



***HELİCHRYSUM PLİCATUM* SUBSP. *PSEUDOPLİCATUM*
BİTKİ EKSTRESİNDEKİ KLOROJENİK ASİTİN HPLC
YÖNTEMİ İLE ANALİZİ VE BİTKİ EKSTRESİNİN YARA
İYİLEŞTİRME ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Abdulkaki AKPINAR

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

Yüksek Lisans Tezi –2020

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HELİCHRYSUM PLİCATUM* SUBSP. *PSEUDOPLİCATUM*
BİTKİ EKSTRESİNDEKİ KLOROJENİK ASİTİN HPLC
YÖNTEMİ İLE ANALİZİ VE BİTKİ EKSTRESİNİN YARA
İYİLEŞTİRME ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

AbdulBaki AKPINAR

Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

ERZURUM
2020

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

***HELİCHRYSUM PLİCATUM* SUBSP. *PSEUDOPLİCATUM* BİTKİ
EKSTRESİNDEKİ KLOROJENİK ASİTİN HPLC YÖNTEMİ İLE
ANALİZİ VE BİTKİ EKSTRESİNİN YARA İYİLEŞTİRME
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Abdulkaki AKPINAR

Tez Savunma Tarihi: 17.09.2020

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU (Atatürk Üniv.)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Onur ŞENOL (Atatürk Üniv.)

Jüri Üyesi : Dr.Öğr. Üyesi CebraİL GÜRSUL (Erzincan Binali Yıldırım Üniv.)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM-2020

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Yara.....	3
2.1.1. Yara İyileşmesi ve Mekanizması	4
2.1.1.1. İnflamatuar Faz (Hemostaz ve Enflamasyon)	5
2.1.1.2. Proliferatif Faz (Çoğalma-Onarım)	6
2.1.1.3. Yeniden Modelleme (Remodelling)	7
2.1.1.4. Yara İyileşme Türleri.....	8
2.1.2. Yara İyileşmesinin <i>in vitro</i> Olarak Ölçülmesi	8
2.1.3. Yara İyileştirmede Bitkisel Yaklaşım.....	9
2.2. <i>Helichrysum plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitkisi Hakkında Genel Bilgiler.....	10
2.2.1. <i>Helichrysum</i> Türlerinin Botanik, Fitokimyasal, Biyokimyasal ve Farmakolojik Özellikleri	10
2.2.2. <i>Helichrysum plicatum</i> subsp. <i>Pseudoplicatum</i>	13
2.3. Klorojenik Asit	14
2.3.1. Klorojenik Asidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	14
2.3.2. Klorojenik asidin Biyokimyasal ve Farmakolojik Özellikleri	15

2.4. Literatür Taraması.....	18
2.4.1. Klorojenik asidin Yara İyileştirme Etkisine Yönelik Literatür Araştırması	18
2.4.2. Helichrysum Türlerindeki Klorojenik Asidin Farklı Analitiksel Yöntemler ile Belirlenmesine Yönelik Literatür Araştırması	21
2.5. Kromatografi, Kromatografinin Sınıflandırılması ve Dayandığı Parametreler	30
2.5.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)	31
2.5.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı	32
2.6. Kemometri ve Kemometrik Yöntemler	35
2.6.1. Deneysel Tasarım	36
2.6.1.1. Merkezi kompozit Tasarım (MKT) Yöntemi	37
3. MATERYAL VE METOT.....	38
3.1. Deneyde Kullanılan Madde ve Malzemeler	38
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	38
3.1.2. Bitki Materyali	38
3.1.2.1. <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitkisinin Toplanması ve Kurutulması.....	38
3.1.2.2. <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitkisinin Ekstraksiyon Prosedürü	39
3.2. Cihazlar ve Araçlar	39
3.3. Deneysel Yöntemler	40
3.3.1. <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitki Ekstresindeki Klorojenik Asidin HPLC Yöntemi ile Analizi	40
3.3.1.1. Klorojenik asidin Stok, Çalışma ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	40
3.3.1.2. HPLC Yönteminin Optimum Şartlarının Belirlenmesi	40
3.3.1.3. HPLC Yöntem Şartları.....	42
3.3.1.4. Analitik Yöntem Validasyonu	42

3.3.1.5. HPLC Analizi İçin <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitki Ekstrat	
Çözeltilisinin Hazırlanması.....	46
3.3.2. Hücre Kültürü Deneyleri	46
3.3.2.1. Human Dermal Fibroblast Hücrelerinin Kültüre Edilmesi.....	46
3.3.2.2. Human Dermal Fibroblast Hücrelerinde <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i>	
Bitki Ekstresinin ve Saf Klorojenik asidin Hücre Canlılığı Üzerindeki	
Proliferatif ve Yara İyileştirici Özelliklerinin İncelenmesi	49
3.3.2.3. Analiz Sonuçlarının İstatistiksel olarak Değerlendirilmesi	54
4. BULGULAR.....	56
4.1. <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitki Ekstresindeki Klorojenik Asidin HPLC	
Yöntemi ile Analizi.....	56
4.1.1. HPLC Geliştirme ve Yönteminin Optimum Şartlarının Belirlenmesi.....	56
4.1.1.1. Klorojenik Asidin HPLC Yöntemiyle Belirlenmesinde Merkezi Kompozit	
Tasarım Yöntemi ile Hareketli Fazın optimisasyonu.....	57
4.1.2. HPLC Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)	61
4.1.3. HPLC Yöntemi ile <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitkisinin Metanol	
Ekstrat Çözeltilisinde Klorojenik Asidin Belirlenmesi	66
4.2. Hücre Kültürü Deneyleri	68
4.2.1. Proliferatif Etkinin Belirlenmesi.....	68
4.2.1.1. <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitki Ekstresi Proliferatif Etkisinin	
Belirlenmesi	68
4.2.1.2. Klorojenik Asidin Proliferatif Etkisinin Belirlenmesi	70
4.2.2. Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi	71
4.2.2.1. <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitki Ekstresi Total Oksidan Seviyesinin	
Belirlenmesi.....	71

4.2.2.2. <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitki ekstresi Total Antioksidan Seviyesinin Belirlenmesi.....	73
4.2.2.3. Klorojenik asidin Total Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi.....	74
4.2.2.4. Klorojenik asidin Total Antioksidan Seviyesinin Belirlenmesi	76
4.2.3. Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	77
4.2.3.1. <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitki Ekstresinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	77
4.2.3.2. Klorojenik Asidin Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	79
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR	98
EKLER	110
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	110
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	111
EK-3. BİRİM ETİK KURULU KARARI	112

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince hem mesleğine hem de hayata yaklaşımı açısıyla bizlere örnek olan, bilgisini ve deneyimlerini her zaman çok cömertçe bizle paylaşan ve tezimin her aşamasında yardımını esirgemeyen tez danışmanım, saygıdeğer hocam Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'na en derin saygı ve şükranlarımı sunuyorum

Yüksek lisans tez çalışmamın yürütülmesi sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tüm enerjisi, özverisi ve anlayışıyla her zaman yanımda olan ikinci Danışman hocam sayın Doç. Dr. Gülşah GÜNDOĞDU'ya, öğrencilerinden yana anlayışlı ve yardımsever tavırlarıyla ideal eğitimci profilini sergileyen, çalışmamızda bitki toplanması ve ekstraksiyonu deneylerinde katkı sağlayan saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Üyesi Leyla GÜVEN'e, bitkinin toplanmasında desteği olan Nurullah ÇALIKIRAN'a hücre kültürü deneylerinin yapılmasında katkılarından dolayı Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLUN'a, Dr. Öğr. Üyesi Alper Kürşat DEMİRKAYA'ya, Arş.Gör. Kemal Alp NALCI'ya ve Arş.Gör. Şeymanur YILMAZ TAŞÇI'ya, HPLC deneylerini yapmam için yardımcı olan ve bilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na ve Arş.Gör. Burak BAYRAK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak benim bugünlere ulaşmamdaki insanüstü çabalarından dolayı başta babam Osman Nuri AKPINAR, annem Sare AKPINAR ve tüm aileme, her zaman yanımda olan kardeşim Abdulhamit AKPINAR'a, tez sürecinde benden inancını eksik etmeyen Feyza YEŞİL'e ve güzel insan, örnek insan olmayı kendisine hedef seçmiş olan Dr. Ahmet Faik ÇAVDAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Abdulkaki AKPINAR

ÖZET

***Helichrysum Plicatum* Subsp. *Pseudoplicatum* Bitki Ekstresindeki Klorojenik Asitin HPLC Yöntemi İle Analizi ve Bitki Ekstresinin Yara İyileştirme Üzerine Etkisinin İncelenmesi**

Amaç: *Helichrysum* türleri (Altınotu) geleneksel tıpta kullanılan ve fenolik bileşikler açısından zengin olup özellikle çiçeklerinde ana bileşen klorojenik asittir. Erzurum yöresinde kaydedilen *Helichrysum* türü *H.plicatum* subsp. *pseudoplicatum*'dur. Bu çalışmada, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin çiçeklerinin metanol ekstresinde HPLC yöntemi ile klorojenik asidin belirlenmesi ve bitki ile klorojenik asidin insan dermal hücre hattında *in-vitro* olarak hücre canlılığı üzerindeki proliferatif, oksidatif stres ve yara iyileşmesi etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: Erzurum Köşk Köyü merasında 1950 m rakımda *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisi toplandı ve kurutuldu ve bitkinin çiçekleri toz haline getirilerek metanol ile ekstrakte edildi. Elde edilen bitki ekstresinde klorojenik asidin miktar tayini için, HPLC yönteminde deney koşulları merkezi kompozit tasarım yöntemi ile optimize edildi. Kromatografik ayırım, C₁₈ (250x4.6 mm.5µm) kolonunda asetronitril ve % 0.2 ortofosforik asit içeren su (95:5 h/h) hareketli fazı kullanılarak 330 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Bitki ekstresinin ve klorojenik asitin hücre canlılığı üzerine proliferatif etkileri XTT testi, oksidatif stres etkinlikleri TAS-TOS ticari kiti ve yara iyileşmesi etkileri ise hücrelerin 0, 12, 18. ve 24. saatlerde mikroskopik görüntüleri alınarak *Scratch deneyi* ile insan dermal hücreleri üzerinde değerlendirildi.

Bulgular: Klorojenik asidin belirlenmesinde HPLC yönteminin 0.1-100 µg/mL derişim aralığında doğrusal; gün içi ve günlerarası yapılan deneyler sonucu $\leq$ % 3.32 %BSS değerleri ile kesin ve $\leq \pm 4.05$ BH değerleri ile doğru olduğu belirlendi. Geliştirilen yöntem ile *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin çiçeklerinin metanol ekstraktında klorojenik asit miktarı 97.70 ± 2.818 (µg/g ekstrakt) olarak tespit edildi. XTT test sonuçlarına göre, sırasıyla 75-250 µM ve 0.5-10 µM doz aralıklarında klorojenik asitin ve *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin önemli proliferatif etkiye sahip oldukları tespit edildi. TAS-TOS sonuçlarına göre, sırasıyla 100-250 µM ve 1-10 µg/mL doz aralıklarında klorojenik asitin ve bitki ekstresinin önemli oranda TAS düzeyini arttırdığı gözlemlendi. Sırasıyla 75-125 µM ve 1-5 µg/mL derişim aralığında klorojenik asit ve bitki ekstresinin 12. saatte hücre göçünü arttırmaya başlayıp 24. saatte belirgin şekilde yara bölgesini kapattığı belirlendi. Belirtilen doz aralığında hem hücre canlılığında ve antioksidan etkide hemde yara iyileşmesinde en güçlü etkiye sahip olduğu tespit edildi.

Sonuç: Klorojenik asidin *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin çiçeklerinde bulunan önemli bir doğal ürün olduğu ve bitki ekstresinin klorojenik aside göre daha düşük dozlarda ve daha dar terapotik aralığında hücre göçünü artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum*, HPLC, Klorojenik asit, Yara iyileştirilmesi

ABSTRACT

Analysis of Chlorogenic Acid in *Helichrysum plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Plant Extract by HPLC Method and Investigation of the Effect of Plant Extract on Wound Healing

Aim: *Helichrysum* species (Altınotu) are rich in phenolic compounds used in traditional medicine, and the main component in their flowers is chlorogenic acid. The *Helichrysum* species recorded in the Erzurum region is *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum*. In this study, it is aimed to determine chlorogenic acid in methanol extract of flowers of *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* plant by HPLC method and to investigate the proliferative, oxidative stress and wound healing effects of chlorogenic acid on human dermal cell line in vitro on cell viability.

Material and method: The *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* plant was collected and dried in the meadow of Erzurum Köşk Köyü at an altitude of 1950 m, and the flowers of the plant were pulverized and extracted with methanol. For the determination of chlorogenic acid in the obtained plant extract, the experimental conditions in the HPLC method were optimized by the central composite design method. Chromatographic separation was performed at 330 nm wavelength using a mobile phase of acetonitrile and water (95: 5 v / v) containing 0.2% orthophosphoric acid coupled with C18 (250x4.6 mm.5µm) column. The proliferative effects of plant extract and chlorogenic acid were evaluated by XTT test, oxidative stress activities TAS-TOS commercial kit and wound healing effects on human dermal cells with the Scratch experiment by taking microscopic images of the cells at 0, 12, 18 and 24 hours.

Results: The HPLC method for determining chlorogenic acid exhibit linearity in the concentration range 0.1-100 µg / mL; As a result of the experiments conducted during the day and between days, proposed method was accurate with 3.32% RSD values and ± 4.05 RE values. According to the developed method, chlorogenic acid amount was determined as 97.70 ± 2.818 (µg / g extract) in the methanol extract of the flowers of *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* plant. According to the XTT test results, chlorogenic acid and *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* plant extract has proliferative effect at 75-250 µM ve 0.5-10 µM concentrations, respectively. According to TAS-TOS results, it was observed that TAS levels significantly increased in chlorogenic acid at the dose ranges of 100-250 µM and in plant extract at the dose ranges 1-10 µg/mL. 75-125 µM chlorogenic acid and 1-5 µg/mL plant extract started to increase cell migration at the 12th hour and significantly closed the wound area at the 24th hour. it has the strongest effect on both cell viability, antioxidant effect and wound healing was found to be in this dose range.

Conclusion: It was concluded that chlorogenic acid is an important natural product found in the flowers of *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* plant, and the plant extract accelerates wound healing by increasing cell migration in lower doses and constricted therapeutic range compare to chlorogenic acid.

Keywords: *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum*, HPLC, chlorogenic acid, wound healing

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSS	: Bağlı Standart Sapma
BH	: Bağlı Hata
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CAT	: Katalaz
DMEM	: Hücre kültürü besi ortamı
DMSO	: dimetil sülfoksit
GK	: Geri Kazanım
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
H	: Helichrysum
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
MDA	: Malondialdehit
MKT	: Merkezi Kompozit Dizayn
NO	: Nitrik Oksit
OFA	: Orto Fosforik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
TOS	: Total Oksidan Seviyesi
UV-GB	: Ultraviyole Görünür Bölge
XTT	: Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntem Test Kiti

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Klorojenik asidin (5-O-kafeoilkinik asit, 5-CQA) kimyasal yapısı.	14
Şekil 2.2. HPLC cihazının şematik gösterimi.....	32
Şekil 3.1. Erzurum Köşk Köyü’nden <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitkisi.....	39
Şekil 4.1. F1 (% asetonitril derişimi) ve F2’nin (su içerisinde bulunan % OFA derişimi) bir fonksiyonu olarak pik alanları yüzey cevap eğrileri	59
Şekil 4.2. 10 µg/mL derişimde klorojenik asidin HPLC kromatogramı	60
Şekil 4.3. Klorojenik asidin artan derişimine bağı HPLC kromatogramı (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5,10, 20, 40, 60 ve 100 µg/mL).....	62
Şekil 4.4. Geliştirilen ve optimize edilen HPLC yönteminde Klorojenik asit için kullanılan çözücü kromatogramı	62
Şekil 4.4. HPLC yöntemi ile klorojenik asidin çalışma çözeltilerinden (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 ve 100 µg/mL) kalibrasyon eğrisi	63
Şekil 4.5. 10 mg/mL derişimde <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitkisinin metanol ekstraktının HPLC kromatogramı	66
Şekil 4.7. 100 mg/mL derişimde <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitkisinin metanol ekstraktının HPLC kromatogramı	67
Şekil 4.8. Çeşitli derişimlerde <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitki ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen proliferatif etkisi	69
Şekil 4.9. Çeşitli derişimlerde <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitki ekstresinin 48 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen proliferatif etkisi	69

Şekil 4.10. Çeşitli derişimlerdeki klorojenik asidin 24 saat inkübasyon süresinin ardından XTT Testi ile değerdendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen proliferatif etkisi.....	70
Şekil 4.11. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 48 saat inkübasyon süresinin ardından XTT Testi ile değerdendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen proliferatif etkisi.....	71
Şekil 4.12. Çeşitli derişimlerdeki <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitki ekstresinin 24 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total oksidan seviyesi.....	72
Şekil 4.13. Çeşitli derişimlerde <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitki ekstresinin 48 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total oksidan seviyesi	72
Şekil 4.14. Çeşitli derişimlerde <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitki ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi.....	73
Şekil 4.15. Çeşitli derişimlerde <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitki ekstresinin 48 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total antioksidan seviyesi.....	74
Şekil 4.16. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 24 saat inkübasyo süresinin ardından ortalama total oksidan seviyesi	75
Şekil 4.17. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 48 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total oksidan seviyesi	75
Şekil 4.18. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 24 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total antioksidan seviyesi	76
Şekil 4.19. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 48 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total antioksidan seviyesi	77

Şekil 4.20. <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> bitki ekstresinin insan dermal fibroblast hücrelerinin göçü üzerindeki etkisi.....	78
Şekil 4.21. Klorojenik asidin insan dermal fibroblast hücrelerinin göçü üzerindeki etkisi.....	80



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Türkiyede bulunan Helichrysum türlerindeki fenolik bileşiklerin HPLC analizi.....	11
Tablo 3.1. Klorojenik asidin HPLC ile belirlenmesi için seçilen faktörler ve aralıkları	41
Tablo 3.2. Uygulanan merkezi kompozit tasarım kapsamındaki deneyler	41
Tablo 3.3. Klorojenik asit için HPLC yöntem şartları.	42
Tablo 4.1. Klorojenik asidin (10 µg/mL) HPLC kromatogramında çözücünün etkisi ..	56
Tablo 4.2. Klorojenik asidin (10 µg/mL) HPLC kromatogramında hareketli faz bileşenlerinin etkisi	57
Tablo 4.3. Merkezi kompozit Tasarım kapsamında yapılan deneyler sonucunda klorojenik asidin pik alan değerleri.....	58
Tablo 4.4. Matematiksel quadropik modelin ANOVA analiz sonuçları.....	58
Tablo 4.5. Oluşturulan y denklemleri ve Design Expert 8 programından yararlanılarak çözülen denklemler	59
Tablo 4.6. Klorojenik asidin merkezi kompozit tasarım yöntemi ile analizi sonucu bulunan optimum değerler	59
Tablo 4.7. HPLC kromatogramında teorik ve deneysel olarak bulunan pik alan değerleri	61
Tablo 4.8. HPLC yöntemi ile klorojenik asit için elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri.....	63
Tablo 4.9. HPLC yöntemi ile klorojenik asit için elde edilen günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	64

Tablo 4.10. HPLC yöntemi kullanılarak farmasötik preparatlara katım yapılan Klorojenik asit çözeltilerinin geri kazanım değerleri	65
Tablo 4.11. Klorojenik asidin HPLC yöntemi ile belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri	65
Tablo 4.12. HPLC yöntemi ile <i>H. plicatum</i> subsp. <i>pseudoplicatum</i> Bitkisinin metanol ekstraktında klorojenik asidin miktar tayini	68



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yara, fiziksel ve kimyasal bir etki sonucunda vücut bütünlüğün bozulması olarak tanımlanır. Yara iyileşmesi, yara oluşmasından hemen sonra başlayan, dört aşamadan oluşan, hücreler ile yönetilen ve birbiriyle çakışan bir dizi karmaşık fizyolojik süreci içerir. Bu karmaşık süreç birbiri ile örtüşecek şekilde sırasıyla pıhtılaşma (hemostaz), iltihaplanma (enflamasyon), çoğalma-onarım (proliferasyon) ve yeniden modellemedir. Yaranın iyileşmesindeki en temel unsur hasarlı dokunun hiçbir iz ve cilt bozukluğu kalmadan iyileşmesidir. Günümüzde yaranın tıbbi tedavisi yaranın onarımına yardımcı olmak amacıyla ya lokal (topikal) ya da sistemik (oral ya da parenteral) ilaçların verilmesi ile gerçekleştirilir. Kullanılan topikal ajanlar arasında antibiyotikler, antioksidanlar, antiseptikler, yara iyileşmesini arttırıcı kimyasal maddeler ve bitkisel tedavi yöntemleri kullanılmaktadır.

Helichrysum, Asteraceae familyasına ait olup Dünya’da 600 türü, Türkiye florasında ise 20 türü yetişen çok yıllık bir bitkidir. *Helichrysum* halk arasında “altınotu, ölmez çiçek, herdem taze” olarak bilinmektedir. Dünyada ve ülkemizde *Helichrysum* türlerinin çiçekleri veya toprak üstü kısımları infüzyon veya dekoksion şeklinde, yarada, böbrek taşlarında, yanıkta, kulak ağrılarında, şeker hastalığında halk arasında kullanımı vardır.

Helichrysum türü üzerinde HPLC yöntemi ile yapılan fitokimyasal (flavonoidler, pironlar, floroglusinoller ve uçucu yağlar gibi fenolik bileşikler, seskiterpenler ve diterpenlerin gibi bazı türler içermektedir) araştırmalar bu bitkinin geleneksel kullanımının yanı sıra potansiyel ilaç olarak kullanılabileceği potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda bitkinin bilimsel olarak doğrulanması, standardizasyonu ve güvenlik değerlendirmesinin yapılması gerekmektedir ve bu durum

bitkide bulunan etkin maddelerinin, kontaminatların veya kalıntıların farklı analitik yöntemler kullanılarak analiz edilebilmesi ile ilişkilendirilmiştir.

Helichrysum türleri üzerine yapılan analitik çalışmalarda fenolik bileşikler açısından zengin olduğu ve klorojenik asidin ana bileşen olduğu görülmektedir. Ayrıca bitkinin klorojenik asit miktarının çiçeklerde kök, gövde ve yapraklardan daha fazla olduğu bilinmektedir. Klorojenik asit, hidroksisinamik asit türlerinden fenolik bir bileşik olup antimikrobiyal, antienflamatuvar, antioksidan, antialerjik, sitotoksik ve antidiyabetik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler, altınotu bitkisinin genellikle çiçekleri halk arasında yara iyileştirme amaçlı kullanımı desteklemektedir.

Helichrysum türlerinin yara iyileşmesi üzerindeki etkinliği ana bileşen olarak bilinen klorojenik asidin güçlü antioksidan kapasitesi nedeniyle yüksek bir yara iyileşme kapasitesine sahip olduğu ve yara iyileşmesinin farklı aşamalarında kollajen sentezini artırarak yara iyileşme sürecini hızlandırdığı düşünülmektedir.

Helichrysum'un Erzurum yöresinde kaydedilen bir türü olan *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum*'dur. Literatürde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin çiçeklerindeki klorojenik asit miktarı ve yara iyileşmesi üzerindeki etkisini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin çiçeklerinin metanol ekstresinde HPLC yöntem ile klorojenik asit miktarının belirlenmesi ile *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin ve klorojenik asidin hücre canlılığı üzerindeki proliferatif, oksitadif stres ve yara iyileşmesi üzerine etkilerinin insan dermal hücre hattı kullanılarak in-vitro olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara

Fiziksel, kimyasal, ısı ve ışık radyasyonu ve cerrahi müdahalelere bağlı olarak veya kendiliğinden gelişen insan vücudundaki canlı dokunun (cilt ve cilt altı dokular) anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulmasıdır¹. Günümüzde yaranın tıbbi tedavisi yaranın onarımına yardımcı olmak amacıyla ya lokal (topikal) ya da sistemik (oral ya da parenteral) ilaçların verilmesi ile gerçekleştirilir. Kullanılan topikal ajanlar arasında antibiyotikler, antioksidanlar, antiseptikler ve yara iyileşme arttırıcı kimyasal maddeler kullanılmaktadır.² Yaralar iyileşme zamanlarına göre akut ve kronik yaralar olmak üzere ikiye ayrılır.

1. Akut Yaralar

Akut yaralar kolay iyileşebilen ve iyileşme sonucu hasarlı doku bırakmayan yaralardır. Günlük hayatta en sık karşılaşılan yara türüdür. Akut yaralar açık ve kapalı yaralar olmak üzere ikiye ayrılırlar^{3,4}.

Açık Yaralar: Aşağıda belirtilen yaralar açık yaralar olarak adlandırılır.

1. Eksizyon (Bir deri parçasını kesip çıkarmak)
2. İnsizyon (Bir deri hat üzerine kesik atmak sureti ile oluşturulmuş yaralardır)
3. Laserasyon (Vücut dokusunun delici bir alet ile yırtılması sonucu oluşan yaralardır)
4. Abrazyon (Deri ve mukoza üzerinde kazıma ya da ovalama oluşan yaralardır)
5. Dil yaraları (Çivi ve iğne gibi delici objelerin batmasıyla oluşan yaralardır)
6. Delinme yaraları (İnce ve uzun bir cisimle oluşmuşsa penetran, cisim kendisine çıkış yeri bulmuşsa perforan yaralar olarak adlandırılır)
7. Ateşli silah yaraları (Ateşli silahtan çıkan objenin oluşturduğu yaralardır)

Kapalı Yaralar: Aşağıda belirtilen yaralar kapalı yaralar olarak adlandırılır.

1. Kontüzyon (Sivri uçlu cisimle ezilme veya sıkışma sonucu damarlarda zedelenme ve kanın ekstrevasyonyyla karakterize bir durumdur)
2. Hematom (Deri altı dokularda damarlarda gelişen hasar ile deri altında kan birikimidir)
3. Ezilme (Dokulara ya çok büyük miktarda bir gücün kısa sürede, ya da daha az bir gücün uzun sürede uygulandığı durumlarda oluşur) yaraları olarak sınıflandırılmaktadır.
4. Akut yaraların tedavisi; kanamayı durdurma, yaranın temizlenmesi, yaranın kapatılması ve antibiyotik tedavisini içermektedir.

2. Kronik Yaralar

Cilt bütünlüğü bozulması, fonksiyonel kayıp ve yavaş iyileşen yaralardır. Kronik yaralar etiyolojik nedenlere göre; bası yaraları, vasküler yaralar, metabolik yaralar (diyabetik ülserler), enfektif yaralar, enflamatuvar yaralar, malignite yaraları, hematolojik yaralar, yanık, donma ve radyasyon yaraları olarak sınıflandırılırlar. Kronik yaraların iyileşmesi haftalar, aylar hatta yıllar alabilir. Kronik yaraların bazıları iyileşemediklerinden dolayı tedavi planı ve yara bakım ürünü kullanması için hastanın bir merkeze yönlendirilmesi gerekir.

Akut ve kronik yaralarda tedavi yöntemlerini belirlemek için yaranın çok iyi değerlendirilmesi gerekir ^{3,4}.

2.1.1. Yara İyileşmesi ve Mekanizması

Yara iyileşmesi; doku hasarına cevap olarak gelişen bir dizi fizyolojik ve biyokimyasal olayın (sitokinler, medyatörler ve ekstrasellüler matriks gibi ajanlar) yer aldığı karmaşık olaylar zinciridir^{5, 6}.

Bu karmaşık süreç birbiri ile örtüşecek şekilde sırasıyla;

1. İnflamatuvar Faz (Hemostaz ve enflamasyon (pıhtılaşma ve iltihaplanma))

2. Proliferatif Faz (Çoğalma-onarım)
3. Yeniden modelleme (Remodelling)⁷.

2.1.1.1. İnflamatuar Faz (Hemostaz ve Enflamasyon)

Doku hasarına karşı ilk gelişen saniyeler içinde ortaya çıkan yara iyileşmesinin temel basamağıdır. 1-5 günde bu dönem genellikle tamamlanır.

Birinci aşama olan hemostaz, yaralanma anında meydana gelen kanamayı durdurmak için kanamadan saniyeler sonra ortaya çıkan bir süreçtir. Bölgesel koagülasyon sistemi aktive olur ve aktive olan hücrelerde trombositlerdir. Ekstrasellüler matriks proteinlerinde bulunan selektin ve integrin reseptörlerine bağlanan trombositler degranüle olurlar.⁸ Trombositler hemostazda görevli kemotaktik ve mitojenik özelliğe sahip (prostaglandinler, fibrinojen, Von Willebrand faktör (VWF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) gibi) çok sayıda faktörün salınımını sağlar. Böylece hem fibrin oluşturulurken hem de yara iyileşmesindeki hücresel yanıt düzenlenir. Trombosit hücreleri bir araya gelerek yaralı cilt hücrelerini kollajene maruz bırakır. Trombosit hücreleri vazokonstriksiyonu aktive eder. Vazokonstriksiyon, daha fazla kan kaybını önlerken, fibrinojenden pıhtılaşma sırasında üretilen fibrin, trombosit tıkacına bağlanır ve geçici matriksi oluşturduktan sonra fibrin pıhtısı yaralanma bölgesi üzerinde geçici bir mühür oluşturarak mikroorganizmaların akmasını önler⁹.

