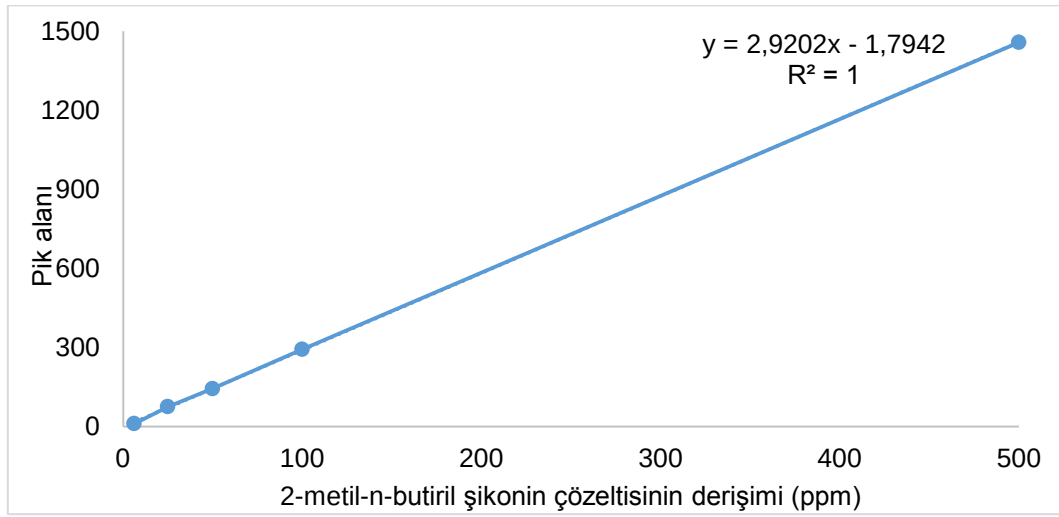
Bileşik	Doğru Denklemi	R^2	LOD(ppm)	LOQ(ppm)	% BSS
Dimetilakrilşikonin	$y = 10,2x - 5,073$	0,9996	0,52	1,55	1,87

2-metil-n-butirilşikonin (MBS) ve İzovalerilşikonin (IVS) 'e ait kalibrasyon eğrisi ve doğru denklemi

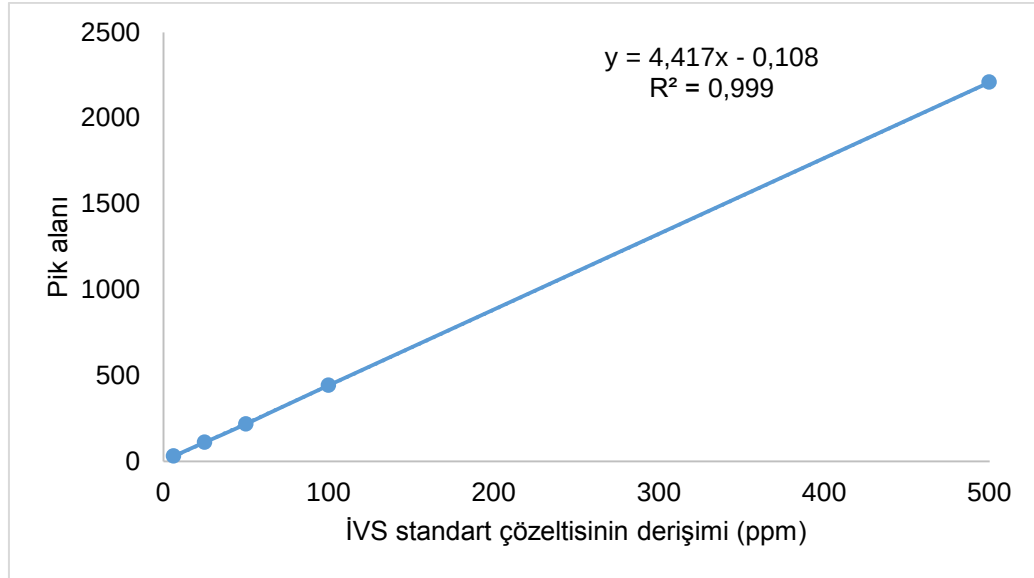
2-metil-n-butirilşikonin (MBS) ve İzovalerilşikonin (IVS)'e ait YBSK kromatogramı Şekil 4.32'de, kalibrasyon eğrisi Şekil 4.33 ve Şekil 4.34'te; konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri Çizelge 4.16'da; doğru denklemi, r^2 , LOD ve LOQ değerleri Çizelge 4.17'de verilmektedir.



Şekil 4.32. 2-metil-n-butirilşikönin (MBS) ve İzövalerilşikönin (IVS)'e ait YBSK kromatogramı(1000 ppm)



Şekil 4.33. 2-metil-n-butirilşikönin (MBS)'e ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.34. İzovalerilşikinin (IVS)'e ait kalibrasyon eğrisi

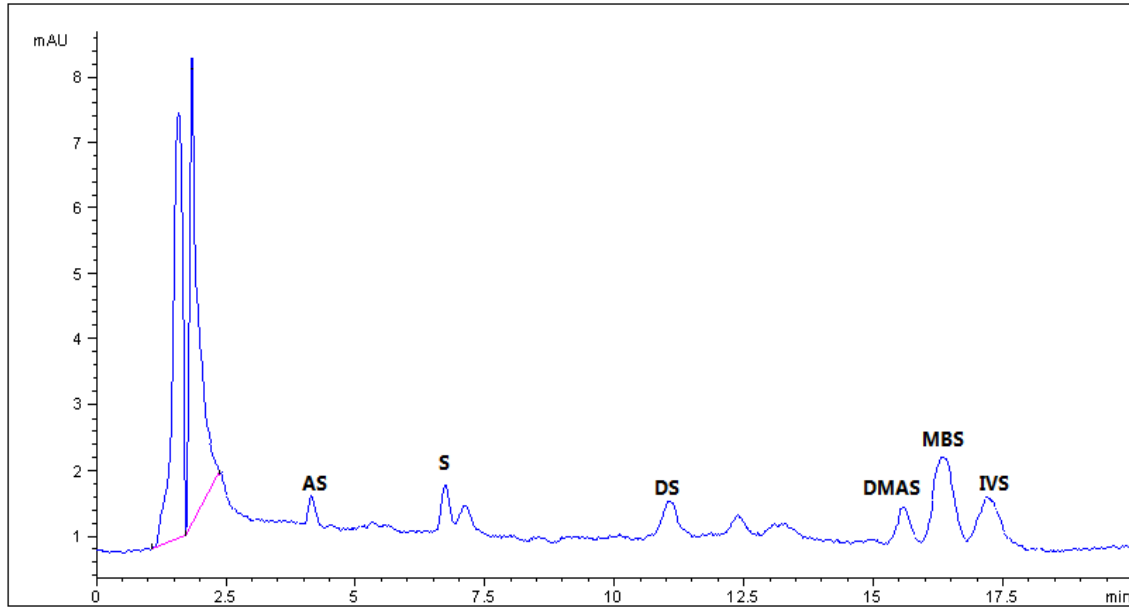
Çizelge 4.16. 2-metil-n-butirilşikinin (MBS) ve İzovalerilşikinin (IVS)'e ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri

X(konsantrasyon ppm)	MBS'e ait Y(pik alanı ortalaması, n=3)	IVS'e ait Y(pik alanı ortalaması, n=3)
500	1457,7	2208,5
100	292,67	442,7
50	143,93	216,82
25	75,1	110,9
6,25	10,99	29,61

Çizelge 4.17. 2-metil-n-butirilşikinin (MBS) ve İzovalerilşikinin (IVS)'e ait doğru denklemi, R^2 , LOD, LOQ ve % BSS değerleri

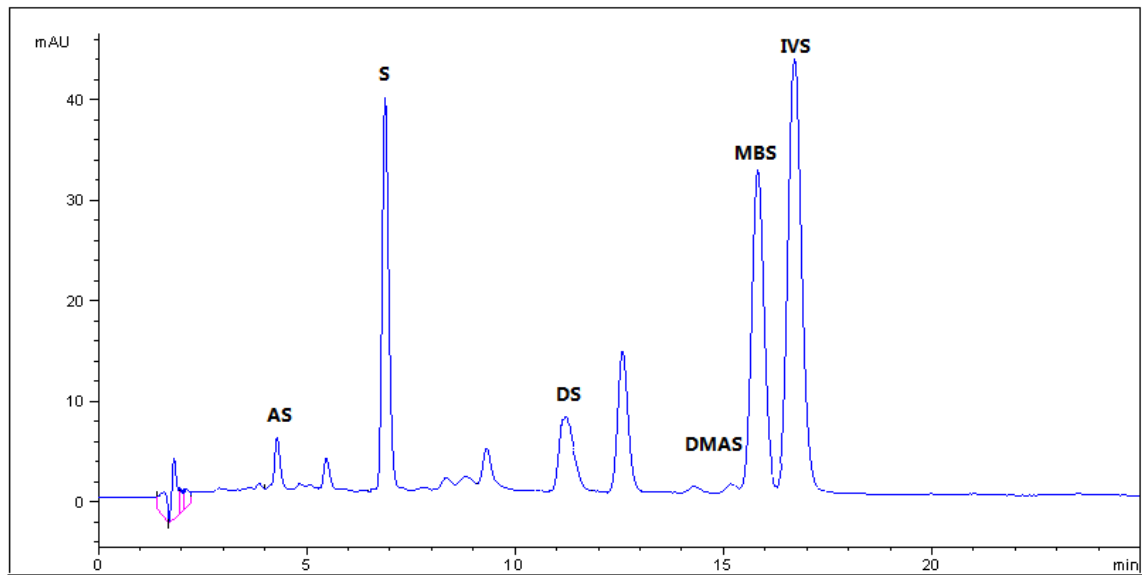
Bileşik	Doğru Denklemi	r^2	LOD(ppm)	LOQ(ppm)	% BSS
2-metil-n-butirilşikinin	$y = 2,920x - 1,794$	1	1,98	5,94	1,58
İzovalerilşikinin	$y = 4,417x - 0,108$	0,999	2,01	6,03	2,72

Echium türlerinden elde edilen ekstrelerin YBSK kromatogramları Şekil 4.35-4.38'de verilmektedir.



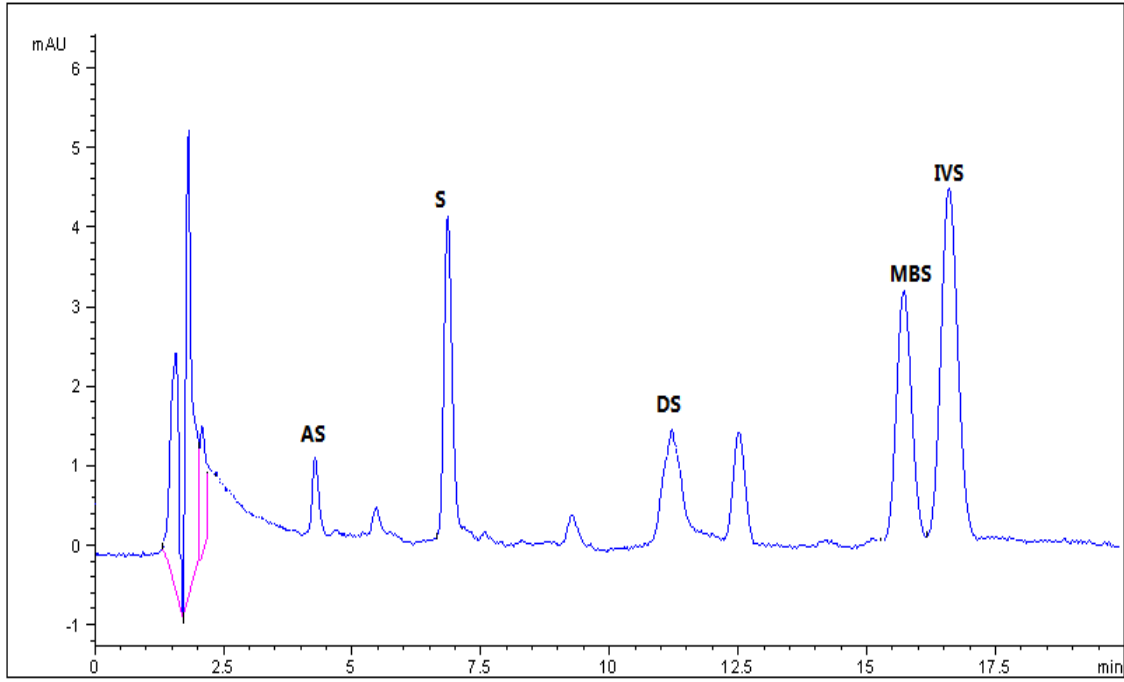
Şekil 4.35. *E. angustifolium* Miller bitkisinin etanol ile hazırlanmış kök ekstresinin 520 nm dalga boyundaki YBSK kromatogramı

Not: **AS**: asetilşikinin; **S**: şikinin; **DS**: deoksişikinin; **DMAS**: dimetilakrilşikinin
MBS: 2-metil-n- butirilşikinin; **IVS**: izovalerilşikinin