İkinci aşama olan iltihaplanma, pıhtılaşmadan kısa bir süre sonra vazodilatasyon ve kapiller geçirgenlik artışıyla başlar ve genellikle yaralanmadan sonraki ilk 24 ila 72 saat içinde tamamlanabilir. Fakat yaralanmalara bağlı olarak 5 ila 7 günde sürebilir. Bu aşamada ana amaç trombositlerden salınan kemotaktik faktörler ve kan akımı artışı ile yara yerine inflammatuar hücre göçünü sağlamaktır. Yaralanmadan sonraki birkaç dakika içinde yara bölgesine ilk gelen nötrofiller, lokal fibroblastları ve epitel hücrelerini aktive

ederek yara onarımını başlatırlar. Monositler, lenfositler ve plazma hücreleri de dahil olmak üzere diğer beyaz hücreler yara bölgesine göç etsede, ilk birkaç gün boyunca nötrofiller baskındır. Nötrofiller, elastaz, kollajenaz vb. proteazları salgılayarak, hasarlı ve denatüre olmuş ekstraselüler matriks elemanlarını ortadan kaldırmakta ve ölü dokuların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. 3. ve 5. Günlerde geçerli olan hücre makrofajlardır. Makrofaj infiltrasyonu, hayatta kalan mikroorganizmalar, ölü nötrofiller, fibrin pıhtısı ve diğer hücresel döküntüleri yutmanın yanı sıra, makrofajlar nitrik oksidi sentezler ve yara onarımını başlatmak için sitokinleri salgılar. Makrofajlar yara iyileşmesindeki temel rolü, yara iltihabı ve yara onarımı arasındaki bir geçiş hücresi olarak davranırlar. Bağışıklık sisteminin savunma ihtiyacı azaldıkça, makrofajlar yara iyileşme sürecinin düzenlenmesini üstlenir. Makrofajlar yaranın içindeki yeni bağ dokusu ve vasküler yatakların yer değiştirmesi, çoğalması ve organizasyonunda yer alan büyüme faktörlerini içeren çeşitli sitokinleri sentezler. Makrofajlar zaman içinde sitokinleri sentezleyebilir ve salgılayarak doku onarım sürecinin devam etmesini sağlar^{10, 11}.

2.1.1.2. Proliferatif Faz (Çoğalma-Onarım)

Çoğalma ve onarım evresi enflamasyon evresini takiben yaralanmadan sonraki yaklaşık 3- 5. günlerde yaradaki nekrotik doku ve kan pıhtısı kaybolduktan sonra başlar. Yara iyileşmesinin önemli göstergesi olan granülasyon dokusunun oluşumu ise 3.-6. günlerde başlar ve 3 haftaya kadar devam eder. Fibroblastlar ve endotelial hücreler, yara bölgesindeki geçici matrikse ulaşıncaya, proliferasyon başlar ve hücre sayısında artış meydana gelir¹². Bu evre, yara yüzeyi yeni deriyle kaplanması, bölgeye vasküler bütünlüğün geri kazanılmasını ve doku kusurunun yapı bütünlüğünü yeni bağ dokusu ile doldurarak onarmayı amaçlamaktadır. Çoğalma ve onarım aşamasında yara (çekme) mukavemeti gelişmeye başlar. Bu işlemlerde görev yapan hücreler fibroblast ve keratinositlerdir. Trombositler ve aktif makrofajlar tarafından üretilen büyüme faktörleri ve

sitokinler fibroblast ve endotelial hücrelerin proliferasyonundan sorumludur¹³. Fibroblastlar yeni ekstraselüler matris ve olgunlaşmamış Tip III kollajen sentezlemeye başlar. Kollajen birikimi yaranın gerilmeye karşı direncini hızla artırır¹⁴⁻¹⁶. Endotelial hücreler ise yaraya yakın olarak bulunan sağlam venüllerden çoğalır ve anjiyogenezi süreci ile yeni kılcal damarlar oluştururlar. Bu süreçte yüksek laktat seviyeleri, pH seviyesi ve özellikle azalmış oksijen düzeyleri rombosit ve makrofajların salgıladıkları TGF- α , TGF- β ve TNF gibi anjiyogenik faktörleri stimüle ederek anjiyogeneze katkıda bulunur. Anjiyogenezi sürecinde filizlenen kan damarları granülasyon dokusunun yapısına katılarak dokuların oksijenlenmesi ve beslenmesini sağlar, endotel hücreleri biyolojik maddeler ve sitokin üreterek ve keratinositler ve fibroblastlar ise Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) üretimine katkı sağlayarak damarlaşma ile yara iyileşmesine katkı sağlar. Keratinositler sayıları artarak yara bölgesinde köprüler kurarak yara kenarları arasında bağlantılar sağlamlaştı ve proliferasyon evresi sonlanır¹⁴⁻¹⁶.

2.1.1.3. Yeniden Modelleme (Remodelling)

Yara iyileşmesinin son aşaması, granülasyon dokusunun olgun bağ dokusu ve/veya skar şeklinde yeniden modellenmesi veya olgunlaşmasıdır¹⁷. Yeniden modelleme için anahtar hücreler makrofajlar ve fibroblastlardır¹⁵. Bu evrede granülasyon dokusundaki tip III kollajen yıkılıp yerini tip I kollajen alır. Kollajen sentezi yaranı olmadan yaklaşık 5 gün sonra en yüksek seviyeye ulaşır, ancak haftalarca veya aylarca devam eder¹⁴. Yara iyileşmesinin bu evresinin özelliklerinden biri de ekstraselüler matriks kompozisyonunun değişmesidir. Bu süre zarfında, kollajen ve ECM dokusu yaraya birikmeye devam ederken, gelişen bağ dokusu hücre olgunlaşması ve apoptoz ile yeniden şekillendirilir. Bu evre de kollajenin fibroblast hücreler tarafından sentezinden sonra, skar dokusunun olgunlaşması sırasında aylar, hatta yıllar boyunca

süren dinamik bir süreçtir¹². Yara gücü artmasına rağmen, yaralanma öncesi gücün asla% 80'inden fazlasını elde edemez^{16, 18}.

2.1.1.4. Yara İyileşme Türleri

1. Birincil (primer) yara iyileşmesi: Cilt bütünlüğü bozulduğunda birincil yara kapanması olarak adlandırılan yara kenarlarının birbirine yakın durduğu ve doku kaybı ve hasarının çok az olduğu yara kapanma sürecini tanımlar. Yara kenarları gerginlikler olmadan dikişlerle, cilt yapıştırıcılarıyla, zımbalarla, klipslerle veya şeritler gibi çeşitli teknikler kullanılarak kapanma sağlanabilir. İyileştirmeyi geciktiren komplikasyonlar veya bilinen bir faktör yoksa yara uygun şekilde tedavi edilir ve genellikle çabuk iyileşir. Birincil yara kapanmaları tipik olarak en iyi estetiğe sahiptir¹⁹.

2. İkincil (sekonder) yara iyileşmesi: Birincil yara kapanmaları mümkün değilse, ikincil yara kapanması olarak bilinen kasılma ve yeniden epitel hücrelerinin çoğalması süreçleri ile kendiliğinden iyileşme olarak tanımlanır. İkincil yara örnekleri olarak büyük travmatik yaralar ve cerrahi drenaj abseleri olarak bilinen yaralardır. İkincil yaraların iyileşmeleri karmaşık nedenlerden dolayı gecikebilir¹⁹.

2.1.2. Yara İyileşmesinin *in vitro* Olarak Ölçülmesi

Yeni terepötik ajanların bulunması amacıyla çeşitli hücre hatları ve yöntemler kullanılarak *in vitro* yara iyileşmesi modelleri kullanılabilir. Hücre hatları olarak primer yada sekonder insan ya da murin (kemirgen) keratinosit ve fibroblast hücreleri ve primer hücreler ihtiyaca göre değişik türlerden yaşlardan ve dönörlerden elde edilebilir²⁰. *In vitro* yara iyileşmesi modelleri aşağıda belirtilen deneyler ile gerçekleştirilir.

1. Hücre proliferasyon ve migrasyon deneyleri: Açık yaraların hızlı bir şekilde kapanması, enfeksiyon riski ve daha ciddi komplikasyon risklerini azaltmak için hayati bir öneme sahiptir. Açık yaraların kapanması epidermal hücrelerin çoğalması ve göçüyle

olur. Bu deneyler yara iyileşmesinin hızlandırıcı yeni terepötik ajanların bulunmasında kullanılabilir²¹.

2. Scratch deneyi (Çizik deneyi): Hücre kültüründe tek tabakalı hücreler mekanik olarak bir mikropipet yardımıyla çizilir ve hücrelerin bu çizici kapatma oranı ölçülerek yara iyileşme hızı tayin edilebilir. Bu deney hücrelerin proliferasyon ve migrasyon hızlarını ve etkililiklerini anlık olarak görütülememizi sağlar²².

3. Üç boyutlu migrasyon deneyi: Hücre medyumunda içinde siferoit bir topun çevresinde kolajen bir pencere oluşturulup süspende edilir. Bu topun çevresine göç etmiş hücre sayısı belirlenerek üç boyutlu bir şekilde yarayı ne kadar iyileştirdiği ölçülebilir²³.

4. Yüksek verimli göç deneyi: Tek tabakalı hücreler ortasında yuvarlak durdurucu bir plakanın olduğu 96 kuyucuklu hücre kaplarına ekilir. Daha sonra durdurucu plakalar ortamdan uzaklaştırılır ve hücrelerin bu kaldırılan plakanın boşluğunu ne kadar sürede kapattığı belirlenir. Bu sayede hücrelerin göç hızları belirlenebilir²⁴.

5. Anjiyogenez: İnsan endoteryal hücreleri tübüler formda kültüre edilir. Bu tübüler formasyonun çevresinde oluşan damar uzunlukları ve dallanmalar anti-CD31 antikorları ile işaretlenerek ölçüm yapılır.²⁵

2.1.3. Yara İyileştirmede Bitkisel Yaklaşım

Yara iyileştirilmesinin geçmişi, insanlığın var olduğu günden bu yana sürmektedir. Yara iyileştirmede bitkiler ve bitki özleri önemli bir potansiyele sahiptir. Yara iyileştirilmesi amacıyla çeşitli bitkisel kaynaklı (safran, susam, incibar kökü, mürver yağı, acı bakla, mürdesenk, gürüz otu, sinirli ot, anzarut, kına vb) maddelerin kullanıldığı bilinmektedir²⁶. Bu bağlamda, bitkiler ve bitki ekstraktları, yaraların tedavisi ve tedavisi için büyük bir potansiyele sahiptir. Yara iyileşmesi için fitokimyasal ilaçlar sadece ucuz ve uygun değil, aynı zamanda hiper-duyarlı reaksiyonlara bu ajanların kullanımıyla nadiren rastlandığı için güvenli olduğu da iddia edilmektedir. Bununla birlikte, yaraların

iyileşmesi için tavsiye edilmeden önce, geleneksel tıbbın bitkilerinin bilimsel olarak doğrulanması, standardizasyonu ve güvenlik değerlendirmesine ihtiyaç vardır²⁷.

2.2. *Helichrysum plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitkisi Hakkında Genel Bilgiler

2.2.1. *Helichrysum* Türlerinin Botanik, Fitokimyasal, Biyokimyasal ve Farmakolojik Özellikleri

Asteraceae (Compositae) familyasına ait olan *Helichrysum* cinsinin Dünya’da 600 türü, Türkiye florasında ise 20 türü olan çok yıllık bir bitkidir²⁸. *Helichrysum* halk arasında ‘altınotu, ölmez çiçek, herdem taze’ olarak bilinmektedir²⁹. *Helichrysum* türlerinin sergilediği çekici sarı renkli çiçeklerinden dolayı Yunanca helios (güneş) ve chrysos (altın) kelimeleri birleştirilerek *Helichrysum* adı verilmiştir. Bu bitkinin Güney Afrika’da yetişen türleri romatizmal hastalıklarda, soğuk algınlığında, baş ağrılarında, karaciğer hastalıklarında ve yara iyileşmesinde kullanılmaktadır. Türkiyede yetişen *Helichrysum* türlerinden olan *Helichrysum plicatum* kapitulumlarından hazırlanan infüzyon, yara iyileşmesi ve karın ağrısı, sarılık, bağırsak problemlerinin yanı sıra böbrek taşlarında ve idrar sökücü olarak kullanılmaktadır²⁸.

Helichrysum türlerinin fitokimyası ve farmakolojisi üzerinde yapılmış bir derleme çalışması sonucunda *Helichrysum* türlerinin fitokimyasında elde edilen bileşikler şunlardır: flavonoidler, kalkanlar, pironlar, floroglusinoller, terpenler, uçucu yağlar, fenolik asitler, benzofuranlar, seskiterpenler ve diterpenlerdir³⁰. *Helichrysum*’un yukarıda belirtilen biyoaktif bileşenleri farmakolojik etkilerini sağlamaktadır. Türkiyede bulunan *Helichrysum* türlerinde bulunan fenolik bileşikleri ve miktarlarını Albayrak ve ark.³¹ HPLC yöntem ile belirlemişler ve elde ettikleri sonuçlar **Tablo 2.1**’de verildi.

Tablo 2.1. Türkiye'de bulunan *Helichrysum* türlerindeki fenolik bileşiklerin HPLC analizi ³¹.

<i>Helichrysum</i> Türü	Bileşikler (µg/g bitki)															Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
A	89.6	2.03	-	1.36	-	-	27.5	99.0	-	-	-	4.54	9.16		0.20	233.69
B	148.4	1.57	-	-	-	-	11.5	37.0	2.18	-	5.44	11.45	11.45	-	-	228.29
C	53.0	1.56	-	2.33	-	1.93	11.8	6.4	2.55	-	1.85	10.93	12.05	-	-	47.51
D	32.3	2.5	-	2.10	-	0.58	21.2	155.5	5.98	-	-	4.98	2.35	15.03	0.21	242.73
E	114.3	2.39	-	-	-	-	23.1	70.5	-	1.27	-	2.55	1.92	6.91	0.11	233.05
F	114.3	2.21	1.40	-	-	-	22.7	33.8	1.13	4.73	-	7.20	11.44	-	0.14	199.05
G	107.2	1.30	0.98	-	-	2.87	30.5	45.6	-	-	4.14	8.99	5.87	2.19	-	209.64
H	30.9	1.07	0.54	-	-	-	-	17.1	-	1.82	2.72	6.54	0.76	3.16	0.13	64.74
I	92.0	1.45	0.16	-	-	-	19.6	32.4	-	-	4.15	8.49	4.59	-	0.32	163.16
İ	81.5	2.03	0.16	-	0.53	-	31.0	26.3	-	-	4.93	-	5.42	-	0.31	152.18
J	91.3	1.45	0.70	-	0.17	1.25	6.3	44.0	-	-	-	-	6.30	-	0.37	151.84
K	90.5	1.84	1.27	1.54	1.77	1.86	10.2	54.1	-	-	1.84	-	0.75	-	-	165.7
L	152.1	1.77	0.22	-	-	-	51.0	45.8	-	-	1.46	4.44	1.47	-	0.21	258.47
M	156.2	1.72	-	0.35	0.76	-	37.9	85.8	-	-	3.37	6.95	9.97	-	-	303.02
N	136.5	1.16	0.86	0.63	1.63	4.31	36.3	52.8	2.12	-	4.26	7.23	13.20	-	-	260.98
O	112.8	2.70	0.26	1.26	-	-	10.4	70.7	10.59	-	5.26	-	-	-	0.57	214.54
Total	1603.2	28.75	6.55	9.45	4.86	12.8	351	876.8	24.55	7.82	39.42	84.29	96.7	27.29	2.57	

Bileşikler; 1: klorojenik asit, 2: kafeik asit, 3: ferulik asit, 4: *p*-kumarik asit, 5: *p* hidroksibenzoik asit, 6: şiringik asit 7: apigenin, 8: apigenin-7-glukozit, 9: epikateşin, 10: eriodiktiyol, 11: hesperidin, 12: luteolin, 13: naringenin, 14: kersetin, 15: resveratrol³¹.

A: *H. arenarium* subsp. *aucheri*, **B:** *H. armenium* subsp. *armenium*, **C:** *H. Artvinense*, **D:** *H. Chionophilum* **E:** *H. Compactum* **F:** *H. goulondrionum*, **G:** *H. Graveolens*, **H:** *H. Heywoodianum*, **I:** *H. Kitianum*, **İ:** *H. Noeanum*, **J:** *H. Orientale*, **K:** *H. Pallasii*, **L:** *H. Peshmenianum*, **M:** *H. plicatum* subsp. *plicatum*, **N:** *H. plicatum* subsp. *polyphyllum*, **O:** *H. stoechas* subsp. *barrelieri* ³¹.

Helichrysum türleri üzerinde yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda antimikrobiyal, antienflamatuvar, antioksidan, antialerjik, sitotoksik, karın ağrısı, kalp yanığı, antidiyabetik, yatıştırıcı, öksürük, soğuk algınlığı ve yara iyileştirmesi gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduklarını göstermiştir^{32,33}.

H. plicatum subsp. *plicatum* bitkisinin kapitulumlarının etanol ekstresinin *Escherichia coli*'ye karşı, hücre çeperinde hasara yol açarak, yüksek inhibisyon etki³⁴; *H. plicatum* subsp. *plicatum* kapitulumlarının *Xanthomonas malvacearum*, *Corynebacterium michiganense*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*'a karşı bakterisit etki³⁵ ve *H. plicatum* subsp. *plicatum* kapitulumlarının etanol ekstresinin yüksek bakterisit etki³⁶ gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, antioksidan, antimikrobiyal ve fibroblast hücrelerinin artışıyla paralel gelişen yara iyileştirmenin etkisi Güney Afrika'da yara iyileştirme üzerine geleneksel olarak kullanılan bitkiler kullanılarak incelenmiş ve bu bitkilerden birisi de *H. foetidum* bitkisi olduğuna karar verilmiştir. Bu çalışmaya göre bitkinin su ve metanol ekstresinin antimikrobiyal olarak MIC değerinin MIC > 4 mg/mL olduğu, fibroblast gelişimini artırıcı bir bulgunun yer almadığı bildirilmiştir³⁷.

Bir çalışmada, *H. plicatum*'un ferrik tiyosiyanat yöntemi ile total antioksidan aktivite, kuprak yöntemi ile Cu²⁺ indirgeme kapasitesi, potasyum ferriksiyanat indirgeme metodu ile Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) giderme aktivitesi tayinleri ve toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktar tayinleri yapılmış ve *H. plicatum*'un yüksek antioksidan aktiviteye, fenolik ve flavonoid madde içeriğine sahip olduğunu gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmada, *H. plicatum*'un etanol ekstresinin 113.5±8.6 mg (gallik asit eşdeğeri/1g ekstre) total fenolik bileşiklerine ve 50.5±1.9 mg (kersetin eşdeğeri/1g ekstre) total flavonoidlere sahip olduğu su ekstresinin ise 75.9±3.7 mg total fenolik bileşiklerine

ve 31.5 ± 2.3 mg flavanoitlere sahip olduğu Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gösterilmiřtir³⁸.

H. plicatum kapitulum ekstrelerinin antioksidan aktivitelerine bakıldığı bir çalışmada ise en yüksek aktivitenin etil asetat ekstresinde olduğu ayrıca bu ekstrenin en yüksek total fenolik bileşiklerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *in vitro* PC3, HeLa ve K562 insan kanser hücre hatlarında sitotoksitesi incelenmiş bütün ekstre eşitlerinin HeLa hücrelerine karşı orta etkide olduğu, PC3 ve K562 hücre hatlarında ise etilasetat ekstresinin %100 aktif olduğu gsterilmiřtir³⁹.

2.2.2. *Helichrysum plicatum* subsp. *Pseudoplicatum*

Helichrysum’un Erzurum yöresinde kaydedilen bir türü olan *H. plicatum* subsp. *Pseudoplicatum*’dur. Yukarıda bahsedildiği gibi yara iyileştirmesinde antioksidan ve antiseptik ajanlar kullanılmakta ve fibroblast hücrelerindeki artışın yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu bağlamda, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* türünün antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin yüksek olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur⁴⁰.

H. plicatum bitkisinin farklı türlerinde HPLC ile yapılan bir çalışmada klorojenik asit flavonoit türevlerinden apigenin, naringenin ve kemferol ve apigenin, naringenin, kersetin and kemferol glikozitlerine sahip olduğu gsterilmiřtir⁴¹. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisindeki klorojenik asit miktarının HPLC cihazı ile belirlenmesine ait çok çalışma yoktur ve yara üzerine etkisi incelenmemiştir. Yapılan alışmalar incelendiğinde çalışmamızda kullandığımız bitki türünden farklı olan *H. plicatum* bitkisinin iek yaprak ve gövdesi üzerinde klorojenik asit miktarı (mg fenolik bileşen/100 g olarak HPLC yöntemi ile belirlendiği, en yüksek klorojenik asit miktarının çiçeklerde gözlendiği grlmřtr⁴². *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* zerinde yapılan bir çalışmada ise bitkisini bir bütün olarak ekstre edildiği ve bu ekstredeki klorojenik asit miktarının çok yüksek olduğu ($94.00 \mu\text{g/g}$ extrat) bildirilmiřtir⁴³. Bundan

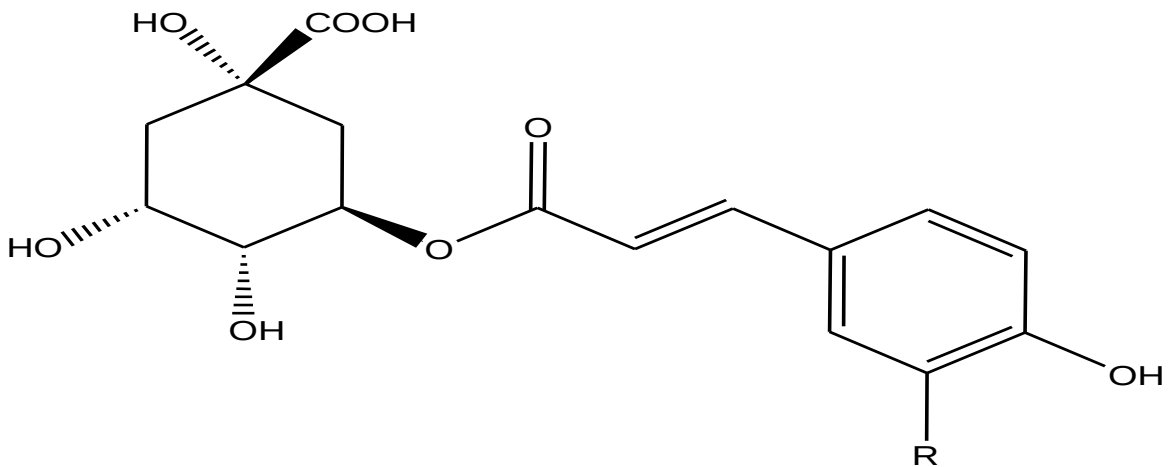
dolayı, Erzurum’da ilk kez kaydedilen ve üzerinde sadece bir antioksidan aktivite çalışması yapılmış olan *Helichrysum plicatum* subsp. *pseudoplicatum* kapitulumlarının

Helichrysum bitki türlerinin fitokimyasını içeren çalışmalarda klorojenik asidin yüksek miktarda bulunduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, klorojenik asidin *Helichrysum plicatum* subsp. *pseudoplicatum*’da bulunan önemli bir doğal ürün olduğu hipotezini ortaya koymaktadır.

2.3. Klorojenik Asit

2.3.1. Klorojenik Asidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Klorojenik asit, hidsoksisinnamik asit ailesinden bir esterdir. Bileşiğin kimyasal yapısı, bir kafeik asit grubu ve bir kinik asit grubundan oluşur (**Şekil 2.1**). Klorojenik asit 1,3,4,5-tetrahidroksi sikloheksankarboksilik asit (3,4-dihidroksi sinamat) yapısında olup kapalı formülü $[C_{16}H_{18}O_9]$ olan bir bileşiktir. Klorojenik asidin molekül ağırlığı ise 354.311 g/mol’dür. 3-CQA olarak bilinen klorojenik asit, Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından 5-O-kafeoilkinik asit (5-CQA) olarak adlandırmıştır. IUPAC yönergelerine göre 5-CQA olarak bilinen kafeoilkinik asidin izomerleri 3-, 4- ve 5-CQA’dır. Bunlar arasında en bol bulunan ve klorojenik asidin en yaygın şekli 5-CQA’dır.



Şekil 2.1. Klorojenik asidin (5-O-kafeoilkinik asit, 5-CQA) kimyasal yapısı.

İnsan diyetinde fazla miktarda bulunan ve polifenollerden birisi olan klorojenik asit, gıdalarda, belirli bitki türlerinde, meyvelerde ve yeşil kahvede fazla miktarda bulunur. Sentetik olarak üretilemeyen klorojenik asit genellikle doğal bitki, çay, kakao, meyve (elma, armut, turunçgiller ve narenciye), yumurta, kavrulmuş fasulye ve kahve gibi besinlerde bulunan hidroksisinamik asit esterlerinden olan fenolik bir bileşiktir^{33, 44, 45}. Klorojenik asit, yeşil kahvenin olduğu her yerde bulunan bileşikler grubu olup besinlere acı ve buruk bir tat vermektedir. Klorojenik asit kahvenin yanı sıra, Asteraceae ve Lamiaceae familyalarında bulunan önemli polifenollerden biridir^{33, 46-50}.

2.3.2. Klorojenik asidin Biyokimyasal ve Farmakolojik Özellikleri

Klorojenik asidin vücuda alındıktan sonraki etkisinin beklenenden daha karmaşık olduğu çünkü besinlerin içerisinde bulunan temel klorojenik asidin bileşenlerine ayrılmadan emildiği belirtilmiştir. Klorojenik asidin vücuttaki emilimi farklı metabolik yollarla gerçekleşir. İlki mide de pasif emilimdir. Midenin asidik ortamında pasif difüzyon ile iyonik olmadan absorbe edilir. pH' nın 7 olduğu ince bağırsakta ise pasif difüzyon olarak emilimi gerçekleşmez. Bu yüzden ince bağırsakta aktif taşıma ile absorbe edilir. Klorojenik asit, ince bağırsakta glikoz emilimini ve karaciğerden dolaşıma glikoz salınımını engeller. Bu da kandaki glikoz seviyesinin azalmasına ve vücudun enerji için karbonhidratların yerine yağ hücrelerini kullanmasına yol açar ve sonuç olarak vücutta yağ kaybı sağlanır³³.

Fenolik asitler son zamanlarda çeşitli farmakolojik ve biyolojik etkileri nedeniyle insan sağlığı üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Klorojenik asit, antiseptik ve anti-kanserojen antioksidan, anti-obezite, anti-diyabetik, hepatoprotektif, kardiyoprotektif, antienflamatuar, antipiretik, nöroprotektif, antiviral, anti-mikrobiyal, anti-hipertansif ve merkezi sinir sistemi stimülatörü olarak ve göreceli olarak kardiyovasküler hastalık riskinin azaltılması ve Alzheimer hastalığı gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan

bir fenolik asittir. Klorojenik asitler genellikle biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki tepkilerinde rol oynar ve klorojenik asit, lignin biyosentez yolağında rol oynayan ara bir madde olarakda bilinir^{33, 46-50}.

Klorojenik asidin antidiyabetik ve antiobezite özellikleri: Klorojenik asit ile zengin kahve tüketiminin antidiyabetik ve antiobezite etkileri, insan ve hayvanların vücut ağırlığı ve glukoz emiliminin azalması ile ilişkilendirilmiştir⁵¹. Bu ilişki iki mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan birincisi karaciğer glikoz-6-fosfataz aktivitesini önleyerek glikoz salınımının engellemesidir. İkincisi ise glikoz-6-fosfat translokaz 1'i inhibe ederek ince bağırsakta glikoz emilimini engeller. Belirtilen yolaklar ile klorojenik asit genel dolaşımdaki kan şekerini azaltır ve daha az insülinin salınımına neden olur. Glikozun kullanımı azaltan klorojenik asit vücudun enerji kaynağı olarak yağ rezervleri kullanmasını sağlayarak yağ dokusunun yakılmasını ve dolayısıyla kilo kaybını sağlayacağı bildirilmiştir³³.

Klorojenik asidin antihipertansiyon etkileri: klorojenik asit, flavonoidler ve resveratrol gibi çeşitli polifenoller içeren farklı doğal ürünlerin sağlık üzerinde yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir. Klorojenik asit bir antihipertansiyon ajanı olarak çeşitli sağlık problemlerinde büyük ölçüde avantajlar sağladığı ortaya atılmıştır. Ayrıca yeşil kahvede bol miktarda bulunan CGA'nın kan basıncını düşürmede çok etkili bir ajan olduğu ve hafif hipertansiyonu olan hastalar için de güvenilir olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada hipertansiyonu olan 117 kişi arasında yapılan bir randomize ve çift-kör klinik deneylerinde, kahve çekirdeği ekstraktının tüketilmesinin, herhangi bir yan etkisi olmaksızın kan basıncını önemli ölçüde azaltabildiğini ortaya koymuştur. Fenolik bileşiklere (sinarin ve CGA) sahip olan bitki türleri ekstreleri güçlü bir vazorelaksan etkiye sahip olup antihipertansif bozukluklarda yardımcı olabildiği bildirilmektedir. Yapılan başka bir çalışmada ise CGA'nın nitrik oksit seviyesini değiştirebileceğini

belirtildi ve bu nedenle sıçan damarlarının vazodilatasyonunda rahatlatıcı bir etkiye sahip olduğu bildirildi³³.

Klorojenik asidin antimikrobiyal etkileri: Çeşitli antimikrobiyal etkilere sahip olan klorojenik asit, ideal bir koruyucu ve gıda katkı maddesi olarak uygun olduğu bulunmuştur. Çalışmada *Stenotrophomonas maltophilia*, *trimetoprim*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* gibi çeşitli bakterilere karşı dirençli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, klorojenik asidi içeren fenolik bileşikler probiyotik bakterilere karşı duyarlı değildir. Fakat mantarlardan *Candida albicans*'a karşı antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir³³.