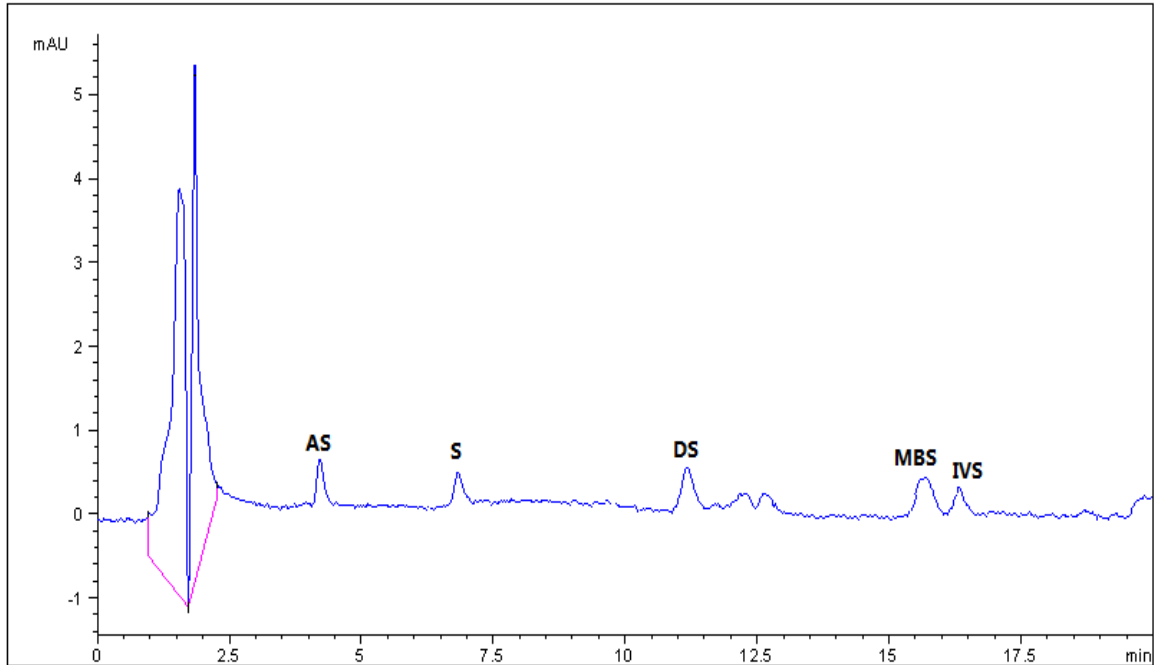
Şekil 4.36. *E. italicum* L. bitkisinin etanol ile hazırlanmış kök ekstresinin 520nm dalga boyundaki YBSK kromatogramı

Not: **AS**: asetilşikinin; **S**: şikinin; **DS**: deoksişikinin; **DMAS**: dimetilakrilşikinin
MBS: 2-metil-n- butirilşikinin; **IVS**: izovalerilşikinin



Şekil 4.37. *E. vulgare* L. bitkisinin etanol ile hazırlanmış kök ekstresinin 520 nm dalga boyundaki YBSK kromatogramı

Not: **AS**: asetilşikoinin; **S**: şikoinin; **DS**: deoksişikoinin; **DMAS**: dimetilakrilşikoinin
MBS: 2-metil-n- butirilşikoinin; **IVS**: izovalerilşikoinin



Şekil 4.38. *E. parviflorum* Moench bitkisinin etanol ile hazırlanmış kök ekstresinin 520 nm dalga boyundaki YBSK kromatogramı

Not: **AS**: asetilşikoinin; **S**: şikoinin; **DS**: deoksişikoinin; **DMAS**: dimetilakrilşikoinin
MBS: 2-metil-n- butirilşikoinin; **IVS**: izovalerilşikoinin

Çizelge 4.18. *Echium* türlerinin köklerinden hazırlanan etanol ekstrelerindeki şikonin türevi bileşiklerin miktar tayini sonuçları (% a/a)

% a/a	Asetil şikonin (1)	Şikonin (2)	Deoksi şikonin (3)	Dimetilakril şikonin (4)	2-metilbutiril şikonin (5)	İzovaleril şikonin (6)
EİK	0,037	0,391	0,105	0,015	1,147	1,185
EAK	0,003	0,007	0,009	0,010	0,074	0,028
EVK	0,053	0,040	0,022	0,004	0,162	0,121
EPK	0,003	0,007	0,008	ND	0,023	0,015

Not: **EİK:** *E. italicum* L. kök etanol ekstresi, **EAK:** *E. angustifolium* Miller kök etanol ekstresi, **EVK:** *E. vulgare* L. kök etanol ekstresi, **EPK:** *E. parviflorum* Moench kök etanol ekstresi, **ND:** tespit edilememiştir veya LOD` nın altındadır.

4.2. Biyolojik Aktivite Deney Bulguları

Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici amaçla kullanılan bazı *Echium* türü bitkilerden hazırlanan ekstrelerin ve biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama sonucu elde edilen fraksiyonlar ve izole edilen bileşiklerin yara iyileştirici ve antioksidan etkileri aşağıda çizelgeler halinde sunulmuştur.

4.2.1. Antioksidan aktivite incelenmesi

Total fenol miktar tayini

Echium türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen etanol ekstreleri üzerinde yapılan total fenol miktar tayini sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.19’da verilmiştir.

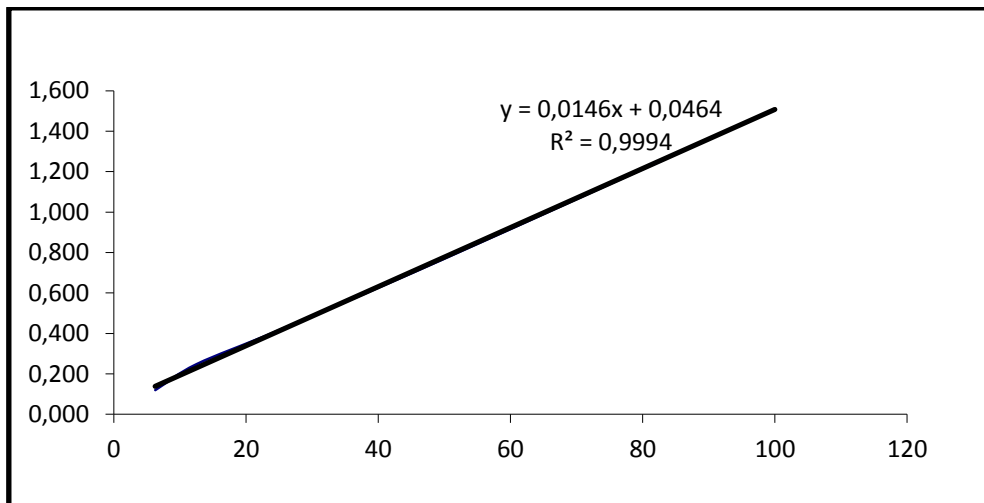
Çizelge 4.19. *Echium* türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstralarının total fenol miktarları

Ekstreler	Analiz edilen kısım	Total Fenol Miktarları (mg GA/g $\pm$ O.S.H.)
<i>Echium italicum</i> L.	EİH	11,458 $\pm$ 0,076
	EİK	19,986 $\pm$ 0,008
<i>Echium vulgare</i> L.	EVH	9,712 $\pm$ 0,028
	EVK	16,082 $\pm$ 0,002
<i>E.angustifolium</i> Miller.	EAH	12,623 $\pm$ 0,033
	EAK	38,856 $\pm$ 0,008
<i>E.parviflorum</i> Moench	EPH	11,973 $\pm$ 0,024
	EPK	9,687 $\pm$ 0,048

O.S.H.= Ortalama Standart Hata

Çizelge 4.20. Gallik asit'e ait konsantrasyon ve absorpsiyon ortalama değerleri

X (Gallik asit konsantrasyonu $\mu\text{g/ml}$)	Y (Absorpsiyonu ortalaması, n=3)
6,25	0,120
12,5	0,248
25	0,417
50	0,770
100	1,509



Şekil 4.39. Gallik asit'e ait kalibrasyon eğrisi

Total flavonoit miktar tayini

Echium türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstralarının toplam flavonoit miktarları AlCl_3 kolorimetrik yöntemi ile, kersetin eşdeğeri mg/g ekstre şeklinde aşağıdaki Çizelge 4.21'de verilmiştir.

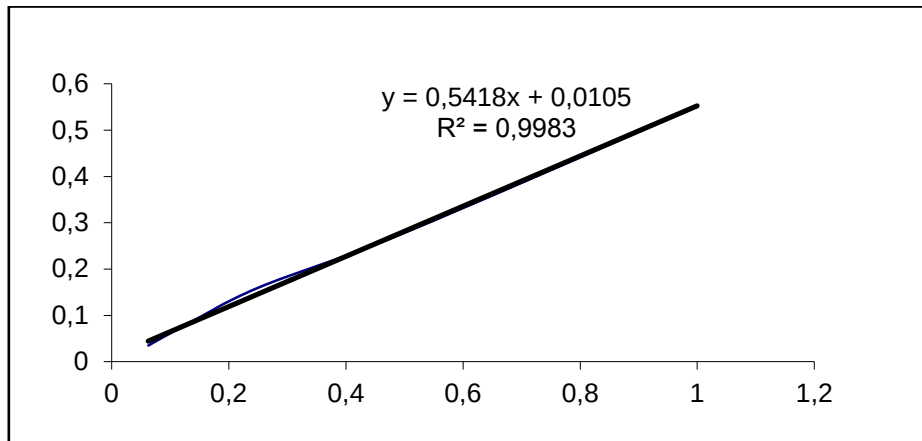
Çizelge 4.21. *Echium* türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanolü ekstraların toplam flavonoit miktarları

Ekstreler	Analiz edilen kısım	Toplam Flavonoit Miktarları (mg kersetin /g $\pm$ O.S.H.)
<i>Echium italicum</i> L.	Kök	47,11 $\pm$ 0,010
	Toprak üstü kısım	49,42 $\pm$ 0,024
<i>Echium vulgare</i> L.	Kök	35,98 $\pm$ 0,027
	Toprak üstü kısım	46,43 $\pm$ 0,032
<i>E.angustifolium</i> Miller.	Kök	65,35 $\pm$ 0,085
	Toprak üstü kısım	56,12 $\pm$ 0,009
<i>E.parviflorum</i> Moench	Kök	33,11 $\pm$ 0,028
	Toprak üstü kısım	48,03 $\pm$ 0,058

O.S.H.= Ortalama Standart Hata

Çizelge 4.22. Kersetinin kalibrasyon çözeltisi ve absorpsiyon değerleri

X (Gallik asit konsantrasyonu mg/ml)	Y (Absorpsiyonu ortalaması, n=3)
0,0625	0,035
0,125	0,078
0,25	0,160
0,5	0,278
1	0,551



Şekil 4.40 . Kersetinin standart çözeltisine ait kalibrasyon eğrisi

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)Serbest radikal süpürücü aktivite tayinine ait bulgular

Tez çalışmamızda kullanılan 4 *Echium* türünden hazırlanan etanollü ekstrelerin 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonda DPPH serbest radikal süpürücü etkilerine ait bulgular Çizelge 4.23 'te verilmektedir.

Çizelge 4.23. *Echium* türlerinden hazırlanan etanol ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü etkileri (% Süpürücü etki ± Standart Sapma)

No	Türlere ait etanollü ekstreler	DPPH Serbest Radikal Süpürücü Etki (% Süpürücü etki ± S.S.*)			
		50 µg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
1	<i>E.italicum</i> herba	3,18 ± 0,021	13,83±0,017	25,90±0,056	33,44±0,033
2	<i>E.italicum</i> Kök	11,93±0,004	16,49±0,006	57,24±0,014	81,43±0,005
3	<i>E.vulgare</i> herba	-	-	15,71 ± 0,007	43,36 ± 0,366
4	<i>E.vulgare</i> kök	18,85 ±0,022	27,02 ± 0,059	69,99 ± 0,008	71.2 ± 0,005
5	<i>E.angustifoliu</i> m herba	-	5,45± 0,017	20,41 ± 0,011	45,32 ± 0,028
6	<i>E.angustifoliu</i> m Kök	13,24 ±0,005	20,87 ± 0,025	69,12 ± 0,04	75,49 ± 0,111
7	<i>E.Parviflorum</i> herba	2,61 ± 0,012	7,41 ± 0,002	43,93± 0,01	68,84 ± 0,034
8	<i>E.parviflorum</i> kök	2,75 ± 0,011	3,34 ± 0,024	30,65 ± 0,06	44,7 ± 0,072
Referanslar					
9	Kersetin	48,95 ±0,017	72,97 ± 0,081	90,38 ± 0,007	92,61 ± 0,008
10	Gallik asit	96,62 ±0,003	96,29 ± 0,006	96,68 ± 0,003	97,98 ± 0,003

*: Standart sapma

-: Aktivite yok

Demir selasyon aktivitesi

4 adet *Echium türünün* toprak üstü kısım ve kök kısımlarından hareketle hazırlanan etanollü ekstrelerin 50 µg/ml, 200 µg/ml ve 500 µg/ml konsantrasyonda tayin edilen demir iyonu-selasyon etkilerine aitbulgular Çizelge 4.24'te verilmektedir.

Çizelge 4.24. *Echium* türlerinden hazırlanan etanollü ekstrelerin demir-iyonu şelasyon etkileri (% Şelasyon etki $\pm$ Standart sapma)

No	Türlere ait etanollü ekstreler	Demir iyonu şelasyon Etki (%Şelasyon etki ± S.S.*)				
		50 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml		
1	<i>E.italicum</i> herba	-	5,93 ± 0,044	7,26 ± 0,055		
2	<i>E.italicum</i> Kök	20,97 ± 0,02	25,93 ± 0,017	32,0 ± 0,059		
3	<i>E.vulgare</i> herba	2,62 ± 0,027	6,90 ± 0,039	17,10 ± 0,041		
4	<i>E.vulgare</i> kök	10,48 ± 0,03	25,10 ± 0,059	34,34 ± 0,014		
5	<i>E.angustifolium</i> herba	-	17,52 ± 0,039	23,72 ± 0,003		
6	<i>E.angustifolium</i> Kök	27,59 ± 0,04	34,34 ± 0,030	48,69 ± 0,040		
7	<i>E.Parviflorum</i> herba	-	1,24 ± 0,029	22,34 ± 0,030		
8	<i>E.parviflorum</i> kök	19,45 ± 0,05	27,17 ± 0,02	35,72 ± 0,010		
Referans						
9	konsantrasyon	20 µM	100 µM	200 µM	500 µM	1000 µM
	EDTA	8,05 ± 0,07	39,59 ± 0,112	67,13 ± 0,016	97,29 ± 0,016	97,98 ± 0,006

*: Standart sapma

-: Aktivite yok

4.2.2. İnsizyon yara iyileştirici aktivite deney bulguları

Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici amaçla kullanılan *Echium* türlerinden hazırlanan ekstrelerin ve daha sonra toplanan iki türün kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstrelerin insizyon yara modeli üzerindeki etkileri aşağıdaki çizelgelerde sunulmuştur.

Çizelge 4.25. Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici amaçla kullanılan bazı *Echium* türlerinden hazırlanan ekstrelerin çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkisi

Materyal	Kullanılan kısım	Doz (mg/g)	Yara gerilme kuvveti $\pm$ O.S.H.	(%Yara gerilimi)
Baz merhem			5,60 $\pm$ 0,66	7,7
Negatif kontrol			5,20 $\pm$ 0,83	
<i>E. italicum</i> L Kök	n-Hekzan	10	6,13 $\pm$ 0,62	9,46
	Klorform	10	8,03 $\pm$ 1,84	43,39**
	Etanol	10	6,46 $\pm$ 0,62	15,36
	Aseton	10	5,80 $\pm$ 1,11	3,57
	Su	10	7,56 $\pm$ 0,82	24,11
<i>E.vulgare</i> L Kök	n-Hekzan	10	7,86 $\pm$ 1,61	40,35**2
	Klorform	10	7,13 $\pm$ 0,81	27,32
	Etanol	10	6,62 $\pm$ 0,73	18,21
	Aseton	10	6,15 $\pm$ 0,89	9,82
	Su	10	5,73 $\pm$ 1,0	2,32
Madecassol®			7,68 $\pm$ 0,57	37,14*

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

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

Çizelge 4.26. Türkiye'de yetişen 4 *Echium* türünün kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanolü ekstrelerin çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkisi

Materyal	Kullanılan kısım	Doz (mg/g)	Yara gerilme kuvveti $\pm$ O.S.H.	(%Yara gerilimi)
Baz merhem			5,27 $\pm$ 0,35	8,44
Negatif kontrol			4,86 $\pm$ 0,71	-
<i>E. italicum</i> L.	Kök	10	7,24 $\pm$ 1,74	37,38**
	Toprak üstü	10	5,69 $\pm$ 0,94	7,97
<i>E. vulgare</i> L.	Kök	10	7,43 $\pm$ 0,28	40,97**
	Toprak üstü	10	5,70 $\pm$ 0,23	8,16
<i>E. angustifolium</i> Miller	Kök	10	7,13 $\pm$ 0,67	35,29**
	Toprak üstü	10	5,77 $\pm$ 0,20	9,49
<i>E. parviflorum</i> Moench	Kök	10	5,59 $\pm$ 0,96	6,07
	Toprak üstü	10	5,63 $\pm$ 0,68	6,83
Madecassol®			7,68 $\pm$ 0,57	45,73**

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

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

Çizelge 4.27. *E.italicum* L. kök kloroform ekstrelerinden elde edilen fraksiyonların çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkisi

Materyal	Fraksiyon numaraları	Doz (mg/g)	Yara gerilme kuvveti $\pm$ O.S.H.	(%Yara gerilimi)
Baz merhem			5,60 $\pm$ 0,66	7,69
Negatif kontrol			5,20 $\pm$ 0,83	
<i>E. italicum</i> L. Kök	8-18	10	6,01 $\pm$ 0,52	7,32
	19-27	10	6,85 $\pm$ 0,99	22,32
	30-70	10	8,30 $\pm$ 1,40	48,21**
	98-144	10	7,09 $\pm$ 0,43	26,61
	145-167	10	7,25 $\pm$ 0,95	29,46
Madecassol®			7,68 $\pm$ 0,57	37,14*

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

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

Çizelge 4.28. *E. italicum* L. kök kloroform ekstresinden elde edilen bileşiklerin çizgisel insizyon yara modeli üzerindeki etkisi

Materyal	Doz (mg/g)	Yara gerilme Kuvveti $\pm$ O.S.H.	(%Yara Gerilimi)
Baz merhem		6,54 $\pm$ 1,86	6,17
Negatif kontrol		6,16 $\pm$ 0,83	-
Asetil şikonin	5	8,41 $\pm$ 1,31	28,59*
Deoksi şikonin	5	8,03 $\pm$ 1,22	22,78*
2-metil-n-butiril şikonin – izovaleril şikonin	5	8,56 $\pm$ 1,01	30,89**
Madecassol®		9,01 $\pm$ 1,02	37,76***

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

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

5.2.3. Hidroksiprolin miktar tayinine ait bulgular

Çizelge 4.29. *E.italicum* L. kök ve *E.vulgare* L. kök ekstreleri, *E.italicum* L. kök kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonlar ve saf maddelerden hazırlanan merhemlerle tedavi edilen dokulardaki hidroksiprolin miktarları

Materyal	Ekstre adı veya fraksiyon	Hidroksiprolin (μ g/mg) $\pm$ S.Sapma
Baz merhem		16,14 $\pm$ 0,06
Negatif kontrol		14,10 $\pm$ 0,05
<i>E. italicum</i> L Kök	<i>n-Hekzan</i>	19,01 $\pm$ 0,03
	<i>Kloroform</i>	47,91 $\pm$ 0,07***
	<i>Etanol</i>	25,46 $\pm$ 0,11
	<i>Aseton</i>	22,45 $\pm$ 0,05
	<i>Su</i>	29,54 $\pm$ 0,04*
<i>E.vulgare</i> L.kök	<i>n-Hekzan</i>	24,57 $\pm$ 0,03
	<i>Kloroform</i>	32,72 $\pm$ 0,01**
	<i>Etanol</i>	10,37 $\pm$ 0,01
	<i>Aseton</i>	12,00 $\pm$ 0,02
	<i>Su</i>	15,97 $\pm$ 0,03
<i>E.italicum</i> Kök kloroform ekstresinin fraksiyonları	<i>8-18</i>	15,83 $\pm$ 0,01
	<i>19-27</i>	15,19 $\pm$ 0,023
	<i>30-70</i>	47,17 $\pm$ 0,04***
	<i>98-144</i>	23,74 $\pm$ 0,08
	<i>145-167</i>	28,58 $\pm$ 0,02
Asetil şikonin		29,81 $\pm$ 0,09*
Deoksi şikonin		35,19 $\pm$ 0,07**
2-metil-n-butiril şikonin + izovaleril şikonin		32,69 $\pm$ 0,15**
Madecassol®		48,42 $\pm$ 0,04***

* : p < 0,05; ** : p < 0,01; *** : p < 0,001; S.S: Standart Sapma

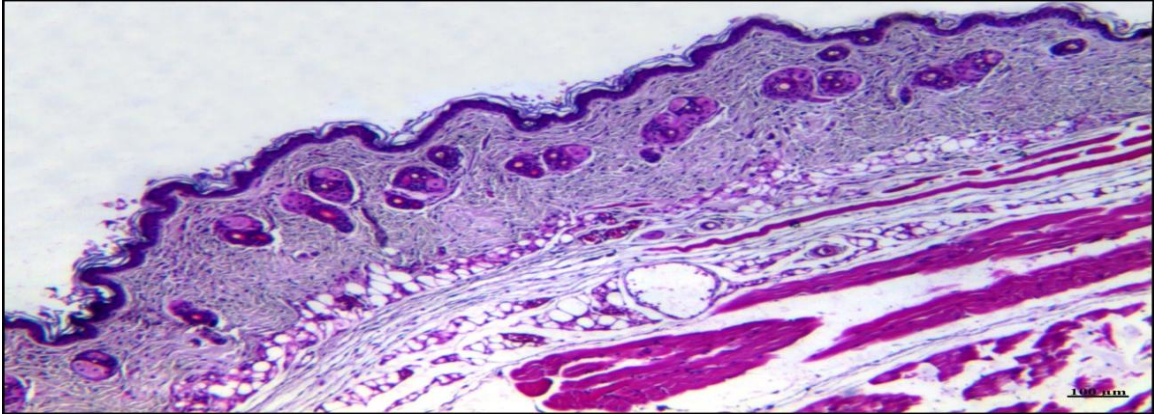
Çizelge 4.30. 4 *Echium* türünün kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen etanollü ekstraktlardan hazırlanan merhemlerle tedavi edilen dokulardaki hidroksiprolin miktarları

Materyal	Kullanılan kısım	Hidroksiprolin ($\mu\text{g}/\text{mg}$) $\pm$ S.Sapma
Baz merhem		16,51 $\pm$ 0,03
Negatif kontrol		14,21 $\pm$ 0,02
<i>E. italicum</i> L.	Kök	28,55 $\pm$ 0,007*
	Toprak üstü	19,39 $\pm$ 0,024
<i>E.vulgare</i> L.	Kök	27,48 $\pm$ 0,043*
	Toprak üstü	18,86 $\pm$ 0,025
<i>E.angustifolium</i> Miller	Kök	49,78 $\pm$ 0,050***
	Toprak üstü	10,21 $\pm$ 0,013
<i>E.parviflorum</i> Moench	Kök	16,12 $\pm$ 0,009
	Toprak üstü	10,06 $\pm$ 0,016
Madecassol®		29,13 $\pm$ 0,040*

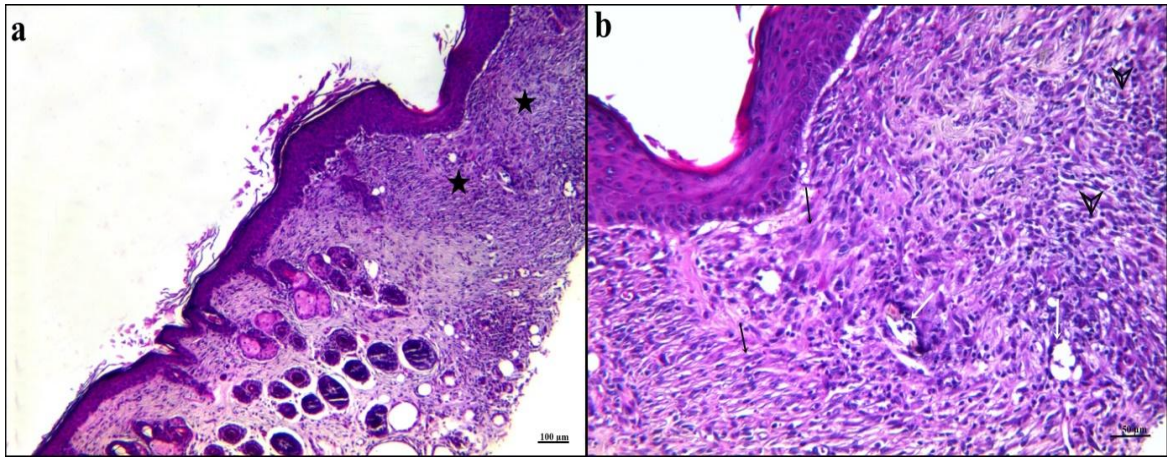
* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; S.S: Standart Sapma

4.2.4. Histopatolojik analizlere ait bulgular

Kontrol grubuna ait farelerin dokularında herhangi bir histopatolojik değişikliğe rastlanmadı (Resim 4.1). Deney gruplarına ait deri kesitleri incelendiğinde, bir bölgede dermiste çoğunluğunu fibroblastların oluşturduğu, fibrositler ve kolajen demetlerin de yer aldığı bağ doku proliferasyonları dikkati çektedir. Bu alanlara lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan hücre infiltrasyonları ve damarlaşmalar eşlik etmektedir (Resim 4.2-4.4). Kontrol ve deney gruplarına ait karaciğerlerde toksikolojik yönden bakıldığında, herhangi bir histopatolojik değişikliğe rastlanmamıştır (Resim 4.5).