Klorojenik asidin antiviral etkileri: Hem kafeik asit hem klorojenik asit önemli antioksidanlar olarak bilinir ve HSV-1 ve HSV-2, HIV ve adenovirüs'e karşı çoklu antiviral aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur. Ebola virüsüne karşı antiviral aktivite gösterebileceği ortaya atılmıştır. Ayrıca kinik asit türevlerini de içeren *Hyssopus officinalis*'in polar bileşiklerinin antimikrobiyal aktivite gösterebileceği bildirmiştir³³.

Klorojenik asidin antioksidan ve antienflamatuvar etkileri: Klorojenik asit antioksidan ve antienflamatuvar potansiyele sahip olan bir bileşiktir. Fenolik asitler üzerinde bulunan hidroksil (OH) gurupları ve sayıları antioksidan aktiviteye pozitif yönde etki ettikleri bildirilmiştir. Bir çalışmada, klorojenik asit, interlökin-8 (IL-8) ve mRNA ekspresyonunun oksidatif strese bağlı olarak salgılanmasını önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir. Kafeik asit ve klorojenik asidin bir dekstran sülfat sodyum ile indüklenmiş kolit modelinde makrofaj enflamatuvar protein 2'nin (IL-8'in bir fare homologu MIP-2) mRNA ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir. Kafeik asit ve klorojenik asidin anti-enflamatuvar mekanizması, hücre içi reaktif oksijen türlerini azaltarak IL-8 ve PKD-IKKNFkB yolağının aktivasyonunu inhibe etmesi şeklindedir. Klorojenik asidin bu özelliğinin kateşol gruplarıyla ilişkili olduğu bildirilmiş olup bu fonksiyonel grubun

enflamatuvar hastalıkların önlenmesine katkıda bulunmaya yardımcı olabileceğine inanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada insan diyetinde yaygın bir şekilde bulunan klorojenik asidin, TLR4 sinyallemesinin aktivasyonunda, adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun regülasyonunda, hepatik lökositlerin infiltrasyonunu ve aktivasyonunda ve proenflamatuvar sitokinlerin üretiminden kaynaklanan Con A- kaynaklı hepatitte koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir³³.

Klorojenik asidin LDL oksidasyon duyarlılığını ve LDL-kolesterol ve malondialdehit (MDA) seviyelerini azaltarak kardiyovasküler riskini azalttığı ve böylece LDL'nin *in vitro* oksidasyonunu inhibe ederek kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağladığı bildirilmiştir⁵². Ayrıca Klorojenik asit kan ve karaciğer lipit birikimini etkili bir şekilde azaltabildiğini ve antioksidan aktivitelerini geliştirerek lipit metabolizmasını düzenleyebildiğini göstermiştir⁵³.

Klorojenik asidin LDL oksidasyon duyarlılığını ve LDL-kolesterol ve malondialdehit (MDA) seviyelerini azaltarak kardiyovasküler riskini azalttığı ve böylece LDL'nin *in vitro* oksidasyonunu inhibe ederek kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağladığı bildirilmiştir⁵². Ayrıca klorojenik asit kan ve karaciğer lipit birikimini etkili bir şekilde azaltabildiğini ve antioksidan aktivitelerini geliştirerek lipit metabolizmasını düzenleyebildiğini göstermiştir⁵³.

2.4. Literatür Taraması

2.4.1. Klorojenik asidin Yara İyileştirme Etkisine Yönelik Literatür Araştırması

Literatür araştırmaları sonucu klorojenik asidin yara iyileştirme üzerine etkisine yönelik 2 adet *in vivo* çalışma bulunmaktadır.

Bağdaş ve ark⁵⁴, deneysel yara iyileşmesi modelinde sistemik klorojenik asit tedavisinin yara iyileşmesi ve oksidatif stres belirteçleri üzerindeki potansiyel rolünü ve

tedavinin vital organlar ve kemik iliği üzerine yan etkileri olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışma 8-12 haftalık 250-300 g ağırlığındaki sprague-Dawley erkek ratlar kullanılarak yapılmış ve deneysel yara modeli genel anestezi altında analjezik uygulanarak sıçanların scapulalarının kaudal sınırına orta hattan 1 cm uzaklıkta 1.5 cm x 1.5 cm kalınlıkta tam kat kesi ile oluşturulmuştur. Klorojenik asit 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında 0.6 mL intraperitoneal (ip), sham grubuna da 0.6 mL PBS ip olarak 15 gün süreyle uygulanmış. Her yara hergün aynı saatte değerlendirilmiş ve ilk granülasyon dokusunun gözlendiği gün ve yaranın kaplandığı ve daha sonra tamamen granülasyon dokusu ile doldurulduğu ve epitelize olduğu günler kaydedilmiştir. 0, 7, 14 ve 16. günlerde yara kontraksiyon alanı hesaplanmış ve yara görüntüleri kaydedilmiş ve 16. gün sıçanlar kurban edilmiştir. Biyokimyasal analizler için serum örnekleri, karaciğer, böbrek, kalp ve iskelet kası (gastrocnemius kası), histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için yara dokusu alınmıştır. Bu çalışmada ilk kez klorojenik asit tedavisinin yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Klorojenik asidin yara bölgesinde malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeylerini azaltıp, indirgenmiş glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeylerini arttırdığı ve yara dokusunda hidroksiprolin içeriğini arttırdığı gösterilmiştir. Klorojenik asit ile tedavi edilen grupların daha fazla epitelizasyon, kılcak yoğunluk, fibroblast proliferasyonu ve kollajen oluşumu gösterdiği gözlenmiş ve 7. günde yapılan yara biyopsisinde metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve doku metalloproteinaz inhibitör-2 (TIMP-2) ekspresyonunu belirgin şekilde arttırdığı tesbit edilmiştir. Ayrıca klorojenik asidin uzun süre yüksek doz kronik kullanımının kalp ve kas dokusunu etkilemeden karaciğer ve böbrek örneklerinin lipid peroksidasyon (LPO) seviyesini arttırdığı gözlenmiştir. Çalışmada klorojenik asit tedavisinin antioksidan savunmayı artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna varılmıştır. Klorojenik asidin bu etkisi yara dokusunda kapiller

dansite ve kollajen üretimini arttırması, oksidatif parametreler üzerinde antioksidan ve serbest radikal temizleyici etkileri ve antienflamatuvar etkileri gibi çeşitli mekanizmalarla açıklanmışlardır. Ayrıca klorojenik asidin uzun süre yüksek doz kronik kullanımı ise karaciğer, böbrek ve kemik iliği üzerinde prooksidan etkiye bağlı olarak yan etkilere neden olabileceği gösterilmiştir.

Chen ve ark⁵⁵, deneysel eksizyonel yara iyileşmesi modelinde topikal klorojenik asit tedavisinin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma 6-8 haftalık 200-250 g ağırlığındaki wistar erkek ratlar kullanılarak yapılmış ve deneysel eksizyonel yara modeli genel anestezi altında 400-mm² deride tam kat kesi ile oluşturulmuş ve yara bölgesi açık bırakılmıştır. Sıçan başı 100 mg olacak şekilde %1 (w/w) klorojenik asit içeren ve gümüş sülfadiazin içeren merhemler, kontrol olarak basit merhem yara bölgesine hergün uygulanmış ve yara bölgesinin tam kapanması ile deney sonlandırılmıştır. 1, 3, 6, 9,12 ve 15. günlerde yara kontraksiyon alanı hesaplanmış ve yara görüntüleri kaydedilmiştir. Yaralanmayı takiben 12, 24, 48 ve 72. saatlerde alınan kan örneklerinden ELİSA kit yardımı ile TNF- α seviyeleri ölçülmüş ve oksidatif stres üzerine etkisi doku örneklerinde LPO, GSH, SOD ve CAT bakılarak değerlendirilmiştir. Histopatolojik olarak doku örnekleri hemooksilen eozin boyası ile, immunokimyasal olarak TGF- β ve anti-kollajen IV değerlendirilerek incelenmiştir. Klorojenik asit içeren merhemin gümüş sülfadiazine benzer şekilde 15. günde yara kontraksiyonu üzerinde belirgin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Tedavi edilen gruplarda epitelizasyonda belirgin artış saptanmış ve yara kapanması değerlendirildiğinde kontrole göre klorojenik asit ile tedavi edilen grupta daha küçük yara boyutu gösterdiği tesbit edilmiştir. Klorojenik asit ile tedavi edilen sıçanlar, kontrollere kıyasla granülasyon dokusunda TBARS seviyesinde bir azalma ile SOD, CAT ve GSH aktivitesinde önemli bir artış göstermiştir. Klorojenik asit ile tedavi edilen grupta yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında (12-72 saat) TNF- α

ve TGF- β seviyelerinin upregölasyonu gözlenmiştir. Çalışmada, klorojenik asidin, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyonu arttırdığı ve lipit peroksidasyonunu azalttığı ve bu şekilde güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Klorojenik asidin yara iyileşmesi sırasında TNF- α ve TGF- β upregölasyonu yoluyla kollajen sentezini arttırmasıyla ve antioksidan etkinliği ile yara iyileşmesi sürecini arttırdığı gösterilmiştir.

2.4.2. Helichrysum Türlerindeki Klorojenik Asidin Farklı Analitiksel Yöntemler ile Belirlenmesine Yönelik Literatür Araştırması

Gouveia ve Castilho⁵⁰, Madeira Takımadaları'nda yetişen *Helichrysum* bitki türlerinin toprak üstü bölgesinde (*H. devium*, *H. melaleucum*, *H. obconicum* ve *H. monizii*) klorojenik asit ve izomerlerinin (7 farklı dikafeoilkuinik asit) ayırımı ve belirlenmesine yönelik bir HPLC-DAD-ESI/MSⁿ yöntemi geliştirmişlerdir. Kurutulan ve toz haline getirilen bitki ekstraları metanol ile katı faz ekstraksiyonu kullanılarak oda sıcaklığında ekstre edilmiş ve daha sonra 40°C'de metanol evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra elde edilen ekstre hareketli faz içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Kromatografik ayırım, RP-C18 ters faz kolonunda % 0.1 formik asit içeren su (A) ve asetonitril (B) hareketli fazın % 80 A (0-1 dk), % 78 A (8-10 dk), % 76 A (12-14 dk), % 75 A (16-18 dakika), % 73 A (20 dk), % 50 A (30 dk), % 0 A (31-35 dk) ve % 80 B (36-40 dk) gradient elüsyonu kullanılarak 320 nm dalga boyunda 30 dakika içerisinde gerçekleştirilmiştir. ESI/MSⁿ analizi ise negatif iyon modunda 365°C nebulizer sıcaklığında 40 eV kolisyon enerjisi kullanarak 100-1000 m/z aralığında gerçekleştirilmiştir. Klorojenik asidin [M-H]⁻ değerleri sırasıyla MS¹'de 353, MS²'de 353:191, MS³'de 353-191:173, MS⁴'de 353-191-127:109 m/z olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen bu analiz yönteminin klorojenik asit ve izomerleri için 0.1–700 µg/mL aralığında 0.999'den büyük kolerasyon katsayıları ile doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Analiz edilen bütün bileşikler için LOD değerinin 0.76-5.95 µg/mL ve LOQ değerinin ise 2.29-18.02 µg/mL aralığında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yöntemin %0.09-2.84 Aralığında elde edilen % BSS değeri ile tekrarlanabilir ve $\geq 96\%$ geri kazanım ile doğru olduğu belirtilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen yöntem ile *Helichrysum* bitki türlerinin çiçeklerinde klorojenik asit miktarı 52.19±0.73 mg/100 g ekstre (*H. obconicum*) ile 129.2 ± 1.2 mg/100 g ekstre (*H. devium*) aralığında tespit edilmiştir.

Gouveia ve Castilho³², *H. devium* bitkisinin farklı morfolojik kısımlarında (yaprak, çiçek ve sap) 34 fenolik bileşiğin (klorojenik asit içeren kinik asit, kafeik asit ve protokatekinik asit türevleri ile O-glikosile flavonoidleri) belirlenmesine yönelik on line HPLC-DAD-ESI/MSⁿ yöntemleri geliştirmişlerdir. Bu amaç ile 100 gr *H. Devium* bitkisinin yaprak, çiçek ve sapsarı ayrı ayrı kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Bitkinin morfolojik değerlendirilmesi ise yine kurutulmuş bitkinin yaprak, çiçek ve sapsarı ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kurutulmuş bitki kısımları ayrı ayrı oda sıcaklığında 24 saat metanol ile ekstrakte edilmiş ve elde edilen metanol ekstraktları kurutulmuştur. Her bir örnek daha sonra 24 saat boyunca oda sıcaklığında artan polariteye sahip dört çözücü (n-hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol) ile sırayla ekstrakte edilmiş ve elde edilen ekstraktlar 40°C’de evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra hareketli faz içerisinde çözülerek HPLC-DAD-ESI/MSⁿ analizi için bitki örnekleri hazırlanmıştır. Kromatografik ayırım, 30°C kolon sıcaklığında RP-C18 ters faz kolonunda, asetonitril (A) ve % 0.1 formik asit içeren su (B) hareketli fazın % 20 A (0 dk), % 25 A (0-10 dk), % 25 A (20 dk), % 50 A (20-40 dk), % 100 A (42-47 dk), % 20 A (49-55 dk) gradient elüsyonu kullanılarak 210-520 nm dalga boyu aralığında scan taraması yapılarak 280 nm dalga boyundaki pik alanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Klorojenik asit 243, 296, 324 nm dalga boylarında bitkinin toprak üstü, yaprak ve sapsarında gözlenmiştir. LC/ESI-MS analizi ise kolon elüatın negatif iyon kütle spektrumları, 13000 da/s tarama hızında,

100-1000 m/z aralığında gerçekleştirilmiştir. Yüksek saflıkta azot gazı, 50 psi'lik bir basınçta, 10.0 mL/dk'lık hacimde hem nebulizer gazı hemde kurutma gazı olarak kullanılmıştır. MS analizinde 365°C nebulizatör sıcaklığı ve +4500 V kapiler voltajı ve 40 V çarpışma enerjisine sahip 1×10^{-5} mbar basınçta ultra yüksek saflıkta He gazı kullanılmıştır. MSⁿ verileri, 4,0 m/z izolasyon genişliği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Klorjenik asit için [M-H]⁻ değerleri sırasıyla MS'de 353, MS²'de 353:191, MS³'de 353-191:173, MS⁴'de 353-191-127:109 m/z olarak tespit edilmiştir. *H. devium* bitkisinin farklı kısımlarında (yaprak, çiçek ve sap) belirtilen biyoaktif bileşiklerin dağılımı belirlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Böylece bitkide flavonoidler ve kinik asit türevleri dahil olmak üzere toplam 34 fenolik bileşik tanımlanmış ve farklı morfolojik (yaprak, çiçek ve sap) kısımlarındaki dağılımı değerlendirilmiştir. Klorojenik asidin toprak üstü kısımlarda bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir.

Gouveia ve Castilho⁵⁶, *H. melaleucum* bitkisinin farklı morfolojik kısımlarında (toprak üstü, yapraklar, çiçekler ve saplar) fenolik bileşiklerin (O- glikosile flavonoidler (flavonol ve flavon tipi), kinik asit, kafeik asit, lignanlar ve polifenoller) belirlenmesine yönelik HPLC-DAD-ESI/MSⁿ yöntemi geliştirmiştir. Toplam 68 bileşik UV ve kütle spektrumlarına göre karakterize edilmiştir. Çalışmada 100 gr *H. melaleucum* bitkisinin toprak üstü, yaprak, çiçek ve sapları ayrı ayrı kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Daha sonra kurutulmuş bitki kısımları ayrı ayrı oda sıcaklığında 24 saat metanol ile ekstrakte edilmiş ve elde edilen metanol ekstraktları kurutulmuştur. Herbir örnek daha sonra 24 saat boyunca oda sıcaklığında artan polariteye sahip dört çözücü (n -hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol) ile sırayla ekstrakte edilmiştir. Daha sonra elde edilen ekstraktlar 40°C'de evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra hareketli faz içerisinde çözülerek HPLC-DAD-ESI/MSⁿ analizleri için bitki örnekleri hazırlanmıştır. HPLC sisteminde ayırım, 10 µL enjeksiyon hacmi ile RP-C18 kolonunda asetonitril (A) ve % 0.1 formik asit içeren su

(B) hareketli fazın % 20 A (0 dk), % 25 A (0-10 dk), % 25 A (20 dk), % 50 A (20-40 dk), % 100 A (42-47 dk), % 20 A (49-55 dk) gradient elüsyonu kullanılarak 210-520 nm dalga boyu aralığında scan taraması yapılarak gerçekleştirilmiştir. Klorojenik asit 243, 296 ve 324 nm dalga boylarında tespit edilmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C'de tutulmuştur. ESI-MS analizi ise kolon elüatın negatif iyon kütle spektrumları, 13000 da/s tarama hızında, 100-1000 m/z aralığında gerçekleştirilmiştir. Azot gazı 50 psi'lik bir basınçta, 10.0 mL/dk'lık hacimde hem nebulizer gazı hemde kurutma gazı olarak kullanılmıştır. Nebulizatör sıcaklığı 365°C, kapiler voltajı +4500 V ve çarpışma enerjisi 40 V olarak ayarlanmıştır. MSⁿ verileri, 4.0 m/z izolasyon genişliği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *H. melaleucum*'nin farklı morfolojik bölümlerin metanolik ekstralarında 68 fenolik bileşik karakterize edilmiştir. Klorojenik asit için [M-H]⁻ değeri sırasıyla MS'de 353, MS²'de 353:191, MS³'de 353-191:173, MS⁴'de 353-191-127:109 m/z'dir. Bitkinin çiçeklerin, daha yüksek fenolik bileşik çeşitliliğine sahip morfolojik kısım olduğu ve 68 bileşik içinde klorojenik asidin toprak üstü kısımlarda fazla miktarda bulunduğu tespit edilmiştir.

Gouveia ve Castilho⁵⁷, *H. obconicum* bitkisinin farklı morfolojik kısımlarında (toprak üstü, yapraklar, çiçekler ve saplar) fenolik bileşiklerin (mono- ve di-kafeoilkinik asit türevleri olmak üzere fenolik asit konjugatları ana bileşenler ve bazı flavonoid türevleri) belirlenmesine yönelik HPLC-DAD-ESI/MSⁿ yöntemi geliştirmiştir. Toplam 50 bileşik UV ve kütle spektrumlarına göre karakterize edilmiştir. Çalışmada 100 gr *H. obconicum* bitkisinin toprak üstü, yaprak, çiçek ve sapları ayrı ayrı kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Daha sonra kurutulmuş bitki kısımları ayrı ayrı oda sıcaklığında 24 saat metanol ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra elde edilen metanol ekstraları 40°C'de evaporatörde kurutularak hareketli faz içerisinde çözülmüş ve HPLC/DAD ve HPLC/ESI-MSⁿ sisteminde analiz edilmiştir. Kromatografik ayırım 10 µL enjeksiyon

hacmi ile RP-C18 kolonunda asetonitril (A) ve % 0.1 formik asit içeren su (B) hareketli fazın gradient elüsyonu kullanılarak 210-520 nm dalga boyu aralığında scan taraması yapılarak 280 nm dalga boyundaki pik alanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Klorojenik asit 243, 296 ve 324 nm dalga boylarında tespit edilmiştir. Yukarıdaki çalışmalardan farklı fenolik bileşik olarak *H. obconicum* bitkisinin metanolik ekstralarında di- ve tri kafeoilşikimik asit izomerleri ve lamiridosins-di- O- heksosit türleri tespit edildi. Klorojenik asit için $[M-H]^-$ değeri MS'de 353, MS²'de 353:191, MS³'de 353-191:173, MS⁴'de 353-191-127:109 m/z değerleri kullanılarak bitkinin bitkinin toprak üstü, yaprak ve saplarında gözlenmiştir.

Kolaylı ve ark⁴², *H. plicatum* bitkisinin çiçek, yaprak ve gövdesinde fenolik bileşiklerin belirlenmesine yönelik HPLC yöntemi geliştirmişler ve toplam fenolik içeriklerine göre antioksidan kapasitesini belirlemişlerdir. Bu amaç ile *H. plicatum* DC. subsp. *plicatum* bitkisi Karadeniz Zigana platosundan (1200-1300 m) toplanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bitki çiçek, yaprak ve gövdesi olmak üzere 3 kısma ayrılmış ve her birinden 5-10 g alınarak metanol ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra elde edilen metanol ekstraları 50°C'de evaporatörde kurutularak hareketli faz içerisinde çözülmüştür. Ekstre içerisinde bulunan klorojenik asit, kuersetin ve rutin başta olmak üzere 17 farklı fenolik bileşenin HPLC sistemindeki ayrımı, RP-C18 kolonunda iki farklı çözücü içeren hareketli fazın (A: % 0.5 asetik asit içeren asetonitril-su (1:1, h/h); B: % 2 asetik asit içeren su) gradyan elüsyonu kullanarak 1.2 mL/dak akış hızı ve 20 µL enjeksiyon hacminde 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Bitkinin antioksidan kapasitesi de FRAP yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *H. plicatum*'un ters faz yüksek performanslı sıvı ile belirlenen klorojenik asit miktarları çiçeklerinde 11.05 mg/100g ekstrakt yapraklarında 10.85 mg/100g ekstrakt ve gövdesinde 2.38 mg/100g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. *H. plicatum* bitkisinin 3 farklı kısmında toplam fenolik asit miktarı 5.56-43.12 mg gallic

acid /g aralığında değiştiği bulunmuş ve FRAP değerlerinin (1000 μ M Trolox/ 100 g) en yüksek değerinin yaprakta bulunduğu (336.25 $\pm$ 0.05) ve bunu iek (272.41 $\pm$ 0.07) ve gövdesinin (200.18 $\pm$ 0.06) takip ettiği bildirilmiştir.

Albayrak ve ark³¹, Türkiye’den toplanan 16 *Helichrysum* (Asteraceae) türünün fitokimyasal bileşenleri ile antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini belirlemişlerdir. Bu amaç ile 16 *Helichrysum* bitki türü (*Helichrysum arenarium* subsp. *aucheri*, *H. armenium* subsp. *armenium*, *H. artvinense*, *H. chionophilum*, *H. compactum*, *H. goulandrionum*, *H. graveolens*, *H. heywoodianum*, *H. kitianum* Yıldız, *H. noeanum*, *H. orientale*, *H. pallasii*, *H. peshmenianum*, *H. plicatum* subsp. *plicatum*, *H. plicatum* subsp. *polyphyllum kupicha*, *H. stoechas*) oda sıcaklığında kurutulmuş ve toprak üstü kısımları ğtlerek toz haline getirilmiştir. Sonra toz halindeki bitki materyalleri (10 g) 60°C’de 6 saat metanol ile ekstre edilmiştir. Daha sonra zt süzülerek 40°C’de evaporatörde vakum altında kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Ekstratlar hareketli fazda zlerek HPLC analizi için hazırlanmıştır. Çalışmada ana bileşen olarak klorojenik asit, ardından apigenin-7-glukozit ve apigenin HPLC analizi ile tanımlanmış ve kromatografik ayırım, C18 terz faz kolonunda, 0.8 mL/dk akış hızında %3 asetik asit içeren su ve metanol içeren hareketli fazın iki farklı lineer gradienti kullanılarak 20 μ L enjeksiyon hacminde 278 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C olarak seçilmiştir. *Helichrysum* türlerinin metanol ekstraktlarının analizinde bitkinin ana bileşeninin klorojenik asit (1603.2 μ g/g) olduğu ardından apigenin-7-glukozit (876.8 μ g/g) ve apigenin (351 μ g/g) takip ettiği belirtilmiştir. Ayrıca tüm ekstraktların, güçlü antioksidan ve radikal süpürücü aktivite gösterdiği belirtilmiş ve askorbik asit eşdeğerleri olarak en yüksek toplam antioksidan kapasitesi 194.64 mg/g ekstrakt olarak elde edilmiştir. DPPH analizinde *Helichrysum stoechas* subsp. ekstresi için en yüksek IC₅₀; 7.95 μ g/mL olarak gözlenmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri 66.74 ila 160.63 mg gallik asit

eşdeğeri/g ekstrakt arasında değiştiği tespit edilmiştir. Mikrobiyolojik analizde ise tüm ekstraktların 13 bakteri ve iki mikroorganizmaya karşı önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Silva ve ark⁵⁸, *H. stoechas* (Asteraceae) bitki türünün çiçekleri, sapları ve yapraklarında bulunan ve yüksek antiasetilkolinesteraz aktivitesinden sorumlu olan klorojenik asit, sinarin ve arzanol belirlenmesine yönelik bir HPLC/DAD ve LC/MS ve LC/MS/MS yöntemlerini geliştirmişlerdir. *H. stoechas* bitkisi çiçeklenme döneminde toplanmış ve taze toplanan bitkinin çiçekleri, yaprakları, sapların her birinden 20 g alınarak su ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra elde edilen su ekstreleri süzülüp liyofilize edilerek analiz edilene kadar -20 °C’de saklanmıştır. Kromatografik ayırım, RP-C8 kolonunda, 25 µL enjekte hacmi kullanılarak 0.8 mL/dk akış hızında %0.05 trifloroasetikasit içeren su (A) ve metanol (B) hareketli fazın %70 A (0 dk), %30 A (0-40 dk), %30 A (45 dk), %70 A (47 dk), %70 A (50 dk) gradient elüsyonu kullanılarak DAD detektörü ile 200 ila 600 nm dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. LC–MS ve LC–MS/MS analizinde hem pozitif hem de negatif iyon modlarında 120-1000 m/z aralığında 250°C kapiler sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Her bir bitki örneği 10 mg/mL derişimde sisteme enjekte edilmiş ve kromatografik ayırımda hareketli faz olarak %0.1 formik asit içeren su (A) ve metanol (B) kullanılmış ve yukarıda bahsedilen aynı gradient uygulanmıştır. Klorojenik asit için [M-H]⁻ değeri MS’de 353, MS²’de 353:191,179 ve 173 değerleri kullanılarak bitkinin kök (sapları), yaprak ve çiçeklerinde tanımlanmıştır. Bitkinin kök/yaprak ve çiçeklerindeki klorojenik asit yüzdesi sırasıyla % 19.7±0.1 (74.1 ± 0.1 µg/mg) ve % 14±0.9 (118.6 ± 3.6 µg/mg) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *H. stoechas* ekstresinde sinarin ve arzanol bol miktarda bulunmuştur. Sinarin kök/yaprak ve çiçek özlerinde sırasıyla %23.3 ile %55.4 arasında değişirken, arzanol kök/yapraklarda % 34.4 ila çiçek sulu özlerinde %8.8 arasında değişmektedir. Bitki ekstrelerinin

antiasetikolinesteraz inhibisyon deneylerinde çiçeklerinin 260.7 µg/mL ve kök/yapraklarının 654.8 µg/mL inhibisyon değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir.

Albayrak ve ark⁴⁰, Doğu Anadolu'dan toplanan *Helichrysum* türlerinde (*H. arenarium* subsp. *erzincanicum*, *H. arenarium* subsp. *rubicundum*, *H. armenium* subsp. *araxinum*, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum*) HPLC yöntemiyle fenolik bileşiklerin belirlenmesi ile antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini belirlemişlerdir. Bitkilerin toprak üstü kısımları oda sıcaklığında kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen 10 g bitki materyalleri metanol ile 60°C'de 6 saat boyunca ekstre edilmiştir ve daha sonra metanol 40°C'de evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra ekstre hareketli faz içerisinde çözülerek hazırlanmışlardır. *Helichrysum* türlerindeki fenolik bileşiklerin HPLC yöntemi ile analizinde, ters faz C18 kolonu, hareketli faz olarak %3 asetik asit içeren su ve metanol çözücü karışımının 0.8 mL/dk akış hızında lineer gradienti kullanılmıştır. Fenolik bileşiklerinin dedeksiyonu 200-550 nm dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. *Helichrysum* türlerinin HPLC analizinde, klorojenik asit, apigenin-7-glukozit ve apigenin ana bileşenler olarak bulunmuştur. HPLC ile metanolik ekstrelerinde klorojenik asit miktarları (µg/g ekstrakt) *H. arenarium* subsp. *erzincanium* bitkisinde 150.30 µg, *H. arenarium* subsp. *rubicundum* bitkisinde 45.20 µg, *H. armenium* subsp. *araxinum* bitkisinde 63.70 µg *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinde 94.00 µg olarak belirlenmiştir. Ayrıca tüm ekstraktların, güçlü antioksidan ve radikal süpürücü aktivite gösterdiği belirtilmiştir. En yüksek toplam antioksidan kapasitesi 161.79 mg askorbik asit eşdeğeri/g ekstrakt olarak elde edilmiştir. *H. arenarium* subsp. *erzincanicum*, 23.03 µg/mL IC₅₀ değeri ile en yüksek düzeyde serbest radikal temizleme aktivitesi göstermiştir. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri 71.81-144.50 mg gallik asit/g ekstrakt arasında değiştiği tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite ise agar difüzyon yöntemi ile yapılmış olup metanolik ekstraktlar *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus brevis*,

B. cereus, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* karşı antibakteriyel aktiviteye göstergisi tespir edilmiştir.