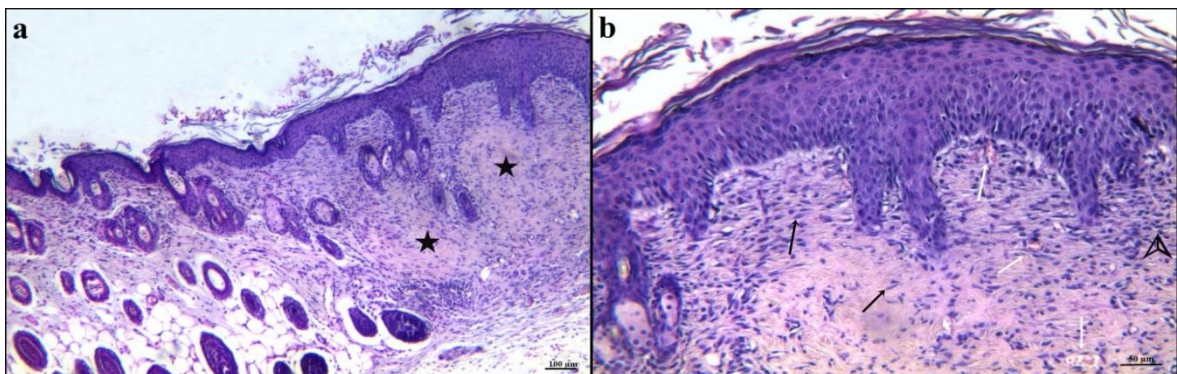


Resim 4.1. Kontrol grubu fareye ait deriye ait histolojik görüntü.



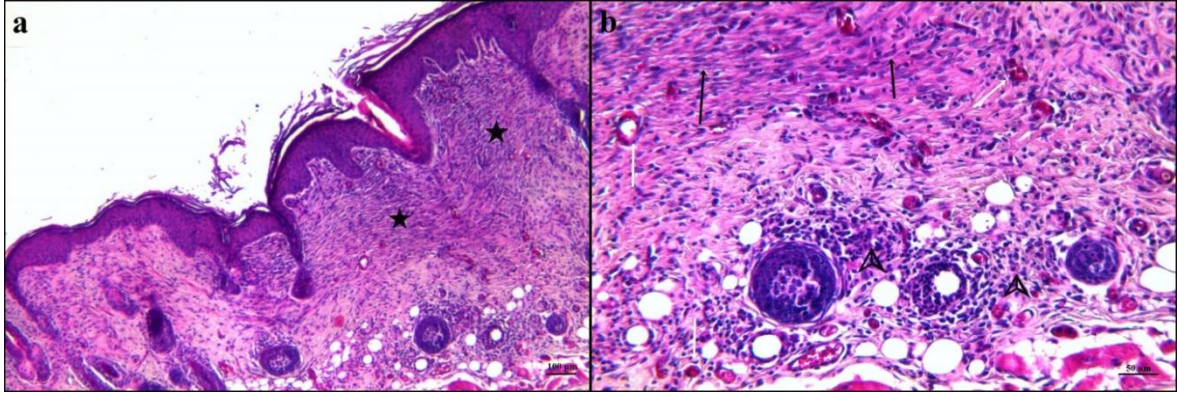
Resim 4.2. Asetilşikonin grubuna ait histolojik görüntü

a) Bağ doku proliferasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu sonu oluşan histolojik görüntü (yıldız), **b)** Fibroblast, fibrosit ve kolajen demetler (siyah ok). Lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan infiltrasyon (ok başı). Kapillar damarlar (beyaz ok).

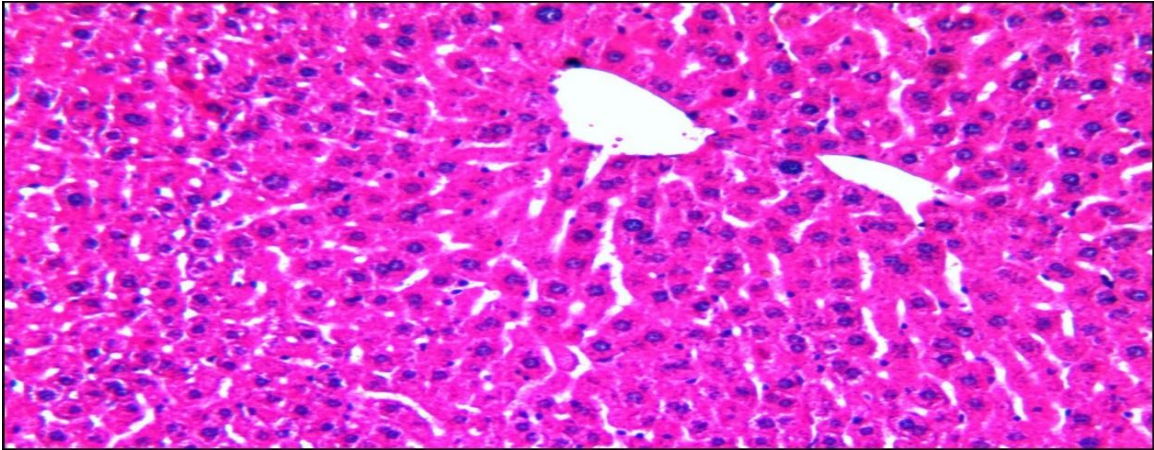


Resim 4.3. Deoksişonin grubuna ait histolojik görüntü;

a) Bağ doku proliferasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu sonu oluşan histolojik görüntü (yıldız), **b)** Fibroblast, fibrosit ve kolajen demetler (siyah ok). Lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan infiltrasyon (ok başı). Kapillar damarlar (beyaz ok).



Resim 4.4. 2-metil-n-butilşikonin ve İzovaleilşikonin grubuna ait histolojik görüntü; **a)** Bağ doku proliferasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu sonu oluşan histolojik görüntü (yıldız), **b)** Fibroblast, fibrosit ve kolajen demetler (siyah ok). Lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan infiltrasyon (ok başı). Kapillar damarlar (beyaz ok).



Resim 4.5. Deney grubu karaciğerine ait histolojik görüntü.

5. TARTIŞMA

Bitkisel ekstraktlar yüzyıllardır yara iyileşmesinde kullanılmakta olup, günümüzde de bu durum geçerliliğini korumaktadır.

Akut yaralar normalde 8 hafta içinde iyileşirken, Kronik yaraların iyileşmesi imkansızdır, ya sık sık tekrarlar ya da uzun bir zaman gerektirir[203]. Kronik yaralar engelilik ve artmış mortalitelerin önemli nedenlerinden biridir. Bunun dışında kronik yaralar enfeksiyon, uzuv kesilmesi veya depresyona yol açabilir[204]. İstatistiklere göre yılda yedi milyon insan kronik yaralardan etkilenir[205]. ABD'de, kronik yara tedavisi için yıllık harcamanın yaklaşık 20,000,000,000 Dolar olduğu tespit edilmiştir[206].

Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak yetişen *Echium* türleri, bir çok uygarlık tarafından, koruyucu ve tedavi edici amaçla kullanılmaktadır. Bu doğrultuda, *Echium* cinsi üzerinde yapılan çalışmalar belli başlı türler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Türkiye'de ise doğal olarak yetişen türler üzerinde yapılan çalışmaların azlığı dikkat çekmektedir. Türkiye'de yetişen 9 türden bazıları üzerinde hiç bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışma materyallerimiz olan *E. italicum* L. ve *E. vulgare* L. üzerinde kısıtlı sayıda çalışma bulunurken, *E. angustifolium* Miller, *E. parviflorum* Moench üzerinde hiç bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ülkemizde yetişen bu türlere ait bilimsel verilerin bizim tarafımızdan ortaya konulması çalışmalarımıza orijinal özellik kazandırmıştır.

Echium türlerinin köklerinin halk arasındaki kullanımından yola çıkarak, *E. italicum* L. ve *E. vulgare* L. köklerinden hazırlanan n-hekzan, kloroform, aseton, etanol ve su ekstratlarının yara iyileştirici aktivitesinin olup olmadığını belirlemek amacıyla *in vivo* yara iyileştirici aktivite yöntemlerinden çizgisel insizyon yara modeli kullanılmıştır. Çizgisel insizyon modeli deride kolajen oluşumu ve buna bağlı olarak deri sağlamlığının artmasıyla ilgili önemli bilgi vermektedir.

Çalışmamızda yara iyileştirici aktivitesi yüksek çıkan kloroform ve su ekstresinden, halk arasındaki kullanımı göz önünde bulundurularak “Biyolojik Aktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama ve izolasyon” çalışmaları kloroform ekstresi

üzerinden yürütülmüştür. *E.italicum* kök kloroform ekstresi silika jel kolon kromatografisi kullanarak fraksiyonlara ayrılmıştır ve Fr. 30-70 fraksiyon aktif bulunmuştur. Aktif bulunan fraksiyonlar üzerinde silika jel kromatografisi kullanılarak izolasyon ve saflaştırma sonucunda 4 bileşik izole edilmiştir. Bu bileşiklerin kimyasal yapısını aydınlatmak amacıyla kullanılan spektroskopik yöntemlerinden $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve LC-MS'a ait spektrumlar şekil 4.9-4.18'de verilmiştir.

İzolasyon çalışmaları sonucunda; *E.italicum* köklerinden kloroform ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstrenin kolon kromatografisine uygulanması ile elde edilen fraksiyonlardan, 2-metil-n-butirilşikoinin + izovalerilşikoinin (M1+M2), Asetilşikoinin (M3) ve Deoksişikoinin(M4) bileşiği izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapısıspektral yöntemlerle aydınlatılmıştır. *E.italicum* bitkisinden 2009 yılında yapılan birçalışmada 9 şikonin ve şikonin türevi bileşiğin izole edildiği yayımlanmıştır[23].

Şikonin ilk defa Marima ve arkadaşları tarafından 1922 yılında asetat esteri şeklinde izole edilmiş ve 1936 yılında Bruckman tarafından yapısı aydınlatılmıştır. Yapılan literatür taramalarında, şikonin türevi bileşikler üzerinde yapılan birçok biyolojik aktivite çalışmalarına raslanmıştır. Şikonin ve şikonin türevi bileşikler yara iyileştirici, antibakteriyel, anti-enflamatuvar, antiviral, analjezik, immünostimülatör, anjiyostatik, radikal süpürücü ve anti-trombotik gibi geniş spektrumlu biyolojik aktiviteye sahip bileşikler oldukları için, yakın zamanda araştırmacılar tarafından çok ilgi görmüştür. Şikonin türevi bileşikleri içeren preparatlar sadece tıbbi amaçla değil, aynı zamanda bazı asya ülkelerinde günümüzde kozmetikte ve boya sanayinde kullanılmaktadır[207].

Xiong Wen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, asetilşikoinin'in A549, Bel-7402, MCF-7 ve LLC kanser hücre hatları üzerinde sırasıyla IC50 5,6 µg/ml, 6,82 µg/ml, 3,04 µg/ml ve 2,72 µg/ml dozlarında sitotoksik etki gösterdiği, LLC transplante edilmiş C57BL/6 farelerde ise 2 mg/kg dozunda tümör büyümelerine karşı %42.85 inhibisyon gösterdiği saptanmıştır[208]. Yapılan diğer bir çalışmada şikonin türevi olan SYUNZ-7 bileşiğin antitümör aktivitesi *in vitro* olarak GLC-82, CNE2, KB, MGC-803, Hep G2 kanser hücre hatlarıda ve *in vivo* olarak EAC ksenograft farelerde belirgin antitümör aktivite gösterdiği ve bu etkinin hücre ölümünün

indüklenmesi, hücre siklusunun bloke edilmesi ve tümör hücrelerinde anjiyogenezisin inhibe edilmesi gibi mekanizmalara bağlı olarak ortaya çıktığı ileri sürülmüştür[209]. Yapılan diğer bir çalışmada, 2-metil n-butiril şikonin (MBS) bileşiğinin SGC-7901 mide kanser hücre hattı üzerindeki etkisi araştırılmış ve bu bileşiğin kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellediği ve apoptozise yol açtığı saptanmış ve bunun Mitokondriyel apoptozis yolağı, ERK1/2 sinyal yolağı ve JNK sinyal yolağının da bu süreç içerisine katıldığı saptanmıştır[210].