Pereira ve ark⁵⁹, *H. italicum* subsp. *picardii* bitkisinin UPLC/DAD/MS yöntemi ile fenolik bileşiklerinin belirlenmesi ve in vitro yeşil çay ile biyolojik aktiviteleri karşılaştırmasını çalışmışlardır. Bu amaç ile, Güney Portekiz'den toplanan *H. italicum* subsp. *picardii* bitkisi kurutulmuş ve bitki kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlara ayrılarak öğütülmüş analiz edilene kadar -20°C'de saklanmıştır. Bitkinin herbir kısmından ayrı ayrı 15 mg alınarak 60:40 metanol: 40 mM amonyum format içeren su ile ekstrakte edilmiştir. Örnekler, santrifüjlendikten sonra 1/100 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. Kromatografik ayırım için 5 µL enjeksiyon hacminde UPLC BEH SHIELD RP18 kolonuna verilerek %0.1 formik asit içeren su (A) ve % 0.1 formik asit içeren asetonitril (B) hareketli fazın gradient elüsyonu (dk /% A): 0.0/100, 9.91 / 74, 18.51 / 35, 18.76 / 0, 23.76/0, 23.88/100, 26.00/100) ile 190-330 nm dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. LC/ MS analizi ise ısıtılmış elektrosprey iyonizasyonun hem pozitif hemde negatif iyon modu kullanılarak 120–1800 m/z aralığında gerçekleştirilmiştir. Nebulizer ve kurutma gazının voltajı sırasıyla 47 kV ve 15 kV olarak ayarlanmış ve MS analizi 350°C nebulizatör sıcaklığı ve +4000 V kapiler voltajı ve 10, 30 ve 50 V çarpışma enerjileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Klorjenik asit için [M-H]⁻:353:191 m/z değeri ile tanımlanmıştır. *H. italicum* subsp. *picardii* bitkisinin kök, toprak üstü kısımları ve çiçeklerindeki bileşiklerin derişimi LC/MS kullanılarak (µg/g ekstrakt, yani µg/fincan-çay), hesaplanmıştır. *H. italicum* subsp. *picardii* bitkisindeki fenolik bileşikleri analiz edildiğinde klorojenik asit miktarının en yüksek olduğu bulunmuştur. *H.italicum* subsp. *picardii* bitkisi kaynatılarak ve demleme olarak derişimleri belirlenmiş olup klorojenik asit en fazla toprak üstünde (6.9 mg/g ekstrakt) gözlenmiş ve bunu sırasıyla çiçek (6 mg/g ekstrakt) ve kökleri (0.19 mg/g ekstrakt) takip etmiştir.

Gradinaru ve ark⁶⁰, *H. arenarium* subsp. *arenarium* bitkisinin çiçek ve salkımlarının metanol ekstraktında fenolik bileşiklerin HPLC/DAD/ESI-MS yöntem ile belirlenmesi ve alt solunum yolu patojenlerine karşı antibakteriyel özelliklerinin incelenmesine yönelik çalışmışlardır. Çeşitli HPLC-DAD-ESI-MS yöntem ile bitkide 12 fenolik bileşik (kafeik asit konjugatları (klorojenik asit ve dikaffeoilkinik asitler) ve flavonoidler (apigenin, naringenin, apigenin-7-O-glukozit ve naringenin-O-hekzositler) tanımlanmıştır. *H. arenarium* subsp. *arenarium* bitkisinin çiçek ve salkımlarında metanol ekstraktında toplam fenolik asit miktarı 160.17 mg gallic acid /g aralığında değiştiği bulunmuştur. Antimikrobiyal aktivite ise agar difüzyon yöntemi ile yapılmış olup metanolik ekstraktlar *S. Aureus*, *S. Pneumonia* ve *M. Catarrhalis*'e karşı antibakteriyel aktiviteye göstergisi tespit edilmiş ve siprofloksasin ile kombinasyonunda *S. Aureus* ve *S. Pneumonia* bakterilerine karşı sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir.

2.5. Kromatografi, Kromatografinin Sınıflandırılması ve Dayandığı Parametreler

Kromatografi, ortak ve uygun bir çözücü ortamına konan bir karışımın içerdiği çeşitli maddelerin sabit faz üzerinde, hareketli faz etkisiyle bileşenlerin farklı hızlarda hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanan maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ayrılma işlemlerine toplu olarak verilen isimdir. Kromatografinin ana amacı hedeflediğimiz numunenin ayrımı ve miktarının ölçümüdür ⁶¹.

Kromatografik yöntemler uygulama biçimlerine göre, ayrılma mekanizmalarına ve faz tiplerine göre sınıflandırılmaktadır. Kromatografi genellikle teorik (adsorpsiyon kromatografisi, dağılma kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi, moleküler eleme kromatografisi ve afinite kromatografisi) ve pratik (kâğıt kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi, gaz kromatografisi ve sıvı kromatografisi (LC)) olmak üzere iki grupta incelenir.

Kromatografide hareketli faz, numuneyi sabit faz boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözücü karışımlarıdır. Kullanılacak olan hareketli fazın seçiminde, analizi yapılacak numunenin bileşenlerinin özellikleri, kullanılacak sabit faz ve dedektörün özellikleri gibi parametrelere dikkat edilmelidir. Sabit faz ise hareketli faz içerisinde gelen numuneye ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları fazdır. Alıkonma, hareketli faz içerisinde gelen, analizi yapılacak numuneye ait bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek, belirli oranda alıkonulması, yavaşlatılması ve böylece daha geç olarak sabit fazı terk etmesi olayıdır.

Kromatografide analiz; alıkonma zamanı, kapasite faktörü, etkinlik, seçicilik, kolon verimi, kolon rezölasyonu, göç hızı, partiyon oranı gibi parametrelere bağlıdır. Bir analitin hareketli ve sabit faz arasındaki transferini kapsayan bir denge mevcuttur. Bu denge analitin sabit faz içindeki molar derişiminin, hareketli faz içindeki molar derişimine oranı olarak K (dağılma katsayısı) olarak adlandırılır.

Belirli sabit analitik koşullar altında, her kimyasal madde için spesifik olan alıkonma zamanı (t_R) tanımlanır. Ayrıca örnek veya hareketli faz tutunmayan bir pik içerir Bu pik ölü zaman (t_m) olarak tanımlanır.

1. Analitin göç hızı: (kolon uzunluğu (L) / t_m) olarak ifade edilir. Analitin kolondaki göç hızı ise kapasite faktörü (k_A) parametresi ile belirlenir. k_A : $[(t_R - t_m) / t_m]$ eşitliği ile gösterilir. İdeal bir kromatografik ayırmada kapasite faktörü 1 ile 5 arasındadır. Seçicilik faktörü (α), kolonda iki analitin birbirinden ayırımını gösteren parametredir ve her zaman birden büyük olmalıdır. $\alpha = [(t_R)_B - t_m] / [(t_R)_A - t_m]$ eşitliği ile gösterilir⁶²⁻⁶⁵.

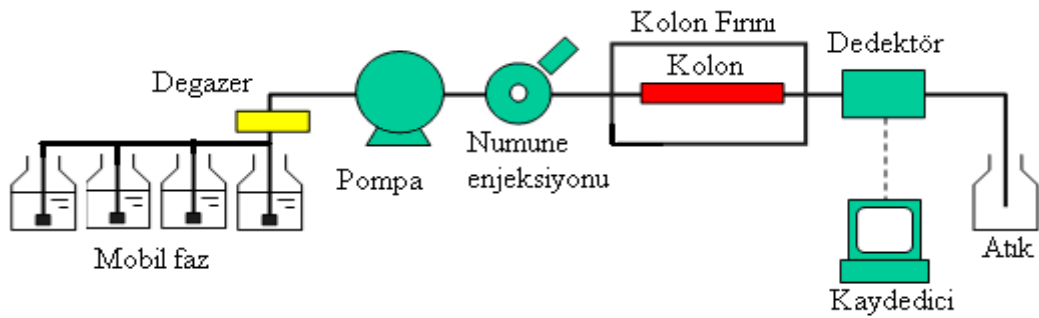
2.5.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Sıvı kromatografisinde bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı hareketli faz kullanılır. Sıvı kromatografisi çeşitlerinden yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) karışımdaki bileşenler ilk olarak çözücüde çözülürler ve daha sonra yüksek

basınç altında kromatografi kolonundan geçirilirler. Yaygın kullanıma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğu, hassasiyet ve bunlara ek olarak endüstri ve bilimde geniş uygulanabilirliğinin olmasıdır.

2.5.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı

HPLC cihazları, hareketli faz rezervuarı, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere altı bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. HPLC cihazının şematik gösterimi

1. Hareketli Faz Rezervuarı: Bir HPLC cihazında, bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelikten yapılmış her biri 200–1000 mL çözücü alacak kapasiteye sahip hareketli faz haznesi içermektedir. Sistemde kullanılan hareketli fazın seçimi uygulanan ayırma tipine bağlıdır. Bu nedenle sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar farklı polaritede çözücüler kullanılır. Tüm solventlerin gazının alınması zorunludur, aksi takdirde çözücüde hava kabarcıklarının bulunması pompa ve kolonda problemlere neden olmaktadır. Bu bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların giderilmesi için cihaz degazer ünitesi içermektedir.

2. Pompa: mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlayan, degazerden mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir. Bu işlemi akış hızını ve basınç değerlerini ayarlayarak gerçekleştirir. HPLC yöntemlerinde kullanılan pompa sistemleri; akış hızına, pompanın yapıldığı malzemeye ve mobil faz

ilerletme mekanizmasına göre sınıflandırılır. Sabit akışlı-pompalar, sistemdeki iç basıncın değişimini motor ile sağlanan basınç değişikliği ile sabit akışı sağlayan pompalardır⁶⁶.

3. Enjeksiyon: Örnekler HPLC sistemine enjeksiyon ünitesinden enjekte edilerek verilir. Enjeksiyon ünitesi basit olarak bir enjeksiyon valfi ve örnek haznesinden oluşur. Örnek, enjeksiyon öncesi hareketli fazda çözülerek bir şırınga ile valften enjekte edilir. Enjeksiyon işlemi, manuel enjeksiyon valfleri, basit otomatik enjektörler ve programlanabilen otoörnekleyiciler olmak üzere üç şekilde yapılmaktadır. Programlanabilen otoörnekleyiciler, lopuna doldurmak için hassas motor ile hareket ettirilen şırıngalar kullanılırlar. Enjektörle çekilen hacmi kontrol edilerek istenen miktarda örnek loopa doldurulur. Bu tip otosamplerlarda 10 µL'lik toplam örnek hacminden 2 µL gibi küçük miktar enjekte edebilirler.

4. Kolon: Kolonlar örnek içerisinde bulunan analitlerin ayırımının yapıldığı kısımdır. Ayırma kolonları genellikle paslanmaz çelik olup yüksek basınçlara dayanıklıdır. Dolgu maddesini yani sabit fazı taşırlar. Dolgu maddelerinin tanecik boyutu 5–10 µm arasındadır ve sistem performansını etkileyen en önemli parametredir. Kolondaki sabit faz, katı bir destek maddesi üzerine fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmış ince bir organik film bulunur. Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın katı destek maddesi silisyum dioksittir. Kolonun ömrünü uzatmak için koruyucu kolonlar kullanılabilir. HPLC ile analiz yapabilmek için yaygın olarak dağılım kromatografisi kullanılır. Dağılım kromatografisinde sistemin ayırım gücü, sabit faz, hareketli faz ve maddenin polaritesine bağlı olarak değişir. Ters-faz sıvı ve normal-faz sıvı kromatografisinde madde polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakınlığına göre kolonu önce terk eder. Kolonlar, ayırdıkları madde miktarlarına göre üç farklı şekilde sınıflandırılır.

1) *Mikrobor Analitik*: 1-2 mm çapında, 7-30 cm uzunluğunda, 0.01 mg örnek miktarı alabilen, akış hızı 0.1 mL/dak olan kolon çeşididir.

2) *Standart Analitik*: 3-5 mm çapında, 7-30 cm uzunluğunda, 0.1 mg örnek alabilen, 1.0 mL/dak akış hızına sahip kolonlardır.

3) *Preparatif*: 5-20 mm çapına sahip, 25-50 cm uzunluğunda, 10 mg örnek miktarı olan ve 10 mL/dak akış hızı olan kolonlardır⁶⁴.

5. Dedektör: Dedektörler, kolondan ele olan örnek bileşeninden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan alettir. HPLC için ideal bir dedektör; geniş derişim aralığında, yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, bilinen seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik rezolüsyona kötü etki yapmaksızın kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı olmalıdır. Böyle bir dedektör sıcaklık ve basınçtaki değişmelere de duyarsız olmalıdır. Kullanılacak dedektör sistemi, analizi yapılacak numunenin cinsine uygun olmalıdır. HPLC’ de genel ve özel amaçlı olmak üzere iki tip dedektör kullanılır. Genel amaçlı dedektörler, hareketli fazın kırma indisini dielektrik sabitini, yoğunluğunu ölçen dedektörlerdir. Özel amaçlı dedektörler ise bir maddenin UV-Görünür bölge (GB) absorpsiyonunu, floresansını, diffzleme akımını ölçer. Özel amaçlı dedektörler, UV dedektörleri, Diod-Array dedektörleri (DAD), floresans dedektörleri ve elektrokimyasal dedektörleridir. Bu dedektörle ilaveten kütle ve IR dedektörleri de kullanılmaktadır.

UV-GB Dedektörler: Maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan dedektörlerdir. Fotometrelerden farklı olarak, bir akış hcreti taşır ve bu küçük akış hcretinden geçen maddeler tarafından absorblanan UV-GB ışınlarını saptayabilen dedektörlerdir. Bu dedektörler, sabit ve değişken dalga boylu dedektörler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Sabit dalga boylu dedektörler, basit bir dedektör olup, dalga boyunun seçimi için farklı

interferanslı filtreler kullanılır. Bu dedektörlerde genellikle UV kaynağı olarak civa lambası kullanılır. Değişken dalga boylu dedektörler, 108-400 nm arasında sürekli ışık verebilen döteryum lamba ya da 400-800 nm arasında ışık veren bir tungsten lambaya sahip ve istenilen dalga boyunu seçmek içinde bir monokromatör taşıyan fotometrelerdir. Maddenin maksimum absorpsiyonunun bulunduğu dalga boyunda çalışma olanağı sağlayan dedektörler olup, hassasiyet artırdığı için kullanışlı detektörlerdir.

DAD dedektörler: Değişken dalga boylu UV görünür bölge dedektörlerdir. Hem sabit hem de taramalı dalga boylarında incelemeye müsait olan dedektörlerdir. Döteryum lambadan gelen UV ışık demeti dalga boylarına ayrılmadan önce akış hücresinden geçer. Grating mekanizmasından sonra yerleştirilen yüzlerce fotodiyod dizisi ile istenilen dalga boyunda kromatogram elde edilir. Birden fazla dalga boyunda kromatogramdaki piklerin UV-GB spektrumları alınabilir, piklerin saflıkları tespit edilebilir⁶⁴.

6. Kaydedici: Dedektörde oluşan sinyalin, yani kromatogramın kâğıt üzerine aktarıldığı bölüme kaydedici denir ⁶⁶.

2.6. Kemometri ve Kemometrik Yöntemler

Temel uygulama alanı analitik kimya olan kemometri; bilgisayar, yazılım, istatistik ve uygulamalı matematik alanların birlikte kullanımına izin vererek karmaşık sistemlerin çözümünü ve kimyasal verilerin işlenmesini sağlayan bir kimya bilim dalıdır. Kemometri kavramı 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından öne sürülmüş olup 1974 yılında uluslararası kemometri derneği tarafından bu disiplinin ilk resmî açıklaması yapılmıştır. Kemometrik yöntemler, kimyasal verilere etki eden faktörleri, bu faktörlerin etkisinin ne ölçüde olduğunu ve bu faktörler arasındaki etkileşimleri belirlemek amacı ile geliştirilmiştir ⁶⁷.

Analitik kimya, günümüzde modern analitik enstrümantal yöntemlerle oluşturulan veriler sayesinde kemometrik yöntemlerin uygulanmasının gelişmesine önemli ölçüde

katkıda sağlamaktadır. Kemometrik uygulamaların çoğu karmaşık hesaplamalar içerdiğinden dolayı bu hesaplamaların elle veya basit hesap makineleriyle gerçekleştirmek mümkün olmadığından bilgisayar programlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle Design Expert, EXCEL, MATLAB, VISUAL BASIC ve C++ gibi paket programlar kullanılmaktadır. Kemometrik yöntemlere kimyada ve özellikle analitik kimyada ihtiyaç duyulmasını sebebi kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler ortaya koymasından kaynaklanmaktadır⁶⁸. Kemometri içerik olarak, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme, deneysel tasarım, modelleme, kalibrasyon, optimizasyon, yapı tanıma, sınıflandırma, yapay akıl yöntemleri, resim işleme, bilgi ve sistem kuramı gibi kavram ve uygulama konularından oluşmaktadır⁶⁷.

2.6.1. Deneysel Tasarım

Deneysel tasarım, Deney sonucunda elde edilen kimyasal verileri etkileyen faktörlerin neler olduğunun incelenmesi ve optimize edilmesi gereken faktörlerin belirlenmesi amacıyla yapılan ve analiz için zaman ve maliyet tasarrufu yapmak için kullanılan yöntemdir. Deneysel tasarımda, deney sonucunu etkileyen değişkenlere faktör denilmektedir. Elde edilen sonuç, yanıt ve faktörlerin aldığı değerler seviye olarak adlandırılmaktadır. Sıcaklık, pH, derişim gibi kontrol edilebilen değişken faktörler olduğu gibi deneyi yapan kişilerden kaynaklanan farklılıklar gibi kontrol edilemeyen faktörlerde vardır⁶⁹.

En sık kullanılan kemometrik deneysel tasarım yöntemleri full faktöriyel, fraksiyonel faktöriyel, Placket Burman ve merkesi kompozit tasarımıdır. Faktöriyel tasarım yöntemlerinde her bir faktörün etkileri genel olarak incelenir fakat optimum faktör şartları belirlenemez. Placket Burman tasarım yönteminde ise faktörlerin sonuç üzerindeki etkileri incelenir fakat faktörler arası etkileşimler belirlenemez. Bir analiz

yönteminde faktörlerin optimum koşulları ve etkileşimleri incelenmek istendiğinde, genellikle merkezi kompozit tasarım (MKT) yöntemi uygulanır⁶⁴.

2.6.1.1. Merkezi kompozit Tasarım (MKT) Yöntemi

MKT yöntemi, deneysel tasarım yöntemlerinin kombinasyonu olup üç tür tasarım noktası (full faktöriyel (2 seviyeli) veya fraksiyonel faktöriyel, star (eksenel) ve merkezi noktalar) bulunmaktadır. MKT’de deney sayısı, faktör sayısına (k) bağlı olarak; “Deney sayısı = $2^k + 2k + 1$ ” eşitliği ile belirlenir. 2^k full faktöriyel ya da fraksiyonel faktöriyel noktaları olup faktörlerin minimum ve maksimum değerleri (-1) ve (+1) seviyesindedir. $2k$ eksenel noktalar olup $\pm\alpha$ seviyelerini gösterir. α , minimum ve maksimum değerlerinin dışındadır ve çoğunlukla 1’den büyük bir değerdir. α değeri $\pm$ formülü ile hesaplanır ve tasarımda star noktaları (model eğriliğini tespit eder) belirlenir. Yukarıdaki eşitlikte belirtilen +1 değeri ise merkez noktalarını gösterir. Merkezi noktalar 0 seviyesindedir ve bu seviye faktörlerin minimum ve maksimum değerlerinin ortalamasıdır ve bu noktalar deneysel hataları belirlemek için 4 ila 6 kez tekrarlanmaktadır⁷⁰.

MKT yönteminin avantajları, faktörlerin etkisi ve aralarındaki etkileşimin incelenebilmesi, tekrarlanan deneyler ile deneysel hatanın varlığının tespit edilebilmesi ve her bir faktörün optimum koşulunun ve parabolik etkilerinin belirlenebilmesi olarak sıralanmaktadır⁶⁸.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneyde Kullanılan Madde ve Malzemeler

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Standart klorojenik asit etkin maddesi Sigma-Aldrich'den (Almanya) temin edildi. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan saf su Milli-Q saflıktadır. (EASY püre RF cihazından elde edildi.) HPLC analizleri için HPLC grade metanol (Merk, Almanya) ve asetonitril (Merk, Almanya), bitki ekstraksiyonunda ise analitik grade metanol (Sigma-Aldrich Almanya) kullanıldı. Kimyasal madde olarak ortofosforik asit Sigma-Aldrich'den (Almanya) elde edildi.

Çalışmamızda yara deneylerinde human dermal fibroblast hücreler (PCS-201-012-ATCC) kullanıldı. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS) kitleri REELASSAY'den (Türkiye) sağlandı. Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), Dimetil sülfoksit (DMSO), Fosfat Tamponu (PBS), Fötal Sığır Serum (FBS), L-Glutamine, Pen-strep solüsyonu, Tripsin-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ve XTT kiti Sigma-Aldrich'den (Almanya) elde edildi.

3.1.2. Bitki Materyali

3.1.2.1. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitkisinin Toplanması ve Kurutulması

1800-2950 metre arasında kuru, açık kayalık yamaçlarda yetişen *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisi, 20 Haziran 2019'de Erzurum Köşk Köyü merasında 1950 m rakımda (40° 5' 21" K 41° 25' 36" D-) toplandı (Şekil 3.1) ve Dr. Öğr. Üyesi Leyla Güven tarafından teşhis edildi. Güneş görmeyen, oda sıcaklığında olan bir ortamda kurutuldu.



Şekil 3.1. Erzurum Köşk Köyü'nden *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitkisi (Resimleyen Yüksek Lisans Öğrencisi Abdalbaki AKPINAR).

3.1.2.2. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitkisinin Ekstraksiyon Prosedürü

70 g *Helichrysum plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin çiçeklerin bir arada olduğu kısım toz haline getirildi ve toz haline getirildikten sonra bitki üzerine 1000 mL metanol eklendikten sonra bir gece maserasyona bırakıldı. Maserasyon süresi sonunda manyetik karıştırıcı kullanılarak 24 saat oda sıcaklığında ekstre edildi. Bu işlem 2 kere tekrar edilerek her ekstraksiyon işleminden sonra ekstratlar süzülüp, süzüntüler birleştirilerek rotavaporda, 40°C'de 120 rpm'de organik fazı uçurularak yoğunlaştırıldı. İşlemler Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi-Farmasötik Botanik Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2. Cihazlar ve Araçlar

H. plicatum subsp. *Pseudoplicatum* bitki ekstresindeki klorojenik asit miktarının belirlenmesi Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Sistemi (Agilent Technologies 1200 Series), UV Dedektör (Agilent Technologies), Degazer (Agilent Technologies), Pompa (Agilent Technologies), Kolon (C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm) (USA), Oto örnekleyici (Agilent Technologies) ve Bilgisayar (HP) kullanılarak yapıldı.

Bitki ekstresindeki organik fazı uçurmak amacıyla Rotavapor: Heidolph WB Laborota 4000 kullanıldı. pH ölçümleri laboratuvar ortam sıcaklığında (22-25°C), standart tamponlar (Fixanal, Riedel-deHaen, Almanya) ile kalibre edilmiş Model 538 pH metre (WTW, Avusturya) ile yapıldı. İstenilen hacimlerde çözücü ve çözelti aktarımı için Eppendorf Research serisi 100-1000 µL ve 1000-5000 µL otomatik pipetler kullanıldı. Ayrıca çalışmada santrifüj (Hettich, RPM x100), hassas terazi (Metler Toledo Ad 104-5), karıştırıcı vorteks (IKA), etüv (Memmert), ultrasonik banyo (Elma LC30), ELISA yöntemi (MicroQuant, Reader, BioTek, Winooski, VT, USA) cihazları kullanıldı.

3.3. Deneysel Yöntemler

3.3.1. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresindeki Klorojenik Asidin HPLC Yöntemi ile Analizi

3.3.1.1. Klorojenik asidin Stok, Çalışma ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Klorojenik asidin stok çözeltisini hazırlamak için 0.5 g klorojenik asidin tartılıp 50 mL'lik balon jojeye konularak metanol ile 10 mg/mL derişimde hazırlandı ve vorteks ile 20 sn karıştırıldı. Elde edilen stok çözelti daha sonra asetonitril ile seyreltilerek 500 µg/mL derişimde ara stok çözeltisi hazırlandı ve yine vorteks ile 20 sn karıştırıldıktan sonra +4°C'de saklandı. Klorojenik asidin ara stok çözeltisi asetonitril ile seyreltilerek 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL derişimlerine sahip standart çalışma çözeltileri ile 0.5, 10 ve 80 µg/mL derişimlerinde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı.

3.3.1.2. HPLC Yönteminin Optimum Şartlarının Belirlenmesi

Klorojenik asidin belirlenmesinde kullanılacak uygun çözücünün belirlenmesi amacıyla, derişimi 10 µg/mL olacak şekilde klorojenik asidin su, asetonitril ve metanol içeren farklı çözücüler kullanılarak çözeltileri hazırlandı. Uygun çözücü ortamı belirlenerek HPLC analizinde en yüksek pik alanı ve en düzenli pik şekli elde edilmesinde

etkili olan hareketli fazdaki asetonitril yüzde derişimi ile su içerisinde bulunan ortofosforik asidin yüzde derişiminin belirlenmesi amacıyla merkezi kompozit tasarım (kemometrik deneysel tasarım yöntemi) uygulandı. Tablo 3.1’de deneysel tasarımda kullanılan faktörler ve belirlenen aralıkları gösterildi.

Tablo 3.1. Klorojenik asidin HPLC ile belirlenmesi için seçilen faktörler ve aralıkları

		% Derişim		
		1. Faktör	2. Faktör	3. Faktör
1. Faktör	Asetonitril yüzde derişimi	30	62.5	95
2. Faktör	Ortofosforik asidin yüzde derişimi	0.01	0.255	0.5

Belirlenen faktörlerin aralıklarına göre Tablo 3.2’de çalışma şartları verilen 13 deney yapıldı. Veri ve her bir deneme için, klorojenik asidin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunda absorbansları belirlendi. Bulunan absorbans değerlerinden denklemler oluşturuldu. Dizayn-expert 8 yazılımı kullanılarak bu denklemler iterasyon yöntemi ile çözüldü. Bu şekilde her bir faktör için optimum değerler tespit edildi.

Tablo 3.2. Uygulanan merkezi kompozit tasarım kapsamındaki deneyler

Deney	1.Faktör (%)	2.Faktör (%)
1	30	0.5
2	100	0.255
3	62.5	0.255
4	62.5	0.00
5	95	0.01
6	62.5	0.6
7	30	0.01
8	62.5	0.255
9	95	0.5
10	62.5	0.255
11	62.5	0.255
12	62.5	0.255
13	16.5	0.255

3.3.1.3. HPLC Yöntem Şartları

Klorojenik asit etkin maddesinin için uygulanan kromatografik şartlar Tablo 3.3’de verildi. %0.2 ortofosforik asit içeren sulu çözeltiyi hazırlamak için, 2 mL ortofosforik asitten bir balon jojeye alınarak yaklaşık 50 mL suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 1000 mL’ye tamamlandı.

Tablo 3.3. Klorojenik asit için HPLC yöntem şartları.

Yöntem Şartları	Klorojenik Asit
Kolon	C ₁₈ (250x4.6 mm.5µm)
Dedektör	UV
Dalga Boyu	330 nm
Hareketli Faz	Asetonitril / %0.2 Ortofosforik Asit içeren su (95:5, h/h)
Kolon Sıcaklığı	Değişken
Kolon Akış Hızı	1 mL/dak.
Enjeksiyon Hacmi	10 µL

3.3.1.4. Analitik Yöntem Validasyonu

1. Belirleyicilik (Özgünlük) /Seçicilik

Belirtilen validasyon parametresi, numune içinde bulunan diğer bileşiklerin ve interferansların varlığında, analitin cevabını doğru bir şekilde ölçen analitik yöntem kabiliyetidir ICH rehberinde, belirleyicilik ve seçicilik ayrı ayrı tanımlanır. Belirleyicilik terimi bir analitin cevabı sağlayan yöntem için kullanılırken seçicilik, birden fazla analitin cevaplarını sağlayan yöntem için kullanılır. USP rehberine göre ise, seçicilik numunede bulunabilecek interferanslar ve bilinen parçalanma ürünlerinin varlığında analitin tam olarak ölçülebilme yeteneği olarak tanımlanır⁷¹⁻⁷³.

Klorojenik asidin HPLC analizinde klorojenik asidin hazırlandığı çözücü karışımının ve bitki ekstresinde bulunan diğer maddelerin klorojenik asidin alıkonma zamanı üzerinde herhangi olumsuz bir etkisinin varlığı araştırıldı.

2. Lineerlik/Çalışma Aralığı

Yöntemin lineerliği elde edilecek analitik cevap ile analitin derişimi arasında meydana gelen ilişkinin belirlenmesidir. Yöntemin lineerliğinin belirlenmesi için analitin düşük derişiminden başlayarak doğrusallıktan sapma gösterdiği derişimlere kadar bir seri çözeltisi hazırlanır sonra analit çözeltilerinin derişimine karşı ölçülerek elde edile cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri üretilir. Kalibrasyon eğrileri analiz edilerek eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı tespit edilerek yöntemin doğrusallığı ifade edilir. Yöntemin çalışma aralıkları ise, Kalibrasyon eğrisinde saptabilen en düşük derişim ile lineerlikten sapma gösterdiği derişim aralığını kapsar ⁷¹⁻⁷³.

HPLC analizinde, klorojenik asidin derişimleri 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olacak şekilde Bölüm 3.2.1.1’de belirtildiği şekilde çalışma çözeltileri hazırlandı. Yukarıda belirtilen derişimlerde hazırlanan çözeltilerin, derişimine karşı pik alanları grafiğe geçirilerek $y=mx+n$ regresyon eşitliği elde edilen kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve bu eğrinin korelasyon katsayısı (r), regresyon eğrisindeki kayma (n) ve eğim (m) tespit edildi ve bu değerlerden regresyon eğri eğiminin standart sapması (σ) hesaplandı.

3. Doğruluk

Doğruluk, ölçülecek olan değerlerin doğru ya da doğru kabul edilmiş değerlere yakınlığını gösterir. Bağıl hata veya mutlak hata ile değerlendirilir. Doğruluk dört farklı şekilde gösterilebilir. Bunlar;

1. Derişimleri bilinen bir seri örneğin analiz ve sonucunun gerçek değerle karşılaştırılması ile gösterilebilir. Bu durumda referans standart gereklidir.
2. Sonuçların daha önce doğru olarak bilinen bir yöntemle alınmış doğru sonuçlarla karşılaştırılması ile gösterilebilir.

3. Hedef derişim üzerinde 3 seviyede 3 deney yapılarak katım yapılmış numune üzerinde çalışılarak gösterilebilir. Katımı yapılmış olan bir numune hazırlanamıyorsa standart katım yöntemleri kullanılabilir.
4. Doğruluk, derişim başına kör hariç en az beş tayin ile belirlenir⁷¹⁻⁷³.

HPLC analizinde, klorojenik asidin derişimleri 0.5, 10, ve 80 µg/mL olacak şekilde Bölüm 3.3.1.1’de belirtildiği şekilde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Kalite kontrol çözeltilerinin gün-içi analizleri için altışar adet çözelti hazırlandı ve aynı gün HPLC kromatogramları alındı. Günler arası analizlerinde ise belirtilen çözeltilerin 3 gün ikişer adet çözeltileri hazırlandı ve her ayrı günde HPLC kromatogramları alındı. Elde edilen klorojenik asidin pik alanlarının ortalaması ve standart sapmaları hesaplandı. Yöntemin doğruluğu bağıl hata (BH) ($BH = [(bulunan - eklenen) / eklenen] \times 100$) ile belirlendi.

3. Kesinlik

Kesinlik, aynı koşullarda ve aynı yöntemle elde edilen sonuçların yakınlığını, diğer bir deyişle ölçümlerin tekrarlanabilme kabiliyetini göstermektedir. Yöntemin kesinliği bağıl standart sapma (% BSS) veya varyasyon katsayısı (VK) ile belirtilir. Kesinlik 3 basamak olarak düşünülmektedir.

1. *Tekrarlanabilirlik*: Kısa bir zaman aralığında ve aynı koşullarda yapılan işlemdeki doğruluğu göstermektedir.

2. *Ara kesinlik*: Farklı cihaz, gün ve kişi tarafından yapılan deney sonuçlarının kesinliği olarak tanımlanır.

3. *Yenilenebilirlik, Uyarlılık*: Laboratuvarlar arası yapılan deneylerin kesinliğini gösteren terimdir

HPLC analizinde, klorojenik asidin derişimleri 0.5, 10, ve 80 µg/mL olacak şekilde Bölüm 3.3.1.1’de belirtildiği şekilde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Kalite

kontrol çözeltilerinin gün-içi analizleri için altışar adet çözelti hazırlandı ve aynı gün HPLC kromatogramları alındı. Günler arası analizlerinde ise belirtilen çözeltilerin 3 gün ikişer adet çözeltileri hazırlandı ve her ayrı günde HPLC kromatogramları alındı. Elde edilen klorojenik asidin pik alanlarının ortalaması ve standart sapmaları hesaplandı. Yöntemin kesinliği % bağıl standart sapma (% BSS) ($\% BSS = [\text{standart sapma} / \text{ortalama} \times 100]$) ile belirlendi.

4. Hassaslık

Analizi yapılacak maddenin derişiminde meydana gelecek çok küçük değışiklikleri fark edebilme özelliğidir ve analitik yöntemin en düşük derişimlerdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür. Hassaslık iki basamak olarak düşünülmektedir⁷¹⁻⁷³.

1. *Teşhis Limiti, Tanıma (Gözlenebilme) Sınırı (Limit of Detection, LOD)*: Bir numunedeki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük derişimidir. Kalibrasyon eğrisi grafiğı kullanan yöntemde, teşhis sınırı, referans çözeltinin standart sapmasından (sb) daha yüksek bir güvenilirlik katsayısına (k) sahip sinyal veren en küçük derişimi şeklinde tanımlanmıştır.

$$LOD = k \sigma / m$$

Denklemleri ile ifade edilir. Burada m, kalibrasyon duyarlılığıdır. LOD için k katsayısı genellikle 3 olarak seçilir (güven seviyesi %98,3).

2. *Miktar Alt Tayini (Limit of Quantitation LOQ)*: Bir numunede incelenen bileşiğin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebilecek en düşük derişimidir. LOQ değerinin LOD değerinden tek farkı güvenilirlik katsayısının (k) 10 alınmasıdır (güven seviyesi %99)⁷¹⁻⁷³.

HPLC analizinde, LOD ve LOQ her iki yöntem için elde edilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak yukarıda belirtilen denklem ile LOD ve LOQ için k değeri

sırasıyla 3 ve 10 olarak alınarak hesaplandı.

5. Geri Kazanım

Geri kazanım, ölçüm değerin gerçek değere oranının yüzdesi olarak ifade edilir. Yöntemin geri zamanımı % geri kazanım (%GK) ($\%GK = [(CF-CU) / CA] \times 100$) ile belirtilir. Burada, CF: ölçüm sonucu (bilinen derişimlerde referans standarttan hazırlanmış çözelti), CU: blank derişim ve CA: referans standarttan hazırlanmış numunenin teorik derişimidir⁷¹⁻⁷³.

HPLC analizinde, klorojenik asidin derişimleri 0.5, 10, ve 80 µg/mL olacak şekilde Bölüm 3.2.1.1’de belirtildiği şekilde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler standart ekleme yöntemi kullanılarak bitki ekstraktına eklenerek HPLC kromatogramları alındı. Her iki yöntem için % GK yukarıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

3.3.1.5. HPLC Analizi İçin *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstrat Çözeltilisinin Hazırlanması

Klorojenik asit içeren bitki ekstresinin stok çözeltisini hazırlamak için 2.8 mg bitki ekstresi tartılıp 2.8 mL metanol eklenerek 1 mg/mL derişimde çözeltisi hazırlandı ve vorteks ile 5 dakika karıştırıldı. Elde edilen stok çözelti daha sonra asetonitril ile seyreltilerek 100, 500, 1000 µg/mL derişimlerinde bitki ekstraktı çözeltileri hazırlandı ve analiz edilene kadar +4°C’de saklandı. Bu çözeltilerin HPLC kromatogramaları alınarak pik alan değerleri hesaplandı. Elde edilen veriler ile *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstraktında bulunan klorojenik asit içeriği HPLC yönteminden elde edilen kalibrasyon eğrisi verileri kullanılarak belirlendi.

3.3.2. Hücre Kültürü Deneyleri

3.3.2.1. Human Dermal Fibroblast Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

H. plicatum subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin ve saf klorojenik asidin hücre canlılığı üzerindeki proliferatif ve yara iyileştirici etkilerinin gösterilmesi amaçlanan bu

tez çalışmasında hücre kültürü yöntemini kullanılarak in vitro koşullarda yapıldı. Çalışmamızda yara modeli human dermal fibroblast hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi. In vitro ortamlarda gerçekleştirilecek olan hücre kültürü çalışmasında kullanılan besi ortamı hücrelerin büyüebilmeleri, yaşayabilmeleri ve proliferasyonu için uygun olan gerekli maddeleri içermeleri gerekir. Bu nedenle bu çalışmada, %10 FBS, %1 L-glutamin, 100 IU/mL penisilin ile 10 mg/mL streptomisin içeren DMEM besi ortamı kullanıldı.

Human dermal fibroblast hücrelerinde öncelikle sırası ile hücrelerin çözülmesi, çoğaltılması, pasajlanması ve dondurulması gibi rutin hücre kültür basamakları gerçekleştirildi.

Human Dermal Fibroblast Hücrelerinin Çözdürülmesi

%10 DMSO ile dondurulmuş human dermal fibroblast hücreleri içeren kriyotüpler sıvı azottan çıkarılıp 37°C de %5 CO₂'lik etüve birkaç dakika çözünmesi için koyuldu. DMSO çözücüsünün hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi bulunduğundan zarar görme sürecisini en aza indirmek için çok hızlı bir şekilde besi ortamının ilave edildikten sonra 1500 g'de 6 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant uzaklaştırılıp ve çöken hücrelerin üzerine 5 mL DMEM besi yeri eklenip 25 cm²' lik flasklara alınarak 37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

Human Dermal Fibroblast Hücrelerinin Çoğaltılması ve Pasajlanması

37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilen human dermal fibroblast hücreleri iki güne bir besi ortamları değiştirilerek çoğaltıldı. Tüm flask yüzeyini kaplayan hücre canlılığının koruması ve devamlılığının sağlanması için pasaj yapıldı. Pasajlamak için flask içinde bulunan besi ortamı alınarak flasklar PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından flask içine tripsin ilave edilip, 5 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. Tüm hücreler kalktıktan sonra, üzerine besi ortamı ilave edilip santrifüj tüpüne alınıp 1500

g'de 6 dakika süreyle santrifuj edildi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılıp çöken hücreler homojen dağılımı sağlanarak 75 cm²' lik flasklara ekim yapıldı. Hücrelerin yüzeye yapışıp üremeye devam edebilmeleri için flasklar etüvde (37°C, %95 nem ve %5 CO₂) inkübe edildi ve çoğalmaları sağlandı.

Human Dermal Fibroblast Hücrelerinin Dondurulması

37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüvde inkube edilmeye bırakılan human dermal fibroblast hücrelerine tripsinizasyon işlemi uygulanarak flask yüzeyinden kaldırıldı. Daha sonra üzerine besi ortamı eklenerek 1500 g' de 6 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant uzaklaştırılıp çöken hücreler dondurma ortamı (9:1 oranında (%10' luk), FBS: DMSO karışımı) içinde süspande edildi ve 1,5 mL' lik kriyotüplere içine konuldu. Hücrelerin bulunduğu tüpler tüpler dondurma kabının (1 derece 1 derece yavaş donmasını sağlamak için) içine konularak -80 °C'de 1 gece bekletildi daha sonra da sıvı azot tankına kaldırılan hücrelerin dondurulma işlemi tamamlandı.

Rutin hücre kültür basamakları gerçekleştirildikten sonra aşağıdaki deney prosedürü aşamaları gerçekleştirildi;

- *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresinin ve Saf Klorojenik asit uygulanması ve hücre canlılığı üzerindeki proliferatif etkilerinin XTT testi ile gösterilmesi
- *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresinin ve Saf Klorojenik asidin yara iyileştirme üzerine etkilerinin Scratch Assay testi ile gösterilmesi
- Oksidatif stres üzerine etkilerinin Total antioksidan/oksidan Seviyeleri (TAS-TOS) ile gösterilmesi
- Verilerin istatistiksel analizlerin yapılması

3.3.2.2. Human Dermal Fibroblast Hücrelerinde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresinin ve Saf Klorojenik asidin Hücre Canlılığı Üzerindeki Proliferatif ve Yara İyileştirici Özelliklerinin İncelenmesi

H. plicatum subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin ve klorojenik asidin hücre canlılığı üzerindeki proliferatif, antioksidan ve yara iyileştirici özellikleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

1. Human Dermal Fibroblast Hücrelerinde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresinin ve Saf Klorojenik Asidin Hücre Canlılığı Üzerindeki Proliferatif Etkilerinin XTT Analizi ile Gösterilmesi

Hücre hattı olarak insan dermal fibroblast hücreleri (PCS-201-012-ATCC) kullanıldı. Hücreler, 2 mM L-glutamin, 10% FBS, penicillin (20 Units/mL) ve streptomycin (20 µg/mL) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) çözeltisi içinde 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Flask yüzeyini tamamen kaplayan hücreler tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldıktan sonra falkona alınarak 5 dakika 1500 g'de santrifuj edildi. Elde edilen süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak çöken hücreler üzerine 1 mL besi ortamı eklenerek hücrelerin homojen bir şekilde medyum içerisinde dağılması sağlandı. Homojen şekilde dağılan hücrelerden 10 µL alındıktan sonra üzerine 90 µL tripan maviside eklenerek 10 kat dilüe edildi. Thoma lamında canlı hücrelerin sayımı yapmak amacıyla bu homojen karışımdan 10 µL alındı ve lama konularak sayım yapıldı. Tripan maviside hücrelerin sayılmasını kolaylaştırmak amacıyla kullanılmaktadır ve sadece ölü olan hücrelerin membranlarından geçebilir. Ölen hücreler mavi (boya almış) olarak görülürken canlı hücreler renksizdirler(boyasız). Hücre sayımı thoma lamına konularak gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonu, mikro pipetler yardımıyla sayma odacığına aktarıldı. Karelerin üçlü çizgilerle çevrelenmiş olduğu merkezi bölmelerde mevcut olan hücreler sayılırken köşe

izgilerinde olan hücreler sayıma dahil edilmez. Thoma lamındaki sayım hacmi toplamı
= 0.00025 mm³ x 400 = 0.1 mm³'dr. ⁷⁴

Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa (N):

1 mL yani 1mm³' teki hücre sayısı = N x DF x10⁴ olarak hesaplanır.

DF= Dilüsyon Faktörü

N=0.1mm³' te mevcut hücre sayısı

Deney standardizasyonunu sağlamak amacıyla tüm deney basamaklarında hücre sayımları yapıldı. 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 10⁴ hücre içerecek şekilde ekimleri yapıldı ve 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda hücrelere %0.5 DMSO içeren hücre kültürü ortamında nen eşitli derişimlerinde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi (her bir kuyucukta final derişimi 0.1-1000 g/mL derişimlerinde olacak şekilde) ve klorojenik asit (her bir kuyucukta final derişimi 10-1000 M derişimlerinde olacak şekilde) uygulandı ve 24 h ve 48 h (37°C ve 5% CO₂) inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, Hücre canlılığı üzerine proliferasyon-indükleyici etkisi XTT analiz yöntemi kullanılarak belirlendi. Yaygın olarak kullanılan bu enzimatik test yöntemi, canlı hücrelerin aktif olarak absorbe edilen XTT'nin tetrazolium halkasının mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilmesine, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısının göstergesi olarak kabul edilen mavi-mor renkli insoluble formazana indirgenmesine dayanmaktadır. Proliferatif etkisi XTT kiti üretici firmanın kullanım talimatına göre uygulandı. XTT solusyonu eklenmesini takiben 4 inkübasyona bırakıldıktan sonra nen formazan kristallerinin absorbansı ELISA yöntemi ile 450 ve 630 nm dalga boyunda değerlendirildi. Hücre canlılığı (%), arka plan düzeltmeli absorbans kullanılarak aşağıdaki gibi hesaplandı:

Canlılık (%) = Deney kuyusunun A / kontrol kuyucuğunun A x100

2. Human Dermal Fibroblast Hücrelerinde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresinin ve Saf Klorojenik asidin Yara İyileştirici Özelliklerinin Scratch (Deneyi) ile İncelenmesi

Yara iyileşmesinde in-vitro bir model olarak Scratch Assay kullanıldı. Bu amaçla yara modeli insan dermal fibroblast hücreleri kullanılarak oluşturuldu. İnsan dermal fibroblast hücreleri %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM çözeltisi içinde 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Flask yüzeyini tamamen kaplayan hücreler tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldıktan sonra falkona alınarak 5 dakika 1500 g'de santrifuj edildi. Elde edilen süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak çöken hücreler üzerine 1 mL besi ortamı eklenerek hücrelerin homojen bir şekilde medyum içerisinde dağılması sağlandı. Deney standardizasyonunu sağlamak amacıyla Tripan mavisi kullanılarak toma lamı kullanılarak hücre sayımları yapıldı. 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 3×10^5 hücre içerecek şekilde ekim yapıldı ve %100 confluens olana kadar inkübe edildi. %100 confluens sağlandıktan sonra, bir plastik pipet ucu (0.1-10 µL) kullanılarak yaklaşık aynı büyüklükte tek yönde stratch oluşturuldu ve sonra yüzen hücreler ile ortam değiştirildi. Daha sonra, hücrelere çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi (her bir kuyucukta final derişimi 0.1-1000 µg/mL derişimlerde olacak şekilde) ve klorojenik asit (her bir kuyucukta final derişimi 10-1000 µM derişimlerinde olacak şekilde) uygulandı ve belirli zamanlarda (0, 12, 18 ve 24. saatlerde) invert florasan mikroskopla (Leica, ebq 100-04 (Germany) mikroskobik görüntüsü alındı. Bir grubun tamamen kapanması ile deney sonlandırıldı.

3. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresi ve Saf Klorojenik Asit Uygulanan Human Dermal Fibroblast Hücrelerinde TAS-TOS Düzeylerine Bakılması

Farklı özelliklerde ki oksidan türlerin serum (plazma) derişimlerinin laboratuarlarda ayrı ayrı ölçülmesi pahalı, zaman alıcı ve yoğun iş gücü gerektirir. Bu nedenle, TAS-TOS düzeylerinin ölçülmesi kolay uygulanabilir, güvenilir ve duyarlı olması, kısa sürmesi, yüksek doğrusallık göstermesi, serum ve plazma örnekleriyle, beyin omurilik sıvısı, plevra sıvısı, amnion sıvısı, semen plazması, idrar ve tükürük gibi vücut sıvılarında, doku örneklerinde çalışılabilmesi gibi çok sayıda avantaja sahip olması nedeniyle tercih edilir.

TAS Düzeylerinin Belirlenmesi

İnsan dermal fibroblast hücreleri %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM çözeltisi içinde 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Deney standardizasyonunu sağlamak amacıyla tüm deney basamaklarında hücre sayımları yapıldı. 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 10⁴ hücre içerecek şekilde ekimleri yapıldı ve 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda hücelere %0.5 DMSO içeren hücre kültürü ortamında çözünen çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi (her bir kuyucukta final derişimi 0.1-1000 µg/mL derişiminde olacak şekilde) ve klorojenik asit (her bir kuyucukta final derişimi 10-1000 µM derişimlerinde olacak şekilde) uygulandı ve 24 h ve 48 h (37°C ve 5% CO₂) inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, tüm grupların üst fazının toplam antioksidan durumu, Erel ⁷⁵ tarafından geliştirilen TAS için yeni bir otomatik kolorimetrik ölçüm yöntemi kullanılarak ölçüldü. Ölçümün prensibi, örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi-yeşil 2,2'-azino-bis (3-etilbenz-thiazoline-6-sülfonik asid) (ABTS) radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Örneğin

absorbansındaki değişiklik onun antioksidan düzeyi ile orantılıdır. Süpernatanın TAS düzeyi -80⁰ de bekletilen süpernatın örnekleri kullanarak solid faz sandwich enzim immunoassay (ELISA) prensibine dayanan TAS (REELASSAY) hazır ölçüm kiti kullanılarak yapıldı. Standart solüsyonları hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara reagent 1'den koyulup üzerine standartlar ve numuneler eklenip ELİSA Reader ile 660 dalga boyunda okundu ve elde edilen değerler 1. Absorbans olarak değerlendirildi. Daha sonra her kuyucuğa reagent 2'den koyularak 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben ELİSA Reader ile 660 dalga boyunda okundu ve elde edilen değerler 2. Absorbans olarak değerlendirildi. TAS düzeyi aşığıdaki formül ile hesaplandı ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Elde edilen absorbans değerleri mmol Trolox Equiv. / L cinsinden tespit edildi.

$$\text{TAS DEğERİ} = \frac{[(\Delta \text{ABS H}_2\text{O}) - (\Delta \text{ABS ÖRNEK})]}{[(\Delta \text{ABS H}_2\text{O}) - (\Delta \text{ABS STD})]} \times 20$$

Δ absorbans örnek = Örneğin 2. Absorbans değeri – örneğin 1. Absorbans değeri

Δ absorbans H₂O = H₂O'un 2. Absorbans değeri – H₂O'un 1. Absorbans değeri

Δ absorbans standart = Std'ın 2. Absorbans değeri – Std'ın 1. Absorbans değeri

TOS Düzeylerinin Belirlenmesi

İnsan dermal fibroblast hücreleri %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM çözeltisi içinde 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Deney standardizasyonunu sağlamak amacıyla tüm deney basamaklarında hücre sayımları yapıldı. 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 10⁴ hücre içerecek şekilde ekimleri yapıldı ve 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda hücrelere %0.5 DMSO içeren hücre kültürü ortamında çözünen çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi (her bir kuyucukta final derişimleri 0.1-1000 µg/mL derişimlerinde olacak şekilde) ve klorojenik asit (her bir

kuyucukta final derişimi 10-1000 µM derişimlerinde olacak şekilde) uygulandı ve 24 h ve 48 h (37°C ve 5% CO₂) inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, tüm grupların üst fazının toplam oksidan durumu, Erel ⁷⁶ tarafından geliştirilen TOS için yeni bir otomatik kolorimetrik ölçüm yöntemi kullanılarak ölçüldü. Ölçümün prensibi örneğin içindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyonla dönüşümünün sağlanması ve bunun da asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girerek absorbans artışına sebep olmasıdır. Spektrofotometrik olarak izlenen absorbans artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır. Süpernatanın TOS düzeyi -80°C’de bekletilen süpernatant örnekleri kullanarak solid faz sandwich enzim immunoassay (ELISA) prensibine dayanan TOS (REELASSAY) hazır ölçüm kiti kullanılarak yapıldı. Standart solüsyonları hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara reagent 1’den koyulup üzerine standartlar ve numuneler eklenip ELİSA Reader ile 530 dalga boyunda okundu ve elde edilen değerler 1. Absorbans olarak değerlendirildi. Daha sonra her kuyucuğa reagent 2’den koyularak 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben ELİSA Reader ile 530 dalga boyunda okundu ve elde edilen değerler 2. Absorbans olarak değerlendirildi. TOS düzeyi aşağıdaki formül ile hesaplandı ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Elde edilen absorbans değerleri µmol H₂O₂ Equiv. /L cinsinden tespit edildi.

$$\text{TOS Değeri} = \frac{\Delta \text{absorbans örnek}}{\Delta \text{absorbans standart}} \times 20$$

Δ absorbans örnek = Örneğin 2. Absorbans değeri – örneğin 1. Absorbans değeri

Δ absorbans standart = Standart 2. Absorbans değeri – standart 1. Absorbans değeri

3.3.2.3. Analiz Sonuçlarının İstatistiksel olarak Değerlendirilmesi

Analiz sonuçları ortalama $\pm$ standart hata olarak değerlendirilecektir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak SPSS 20 yazılım programı kullanılarak one-way anova posthoc

Tukey testi ile gruplar arası farklılıklar değerlendirildi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresindeki Klorojenik Asidin

HPLC Yöntemi ile Analizi

4.1.1. HPLC Geliştirme ve Yönteminin Optimum Şartlarının Belirlenmesi

HPLC yöntemin geliştirilmesindeki önemli hususlar, düzenli pik şeklinin eldesi ve örnek içerisinde bileşiklerin yeterli ayrımının sağlanmasıdır.

Klorojenik asidin HPLC sisteminde en düzenli ve şiddetli pik verebileceği çözücü ve ortamı belirlemek için suda, asetronitril ve metanolde 100 µg/mL derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra klorojenik asidin belirtilen çözücüler ile seyreltmeleri yapılarak 10 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlandı ve 330 nm dalga boyunda HPLC kromatogramları alındı. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi klorojenik asidin rezölüsyonunun sağlandığı en yüksek pik elde edildiği çözücü asetronitril olarak belirlendi. Bundan sonraki bütün çalışmalarımızda çözücü olarak asetronitril kullanıldı.

Tablo 4.1. Klorojenik asidin (10 µg/mL) HPLC kromatogramında çözücünün etkisi

Çözücü	Alıkonma Zamanı	Pik Alanı	Pik Şekli
Su	3.3	68	İç içe geçmiş 4 pik
Metanol	3.3	201	Sağdan omuzlu tek pik
Asetonitril	2.7	324	Simetrik tek pik

Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda HPLC yöntemiyle klorojenik asidin belirlenmesine yönelik ters faz kolonların kullanıldığından dolayı bu çalışmada C₁₈ (250x4.6 mm, 5µm) kolon tercih edildi^{31, 32, 40, 42, 50, 56-60}.

Hareketli fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonma zamanlarında ve pik rezölüsyonunda önemli rol oynar. Hareketli faz olarak kullanılan çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve ters faz sıvı kromatografide çözünenin alıkonmasını etkileyen temel faktördür. Bu çalışmada hareketli faz olarak literatürde önerilen⁵⁶ metanol-su ve asetronitril çözücülerinin farklı

karışımları denendi. Tablo 4.2’de görüldüğü gibi klorojenik asidin rezölüsyonunun sağlandığı en yüksek pik elde edildiği hareketli faz karışımı asetonitril-su olarak belirlendi.

Tablo 4.2. Klorojenik asidin (10 µg/mL) HPLC kromatogramında hareketli faz bileşenlerinin etkisi

Çözücü	Alıkonma Zamanı	Pik Alanı	Pik Şekli
Asetonitril-Su	2.7	324	Simetrik tek pik
Metanol-Su	3.3	198	Sağdan omuzlu 2 pik
Asetonitril-Metanol	3.0	229	Sağdan omuzlu tek pik

Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda HPLC yöntemiyle klorojenik asidin belirlenmesinde hareketli faz bileşiminin asidik olması gerektiği belirtilmiştir⁵⁶. Bu bilgiler ışığında hareketli fazın asidik olması amacıyla hareketli faz bileşenlerinden su içerisine ortofosforik asit eklendi.

HPLC yönteminde seçilen hareketli faz çözücü bileşenlerinden yüzde asetonitril derişimi (% asetonitril) ile su içerisinde bulunan ortofosforik asidin yüzde derişiminin (% OFA) belirlenmesi amacı ile merkezi kompozit tasarım (kemometrik deneysel tasarım) yöntemi uygulandı.

4.1.1.1. Klorojenik Asidin HPLC Yöntemiyle Belirlenmesinde Merkezi Kompozit Tasarım Yöntemi ile Hareketli Fazın optimisasyonu

HPLC yönteminde deney koşulları belirlendikten (Bölüm 3.3.1.3) hareketli fazın optimisasyonu için sonra suyun yüzde derişimi ile su içerisinde bulunan ortofosforik asidin yüzde derişiminin belirlenmesi için merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulandı. Bu amaç ile klorojenik asidin metanol ile çözölüp asetonitril ile seyreltilerek elde edilen 10 µg/mL çözeltisi kullanıldı ve 13 farklı deney yapıldı (Tablo 3.2) ve 330 nm dalga boyunda klorojenik asidin pik alan değerleri belirlendi. (Tablo 4.3). Belirlenen pik alan değerleri ile matematiksel model oluşturuldu. Bu matematiksel quadropik modelin yüzey

cevapları için elde edilen sonuçlar ANOVA testine tabi tutuldu (Tablo 4.4). Bu hesaplamalara göre % Asetonitril derişimi ile su içerisinde bulunan % OFA açısından modelin anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Tablo 4.3. Merkezi kompozit Tasarım kapsamında yapılan deneyler sonucunda klorojenik asidin pik alan değerleri

Deney	Klorojenik asidin Pik Alan Değerleri
1	154.5
2	325.5
3	300.0
4	285.4
5	320.5
6	215.8
7	295.8
8	311.3
9	213.5
10	300.4
11	299.4
12	298.7
13	255.7

Tablo 4.4. Matematiksel quadropik modelin ANOVA analiz sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Df	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri olasılık>F
Model	26936.19	5	4387.24	9.09	0.0057 (Significant)
% Asetonitril	4159.27	1	4159.27	7.02	0.0330
%Ortofosforik Asit (OFA)	15027.65	1	15027.65	25.35	0.0015
%Asetonitril-% OFA	294.12	1	294.12	0.4962	0.5039
%Asetonitril ²	970.47	1	970.47	1.64	0.2415
-% OFA ²	7039.69	1	7039.69	11.88	0.0107
Artan	4149.47	7	592.78		
Uyum Eksikliği	4038.78	3	1346.26	48.65	0.0013 (Significant)
Saf Hata	110.69	4	27.67	--	--
Toplam	31085.66	12	--	--	--

Elde edilen matematiksel modelden yararlanılarak Tablo 4.5’de verilen denklemler elde edildi. Bu denklemler Design Expert 12 programında çözüldü.

Tablo 4.5. Oluşturulan y denklemleri ve Design Expert 8 programından yararlanılarak çözülen denklemler

$Y = 301.96 - 22.80F_1 - 43.34F_2 + 8.58 F_1 F_2 - 11.81 F_1^2 - 31.81F_2^2$
$dY/d F_1 = -22.80 + 8.58 F_2 - 2(-11.81) F_1$
$dY/d F_2 = -43.34 + 8.58 F_1 - 2(31.81) F_2$

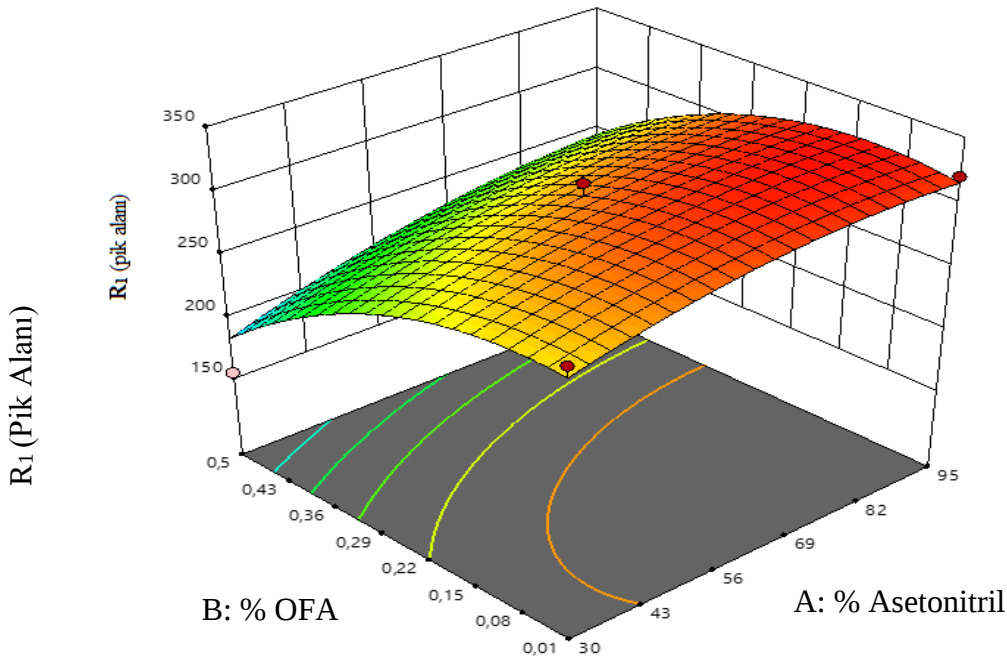
Y: Klorojenik Asidin pik Alanı F₁: % Asetonitril ve F₂: % OFA

Deneysel veriler kullanılarak oluşturulan Tablo 4.5’deki denklemlerin çözümü ile Tablo 4.6’de verilen F₁ (% asetonitril derişimi) ve F₂ (su içerisinde bulunan % OFA derişimi) optimum değerleri bulundu. Şekil 4.1’de gösterilen F₁ ve F₂’nin fonksiyonu olarak klorojenik asit için seçilen hareketli faz bileşiminin yüzey cevap eğrileri elde edildi.