Papageorgiou ve grup arkadaşları 10 yılı aşkın süredir şikonin ve şikonin türevleri üzerinde yoğun çalışmalar yapmış ve büyük neticeler elde etmiştir.yaptıkları çalışmada, şikonin ile muamele edilen grupta yaranın 5. gününde anjiyogenezin kontrol grubuna göre belirgin derecede artış olduğu ve histolojik incelemelerde de aynı sonuçlar gözlemlenmiştir[211]. Diğer bir çalışmada, insanlar için kullanılan alkanin/şikonin bazlı merhemlerin köpeklerde oluşturulan yara üzerine uygulandığında, laktatlı ringer çözeltisi uygulanan kontrol grubuna göre, deney sonunda her iki grupta yara büyüklüğünde fark gözlenmezken, şikonin içeren merhem uygulanmış grupta, kolajen üretimi, doku perfüzyonu, anjiyogenezis ve epitelyal yoğunluğun kontrol grubuna göre büyük ölçüde yüksek olduğu gözlemlenmiştir[212].

Şikonin, asetil şikonin ve β,β -dimetil akrilşikonin gibi şikonin türevi bileşikler üzerinde yapılan antienflamatuvar aktivite çalışmalarında, bu tür bileşiklerin *in vivo* ve *in vitro* olarak antienflamatuvar etki gösterdiği ve bu etkinin kapiler permeabilitenin azalması, ödem oluşması ve lökositlerin inhibe edilmesi, *in vitro* deneylerde ise 0,39-21,4 μM konsantrasyonlarda, nötrofil solunumunun engellenmesi, reaktif oksijen sistemine katılarak antioksidan etki gösterme gibi mekanizmalarla etki gösterdiği saptanmıştır[213-216].

Köklerden hazırlanan ekstreler çizgisel insizyon yara modelinde *E.italicum* L. kloroform ve su ekstralarının sırasıyla %43,39 ve %24,11, *E.vulgare* L. ekstralarından n-Hekzan ekstresinin %40,35 oranında yara gerilim kuvvetini arttırdığı tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.25). *E.italicum* kök kloroform ekstrenin kolon kromatografisine uygulanması ile elde edilen fraksiyonlar üzerinde aynı yara iyileştirici aktivite modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Çizgisel insizyon yara

modelinde Fr. 30-70'in %48,21 oranında yara gerilim kuvvetini arttırdığı tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.27). Sonraki sene topladığımız iki tür ilave olarak toplam 4 *Echium* türünün kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanollü ekstraler üzerinde çizgisel insizyon yara modeli kullanılarak değerlendirildiğinde, *E.italicum* L.; *E.vulgare* L., *E.angustifolium* Miller kök etanol ekstralarının sırasıyla %37.38, %40.97, %35.29 oranında yara gerilim kuvvetini arttırdığı tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.26). *E.italicum* kök kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonlarda aktif bulunan Fr. 30-70'i izole etme sonucunda saflaştırılan maddelerden asetilşikoinin, deoksişikoinin ve 2-metil-n-butirilşikoinin, izovalerilşikoininler üzerinde yapılan çizgisel insizyon yara deneyinde, sırasıyla %28,59, %22,78 ve %30,89 oranında yara gerilim kuvvetini arttırdığı tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.28).

Hidroksiprolin, memelilerde elastin ve kolajende bulunan bir proteinojenik olmayan amino asittir. Bu amino asit özellikle kolajenin üçlü sarmal yapısında bulunur ve bu üçlü heliks yapının stabilitesini arttırmada önemli rol oynar. Hidroksiprolin, belirli bir prolin kalıntısından enzim prolihdroksilaz yardımıyla post-translasyonel olarak oluşur. Kolajen bağ doku hidrolizatı olan hidroksiprolin kolajen miktarına doğrudan bir ölçüsü olarak kullanılabilir. *E. italicum* L. kök kloroform ekstresi ve *E. vulgare* L. Fr. 30-78 ve 4 türün kök etanollü ekstrallerinden *E. italicum* L., *E. vulgare* L. ve *E.angustifolium* Miller ekstrallerinden hazırlanan merhemle tedavi edilen hayvan dokularının hidroksiprolin miktarı anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.29, 4.30).

Yara iyileşmesinin düzeyinin belirlenmesinde en önemli ölçütlerden birisi de yaradokusu üzerinde yapılan histopatolojik araştırmalardır. Histopatolojik incelemelerde, kontrol ve negatif kontrol gruplarının derisinde hiçbir değişiklik gözlenmezken, deney gruplarında rastlanan fibroblast, fibrosit, kolajen demetlerden oluşan bağ doku proliferasyonları; lenfosit, makrofaj, plazma hücrelerinin oluşturduğu hücre infiltrasyonları ve kapillar damarlaşma iyileşmenin olduğunu göstermektedir (Bkz. Resim 4.1-4.4) [217].

Antioksidan etkili bileşikler lipit peroksidasyonu inhibe etmek suretiyle hücre hasarını engelleyerek yara iyileştirici aktiviteye katkı sağlamaktadır. Yapılan literatür çalışmalarında da *Echium* türlerinin antioksidan aktivite gösteren fenolik

bileşikler ve flavonoidler içerdiği tespit edilmiştir. Bu amaçla çalışmamızda antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla, DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi, demir iyonu şelasyon aktivitesi, total fenol miktar tayini ve total flavonoid miktar tayini gibi yöntemler kullanılmıştır. Bu deneylere ait bulgular Çizelge 4.19, 4.21, 4.23, 4.24'te verilmiştir.

Echium türlerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmaları bu türlerin antioksidan, antimikrobiyal, antiproliferatif, anti-enflamatuvar, antidepresan ve anksiyeteye karşı etkili oldukları tespit edilmiştir. Nićiforović, N ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *E. rubrum* ve *E. vulgare* toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin yüksek miktarda flavonoid içerdiği ve güçlü hidroksil radikal süpürücü ve demir iyonu şelasyon yapıcı özelliği gösterdiği saptanmıştır[94]. *E. amoenum* Fisch. & C.A. Mey metanol ve kloroform ekstrelerinin etilmetansülfonat'a karşı antitümör aktivitesi incelenmiş ve her iki ekstrenin antitümör aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir[96]. *E. amoenum* çiçeğinin sulu ekstresinin antidepresyon çift kör randomize klinik çalışmasında, plasebo'ya göre belirgin seviyede hafiften orta dereceye kadar olan depresyonun semptomlarını hafiflettiği tespit etmiştir[100]. Aynı tür üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise, *E. amoenum* sulu ekstreleri klinik olarak 44 hastada obsesif kompulsif bozukluk üzerindeki etkisi araştırılmış, semptomlarının belirgin derecede azaldığı gözlenmiştir[101].

Echium türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar bu türlerin şikonin türevi bileşikler, sabit yağlar, uçucu yağlar, pirolizidin alkaloidleri, flavonoidler, fenolik bileşikler, amino asitler ve steroidal bileşikler içerdiği tespit edilmiştir. *Echium* türleri *Boraginaceae* familyasındaki bir cins olarak şikonin türevi bileşikler, pirolizidin alkaloidleri ve yağ asitleri içermesi bakımından dikkat çekicidir.

E. italicum L., *E. vulgare* L. ve *E. angustifolium* Miller köklerinde bulunan etkidenden sorumlu olan majör şikonin türevi bileşiklerin kantitatif olarak tayin etmek amacıyla YBSK yöntemi kullanılmıştır. Bu 4 taksondaki şikonin ve şikonin türevlerinin analiz sonuçları Çizelge 5.18'de verilmiştir. Yapılan literatür araştırmasında, *E. italicum* türünden 9 adet şikonin türevi izole edilmesine ve diğer birçok çalışmalarda diğer cins bitkilerden izole edilen şikonin türevi bileşiklerin yara iyileştirici aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Fakat *Echium* türleri üzerinde yapılan bu tür çalışmaya

rastlanmamıştır. Bu bakımdan bizim çalışmamız ilk olarak *Echium* türlerinin halk arasındaki kullanımını bilimsel yönden desteklemektedir.

Bu çalışmada, izolasyon ve saflaştırma sonucu şikonin türevi bileşiklerden asetilşikonin, deoksişikonin ve 2-metil n- butirilşikonin+izovalerilşikonin izole edilmiştir. Bu sonuç yara iyileştirici aktiviteden sorumlu bileşiklerin şikonin türevi bileşikler olduğunu doğrulamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Boraginaceae familyasında yer alan *Echium* türleri 42 türle dünyanın her yerinde dağılmış olmakla beraber avrupa'da yoğun bulunmaktadır.

Echium türleri Türkiye ve dünyada önemli bitkiler olarak kullanılmasına ve üzerinde bazı biyolojik aktivite çalışmaları ve fitokimyasal çalışmaları yapılmasına karşın, Türkiye'de yetişen *E. angustifolium* ve *E. italicum* türleri üzerinde hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu araştırma ülkemizde yetişen bazı *Echium* türleri üzerindeki yara iyileştirici ve antioksidan aktivitesi açısından ilk ve tek çalışma niteliği taşımaktadır.

Bu araştırma sonucunda, *E. italicum* L. kök kloroform ekstresinden BAYF yöntemine göre yara iyileştirici aktivitesi bulunan 4 şikonin türevi bileşik izole edilmiştir ve YBSK yöntemi kullanarak izole edilen şikonin türevi bileşiklerin Türkiye'de doğal yetişen 4 *Echium* türünün köklerinden hazırlanan etanol ekstresindeki miktar tayini analizi yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında, halk ilacı olarak kullanılan *E. italicum* L., *E. angustifolium* Miller, *E. vulgare* L. ve *E. parviflorum* Moench köklerinin etanollü ve kloroform ekstreleri üzerinde gerçekleştirilen yara iyileştirici ve antioksidan aktivite deneyleri sonucunda elde edilen veriler bu tür bitkilerin halk arasındaki geleneksel kullanımını bilimsel yönden desteklemektedir. Yine literatür çalışmalarında söz konusu izole edilen bileşiklerin geniş spektrumlu biyolojik aktivite göstermesi, çalışmamızda bulunan biyolojik aktiviteden sorumlu bileşikler olduğunu doğrulamaktadır.

Echium türlerinden elde edilen ekstrelerin ve izole edilen bileşiklerin sitotoksikite aktivite çalışmaları da yapılmaktadır. Bu doğrultuda önümüzdeki aşamada, Türkiye'de yetişen ve üzerinde çalışma bulunmayan türler öncelikli olarak ele alınarak, farmakognozik açıdan incelemeye devam edilecektir.

Bu çalışma sonucu elde edilen verilere dayanarak, ülkemizde doğal yetişen bu tür bitkilerin etkiden sorumlu etken mmaddelerin izolasyon çalışmalarında kaynak

olarak kullanılabilecekleri ve piyasada bulunan yara iyileştirici aktiviteye sahip ilaçlara alternatif ilaç olarak piyasaya srlebilecekleri öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Baytop, T. (1999). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. (İkinci baskı) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 109.
2. Edmondson, JR. (1978). *Echium*. in: P H Davis. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: The University Press,6,318-24.
3. Ernaz, MO. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of East Anatolia,Turkey. *Procedia Social and Behavioral Sciences* ,19,756–77.
4. Kargioğlu, M., Serteser, A., Konuk,M., Vural, G. (2010). Traditional uses of wild plants in the Middle Aegean Region of Turkey. *Journal of Human Ecology*, 39.
5. Altundağ, E. (2011). Local names of some useful plants from Iğdır province (east Anatolia). *Journal of Faculty of Pharmacy ofİstanbul University*, 40, 2008-09.
6. Ertut, F., Rdvan, F. (2000). An ethnobotanical study in Central Anatolia (Turkey). *Economic Botany*, 54(2),155-82.
7. Simşek, FA., Yeşilada, E., Yıldırımli, Ş. (2004). An ethnobotanical survey of the Beypazarı, Ayaş and Gündüldistrict towns of Ankara province (Turkey). *Economic Botany*, 58(4),705-20.
8. Yesilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K., Ikeshiro, Y. (1993). Traditional medicine in Turkey. IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(1),31-8.
9. Conforti, FS., Marrelli, S., Menichini, M., Statti, F.,Uzunov, GA.,Tubaro, D., Menichini, AF. (2009). The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chemistry*, 112(3), 587-94.
10. Jarić, S., Popović, Z., Macukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadzić, B., Pavlović, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1),160-75.
11. Nurten, KA. (2004). Çerkeş (Çankırı) yöresinde kullanılan halk ilaçları. *Hacettepe Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 24(2), 67-80.
12. Yeşilada, E., Aslan, M., Sezik, E., Yeşilada, A. (1996). Quantitative analysis of the enantiomeric naphtaquinone derivates from *Boraginaceous* roots by High Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 19, 3369-3381.