Tablo 4.6. Klorojenik asidin merkezi kompozit tasarım yöntemi ile analizi sonucu bulunan optimum değerler

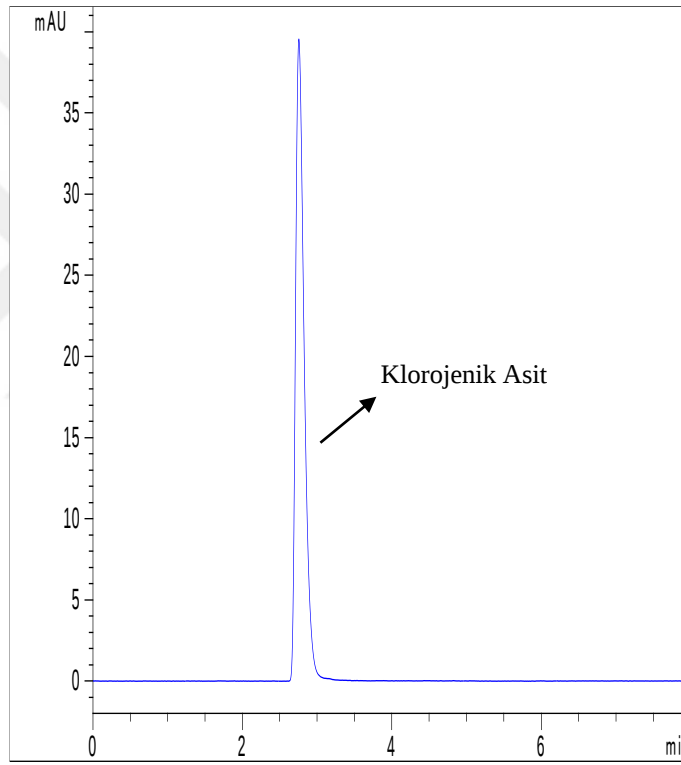
Değişkenler	Bulunan Optimum Değerler	Elde Edilen Pik Alanı
F ₁	95	
F ₂	0.2	319.52

F₁: %Asetonitril ve F₂: %OFA



Şekil 4.1. F₁ (% asetonitril derişimi) ve F₂’nin (su içerisinde bulunan % OFA derişimi) bir fonksiyonu olarak pik alanları yüzey cevap eğrileri

Bu parametrelere bakıldığında F-testine göre en iyi sonuçların quadropik yaklaşımla tespit edildiği gözlemlendi. Deney sonuçlarına göre χ^2 değerinin anlamlı çıkması bu tezi doğrulamaktadır. Her bir parametrenin ANOVA test sonucuna göre, F₁ (% asetonitril derişimi) ve F₂ (su içerisinde bulunan % OFA derişimi) açısından modelin anlamlı olduğu F-testi ile belirlendi. F₁ ve F₂ ile yapılan modellemede 319.52 pik alan değeri matematiksel olarak hesaplandı. HPLC yönteminde hareketli faz için belirlenen optimum değerler kullanılarak klorojenik asidin derişimi 10 µg/mL olacak şekilde kromatogramı alındı (Şekil 4.2) ve elde edilen absorbands değerleri Tablo 4.7’de verildi.



Şekil 4.2. 10 µg/mL derişimde klorojenik asidin HPLC kromatogramı

Tablo 4.7. HPLC kromatogramında teorik ve deneysel olarak bulunan pik alan değerleri

Deney Sayısı	Teorik Pik Alan Değeri	Deneysel Pik Alan Değeri
1		318.45
2		317.39
3		325.37
4		323.58
5		317.91
6	319.25	318.62
7		321.03
8		319.52
9		320.44
10		321.37
	Ortalama	320.37
	%GK±SS	100.26±0.8023
	%BSS	0.80

% GK: % Geri Kazanım, SS: Standart Sapma, % BSS: %Bağıl Standart Sapma³

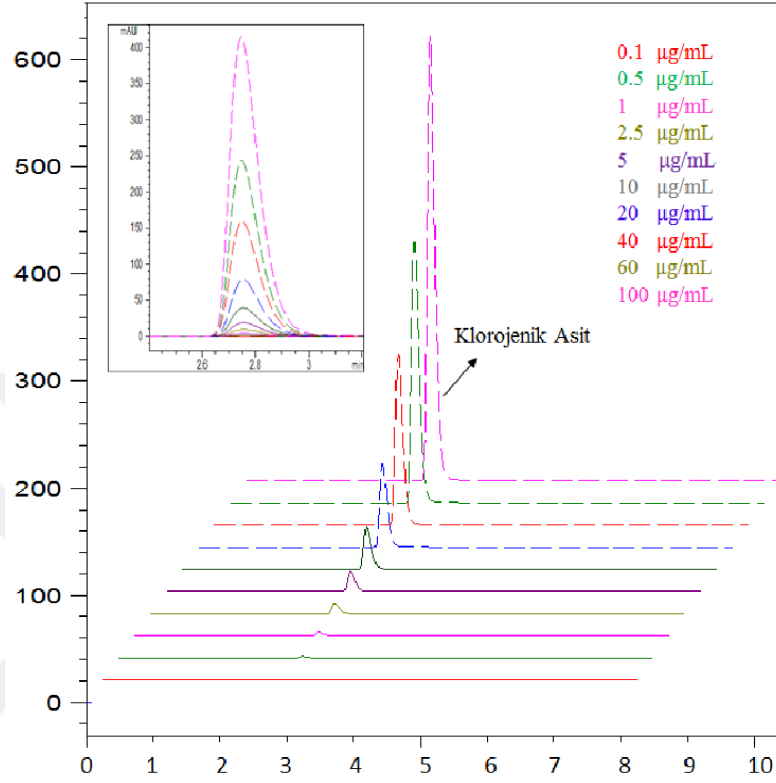
Modelleme ile hesaplanan değer ile deneysel çalışma sonuç değerleri arasında %100,26 geri kazanım değeri vardır. Bu da birbirlerine yakın değerler olduğunu gösterir. Lack of fit değeri ile yöntemin var olan sonuçlarla arasında lineerlik olup olmadığı belirlendi. H_0 hipotezine göre lineer bir ilişki vardı ve bu ilişki bulunan 0.0057 değeriyle reddedildi. Yöntem kümülatif olarak F-testine tabi tutuldu. Test sonucunda belirlenen 9.09 değeri yöntemin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu kanıtladı. Bu bağlamda elde edilen sonuçlara göre modelin ve optimizasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Ayrıca modelin gerçek örneklerle uygulanabilir olduğu deneysel veriler karşılaştırılarak belirlendi.

4.1.2. HPLC Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

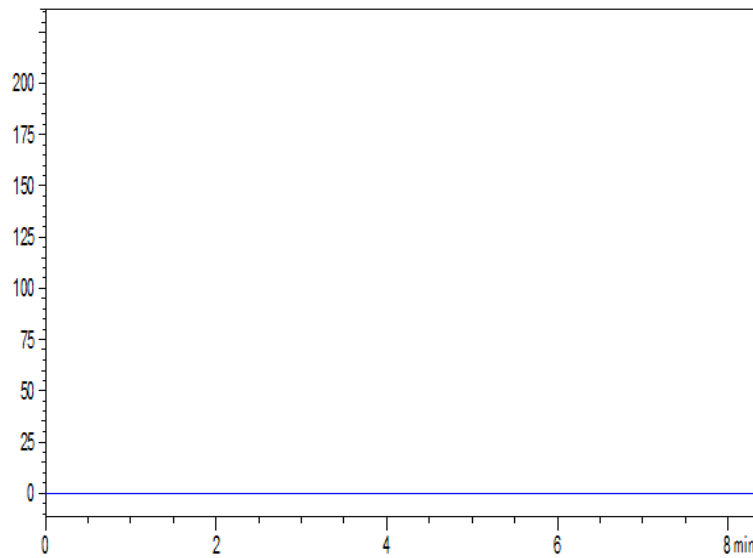
1. Belirleyicilik (Seçicilik)

Standart çözeltiler ile elde edilen kromatogramların incelenmesinde klorojenik asidin alıkonma zamanı 2.7 dakika olarak belirlendi. Klorojenik asidin derişimine (0.5-100 µg/mL) bağlı artan pik alanına dair kromatogramları Şekil 4.3.'de verildi. Klorojenik

asidin HPLC analizinde klorojenik asidin hazırlandığı çözücü karışımının (Şekil 4.4) klorojenik asidin alıkonma zamanı üzerinde herhangi olumsuz bir etkisinin varlığına rastlanmadı.



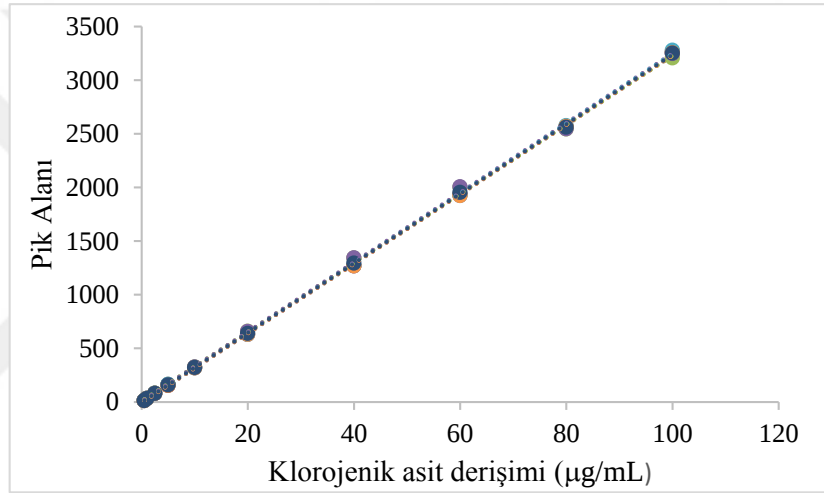
Şekil 4.3. Klorojenik asidin artan derişimine bağı HPLC kromatogramı (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 ve 100 µg/mL)



Şekil 4.4. Geliştirilen ve optimize edilen HPLC yönteminde klorojenik asit için kullanılan çözücü kromatogramı

2. Lineerlik (Kalibrasyon Eğrisi) ve Çalışma Aralığı

Metanol içerisinde hazırlanan klorojenik asidin stok çözeltisi, asetonitril ile seyreltilerek 11 farklı derişimde (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 ve 100 µg/mL) standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Geliştirilen ve optimize edilen HPLC yöntemi ile 330 nm dalga boyunda kromatogramları ve pik alan değerleri kaydedildi. Klorojenik asidin derişimine karşı pik alan değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.5). Bu kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.8’de verildi.



Şekil 4.4. HPLC yöntemi ile klorojenik asidin çalışma çözeltilerinden (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 ve 100 µg/mL) kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.8. HPLC yöntemi ile klorojenik asit için elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	HPLC Yöntemi
Dalga boyu (λ : nm)	330
Çalışma aralığı (µg/mL)	0.1-100
Regresyon doğrusu denklemi	$Y=32.421x - 8.530$
S_a	0.325
S_b	0.068
Korelasyon katsayısı (R^2)	0.9999

Y: Pik alanı X: klorojenik asit derişimi, S_a : Kalibrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması, S_b : Kalibrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması

3. Doğruluk ve Kesinlik

Klorojenik asidin stok çözeltisinden asetonitril ile yapılan seyreltmelerle yüksek, orta ve düşük derişimleri temsil eden 0.5, 10, ve 80 µg/mL derişimlerde klorojenik asit kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) HPLC kromatogramları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi, değişim katsayıları hesaplandı, elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.9’da verildi.

Tablo 4.9. HPLC yöntemi ile klorojenik asit için elde edilen günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
	Bulunan±SS (µg/mL)	BH	%BSS	Bulunan±SS (µg/mL)	BH	%BSS
0.5	0.479± 0.016	-4.052	3.320	0.501± 0.009	0.191	1.806
10	9.970± 0.283	1.129	2.835	10.018±0.023	1.605	0.232
80	79.887± 1.191	-0.165	1.491	80.047±0.741	0.068	0.925

SS: Standart Sapma. BH: Bağıl Hata. % BSS: % Bağıl Standart Sapma

4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Klorojenik asit için LOD ve LOQ değerleri HPLC yönteminden elde edilen verilere göre çizilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak Bölüm 3.3.1.4.’de belirtilen eşitliklere göre hesaplandı. Klorojenik asidin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.03 µg/mL ve 0.1 µg/mL olarak tespit edildi.

5. Geri Kazanım

H. plicatum subsp. *pseudoplicatum* bitkinin metanol ekstraktında klorojenik asidin geri kazanımı standart ekleme yöntemi kullanılarak yapıldı. Bitki ekstraktından daha önce Bölüm 3.3.1.5.’de belirtilen prosedüre göre 10 µg/mL derişimlerinde çözeltileri hazırlanarak HPLC kromatogramı alındı. Daha sonra bu hazırlanan çözeltiler üzerine klorojenik asidine 0.5, 10 ve 80 µg/mL derişimlerdeki standart çözeltileri ilave

edilerek tekrar HPLC kromatogramları alındı. Elde edilen pik alanları aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik alan değeriyle karşılaştırılarak elde edilen değeri yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.10’da verildi.

Tablo 4.10. HPLC yöntemi kullanılarak farmasötik preparatlara katım yapılan klorojenik asit çözeltilerinin geri kazanım değeri

Bitki Ekstraktı	Eklenen (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	%GK	% BSS
10 µg/mL	0.5	0.499± 0.012	99.85	2.46
	10	10.104±0.192	101.04	1.89
	80	80.449±0.502	100.56	0.62

SS: Standart Sapma. %GK: % Geri Kazanım. % BSS: % Bağıl Standart Sapma

6. Kararlılık (Stabilite)

Klorojenik asidin stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı kaldığı süreyi belirlemek için klorojenik asidin üç farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığında, +4 ve -20°C’de 6, 24 ve 48 saat bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin HPLC kromatogramları alındı ve pik alanları hesaplandı. Bulunan pik alan değeri çözeltilerin hemen ölçülen pik alan değeri ile karşılaştırılarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.11’da verildi.

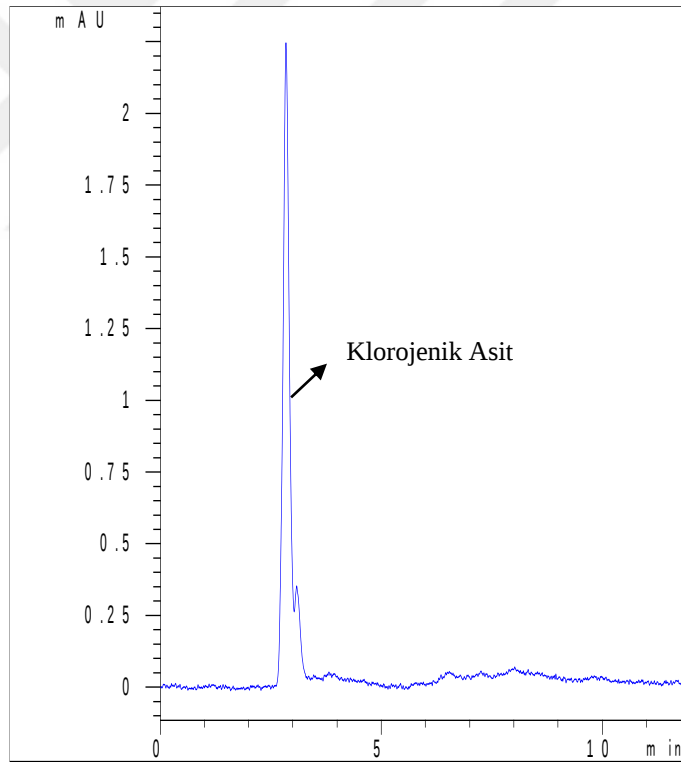
Tablo 4.11. Klorojenik asisin HPLC yöntemi ile belirlenen kararlılık (stabilite) değeri

Kararlılık (Stabilite)	Eklenen (µg/mL)	6 Saat (%GK±SS)	24 Saat (%GK±SS)	48Saat (%GK±SS)
Oda Sıcaklığı	0.5	100.71 ±1.07	99.85 ± 1.58	97.87±2.48
	10	99.63 ± 1.42	100.96 ± 1.83	97.94 ±2.60
	80	99.92 ± 0.37	100.09 ± 0.97	98.78 ±1.15
+4 °C	0.5	-	101.28 ± 0.46	101.01 ±1.92
	10	-	99.66 ± 1.29	98.71±1.85
	80	-	99.09 ± 2.01	98.60±1.58
-20 °C	0.5	-	98.62 ± 2.54	98.74±1.10
	10	-	98.81 ± 1.78	98.47±1.21
	80	-	99.09 ± 1.81	100.47±1.08

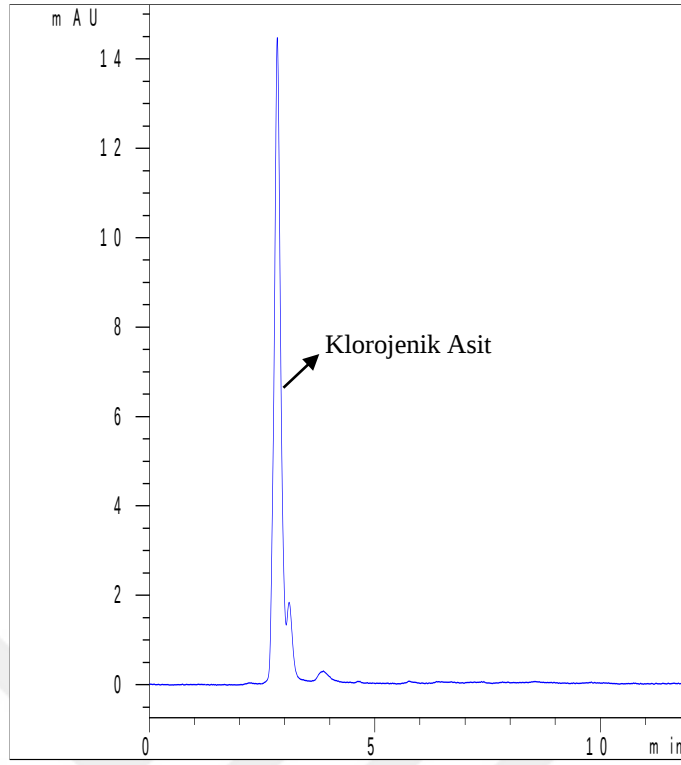
%GK: %Geri Kazanım. SS: Standart Sapma

4.1.3. HPLC Yöntemi ile *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitkisinin Metanol Ekstrat Çözeltisinde Klorojenik Asidin Belirlenmesi

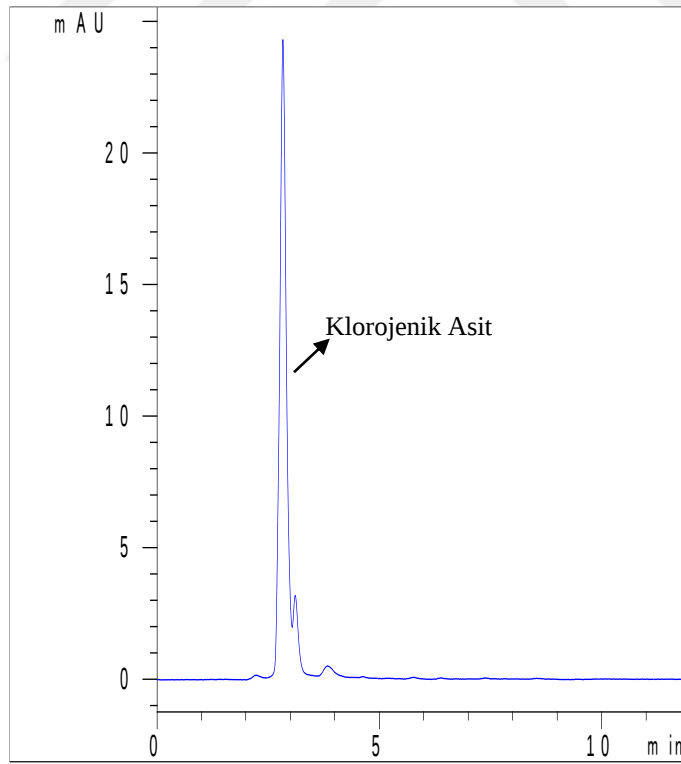
Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan HPLC yönteminin uygulanabilirliği *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin metanol ekstraktında klorojenik asidi tayini Şekil 4.3’de verilen kalibrasyon grafiği kullanılarak yapıldı. Klorojenik asit içerdiği düşünülen *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin metanol ekstradı Bölüm 3.3.1.5’de verildiği gibi metanolde 1mg/mL’lik çözeltileri hazırlandı ve vorteks ile 5 dakika karıştırıldı. Daha sonra stok bitki çözeltisi asetonitril ile seyreltilerek 100, 500, 1000 µg/mL derişimlerinde bitki ekstraktı çözeltileri hazırlandı ve elde edilen çözeltilerin HPLC kromatogramları alındı.



Şekil 4.5. 100 µg/mL derişimde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin metanol ekstraktının HPLC kromatogramı



Şekil 4.6. 500 µg/mL derişimde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin metanol ekstraktının HPLC kromatogramı



Şekil 4.7. 1000 µg/mL derişimde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin metanol ekstraktının HPLC kromatogramı

Hesaplanan pik alan değerleri ile klorojenik asidin derişimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.12’de verildi.

Tablo 4.12. HPLC yöntemi ile *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin metanol ekstraktında klorojenik asidin miktar tayini

Bitki Ekstraktı Derişimi	N	Bulunan Klorojenik asit miktarı Ortalama±SS (μg/mg ekstrakt)	% BSS
100 μg/mL	10	9.61±1.571	1.64
500 μg/mL	10	10.05±1.01	2.99
1000 μg/mL	10	9.65±0.617	0.639
Ortalama Değer	30	9.770± 1.818	1.884

N: Analiz sayısı, SS: Standart Sapma. %GK: %Geri Kazanım. % BSS: Bağıl Standart Sapma

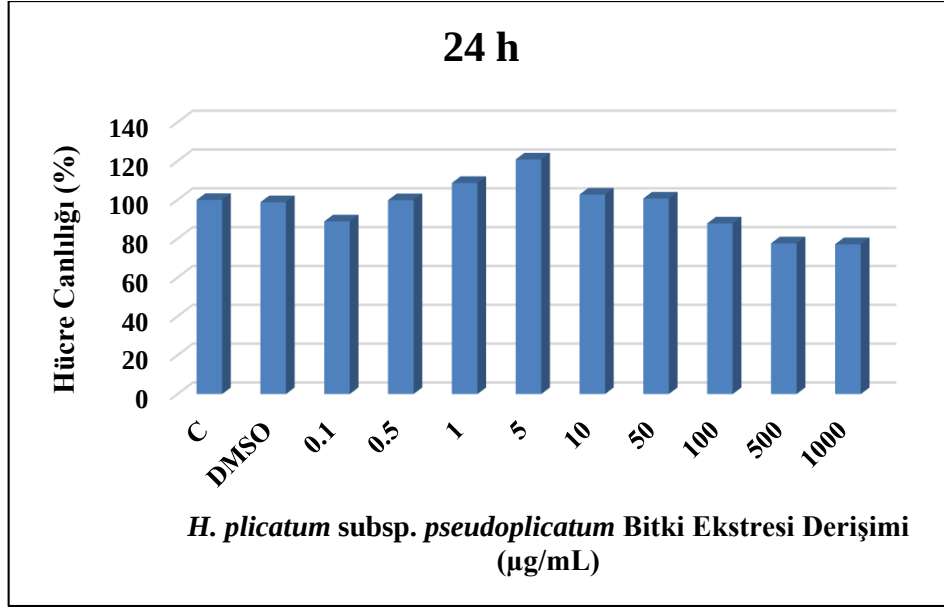
4.2. Hücre Kültürü Deneyleri

H. plicatum subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi elde edildi. Elde edilen *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi ve klorojenik asit’in proliferatif, oksidatif stres ve yara iyileşmesi üzerine etkileri insan dermal hücre dizininde çalışıldı.

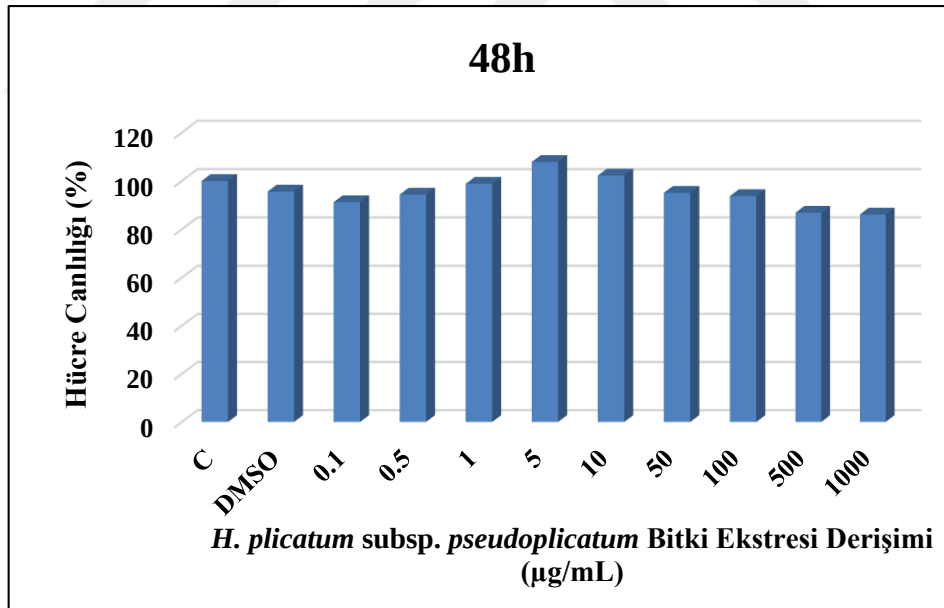
4.2.1. Proliferatif Etkinin Belirlenmesi

4.2.1.1. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresi Proliferatif Etkisinin Belirlenmesi

İnsan dermal fibroblast hücre dizininde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 24-48 saatlik inkübasyonu takiben proliferatif etkisi XTT testi ile değerlendirildi. İnsan dermal fibroblast hücre dizininde çeşitli derişimlerde kullanılan *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin (her bir kuyucukta final derişimi 0.1-1000 μg/mL derişimlerinde olacak şekilde) 24 ve 48. saatteki XTT sonuçları sırasıyla şekil 4.8 ve şekil 4.9’da gösterildi. Çalışmamızda, 0.5 ve 10 μM doz aralığında *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi dozlarının, insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde önemli proliferatif etkiye sahip olduğu tesbit edildi.