13. Papageorgiou, VP., Assimopoulou, AN., Couladouros, EA., Hepworth, D., Nicolaou, KC. (1999). The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. *Angewandte Chemie-International Edition*, 38(3), 270-301.
14. Sherbanivs'kii, LP. (1971). Presence of the shikonin in some species of the family *Boraginaceae* and its effect on lactic acid bacteria. *Ukrains'kii Botanichnii Zhurnal*, 28(4), 504-8.
15. Shcherbanovskii, LR. (1974). Shikonin from *Echium lycopsis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 10(4), 513-17.
16. Romanova, AS., Bankovskii, AI. (1967). Isolation of shikonin from *Onosma caucasicum* and *Echium rubrum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 3(1), 60-71.
17. Shcherbanovskii, LR. (1971). Shikonin. *R.U.S.S.R.*, 4.
18. Fedoreev, SA., Denisenko, VA., Gorovoi, PG., Maksimov, OB. (1979). Quinoid pigments of Far Eastern species of the *Boraginaceae* family. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 5, 625-30.
19. Leslie, A., Weston, P., Margaret M. (2012). Production of bioactive naphthoquinones by roots of paterson's curse (*Echium plantagineum*) – implications for invasion success. *Pakistan Journal of Weed Sciences Research*, 18, 677-86.
20. Papageorgiou, VP., Assimopoulou, AN., Ballis, AC. (2008). Alkannins and shikonins: a new class of wound healing agents. *Current Medicinal Chemistry*, 15(30), 3248-67.
21. Zare, K., Nazemiyeh, H., Movafeghi, A., Khosrowshahli, M., Motallebi-Azar, A, Dadpour, M. (2009). Bioprocess engineering of *Echium italicum* L.: induction of shikonin and alkannin derivatives by two-liquid-phase suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100(2), 157-64.
22. Fukui, H., Mizukami, H., Tabata, M. (1983). Formation of stereoisomeric mixtures of naphthoquinone derivatives in *Echium lycopsis* callus cultures. *Phytochemistry*, 22(2), 453-56.
23. Albreht, A., Vovk, I., Simonovska, B., Srbinska, M. (2009). Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium italicum* L. *Journal of Chromatography A*, 1216(15), 3156-62.
24. Chaouche, T., Bekkara, F. (2012). Identification of shikonin from the roots of *Echium pycnanthum* pomel. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 30-32.
25. Zare, K., Khosrowshahli, M., Nazemiyeh, H., Movafeghi, A., Azar, AM., Omid, Y. (2011). Callus culture of *Echium italicum* L. towards production of a shikonin derivative. *Natural Product Research*, 25(16), 1480-7.

26. Tareeva, NVR., Ban'kovskii, AI. (1970). Detection of shikonin in *Boraginaceae* plants Sb. Nauch. Rab., Vses. Nauch.-Issled. Inst. Lek. Rast, 1, 175-81.
27. ElShazly, A., Sarg, T., Ateya, A., Aziz, AA., ElDahmy, S., Witte, L. (1996). Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium setosum* and *Echium vulgare*. *Journal of Natural Products*, 59(3), 310-13.
28. ElShazly, A., Abdel-All, M., Tei, A., Wink, M. (1999). Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium rauwolfii* and *Echium horridum* (*Boraginaceae*). *Journal for Nature Research*, 54(5-6), 295-300.
29. Liddell, JR. (2001). Pyrrolizidine Alkaloids. *Journal of Natural Product Report*, 18(4), 441-7.
30. Roeder, E., Liu, K., Bourauel, T. (1991). Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium-Pininana*. *Phytochemistry*, 30(9), 3107-10.
31. Dominguez, DM., Reina, M., Santos-Guerra, A., Santana, O., Agullo, T., Lopez-Balboa, C. (2008). Pyrrolizidine alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(3), 153-66.
32. Culvenor, CCJ. (1956). The alkaloids of *Echium plantagineum*. I. Echiumine and Echimidine. *Australian Journal of Chemistry*, 9, 512-20.
33. George, E. Burrows., Ronald, J.Tyrl. (2013). Toxic Plants of North America (Second edition). Oxford: *Wiley-Blackwell*, 266-281.
34. Sarg, TE-D, S., Abdel Aziz, E., Abdel Ghani, A., Roeder, E. (1992). Pyrrolizidine alkaloids from *Echium angustifolium*. *Fitoterapia*, 63(5), 466-68.
35. Wassel, G., El-Menshaw, B., Saeed, A., Mahran, G. (1987). Toxic pyrrolizidine alkaloids of certain *Boraginaceae* plants. *Acta Pharmaceutica Suecica*, 24(4), 199-204.
36. Mehrabani, MG., Alireza, S., Ebrahim, G., Nasrolah; Shams, M. (2006). Toxic pyrrolizidine alkaloids of *Echium amoenum* Fisch. & Mey. *Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 14(3), 122-27.
37. Boppre, M., Colegate, SM., Edgar, JA. (2005). Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 594-600.
38. Culvenor, CC., Edgar, JA., Smith, LW. (1981). Pyrrolizidine alkaloids in honey from *Echium plantagineum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(5), 958-60.
39. Kempf, M., Wittig, M., Reinhard, A., Von der Ohe, K., Blacquiere, T., Ræzke, KP. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of

analytical methods. *Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Expo Risk Assess*, 28(3), 332-47.

40. Betteridge, K., Cao, Y., Colegate, SM. (2005). Improved method for extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in honey: application to *Echium vulgare* honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1894-902.
41. Amal, H. (1971). Investigation of *Echium italicum* L.var *biebersteinii*. Lac. *Journal of Faculty of Pharmacy*, 7, 85-95.
42. Alali, FQ., Tahboub, YR., Ibrahim, ES., Qandil, AM., Tawaha, K., Burgess, JP. (2008). Pyrrolizidine alkaloids from *Echium glomeratum* (Boraginaceae). *Phytochemistry*, 69(12), 2341-6.
43. ElShazly, A., Sarg, T., Ateya, A., Aziz, EA., ElDahmy, S., Witte, L. (1996). Pyrrolizidine and tetrahydroisoquinoline alkaloids from *Echium humile*. *Phytochemistry*, 42(1), 225-30.
44. Kazimierz, M. (2004). Screening for pyrrolizidine alkaloids in plant materials by electron ionization RP-HPLC-MS with thermabeam interface. *Biomedical chromatography*, 18(9), 745-51.
45. Colegate, SM., Edgar, JA., Knill, AM., Lee, ST. (2005). Solid-phase extraction and HPLC-MS profiling of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides: a case study of *Echium plantagineum*. *Phytochemical Analysis*, 16(2), 108-19.
46. Karimov, AT. M. V., Lutfullin, K. L., Yunusov, S. Yu. (1975). Alkaloids of *Echium vulgare* and *Berberis oblonga*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 11(3), 433-4.
47. Manko, IV. (1964). Studies on *Cynoglossum officinale* and *Echium vulgare* alkaloids and preparation of standard cynoglossum preparations. *Journal of Farm Zh*, 19, 22-6.
48. Di Paola-Naranjo, RD., Sanchez-Sanchez, J., Gonzalez-Paramas, AM., Rivas-Gonzalo, JC. (2004). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 205-10.
49. Cequier-Sanchez, E., Rodriguez, C., Dorta-Guerra, R., Ravelo, AG., Zarate, R. (2011). *Echium acanthocarpum* hairy root cultures, a suitable system for polyunsaturated fatty acid studies and production. *BMC Biotechnology*, 11, 42.
50. Kuruüzüm-Uz, A., Güvenalp, Z., Ströch, K., Demirezer, L.Ö., Zeeck, A. (2004). Phytochemical and antimicrobial investigation of *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(9), 833-36.

51. Tomas, B., Francisco, F., Federico, F. Cristina, GV. (1989). Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47(3), 337-40.
52. Shams, KHM., Mohamed, WA., Ismail, IA. (2006). Phytochemical and bioactivity investigation of *Echium sericeum* (Vahl) growing in Egypt. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy*, 44(4), 117-26.
53. Mehrabani, MGN., Sajjadi, E., Ghannadi, A., Ardakani, MS. (2005). Main phenolic compound of petals of *Echium amoenum* Fisch. and C. A. Mey., a famous medicinal plant of Iran. *Daru*, 13, 65-69.
54. Mitkov, S., Ilieva I., Pangarova, t., Pencheva, I. (2002). Phenolcarboxylic acids in *Echium vulgare* L. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44, 43-48.
55. Guil-Guerrero, JL., Gomez-Mercado, F., Garcia-Maroto, F., Campra-Madrid, P. (2000). Occurrence and characterization of oils rich in gamma-linolenic acid Part I: *Echium* seeds from Macaronesia. *Phytochemistry*, 53(4), 451-6.
56. Guil-Guerrero, JL., Garcia-Maroto, F., Campra-Madrid, P., Gomez-Mercado, F. (2000). Occurrence and characterization of oils rich in gamma-linolenic acid Part II: fatty acids and squalene from Macaronesian *Echium* leaves. *Phytochemistry*, 54(5), 525-9.
57. Velasco, L., Goffman, DF. (1999). Chemotaxonomic significance of fatty acids and tocopherols in *Boraginaceae*. *Phytochemistry*, 52, 423-26.
58. Guil-Guerrero, JL., Gomez-Mercado, F., Rodriguez-Garcia, I., Campra-Madrid, P., Garcia-Maroto, F. (2001). Occurrence and characterization of oils rich in gamma-linolenic acid (III): the taxonomical value of the fatty acids in *Echium* (*Boraginaceae*). *Phytochemistry*, 58(1), 117-20.
59. Lopez-Martinez, JC., Campra-Madrid, P., Guil-Guerrero, JL. (2004). Gamma-linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(5), 294-8.
60. Guil-Guerrero, JL., Lopez-Martinez, JC., Campra-Madrid, P., Rincon-Cervera, MA. (2007). GLA purification from *Echium fastuosum* seed oil in a two-step process: simultaneous PUFAs extraction/ concentration and selective enzymatic esterification. *Journal of Food Biochemistry*, 31(3), 386-98.
61. Garcia-Maroto, F., Garrido-Cardenas, JA., Rodriguez-Ruiz, J., Vilches-Ferron, M., Adam, AC., Polaina, J. (2002). Cloning and molecular characterization of the delta 6-desaturase from two *Echium* plant species: production of GLA by heterologous expression in yeast and tobacco. *Lipids*, 37(4), 417-26.
62. BLJ, M. Berti., Dash, S., Fischer, S., Wilckens, R., Hevia, F. (2007). *Echium*: a source of stearidonic acid adapted to the northern great plains in the US.

Issues in new crops and new uses. In: Whipkey JJaA, editor. Alexandria: ASHS Press, 120-25.

63. Zhou, X.R., Robert, S., Singh, S., Green, A. (2006). Heterologous production of GLA and SDA by expression of an *Echium plantagineum* Delta 6-desaturase gene. *Plant Science*, 170(3), 665-73.
64. Erdemoğlu, N., Küsmenoğlu, S., Vural, M. (2004). Gamma-Linolenic acid content and fatty acid composition of *Boraginaceae* seed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(3), 160-64.
65. Guil-Guerrero, J.L., Lopez-Martinez, J.C., Gomez-Mercado, F., Campra-Madrid, P. (2006). Gamma-linolenic and stearidonic acids from Moroccan *Boraginaceae*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(1), 43-47.
66. Ruiz-Lopez, N., Haslam, R.P., Venegas-Calero, M., Larson, T.R., Graham, I.A., Napier, J.A. (2009). The synthesis and accumulation of stearidonic acid in transgenic plants: a novel source of 'heart-healthy' omega-3 fatty acids. *Journal of Plant Biotechnology*, 7(7), 704-16.
67. Kleiman, R.F., Wolff, I.A. (1964). Search for new industrial oils. XI. Oils of *Boraginaceae*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 41, 459-60.
68. Sakineh, A.T.R., Taghizadeh, M., Fazeli, F., Salmaki, Y. (2011). Characterization of fatty acids in different organs of some Iranian *Echium* plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(19), 4814 - 21.
69. Guil-Guerrero, J.L., Maroto, F.F.G., Gimenez, A.G. (2001). Fatty acid profiles from forty-nine plant species that are potential new sources of gamma-linolenic acid. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 78(7), 677-84.
70. Czaplicki, S., Zadernowski, R., Ogrodowska, D. (2009). Triacylglycerols from viper bugloss (*Echium vulgare* L.) seed bio-oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(12), 1266-69.
71. Guil-Guerrero, J.L., Campra-Madrid, P., Belarbi, E.H. (2000). Gamma-linolenic acid purification from seed oil sources by argentated silica gel chromatography column. *Process Biochemistry*, 36(4), 341-54.
72. Campra-Madrid, P., Guil-Guerrero, J.L. (2002). High-performance liquid chromatographic purification of gamma-linolenic acid (GLA) from the seed oil of two *Boraginaceae* species. *Chromatographia*, 56(11-12), 673-77.
73. Cequier-Sanchez, E., Rodriguez, C., Ravelo, A.G., Zarate, R. (2008). Dichloro- methane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4297-303.
74. Manas-Fernandez, A., Vilches-Ferron, M., Garrido-Cardenas, J.A., Belarbi, E.H., Alonso, D.L., Garcia-Maroto, F. (2009). Cloning and molecular