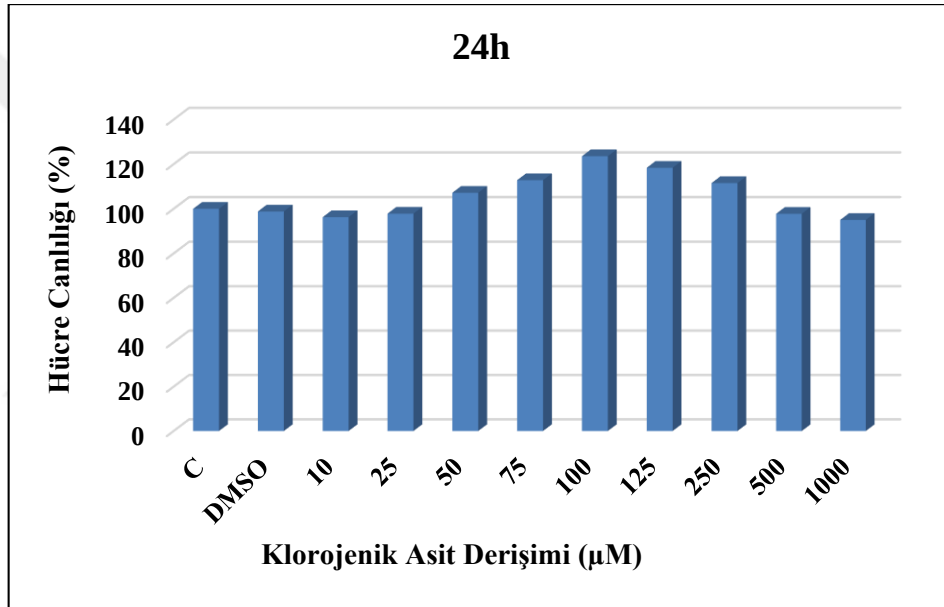
Şekil 4.8. Çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerdendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen proliferatif etkisi. (K: Kontrol, 0.1-1000 µg/mL: *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresine maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri)



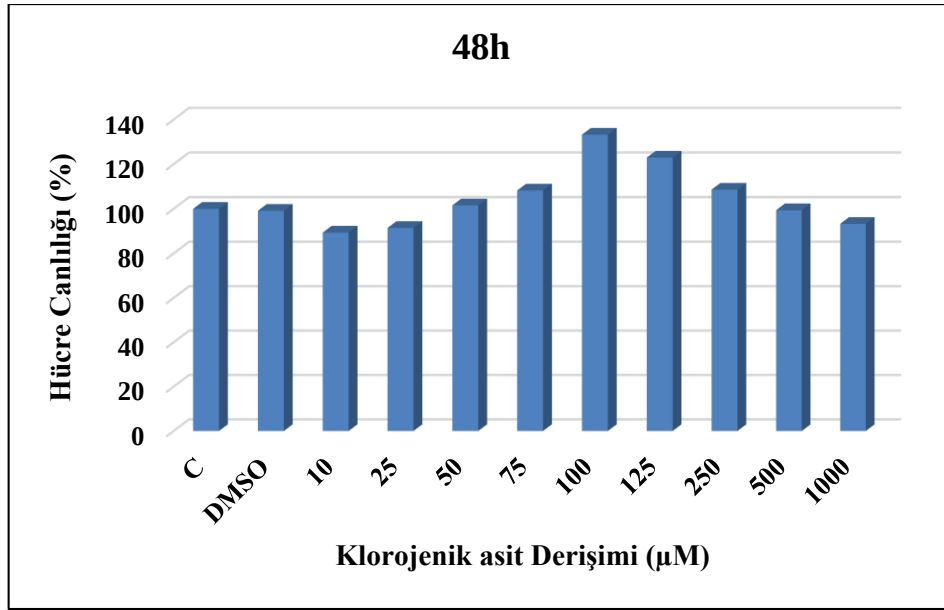
Şekil 4.9. Çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 48 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerdendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen proliferatif etkisi. (K: Kontrol, 0.1-1000 µg/mL: *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresine maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri)

4.2.1.2. Klorojenik Asidin Proliferatif Etkisinin Belirlenmesi

İnsan dermal fibroblast hücre dizininde klorojenik asidin 24-48 saatlik inkübasyonu takiben proliferatif etkisi XTT testi ile değerlendirildi. İnsan dermal fibroblast hücre dizininde çeşitli derişimlerde kullanılan klorojenik asidin (her bir kuyucukta final derişimi 10-1000 μ M derişimlerinde olacak şekilde) 24 ve 48. saatteki XTT sonuçları sırasıyla Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de gösterildi. Çalışmamızda, 75-250 μ M doz aralığında klorojenik asit dozlarının, insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde önemli proliferatif etkiye sahip olduğu tesbit edildi.



Şekil 4.10. Çeşitli derişimlerdeki klorojenik asidin 24 saat inkübasyon süresinin ardından XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen proliferatif etkisi. (K: Kontrol, 10-1000 μ M: klorojenik asite maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri)



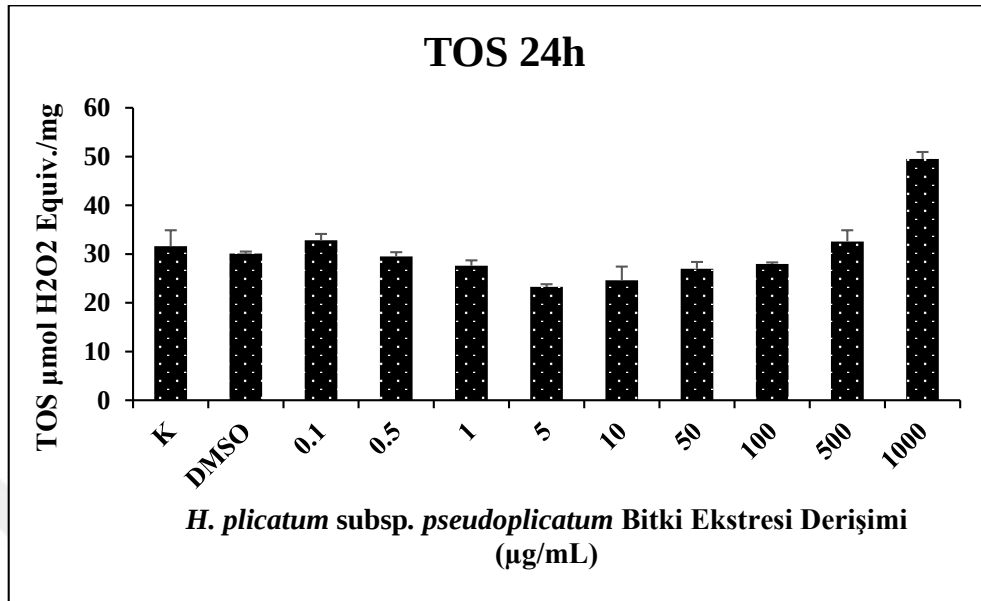
Şekil 4.11. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 48 saat inkübasyon süresinin ardından XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen proliferatif etkisi (K: Kontrol, 10-1000 µM: klorojenik aside maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri)

4.2.2. Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi

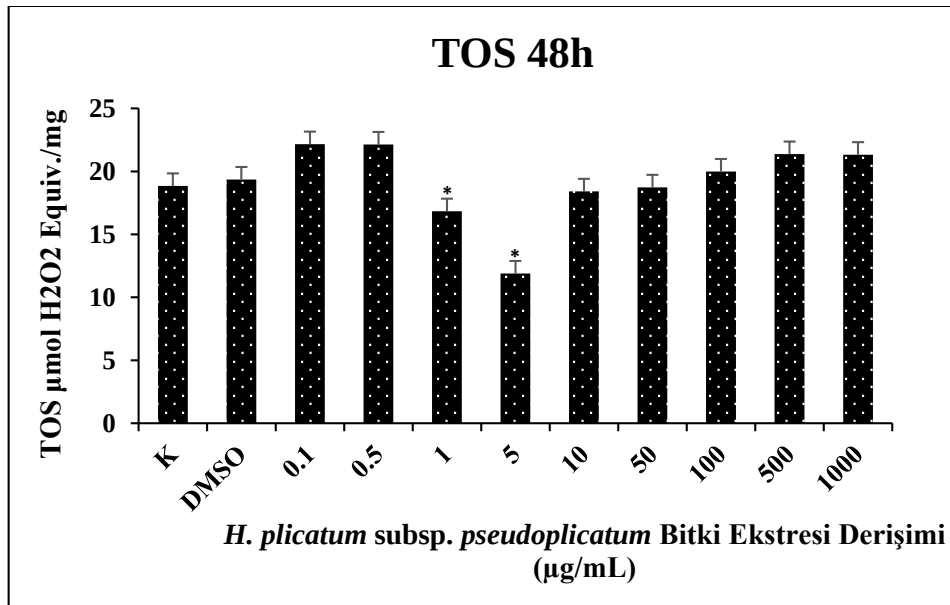
4.2.2.1. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresi Total Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi

İnsan dermal fibroblast hücre dizininde oksidan stresin rolünü araştırmak için çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresini (her bir kuyucukta final derişimi 0.1-1000 µg/mL derişimlerinde olacak şekilde) seçtiğimiz deneyde total oksidan düzeyi 24-48 saatlik inkübasyonu takiben ELISA prensibine dayanan TOS hazır ölçüm kiti kullanılarak değerlendirildi ve 24 ve 48. saatteki TOS düzeyleri sırasıyla şekil 4.12 ve 4.13’de gösterildi. TOS sonuçlarına göre; Doz bağımlı olarak *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 1-10 µg/mL derişimlerde kontrol grubuna kıyasla TOS düzeyini azalttığı ($p>0.05$), 48 saat inkübasyonu takiben 1 ve 5 µg/mL *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinde ise bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.01$). TOS sonuçlarımız MTT sonuçlarımız ile paraleldi. Özellikle 1 ve 5 µg/mL *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi derişimlerinin oksidan

kapasiteyi anlamlı azaltırken hücre canlılığında en yüksek artışa neden olduğu tespit edildi.



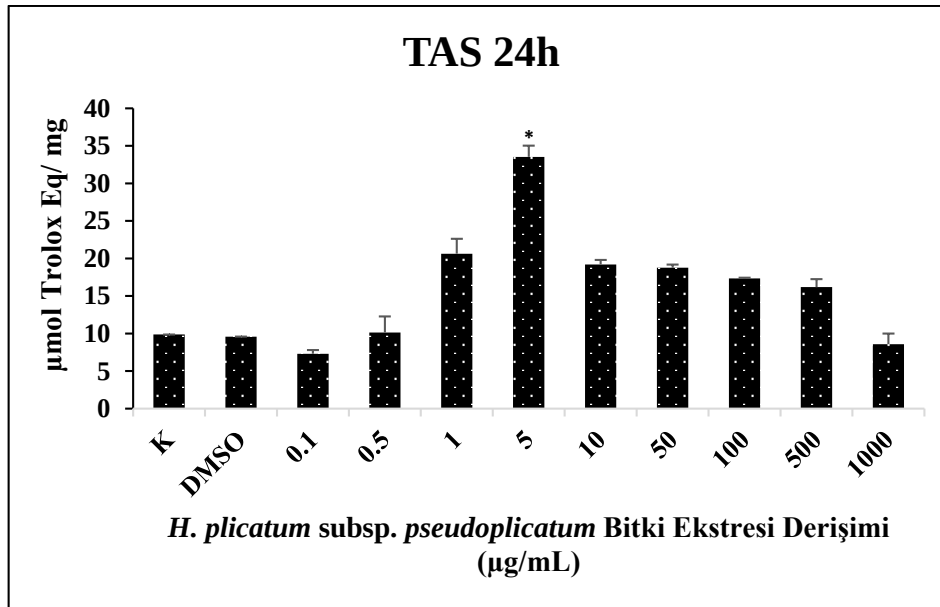
Şekil 4.12. Çeşitli derişimlerdeki *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 24 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total oksidan seviyesi (K: Kontrol, 0.1-1000 µg/mL: *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresine maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri)



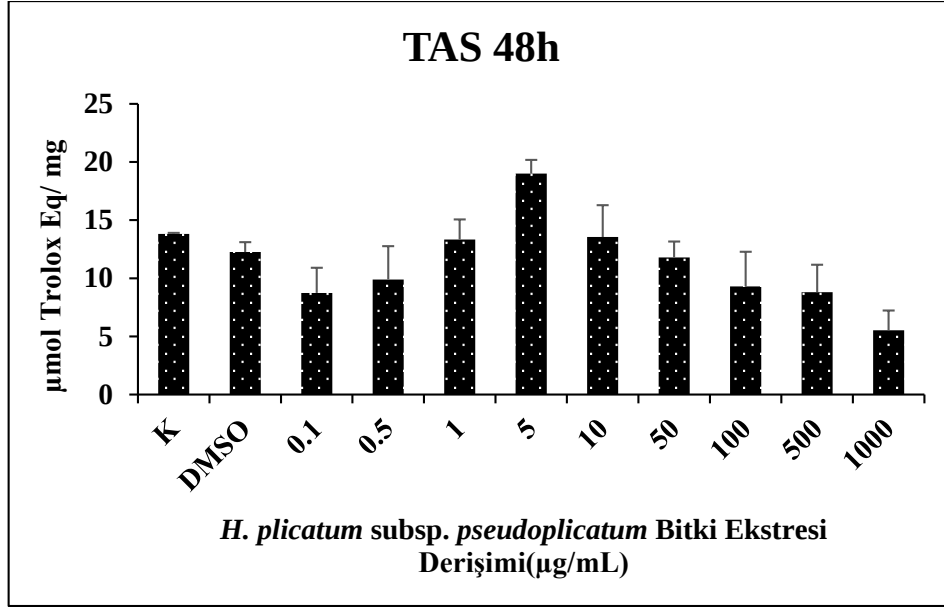
Şekil 4.13. Çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 48 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total oksidan seviyesi. (K: Kontrol, 0.1-1000 µg/mL: *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresine maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri, *p<0.01; istatistiksel olarak kontrole göre anlamlılık)

4.2.2.2. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi Total Antioksidan Seviyesinin Belirlenmesi

İnsan dermal fibroblast hücre dizininde oksidan stresin rolünü araştırmak için çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresini (her bir kuyucukta final derişimi 0.1-1000 µg/mL derişimlerinde olacak şekilde) seçtiğimiz deneyde total antioksidan düzeyi 24-48 saatlik inkübasyonu takiben ELISA prensibine dayanan TAS hazır ölçüm kiti kullanılarak değerlendirildi ve 24 ve 48. saatteki TAS düzeyleri sırasıyla Şekil 4.14 ve 4.15’de gösterildi. TAS sonuçlarına göre; 1-10 µg/mL derişimlerinde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TAS düzeyini arttırdığı, 5 µg/mL *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinde ise bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.01$). TAS sonuçlarımız XTT sonuçlarımız ile paraleldi. 1 ve 5 µg/mL *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi derişimlerinin hem hücre canlılığında hemde antioksidan kapasitede en yüksek etkiye sahip olduğu tesbit edildi.



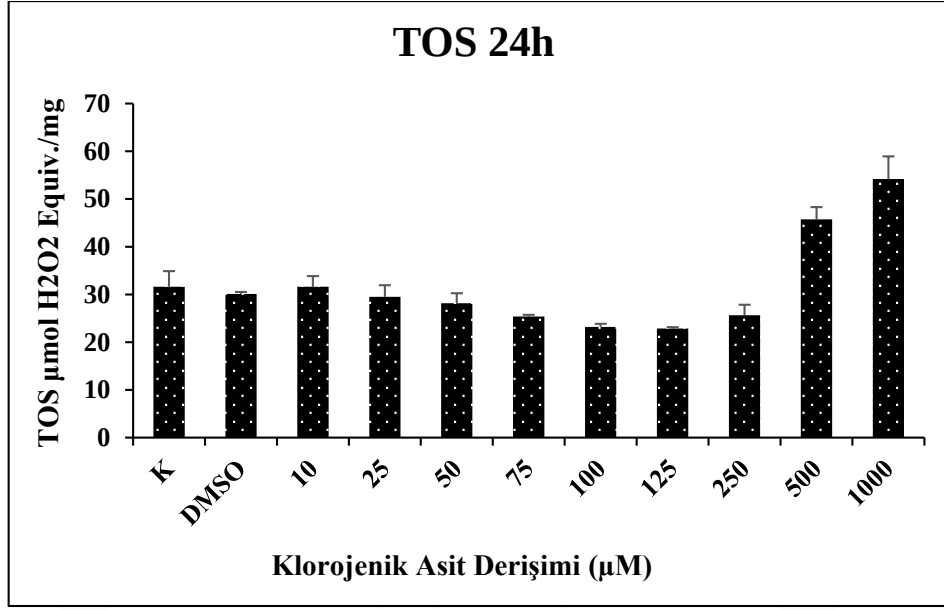
Şekil 4.14. Çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi (K: kontrol, 0.1-1000 µg/mL: *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresine maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri, * $p<0.01$; istatistiksel olarak kontrole göre anlamlılık)



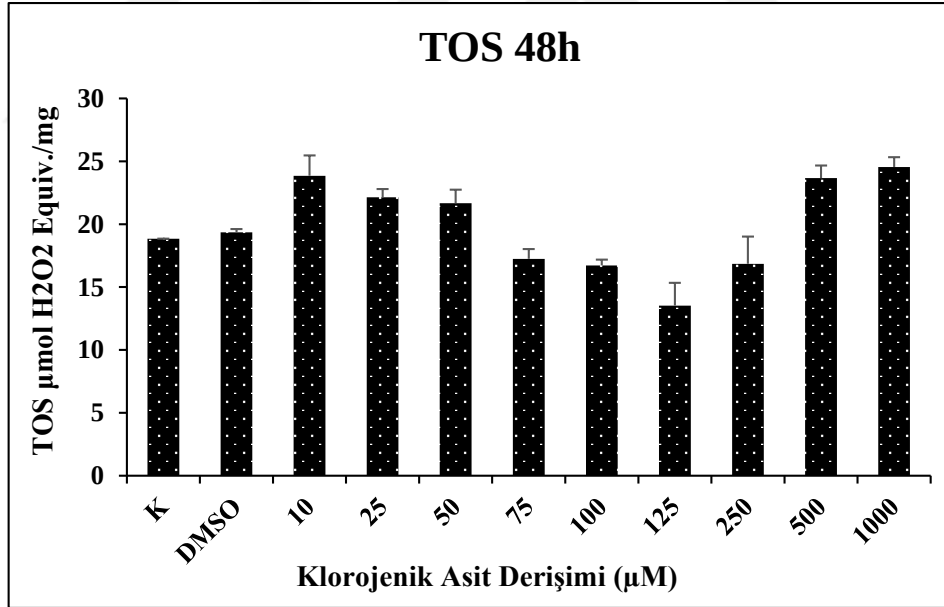
Şekil 4.15. Çeşitli derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 48 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total antioksidan seviyesi. (K: kontrol, 0.1-1000 µg/mL: *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresine maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri)

4.2.2.3. Klorojenik asidin Total Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi

İnsan dermal fibroblast hücre dizininde oksidan stresin rolünü araştırmak için çeşitli derişimlerde klorojenik asit (her bir kuyucukta final derişimi 10-1000 µM derişimlerinde olacak şekilde) seçtiğimiz deneyde total oksidan düzeyi 24-48 saatlik inkübasyonu takiben ELISA prensibine dayanan TOS hazır ölçüm kiti kullanılarak değerlendirildi ve 24 ve 48. saatteki TOS düzeyleri sırasıyla şekil 4.12 ve 4.13’de gösterildi. TOS sonuçlarına göre; Doz bağımlı olarak klorojenik asidin 75-125 µM derişimlerde kontrol grubuna kıyasla TOS düzeyini azalttığı, bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). TOS sonuçlarımız XTT sonuçlarımız ile paraleldi. Yüksek derişimlerde klorojenik asidin ise TOS düzeyi arttırdığı tesbit edildi.



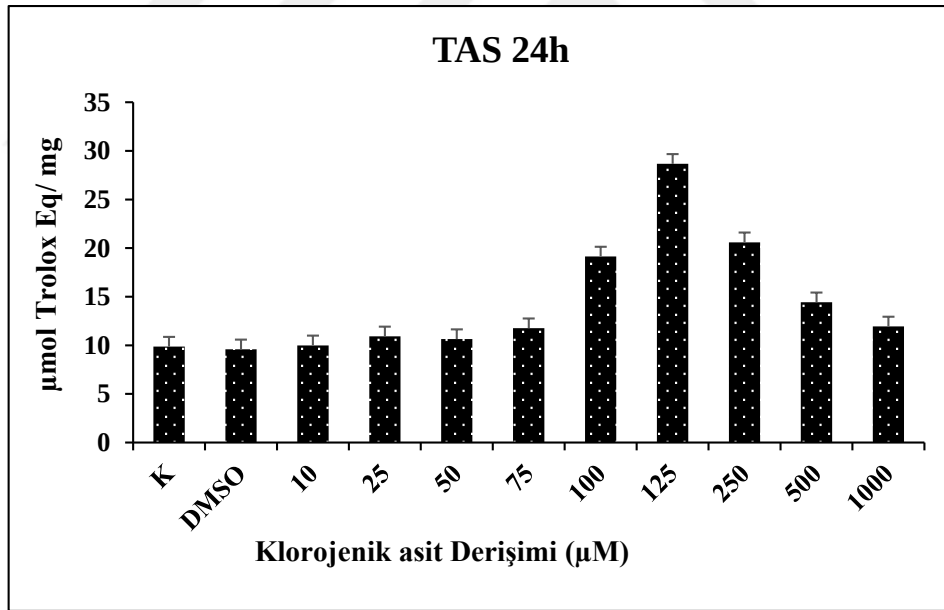
Şekil 4.16. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 24 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total oksidan seviyesi (K: Kontrol, 10-1000 μM: Klorojenik asite maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri)



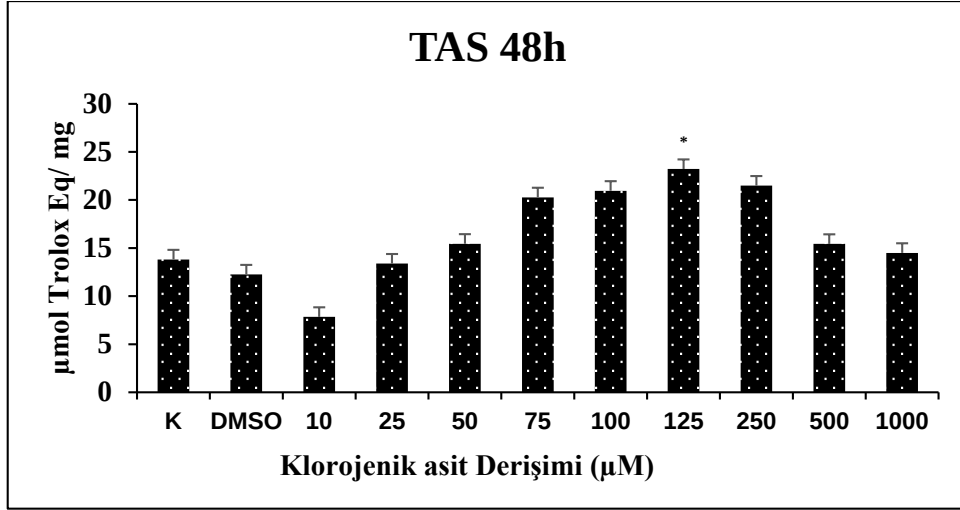
Şekil 4.17. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 48 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total oksidan seviyesi. (K: Kontrol, 10-1000 μM: Klorojenik asite maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimi)

4.2.2.4. Klorojenik asidin Total Antioksidan Seviyesinin Belirlenmesi

İnsan dermal fibroblast hücre dizininde oksidan stresin rolünü araştırmak için çeşitli derişimlerde klorojenik asit (her bir kuyucukta final derişimi 10-1000 μM derişimlerinde olacak şekilde) seçtiğimiz deneyde total antioksidan düzeyi 24-48 saatlik inkübasyonu takiben ELISA prensibine dayanan TAS hazır ölçüm kiti kullanılarak değerlendirildi ve 24 ve 48. saatteki TAS düzeyleri sırasıyla şekil 4.14 ve 4.15’de gösterildi. TAS sonuçlarına göre; 100-250 μM derişimlerde klorojenik asidin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TAS düzeyini arttırdığı, 125 μM klorojenik asitte ise bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$). TAS sonuçlarımız XTT sonuçlarımız ile paraleldi. 100-250 μM klorojenik asit derişimlerinin hem hücre canlılığında hemde antioksidan kapasitede en yüksek etkiye sahip olduğu tesbit edildi.



Şekil 4.18. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 24 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total antioksidan seviyesi (K: Kontrol, 10-1000 μM : Klorojenik asite maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri, * $p<0.05$; istatistiksel olarak kontrole göre anlamlılık)



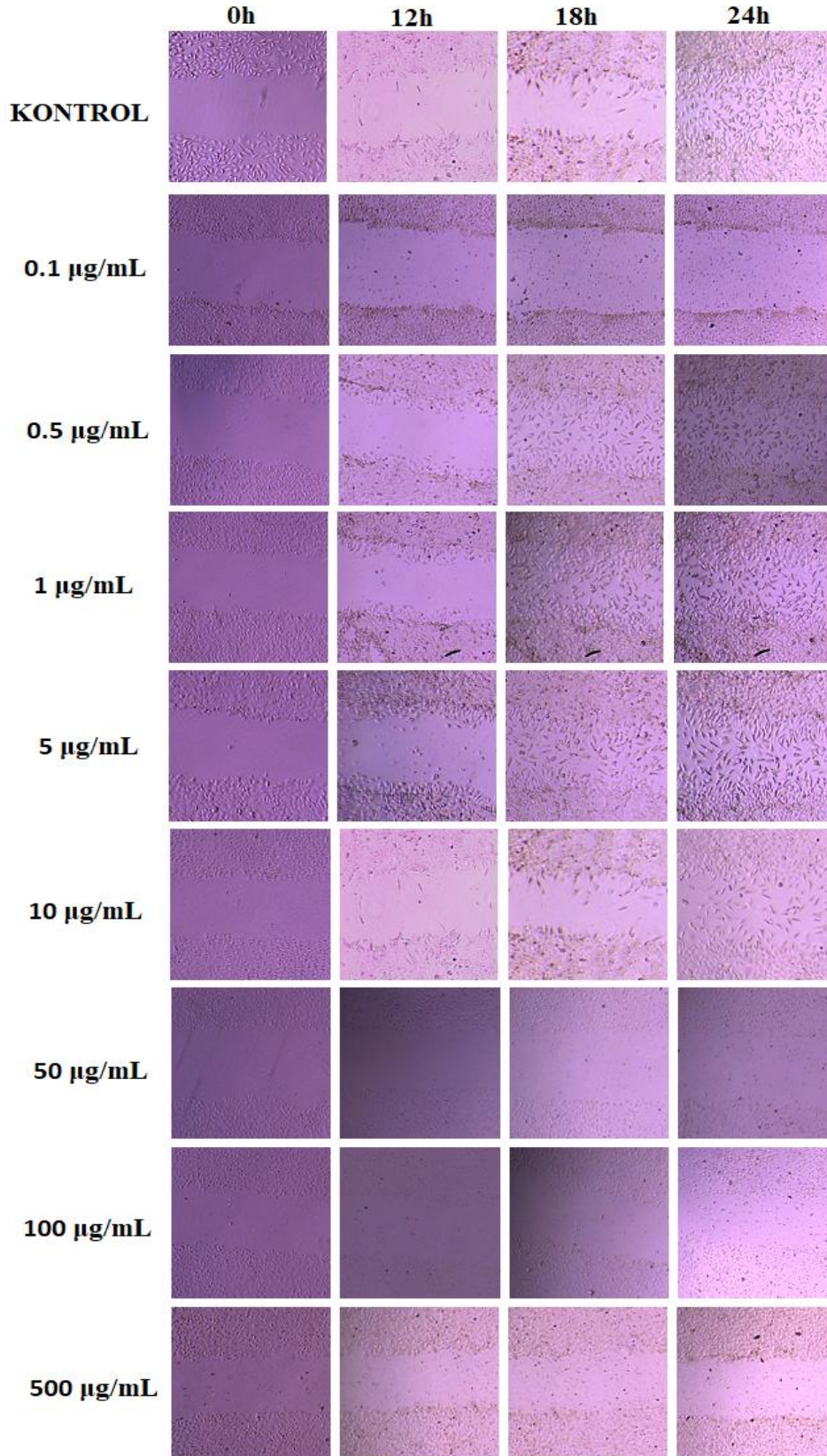
Şekil 4.19. Çeşitli derişimlerde klorojenik asidin 48 saat inkübasyon süresinin ardından ortalama total antioksidan seviyesi (K: Kontrol, 10-1000 µM: Klorojenik asite maruz kalan insan dermal fibroblast hücre dizini derişimleri, *p<0,05; istatistiksel olarak kontrole göre anlamlılık)

4.2.3. Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

4.2.3.1. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* Bitki Ekstresinin Yara İyileşmesi

Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

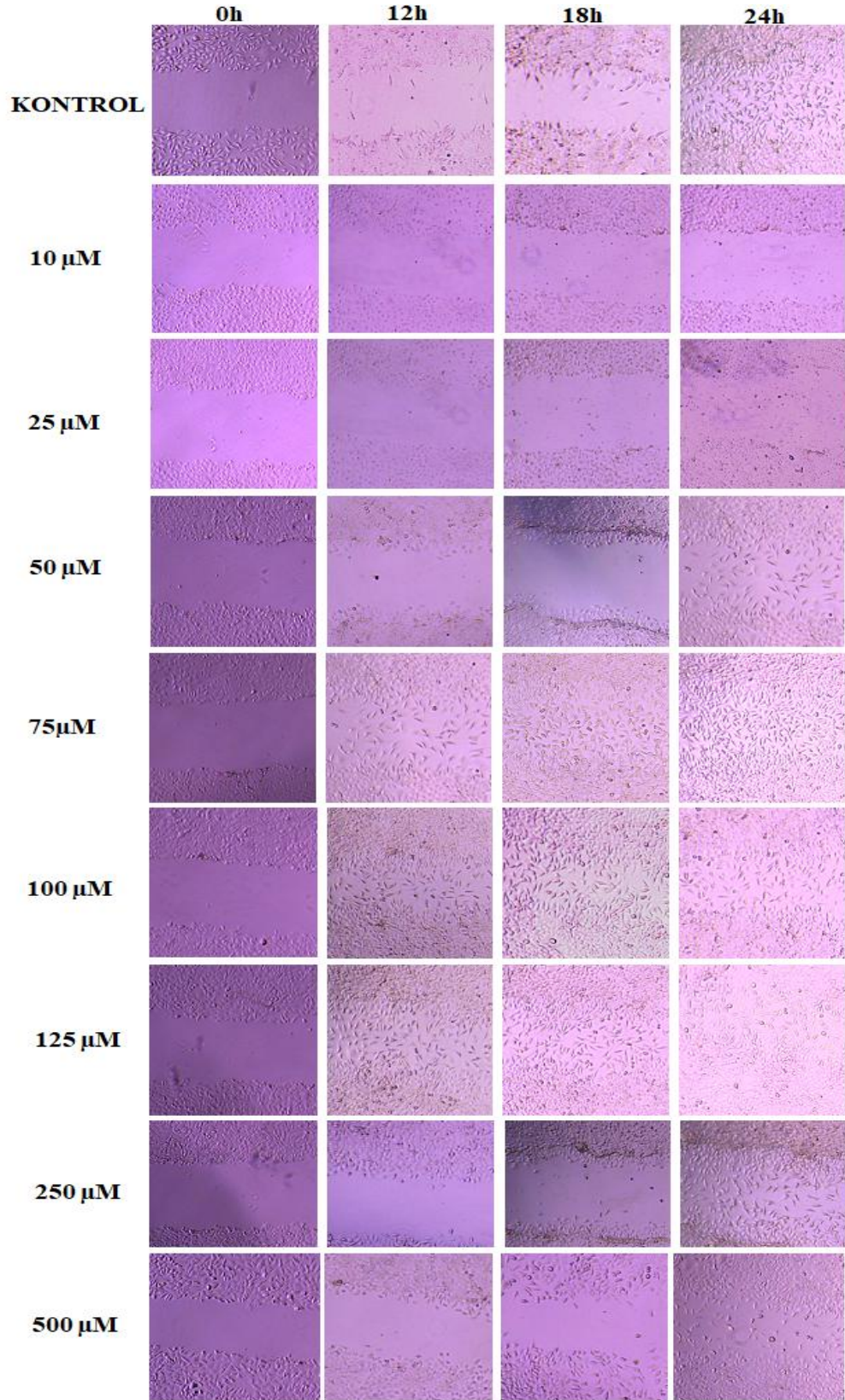
Çalışmamızda klorojenik asidin yara iyileşmesi üzerine etkisi strach assay deneyi ile MTT analizi sonuçlarına göre 0.5-500 µg/mL derişim aralığında araştırılmıştır. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin insan dermal hücre hattında yara iyileşmesi üzerine etkilerinin doza bağlı olduğu tesbit edildi. 0.5-10 µg/mL derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin hücre göçü üzerine belirgin etkiye sahip olduğu, özellikle 1-5 µg/mL derişimlerinde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 12. saatte hücre göçünü arttırmaya başlayıp 24. saatte belirgin şekilde yara bölgesini kapattığı tesbit edildi (Şekil 21). Aynı zamanda hücre göçü sonuçlarımızın XTT sonuçlarına paralel olduğu ve 1-5 µg/mL *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin hem hücre canlılığını hemde yara iyileşmesinde en güçlü etkiye sahip olduğu tesbit edildi. Bu çalışmada, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin ilk kez insan dermal hücre hattı kullanılarak yara iyileşmesi üzerine etkileridoz bağımlı uyarıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.20. *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin insan dermal fibroblast hücrelerinin göçü üzerindeki etkisi. Mikropipet yardımı ile yara modeli oluşturulan ve çeşitli derişimlerinde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi (µg/mL) ile tedavi edilen insan dermal fibroblast hücrelerinin 0., 12., 18. ve 24. saatteki mikroskobik görüntüleri (4X büyütme)

4.2.3.2. Klorojenik Asidin Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda klorojenik asidin yara iyileşmesi üzerine etkisi strach assay deneyi ile MTT analizine göre 500 μM üzeri derişimlerinde toksik olduğu için 10-500 μM derişim aralığında araştırılmıştır. Klorojenik asidin insan dermal hücre hattında yara iyileşmesi üzerine etkilerinin doza bağlı olduğu tesbit edildi. 50-250 μM derişimlerde klorojenik asidin hücre göçü üzerine belirgin etkiye sahip olduğu, özellikle 75-125 μM derişimlerde klorojenik asidin 12. saatte hücre göçünü arttırmaya başlayıp 24. saatte belirgin şekilde yara bölgesini kapattığı tesbit edildi (Şekil 21). Aynı zamanda hücre göçü sonuçlarımızın XTT sonuçlarına paralel olduğu ve 75-125 μM klorojenik asidin hem hücre canlılığını hemde yara iyileşmesinde en güçlü etkiye sahip olduğu tesbit edildi.