- characterization of the acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from *Echium*. *Lipids*, 44(6), 555-68.
75. Guil-Guerrero, J.L., Garcia-Maroto, F., Vilches-Ferron, M.A., Lopez-Alonso, D. (2003). Gamma-linolenic acid from fourteen *Boraginaceae* species. *Industrial Crops and Products*, 18(1), 85-89.
 76. Constantinescu, E., Tamasdan, L. (1961). Contribution to the chemical study of *Echium vulgare* L. European review for medical and pharmacological science, 6, 21-4.
 77. Pardo, F., Perich, F., Torres, R., Delle Monache, F. (2000). Stigmast-4-ene-3,6-dione an unusual phytotoxic sterone from the roots of *Echium vulgare* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(9), 911-13.
 78. Çakılcıoğlu, U., Kürşat, M. (2007). Harput (Elazığ) ve çevresinin etnobotanik özellikleri. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, 22-28.
 79. Çakılcıoğlu, U., Türkoğlu, I. (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of ethnopharmacology*, 132(1), 165–75.
 80. Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yeşilada, E., Fukui, H., Goto, K., Ikeshiro, Y. (1994). Traditional Medicine in Turkey III. Folk Medicine in East Anatolia, Van and Bitlis Provinces. *Pharmaceutical Biology*, 32(1), 3-12.
 81. Fujita, T.S., Tabata, M., Yeşilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, Y. (2013). Traditional Medicine in Turkey VII. Folk Medicine in Middle and West Black Sea Regions. *Spri*, 49(4), 406-22.
 82. Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T. (1995). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*, 46(3), 133-52.
 83. Sarper, F., Akaydin, G., Şimşek, I., Yeşilada, E. (2009) . An Ethnobotanical Field Survey in the Haymana District of Ankara Province in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 33, 79-88.
 84. Ünsal Ç, Vural, H., Sariyar, G., Özbek, B., Ötük, G. (2010). Traditional medicine in Bilecik province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 139-50.
 85. Altundağ, E., Öztürk, M. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 19, 756–77.
 86. Sezik, E., Tabata, M., Honda, G., Takashi, Y., Fujita, T., Anaka, T., Takeda, Y. (1997). Traditional medicine in Turkey VIII. folk medicine in east Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağır, Kars, Iğdır province. *Economic Botany*, 51(3), 195-211.

87. Natale, DA., Pollio, A. (2007). Plants species in the folk medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 295-303.
88. Ghorbani, A. (2005). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran (Part 1): general results. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(1), 58-68.
89. Mirdeilami, SZ., Barani, H., Mazandarani, M., Heshmati, G. (2011). An ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maraveh Tappeh Region , North of Iran. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 2(1), 327-38.
90. Nićiforović, N., Mihailović, V., Masković, P., Solujić, S., Stojković, a, Pavlović Muratspahić, D. (2010). Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3125-30.
91. Graham, JG., Quinn, ML., Fabricant, DS., Farnsworth, NR. (2000). Plants used against cancer-an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 347-77.
92. Ferreira, ICFR., Aires, E., Barreira, JCM., Estevinho, LM. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114(4), 1438-43.
93. Ranjbar, A., Khorami, S., Safarabadi, M., Shahmoradi, A., Malekirad, AA., Vakilian, K. (2006). Antioxidant activity of Iranian *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey flower decoction in humans: A cross-sectional before/after clinical trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(4), 469-73.
94. Niciforovic, N., Mihailovic, V., Maskovic, P., Solujic, S., Stojkovic, A., Pavlovic Muratspahic, D. (2010). Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *Food Chemical Toxicology*, 48(11), 3125-30.
95. Abed, A., Minaiyan, M., Ghannadi, A., Mahzouni, P., Babavalian, MR. (2012). Effect of *Echium amoenum* Fisch. et Mey a Traditional Iranian Herbal Remedy in an Experimental Model of Acute Pancreatitis. *ISRN Gastroenterology*, 2012, 1415-48.
96. Uysal, H., Kizilet, H., Ayar, A., Taheri, A. (2012). The use of endemic Iranian plant, *Echium amoenum*, against the ethyl methanesulfonate and the recovery of mutagenic effects. *Toxicology and Industrial health*, 1-8.
97. Conforti, F., Ioele, G., Statti, GA., Marrelli, M., Ragno, G., Menichini, F. (2008). Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food Chemical Toxicology*, 46(10), 3325-32.

98. Wassel, G., el-Menshawi, B., Saeed, A., Mahran, G., El-Merzabani, M. (1987). Screening of selected plants for pyrrolizidine alkaloids and antitumor activity. *Pharmazie*, 42(10), 709.
99. Moallem, SA., Hosseinzadeh, H., Ghoncheh, F. (2007). Evaluation of antidepressant effects of aerial parts of *Echium vulgare* on mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 10(3), 189–96.
100. Sayyah, M., Kamalinejad, M. (2006). A preliminary randomized double blind clinical trial on the efficacy of aqueous extract of *Echium amoenum* in the treatment of mild to moderate major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 30(1), 166-9.
101. Sayyah, M., Boostani, H., Pakseresht, S., Malaieri, A. (2009). Efficacy of aqueous extract of *Echium amoenum* in treatment of obsessive-compulsive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33(8), 1513-6.
102. Gholamzadeh, S. Zare. S., Ilkhanipoor, M. (2007). Evaluation of the anxiolytic effect of *Echium amoenum* petals extract, during chronic treatment in rat. *Research in Pharmaceutical Science*, 2(2), 91–95.
103. Gomes, NGM., Campos, MG., Orfao, JMC., Ribeiro, CAF. (2009). Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* , 33(8), 1372-89.
104. Hosseinzadeh, HSS., Shahsavand, S. (2012). Anxiolytic and Hypnotic Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of Aerial Parts of *Echium italicum* L. in Mice. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 7(2), 71-79.
105. Shafaghi, B., Naderi, N., Tahmasb, L., Kamalinejad, M. (2002). Anxiolytic Effect of *Echium amoenum* L . in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 1(1), 37-41.
106. Heydari, AM., Hosseini, A., Vahedian, M. (2006). Anticonvulsant effects of methanolic extracts of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey against seizure induced by picrotoxin in mice. *Pakistan Journal of Biological sciences*, 9(4), 772-76.
107. Gholamzadeh, S., Zare, S., Ilkhanipoor, M. (2008). Anxiolytic effect of *Echium amoenum* during different treatment courses. *Resuarch Journal of Biological Sciences*, 3(2), 176-78.
108. Rabbani, M., Sajjadi, SE., Vaseghi, G., Jafarian, A. (2004). Anxiolytic effects of *Echium amoenum* on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Fitoterapia*, 75(5), 457-64.

109. Rusinov, K.S., Atanasova-Shopova, S. (1964). Pharmacological studies on our plants with special reference to their anticonvulsive properties. *Izv Inst Fiziol (Sofia)*, 7, 205-15.
110. Farahani, M., Branch, Q., Azad, I. (2013). Antiviral effect assay of aqueous extract of *Echium Amoenum*-L against HSV-1. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 15(8), 46-48.
111. Abolhassani, M. (2004). Antibacterial effect of Borage (*Echium amoenum*) on *Staphylococcus aureus*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(5), 3.
112. Karakaş, F.P., Yildirim, A., Türker, A. (2012). Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish Journal of Biology*, 36, 641–52.
113. Quave, C.L., Plano, L.R., Pantuso, T., Bennett, B.C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(3), 418-28.
114. Peter, MHP., Madeleine, R.G. (1970). Antibiotic effect of *Echium* extracts. *Studii si cercetari de biologie, seria botanica*, 22(1), 71-74.
115. Tabata, M., Tsukada, M., Fukui, H. (1982). Antimicrobial activity of quinone derivatives from *Echium lycopsis* callus cultures. *Planta Medica*, 44(4), 234-6.
116. Shcherbanovskii, L.R.N.G.I., Rabinovich, Z.D., Gorina, V.A. (1972). Plant naphthoquinones as inhibitors of yeasts as well as lactic acid and acetic acid bacteria. *Rastitel'nye Resursy*, 8(1), 112-15.
117. Heidari, M.R., Azad, E.M., Mehrabani, M. (2006). Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. extract in mice: possible mechanism involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(3), 345-9.
118. Bell, J.G., Strachan, F., Good, J.E., Tocher, D.R. (2006). Effect of dietary echium oil on growth, fatty acid composition and metabolism, gill prostaglandin production and macrophage activity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 37(6), 606-17.
119. Díaz-López, M., Pérez, M.J., Acosta, N.G., Jerez, S., Dorta-Guerra, R., Tocher, D.R., Rodríguez, C. (2010). Effects of dietary fish oil substitution by *Echium* oil on enterocyte and hepatocyte lipid metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 155(4), 371-9.
120. Miller, M.R., Nichols, P.D., Carter, C.G. (2007). Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(2), 382-92.

121. Raza, M., Choudhary, MI. (2000). Medicinal plants with anticonvulsant studies. *Natural Products Chemistry*, 22, 507-53.
122. Yang, Q., O'Shea, TM. (2009). Dietary *Echium* oil increases tissue (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids without elevating hepatic lipid concentrations in premature neonatal rats. *Journal of Nutrition*, 139(7), 1353-9.
123. Zhang, P., Boudyguina, E., Wilson, MD., Gebre, AK., Parks, JS. (2008). *Echium* oil reduces plasma lipids and hepatic lipogenic gene expression in apoB100-only LDL receptor knockout mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 655-63.
124. Zamansoltani, F., Nassiri-asl, M., Karimi, R., Mamaghani-rad, P. (2008). Hepatotoxicity Effects of Aqueous Extract of *Echium amoenum* in Rats. *Pharmacologyonline*, 1, 432-38.
125. Mehrabani, MMM., Raftari, Sh., Nabipour, F., Heidary, MR., Mahdavi, Z., Sadeghi, RB. (2007). Evaluation of Hepatotoxicity of Common Doses of Decoction of *Echium Amoenum* Fisch and C.A. Mey in Rats. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 14(1), 44-54.
126. Peterson, JEJ. (1983). Toxicity of *Echium plantagineum* (Paterson's curse). II. Pyrrolizidine alkaloid poisoning in rats. *Australian Journal of Agricultural Research*, 35(2), 305.
127. Cheeke, PR. (1988). Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Animal Science*, 66(9), 2343-50.
128. Culvenor, CCJ. (1985). Paterson's curse and toxic Alkaloids Search, Sydney, 16(7-8), 219-23.
129. Culvenor, CCJ., Jago, MV., Peterson, JE., Smith, LW., Payne, AL., Campbell, DG. (1984). Toxicity of *Echium plantagineum* (Paterson Curse) .1. marginal toxic effects in merino wethers from long-term feeding. *Australian Journal of Agricultural Research* , 35(2), 293-304.
130. George-Grambauer, TDSR., Rac, R. (1962). Hepatogenous chronic copper poisoning in sheep in South Australia due to the consumption of *Echium plantagineum*. *Australian Veterinary Journal*, 38, 288-93.
131. Boppré, M., Colegate, SM., Edgar, JA., Fischer, OW. (2008). Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5662-72.
132. Seaman, JT., Dixon, RJ. (1989). Investigations into the toxicity of *Echium plantagineum* in sheep. 2. Pen feeding experiments. *Australian Veterinary Journal*, 66(9), 286-92.

133. Seaman, JT., Turvey, WS., Ottaway, SJ., Gilmour, AR., Dixon, RJ. (1989). Investigations into the toxicity of *Echium plantagineum* in sheep. 1. Field grazing experiments. *Australian Veterinary Journal* , 66(9), 279-85.
134. Seaman, JT. (1987). Pyrrolizidine Alkaloid poisoning of sheep in New South Wales. *Australian Veterinary Journal* , 64(6), 164-7.
135. Burdon, JJ., Burdon, JG. (1983). Allergy associated with Paterson's Curse. *The Medical Journal of Australia* , 2(2), 87-8.
136. Katelaris, C., Baldo, BA., Howden, ME., Matthews, PA., Walls, RS. (1982). Investigation of the involvement of *Echium plantagineum* (Paterson's curse) in seasonal allergy. IgE antibodies to *Echium* and other weed pollens. *Allergy* , 37(1), 21-8.
137. Gerald, MCDRK., David, JM., David, EP., Roger, R., Martin, C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration* , 2, 165–70.
138. Altındaş, M. (2001). *Yara-Açık Yara*. Cilt Hastalıkları ve Yara Bakımı Sempozyumu: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. 2001.
139. Rashed, A., Afifi, FU., Disi, AM. (2003). Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca Olerace* L. (Growing in Jordan) In *Mus musculus* JVI-1. *Journal of Ethnopharmacology* , 88, 131-36.
140. David, K., Heather, O. (2000). The basic principles of wound healing. *Ostomy Wound Management* , 46(11), 16.
141. İnternet: Öcal, K. Yara İyileşmesi ve Yara Bakımı. URL: [http://yeniweb.mersin.edu.tr/uploads/304/files/Yara_iyile%C5%9Fmesi_ve_yara_bak%C4%B1m%C4%B1\(D4-K%C3%96\).pdf](http://yeniweb.mersin.edu.tr/uploads/304/files/Yara_iyile%C5%9Fmesi_ve_yara_bak%C4%B1m%C4%B1(D4-K%C3%96).pdf), Son Erişim Tarihi: 14.10.2014
142. Thomson, PD. (2000). Immunology, microbiology and the recalcitrant wound. *Ostomy Wound Management* , 46, 77-82.
143. Pierce, GF. (2001). Inflammation in non healing diabetic wounds: The space-time continuum does matter. *American Journal of Pathology* , 159, 399-403.
144. Loggia, DRTA. (1994). The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica* , 60, 516-20.
145. Yeoh, S. (2000). The influence of iron and free radicals on chronic leg ulceration. *Primary Intention* , 8, 47-55.
146. Rijswijk, L., Harding, K., Bacilious, N. (2000). Issue and clinical implications. *Ostomy Wound Management* , 46, 51-62.

147. Faoagali, J. (1997). Use of antiseptics in managing difficult wounds. *Primary Intention*, 7, 156-60.
148. Gupta, NJU. (2010). Prominent wound healing properties of Indigenous medicines. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 1(1), 2-13.
149. Raf, C. (1985). Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 13, 701-25.
150. Leibovich, SJ. (1975). The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and anti-macrophage serum. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78, 71-100.
151. Epstein, WL. (1989). *Dermatology Focus*. Chicago: Eragmaton, 7
152. Cheng, CY., Leggett, CG. (1988). Fibronectin enhances healing of excised wounds in rats. *Archives of Dermatological Research*, 124, 221-25.
153. Repesh, LA., Furcht, LT. (1982). Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 30, 351-58.
154. Sears, JK. (1996). Cutaneous wound healing in space. *Cutis*, 48, 307-08.
155. Erdem, C., Çelebi, CR. (1996). *Tüm Yönleriyle Yara İyileşmesi*. Ankara, Türk Dermatoloji Derneği Yayınları, 19-26.
156. Kumar, B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R., Pushpangadan, P. (2007). Ethnopharmacological approaches to wound healing: Exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 103-13.
157. Carlson, MA. (1997). Acute wound failure. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 607-36.
158. Millikan, LE. (1992). Fibrel and wound healing. *Clinics in dermatology*, 90, 569-72.
159. Mian, MBF., Mian, E. (1992). Collagen as a pharmacological approach in wound healing. *International Journal on Tissue Reactions*, 15, 1-9.
160. Zeren, İ. (1996). Yara iyileşmesi ve kolajen. *Tüm yönleriyle yara iyileşmesi*. Ankara: Türk Dermatoloji Derneği Yayınları, 37-40.
161. Regan, MC., Barbul, A. (1994). *The Cellular Biology of Wound Healing*. Berlin: Springer-Verlag
162. Engin, A. (1996). Yara İyileşmesi. (İkinci baskı), Sayek, İ.(ed), *Temel Cerrahi*, Ankara: Güneş Kitabevi, Cilt 1, 266-277.
163. Bullard, K., Mudgett, JS. (1999). Impaired wound contraction in stromelysin-1 deficient mice. *Annals of Surgery*, 230, 260-5.

164. Nimmi, ME. (1974). Collagen: its structure and function in normal and pathological connective tissues. *Semin Arthritis Rheum*, 4, 95-150.
165. Ignatz, RA. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 4337-45.
166. Caterson, BLD. (1978). Changes in the metabolism of the proteoglycans from sheep articular cartilage in response to mechanical stress. *Biochimica Biophysica Acta*, 540, 412-22.
167. Reed, MJ., Lane, TF. (1993). Differential expression of SPARC and thrombospondin I in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41, 1467-77.
168. Thornton, FJ. (1997). Healing in the gastrointestinal tract. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 549-73.
169. Knight, B. (1996). *Forensic Pathology*. Second edition. New York: Oxford University Press, 34.
170. Polat, O., İnanıcı, M., Aksoy, ME. (1997). *Adli Tıp Ders Kitabı*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri
171. Shrimanker, M., Modi, PN., Dave, R. (2013). A Review: Screening Models for Wound Healing Activity in Animals. *American Journal of Pharmatechnology Research*, 3(3), 237-51.
172. Sahasrabudhe, ADM. (2010). Anti-hyaluronidase, Anti-elastase Activity of *Garcinia indica*. *International Journal of Botany*, 6(3), 299-303.
173. Menke, NB., Witten, TM., Bonchev, DG., Diegelmann, RF. (2007). Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology*, 56, 967-70.
174. Wang, JP., Ruan, JL., Cai, YL., Luo, Q., Xu, HX., Wu, YX. (2001). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(3), 1033-8.
175. Liu, CL. (2013). *In vivo* and *in vitro* mechanistic studies of the wound healing effects of *Rehmanniae Radix*. ProQuest LLC The Chinese University of Hong Kong
176. Akkol, EK., Koca, U., Pesin, I., Yilmazer, D., Toker, G., Yesilada, E. (2009). Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by in vivo models. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(1), 137-41.
177. Mukherjee, PK., Verpoorte, R., Suresh, B. (2000). Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: *Hypericaceae*) leaf extract on different wound model in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3), 315-21.

178. Mekonnen, A., Sidamo, T., Asres, K., Engidawork, E. (2013). In vivo wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe petitiiana* A. Rich (*Crassulaceae*) leaves in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(2), 638-46.
179. Wanda, A., Dorsett-Martin, D. (2004). Rat models of skin wound healing: A review. *Wound Repair and Regeneration*, 12(6), 591-99.
180. Woessner, JFJ. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Journal of Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93, 440-7.
181. Fitzmaurice, SD., Sivamani, RK., Isseroff, RR. (2011). Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24(3), 113-26.
182. Lee, SK., Mbwambo, ZH., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, EJ., Mehta, RG. (1998). Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening (CCHTS)*, 1(1), 35-46.
183. Halliwell, B., Gutteridge, JM. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymology*, 186, 1-85.
184. Miller, DD. (1996). *Minerals*. In: Fennema OR, editor. Food chemistry. New York: Marcel Dekker, 617-49.
185. Lindsay, RC. (1996). *Food Additives*. In: Fennema OR, editor. Food Chemistry. New York: Marcel Dekker, 767-823.
186. Lavelli, V., Peri, C., Rizzolo, A. (2000). Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1442-8.
187. Dinis, TC., Maderia, VM., Almeida, LM. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161-9.
188. Selvakumar, KMR., Srinivasan, G., Baskar, V. (2011). Antioxidant assays in pharmacological research. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation*, 1(4), 99-103.
189. Folin, O., Denis, W. (1912). On phosphotungstic - phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 12, 239-243.
190. Folin, O., Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-50.

191. Singleton, VL., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants, Part A*, 299, 152-78.
192. Rice-Evans, CA., Paganga, G. (1996). Structure - antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-56.
193. Chen, YT., Jia, Z.J., Ju, Y. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 9(1), 19-21.
194. Burak, YÇ. (1999). Flavonoids and their antioxidant properties. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 19, 296-304.
195. Chang, CC., Wen, HM., Chern, JC. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-82.
196. Woisky, RG., Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105.
197. Singh, R. (2013). HPLC method development and validation- an overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 4(1), 26-33.
198. SDBS SDFOC: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
199. Seetharaman, DJP., Cheol, P., Sejin, P., Park, YH., Kim, ST., Choi, YH., Choi, YW. (2012). *In vitro* and *in vivo* anticancer effects of *Lithospermum erythrorhizon* extract on B16F10 murine melanoma. *Journal of Ethnopharmacology*, 144, 335-45.
200. Özgen, U., Kazaz, C., Seçen, H. (2004). Naphthoquinones from the Roots of *Onosma argentatum* Hub.-Mor. (Boraginaceae). *Turkish Journal of Chemistry*, 28, 451-54.
201. Chaouche, T., Med, FH., Fawzia, AB. (2012). Identification of shikonin from the roots of *Echium pycnanthum* Pomel. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 30-32.
202. Yani, Hu., Kelvin, SL., Zhao, Z. (2006). Simultaneous determination of naphthoquinone derivatives in *Boraginaceae* herbs by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 577, 26-31.
203. Lazarus, GSC., Knighton, DR., Margolis, DJ., Pecoraro, RE., Rodeheaver, G., Robson, MC. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Archives of Dermatology*, 130, 489-93.
204. Jeffcoate, WJH. (2003). Diabetic foot ulcers. *Lancet*, 361, 1545-51.

205. Petrie, NE. (2003). Gene therapy in wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 83, 194-99.
206. Harding, KGM., Patel, GK. (2002). Healing chronic wounds. *Archives of British Medical Journal*, 324, 160-63.
207. Rubing, WRY., Wen, Z., Defeng, Xu., Shaoshun, Li. (2012). Shikonin and its derivatives: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(9), 977-97.
208. Wenbi, XGL., Liming, Z., Yun, Z., Wenji, Y. (2009). *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of acetylshikonin isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston (Ruanzicao) cell suspension cultures. *Chinese Medicine*, 4, 14.
209. Huang, HXB., Zhu, XF., Feng, GK., Zhou, JM., Wang, Y., Wu, HQ., Huang, ZS., Gu, LQ., Liu, ZC. (2005). Antitumor effect and mechanism of shikonin derivative SYUNZ-7. *Cancer*, 24(12), 1453-8.
210. Wang, HB., Ma, XQ. (2012). Mechanisms of (2-methyl-n-butyl) shikonin induced apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 47(6), 816-21.
211. Karayannopoulou, MLP., Papazogiou, LG. (2010). Naturally occurring isohexenylnaphthazarins and wound healing: experimental study in dogs. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 14, 62-70.
212. Karayannopoulou, MTV., Loukopoulos, P. (2011). Evaluation of the effectiveness of an ointment based on alkannins/shikonins on second intention wound healing in the dog. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75, 42-8.
213. Tanaka, SMT., Tsukada, M., Tabata, M. (1986). A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin. *Journal of Natural Products*, 49(3), 466-69.
214. Wang, JP., Chang, LC., Kuo, SC. (1995). Inhibition of hind-paw edema and cutaneous vascular plasma extravasation in mice by acetylshikonin. *European Journal of Pharmacology*, 272(1), 87-95.
215. Wang, JP., Raung, SL., Hsu, MF., Kuo, SC. (1997). Investigation of the inhibition by acetylshikonin of the respiratory burst in rat neutrophils. *British Journal of Pharmacology*, 121(3), 409-16.
216. Xin, CLY., Oppenheim, JJ., Howard, OMZ. (2002). Cellular Pharmacology Studies of Shikonin Derivatives. *Journal of Phytotherapy Research*, 16, 199-209.
217. Rhett, JM., Ghatnekar, GS., Palatinus, JA., O'Quinn, M., Yost, MJ., Gourdie, RG. (2008). Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends in Biotechnology*, 26(4), 173-180.

EKLER

EK-1. Etik kurul izin belgesi



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

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 66-5238
KONU :

21.03/2011

Sayın

Doç.Dr.Osman ÜSTÜN
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Osman ÜSTÜN ve Nueraniye REHEMAN'dan oluşan, G.Ü.ET-11.023 kod numaralı ve "*Bazı Echium türlerinin biyolojik aktivitelerinin araştırılması*" 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-11.023 and entitled "*Research on the biological activities of some Echium sp.*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


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

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI
KARARLARI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 16.03.2011		TOPLANTI SAYISI : 03	
ADI-SOYADI			
Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN		KATILDI	
Prof.Dr.Aydan BABÜL		KATILDI	
Prof.Dr.Nurten TÜRKÖZKAN		KATILDI	
Prof.Dr.M.Tahir HATİPOĞLU		KATILDI	
Prof.Dr.Mustafa ARK		KATILDI	
Doç.Dr.Şule COŞKUN CEVHER		KATILDI	
Uzman Dr.Şeyda DİKER		KATILDI	
Arş.Gör. Esra PER		KATILDI	
Dr.Kadir BAŞAR		KATILDI	
İlknur ALKAN		KATILAMADI	

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

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ERUYGUR, Nuraniye

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 08/05/1982 Kaşgar

Medeni hali : Evli

Telefon : 0 (312) 244 3039

e-posta : nuraniye58@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniv./Ecz.Fak./Farmakognozi AD	Devam Ediyor
Yüksek lisans	Xinjiang Tıp Üniv./Ecz.Fak./Farmakognozi AD.	2008
Lisans	Xinjiang Tıp Üniv./Ecz.Fakültesi	2005
Lise	Kaşgar 1. Lisesi	2000

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2007- 2008	Xinjiang Tıp Üniv./Ecz.Fak./Farmakognozi AD.	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce, Çince

Yayınlar

Nueraniye, R., Kasimu, R. (2008). Analysis of essential oil from *Alpinia officinarum* Hance by GC-MS. *Journal of Xinjiang Medical University*, 31(4), 441-442.

Koca, U., Çölgeçen, H., Nueraniye, R. (2012). Progress in Biotechnological Applications of Diverse Species in *Boraginaceae* Juss. *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*. 200-215



GAZİ GELECEKTİR..