Şekil 4.21. Klorojenik asidin insan dermal fibroblast hücrelerinin göçü üzerindeki etkisi. Mikropipet yardımı ile yara modeli oluşturulan ve çeşitli derişimlerinde klorojenik asit (µM) ile tedavi edilen insan dermal fibroblast hücrelerinin 0., 12., 18. ve 24. saatteki mikroskopik görüntüleri (4X büyütme)

5. TARTIŞMA

Fiziksel, kimyasal, ısı ve ışık radyasyonu ve cerrahi müdahalelere bağlı olarak veya kendiliğinden gelişen insan vücudundaki doku harabiyeti yara olarak adlandırılır¹. İyileşme süreçlerine göre yaralar, akut ve kronik olarak sınıflandırılır. Akut yaralar, doku hasarı bırakmadan kolayca iyileşirken kronik yaralar uzun sürede iyileşen ve doku hasarı bırakabilen yaralardır^{3,4}. Yara iyileşmesindeki en temel amaç hasarlı dokuların yeniden yapılandırılmasıdır. Yara iyileşmesi hücreler ile yönetilen karmaşık fizyolojik bir süreç olup inflamatuvar, proliferatif ve yeniden modelleme fazlarından oluşmaktadır^{5, 7}. İnflamatuvar fazın birinci aşaması olan hemostazda, bölgesel koagülasyon meydana gelirken ikinci aşaması olan iltihaplanmada trombositlerden salınan kemotaktik faktörler ve kan akımı artışı ile yara yerine inflamatuvar hücre göçü sağlanır^{9, 10}. Proliferatif fazda yara yüzeyi deriyle kaplanarak vasküler bütünlük kazandırılır. Son aşama olan yeniden modellemede ise granülasyon dokusu olgun bağ dokusu veya skar şeklini alır. Yara iyileşmesinin birincil ve ikincil yara iyileşmesi olmak üzere iki türü mevcuttur. Birbirine yakın yara kenarları olan doku kaybı ve hasarının çok az olduğu yara kapanma süreci birincil yara iyileşmesi olarak tanımlanırken kasılma ve yeniden epitel hücrelerinin çoğalması süreçleri ile kendiliğinden iyileşme sağlayan yaralar ikinci yara iyileşmesi olarak tanımlanır¹⁹. Bu süreçlerdeki oluşabilecek aksaklıklar iyileşmenin yetersizliği ile sonuçlanır^{77, 78}.

Günümüzde yaranın tıbbi tedavisi yaranın onarımına yardımcı olmak amacıyla ya lokal (topikal) ya da sistemik (oral ya da parenteral) ilaçların verilmesi ile gerçekleştirilir. Kullanılan topikal ajanlar arasında antibiyotikler, antioksidanlar, antiseptikler ve yara iyileşmesini arttırıcı kimyasal maddeler ve bitkisel tedavi yöntemleri bulunmaktadır²⁶.

Bitkisel tedavi, bitkinin tamamından veya belirli kısımlarından yararlanılarak yapılan tamamlayıcı, destekleyici bir rasyonel tedavi olup bilinen en eski

bilimlendedir⁷⁹. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tıbbi bitkileri ‘bir veya daha çok organıyla tedavi edici, hastalıklara karşı koruyucu veya herhangi bir kimyasal-farmasötik sentezin öncü maddesi olabilecek bitkilerdir’olarak tanımlamıştır⁸⁰. Şüphesizki bitkiler fotosentezden dolayı birçok besi elementlerini (yağlar, karbonhidratlar, proteinler, vitaminler ve mineraller gibi önemli primer ve sekonder metabolitleri) içerir, bitkisel tedavide de bu önemli besin öğelerinden yararlanılır. Bitkisel bir tedaviye başlamadan önce, hastalığın özellikleri belirlenerek uygulanacak tedaviye karşı alınacak cevaplar belirlenmelidir. Bu cevapları saptayabilmek yani ilacın biyolojik etkisinin belirlenebilmesi için, şüphesiz ki bitkide bulunan etkin maddelerinin analizlerinin gerçekleştirilebilmesi gerekmektedir. Buna ilaveten bitkisel tedavinin ana koşulu standardizasyondur⁸¹. Yani bitkinin uygun koşullarda toplanması ve hazırlanması ile kullanılabilir hale gelmiş olmalıdır. Çünkü içerdiği başka etkin maddeler, kontaminatlar veya kalıntılar yüzünden yan etkilere sebep olabilir hatta vücuda zarar verebilir. Ayrıca bitkisel etkin maddelerin sadece ucuz ve uygun değil, aynı zamanda hiper duyarlı reaksiyonları, bu ajanların kullanımıyla nadiren rastlandığı için güvenli olduğu da iddia edilmektedir¹.

Ülkemiz bitki türleri açısından çok zengindir. Türkiye’de yetişen bitki türü sayısı yaklaşık 10.000’dir. Tıbbi amaçla birçok tür de halk arasında kullanılmaktadır. Yara iyileştirilmesinde geleneksel olarak kullanılan bitkilerin kullanılması çalışmamızın konusunu ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, yara iyileştirilmesinin de geçmişi, insanlığın var olduğu günden bu yana sürmekte olup yara iyileştirilmesi amacıyla çeşitli bitkisel kaynaklı (safran, susam, incibar kökü, mürver yağı, acı bakla, mürdesenk, gümrüz otu, sinirli ot, anzarut ve kına vb) maddelerin kullanıldığı bilinmektedir²⁶.

Eski çağlardan beri yara iyileştirilmesinde geleneksel olarak *Helichrysum* bitkisi kullanılmaktadır. *Helichrysum*, Asteraceae familyasına ait çok yıllık bir bitki olup halk

arasında altınotu, ölmez çiçek ve herdem taze olarak adlandırılmaktadır²⁹. Altıyüz türünden sadece 20 türü Türkiye florasında bulunmaktadır²⁸.

H. plicatum bitkisinin Erzurum yöresinde kaydedilen türü olan *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* 1800-2950 metre arasında kuru, açık kayalık yamaçlarda yetişen bir bitkidir. Bu tez çalışmasında bu türü seçilmiş olup 20 Haziran 2019 Erzurum Köşk köyü merasından toplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu.

Türkiyede yetişen *Helichrysum* türlerinin kapitulum başları veya toprak üstü kısmı halk arasında infüzyon veya dekoksion şeklinde, yara iyileştirme, idrar söktürücü olarak, böbrek taşlarında, yanıkta, kulak ağrılarında ve şeker hastalığında kullanımı bilinmektedir^{2, 82, 83}. Ayrıca mide ülserlerine karşı bal ile karıştırılarak, yüzdeki yaraları tedavi etmek için ise külüyle tereyağı veya krem ile karıştırılarak kullanılmaktadır. Dünyada ise *Helichrysum* bitkisi Güney Afrika'da sünnet sonrası yaraların iyileştirilmesinde, romatizmal hastalıklarda, uçucu yağının doku ağrısını azaltmasında, baş ağrılarında, karaciğer hastalıklarında kullanılmaktadır⁸³. Ayrıca bitkinin cildi koruduğu, kolesterolün düzenlenmesine yardımcı olduğu, karaciğer hücre fonksiyonunu uyardığı, yara izi ve renk değişikliğini azalttığı da bilinmektedir^{84, 85}. Özellikle *Helichrysum* bitkisi halk arasında kolay tedarik edilmesi ve bitkisel kaynaklı olduğu için yan etkilerinin az olabileceği düşüncesi ile yara iyileştirmede tercih edilmektedir. Bu bağlamda, *Helichrysum* bitkisi ekstratları, yaraların tedavisi için büyük bir potansiyele sahiptir.

Helichrysum türleri üzerinde yapılan farmakolojik çalışmalarda bu bitkinin antimikrobiyal, antienflamatuvar, antioksidan, antialerjik, sitotoksik ve antidiyabetik, anti-öksürük etkiye sahip olduğu ve bu biyolojik özellikleri ile yukarıda belirtilen hastalıklar da kullanımı belirtilmiştir^{85, 86}.

Helichrysum türleri, şu ana kadar belirtilen yara iyileştirmesi başta olmak üzere farmakolojik ve biyolojik etkilerini içerdiği biyoaktif bileşenler sayesinde göstermektedir. Fakat yukarıda da bahsedildiği gibi geleneksel olarak kullanılan bitkileri yara iyileşmesi için tavsiye edilmeden önce, bilimsel olarak doğrulanması, standardizasyonu ve güvenlik değerlendirmesinin yapılması gerekmektedir¹. Bu bağlamda, bitkisel yara tedavide son yıllarda büyük atılımlar yapılmış ve bu durum bitkide bulunan etkin maddelerinin, kontaminatların veya kalıntıların farklı analitik yöntemler kullanılarak analiz edilebilmesi ile ilişkilendirilmiştir.

Bitkilerde etkin veya diğer maddelerin analizleri için bir analitik yöntem seçimi yapılabilmesi için analitik yöntemler hakkında yeterli bir bilgi ve donanımına sahip olmak gerekir. Ayrıca çalışılacak bitkinin fitokimyası hakkında detaylı bir literatür araştırılması yapılması gerekmektedir. Bu bağlamda, hangi analitik yöntemin seçilmesi gerektiği konusunda kesin bir şey söylenemez çünkü belirtilen koşullar altında seçilebilecek birden fazla analitik yöntem olabilir. Seçilecek analitik yöntem için ilk koşul ölçülmesi istenen değerler olup bu değerlere ulaşmak için en hızlı, doğru ve güvenilir yöntem seçilmelidir⁸⁷.

Analitik Kimyada, enstrümental analiz yöntemleri, bir örnekte bulunan bir bileşenin cinsi veya derişimi ile orantılı sinyal üreten cihazlarla yapılan analizleri içerir. Enstrümental analiz yöntemleri spektroskopik, elektrokimyasal, kromatografik ve termal analiz yöntemleri olarak dört sınıfta ayrılır⁸⁸.

Kromatografi, ortak ve uygun bir çözücü ortamına konan bir karışımın içerdiği çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanan, maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ayrıldığı ayrılma işlemlerine toplu olarak verilen isimdir⁶¹. Kromatografinin ana amacı hedeflediğimiz numunenin ayrımı ve miktarının ölçümüdür. Kromatografide, moleküllerin adsorpsiyon, dağılma, iyon değişim ve

molekül büyüklükleri etkin rol oynar. Kromatografik yöntemler uygulama biçimlerine göre, ayrılma mekanizmalarına ve faz tiplerine göre sınıflandırılmaktadır. Kromatografik analiz; alıkonma zamanı, kapasite faktörü, etkinlik, seçicilik, kolon verimi, kolon rezölasyonu, göç hızı, partiyon oranı gibi parametrelere bağlıdır⁶²⁻⁶⁵.

Sıvı kromatografisi bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı hareketli faz kullanılır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) yönteminde karışımda bulunan bileşenler ilk olarak çözücüde çözülür ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçirilir. HPLC'nin yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. HPLC cihazının bölümleri genel olarak sırasıyla hareketli faz rezervuarı, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşmaktadır. Bu kısımlardan bazıları çalışılacak örneğe ve cihaz marka, modeline göre değişiklik gösterebilir. Hareketli faz rezervuarı, bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelik kaplardan oluşmaktadır. Hareketli fazda bulanabilecek hava kabarcıkları pompa ve/veya kolon için sıkıntılı olabileceğinden dolayı hareketli faz bir degazer ünitesinden geçirilir. HPLC pompası, sisteminin en önemli kısımlarından biri olup sistemde örnek ve hareketli fazın enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışta sürüklenmesini sağlar. Enjektör, örneğin kolon öncesinde hareketli faza enjekte edilmesi için kullanılır. Kolon bir kolon fırını içine yerleştirilmiştir. Kolon fırını çalışmanın kalitesi için kolon ortamını sabit bir sıcaklıkta tutar. HPLC'in en önemli kısmı olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden ayrılmasını sağlayan kısımdır. HPLC'de kullanılan kolon ile hareketli faz ve bunların etkileşimleri gibi bazı özellikler dikkate alınarak farklı ayırım teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar normal faz, ters faz, ters faz iyon çifti, iyon değişim, boyut eleme ve kiral ayırım teknikleridir⁶²⁻⁶⁵. Dedektör, kolondan çıkan bileşenleri görebilmemizi, bunların ayırım ve miktarlarını belirlememizi

sağlar. UV/GB dedektörü, fotodiyot array dedektörü, floresans dedektörü, iletkenlik dedektörü, refraktif indeks dedektörü, elektrokimyasal, kütle dedektörü gibi çeşitli dedektörler geliştirilmiştir⁶⁴. Dedektörden geçen maddeler bir kaydedici yardımıyla kaydedilerek, zamana karşı dedektör cevabına ait bir grafik oluştururlar ve buna da kromatogram denir. HPLC cihazının çalışma basamakları sırasıyla analiz edilecek molekülün uygun bir çözücünde çözünmesi, numunedeki bileşenlerin ayrımının sağlanması, ayrılan bileşenlerin ve miktarlarının tayin edilmesi ve elde edilen kromatogramların değerlendirilmesini içerir⁶⁴. HPLC yönteminin Tıp ve Eczacılık fakültelerinin birçok bilim dalında yaygın kullanımı bulunmaktadır. Bunlar; ilaç ve bitki etkin madde ve kalıntı analizleri, biyokimyasal analizler, adli tıp analizleri, toksikolojik analizleri, endüstriyel analizler gibi birçok konuda kalitatif ve kantitatif analizlerdir⁶⁴. Kemometri bir kimya bilim dalı olup istatistik, matematik ve bilgisayarın birlikte kullanımı ile karmaşık kimyasal problemlerin ve verilerin çözümünü kapsar. Kemometri analitik kimyada da karmaşık analitik verilerden maksimum kimyasal bilgi edinmesi açısından kullanılmaktadır. Her geçen gün analitik kimyada yeni aletli analiz yöntemleri geliştirilmektedir. Elde edilen karmaşık kimyasal verilerin açıklanabilmesinde kemometrik yöntemler kolaylık sağlar. Çünkü kimyasal verilerde genellikle birden fazla değişken vardır ve bu değişkenlerin veriler üzerinde etkisini değerlendirmek zordur fakat kemometrik analiz yöntemleri ile kolaylıkla çözülebilir. Kimyada, günümüzde deneysel tasarım, modelleme, yapı tanıma, sinyal işleme, kalibrasyon, yöntem optimizasyonu, yapay akıl oluşturma, resim işleme ve sistem kuramları konularında kemometrik yöntemler uygulanmaktadır^{68, 89}.

Deneysel tasarım yöntemleri, matematiksel modelleme yaparak optimum deney şartlarını belirler ve deney sayısını dolayısıyla çözücü ve zaman kaybının azaltılmasını sağlar. Böylece daha ekonomik analitik yöntemler geliştirilerek çevre daha az kirlenir ve

dünya standartlarına uygun hale geldiğinden dolayı günümüzde kemometrik yöntemler çok fazla tercih edilmektedir. Aynı zamanda deneysel tasarım yöntemleri ile deney sonuç verilerine etki eden önemli faktörler belirlenebilir ve faktörlerin birbiri ile etkileşimi tanımlanabilir. MKT yöntemi deneysel tasarım yöntemlerinden biri olup MKT yöntemi ile deneye etki eden faktörler ve varsa aralarında bulunan etkileşim, deney hataları ve optimum deney şartları belirlenebilir⁶⁸.

Analitik aletli yöntemin kemometrik yöntemler ile optimizasyonundan sonra yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için validasyon parametreleri (seçicilik, doğrusallık, hassaslık, doğruluk, kesinlik ve kararlılık) ile validasyonunun yapılmalıdır. Validasyon analizlerinde, standart maddeler kullanılmalıdır.

HPLC, LC/MS, LC/MS-MS yöntemleri ile *Helichrysum* türlerinin fitokimyasının belirlenmesine yönelik aşağıda belirtilen çalışmalar mevcuttur. *Helichrysum* türleri üzerine yapılmış bir derleme çalışmasına göre, *H. arenarium*, *H. plicatum* ve *H. plicatum* subsp. *polyphyllum* türlerinin fenolik bileşiklerce zengin olduğu ayrıca pironlar, floroglusinoller, terpenler, uçucu yağlar, fenolik asitler, benzofuranlar, seskiterpenler ve diterpenler⁸⁶ içermektedir. Ayrıca *Helichrysum* türleri üzerinde yapılan diğer fitokimyasal çalışmada; *H. devium*, *H. melaleucum*, *H. obconicum* ve *H. monizii* türlerinin klorojenik asit ve izomerleri (7 farklı dikafeoilkuinik asit) ⁵⁰; *H. devium* bitkisinin yaprak, çiçek ve sapında 34 fenolik bileşik (klorojenik asit içeren kinik asit, kafeik asit ve protokatekinik asit türevleri ile O-glikosile flavonoidleri) ³²; *H. Melaleucum* bitkisinin toprak üstü, yapraklar, çiçekler ve saplarında fenolik bileşikler (O- glikosile flavonoidler (flavonol ve flavon tipi), kinik asit, kafeik asit, lignanlar ve polifenoller) ⁵⁶; *H. obconicum* bitkisinin toprak üstü, yapraklar, çiçekler ve saplar fenolik bileşikler (mono- ve di-kafeoilkinik asit türevleri olmak üzere fenolik asit konjugatları ve bazı flavonoid türevleri) ⁵⁷; *Helichrysum* (Asteraceae) 16 türünde ana bileşikler olarak

klorojenik asit, apigenin-7-glukozit ve apigenin³¹; *H. stoechas* (Asteraceae) bitki türünün çiçekleri, sapları ve yapraklarında klorojenik asit, sinarin ve arzanol⁵⁸; *H. arenarium* subsp. *erzincanicum*, *H. arenarium* subsp. *rubicundum*, *H. armenium* subsp. *araxinum*, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkilerinin toprak üstü kısımlarında ana bileşik olarak klorojenik asit, apigenin-7-glukozit ve apigenin⁴⁰ ve *H. italicum* subsp. *Picardii*⁵⁹ bitki kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarında ana bileşik olarak klorojenik asit; *H. arenarium* subsp. *arenarium* bitkisinin çiçek ve salkımlarında 12 fenolik bileşik (kafeik asit konjugatları (klorojenik asit ve dikaffeoilkinik asitler) ve flavonoidler (apigenin, naringenin, apigenin-7-O-glukozit ve naringenin-O-hekzositler)⁶⁰ tespit edilmiştir. *H. plicatum* bitkisinin çiçek, yaprak ve gövdesinde yapılan bir çalışmaya göre ise klorojenik asidin ana bileşen olduğu daha sonra bunu flavonoid türevlerinden apigenin, naringenin, rutin, kersetin kemferol ve glikozitlerini içeren 17 farklı fenolik bileşik sahip olduğu gösterilmiştir⁴².

Bu bilgiler ışığında, *Helichrysum* bitkisinin fenolik bileşikler açısından zengin olduğu ve klorojenik asidin ana bileşen olduğu görülmektedir. *Helichrysum* bitkisinin yara iyileştirme etkisi göz önüne alındığında yara iyileştirmede bitkide bulunan fenolik bileşiklerin etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *Helichrysum* bitki türlerinde fenolik bileşiklerin tayini için yapılan HPLC çalışmalarında *Helichrysum* bitki türlerinde klorojenik asit miktarının çiçeklerde kök, gövde ve yapraklardan daha fazla olduğu görülmektedir. Bu bağlamda *Helichrysum türlerinden* çalışmamızda Erzurum yöresinde yetişen türü olan *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin çiçekleri üzerinde çalışmasına karar verildi.

Klorojenik asit- [1,3,4,5-tetrahidroksisikloheksankarboksilik asit 3-(3,4-dihidroksisinnamat); C₁₆H₁₈O₉] genellikle bitki, meyve (elma, armut ve turuncgiller), sebze ve kahve gibi besinlerden alınan ve besinlerde yaygın olarak rastlanan

hidroksisinamik asit türlerinden fenolik bir bileşiktir ⁴⁴. Klorojenik asit besinlere acı ve buruk tadı verir. Antiseptik ve anti-kanserojen antioksidan, anti-obezite, anti-diyabetik, hepatoprotektif, kardiyoprotektif, antienflamatuar, antipiretik, nöroprotektif, antiviral, anti-mikrobiyal, anti-hipertansif ve merkezi sinir sistemi stimülatörü olarak klorojenik asidin nutrasötik ajan olarak birçok hastalığın tedavisinde kullanımını ön plana çıkartmıştır^{33, 46, 47}.

Klorojenik asitlerin kuvvetli antioksidan özellikleri bulunduğu, deney hayvanları üzerinde yürütülen çalışmalarda sağlıklı ve obez hayvanlarda lipid ve glikoz metabolizmasını düzenlediği, spontan hipertansif sıçanlarda kan basıncını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Kan basıncındaki benzer etkilerin hafif hipertansif deneklerde zengin polifenol içerikli kahve özütü verilmesiyle de sağlanabildiği bildirilmiştir. Son zamanlarda klorojenik asidin lipojenezi sağlayan enzimler üzerinde etkili olarak normal dokularda yağ birikimini azaltabileceği yönünde bazı deneysel bulgular dikkati çekmektedir. Klorojenik asidin yara iyileştirme üzerine etkisinin olduğunu gösteren bir in-vivo çalışmada, sıçanlar klorojenik asit uygulanmış ve klorojenik asidin güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu için yara iyileştirme kapasitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir ^{46, 47, 90}. Yapılan çalışmalarda yara iyileştirmesi yanı sıra klorojenik asidin, kardiyovasküler rahatsızlıkların, Tip II diyabetin, Alzheimer'ın, iltihabi rahatsızlıkların oluşum riskini azalttığı ayrıca kanser hücrelerinin çoğalmasını da engellediği bilinmektedir^{33, 49, 91, 92}.

Yukarıda bahsedildiği gibi yara iyileştirmesinde antioksidan ve antiseptik ajanlar kullanılmakta ve fibroblast hücrelerindeki artışın yüksek olması istenmektedir. Bu bağlamda, klorojenik asidin ve klorojenik asit içerdiği belirlenen *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* türünün antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı yara iyileştireme de etkili olabileceği düşüncesiyle, *çalışmamızda H. plicatum* subsp.

pseudoplicatum bitkisinin daha ayırt edici özelliğini belirlemek ve halk arasındaki kullanımına daha paralel bir çalışma olmasını sağlaması amacı ile bitkinin sadece çiçeklerinde yara iyileştirme özelliği ve klorojenik asit miktarının HPLC yöntemi ile tayini yapılmasına karar verildi.

Yapılan literatür taramasında, *Helichrysum* bitkisinin farklı türlerinde klorojenik asidin belirlenmesi yönelik HPLC^{31, 32, 42, 50, 56, 57 58 40, 59, 60} ve LC/MS^{58, 59} çalışmaları rastlanmıştır. Bu çalışmalarının hepsinde kromatografik ayırım için RP-C18 ters faz kolon kullanılmıştır^{31, 32, 42, 50, 56, 57 58 40, 59, 60}. Diğer kromatografik ayırım parametreleri olarak Gouveia ve Castilho⁵⁰ % 0.1 formik asit içeren su ve asetonytril hareketli fazının gradiyent elüsyon, 30 °C'de kolon sıcaklığı ve sırasıyla 320 nm dalga boyu ve 210-520 nm^{2,3} dalga boyu aralığı; Kolaylı ve ark⁴, % 0.5'er asetik asit içeren su ve asetonytril hareketli fazının gradiyent elüsyon, 1.2 mL/dak akış hızı ve 280 nm dalga boyu; Albayrak ve ark⁵, % 0.1 asetik asit içeren su ve metanol hareketli fazının gradiyent elüsyon ve 278 nm dalga boyu; Silva ve ark⁶, % 0.05 trifloroasetik asit içeren su ve metanol hareketli fazının linner gradiyent elüsyon ve 200-600 nm dalga boyu aralığı; Pereira ve ark⁶, %0.1 formik asit içeren su ve asetonytril hareketli fazının linner gradiyent elüsyon ve 280-330 nm dalga boyu aralığı seçilmiştir. Fakat *Helichrysum* bitkisinin Erzurumda yetişen türü olan belirlenen *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* türünün çiçeklerinde klorojenik asidin HPLC yöntemi ile belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu sebeple yukarıda verilen bilgiler ışığında, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* türünün çiçeklerinde klorojenik asidin miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirildi, deneysel tasarım yöntemi olan MKT yöntemi ile optimize edildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Belirtilen HPLC yöntem koşulları ve elde edilen sonuçlar kısaca özeti aşağıda verildi.

Bu çalışmada, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* türünün çiçeklerinde klorojenik asidin miktar tayini için, HPLC yönteminde, ters faz C18 kolonda (5 µm, 250 x 4,6

mm), %0.2 orto fosforik asit içeren su-asetonitril hareketli fazında (5:95 h/h), değişken oda kolon sıcaklığında, 1 mL/dak. kolon akış hızında, 330 nm dalga boyunda kromatografik ayırım gerçekleştirildi. Yöntemde bileşiklerin alıkonma zamanlarında ve pik rezölüsyonunda önemli rol oynayan ve yukarıda verilen hareketli fazın belirlenmesi amacı ile deneysel sonucu etkileyen yüzde asetonitril derişimi ile su içerisinde bulunan ortofosforik asidin yüzde derişiminin optimum değerlerinin belirlenmesine yönelik MKT yöntemi uygulandı. Her bir parametrenin maksimum ve minimum değerleri saptandı Tablo 3.1 ve belirlenen değerler 2 faktörlü merkezi kompozit tasarımına göre 13 deneyden oluşan bir set halinde belirlendi ve yukarıda 330 nm dalga boyunda kromatogramları alınarak klorojenik asidin pik alanları belirlendi Tablo 4.3. Elde edilen pik alan değerleri kullanarak Tablo 4.4’de matematiksel quadropik modeli oluşturuldu ve Tablo 4.5’de verilen denklemler elde edildi. Elde edilen pik alan değerlerine göre Design Expert 12 programı yardımıyla optimum şartlar ve bu şartlar sonucu elde edilmesi gereken cevap değeri matematiksel model olarak ifade edildi. Bu parametrelere bakıldığında F-testine göre en iyi sonuçların quadratik yaklaşımla tespit edildiği gözlemlendi. Deney sonuçlarına göre χ^2 değerinin anlamlı çıkması bu deney faktörlerini doğrulamaktadır. Daha sonra her bir parametre ANOVA testine tabi tutuldu ve bu hesaplamalara göre asetonitrilin yüzde derişimi ile su içerisinde bulunan ortofosforik asidin yüzde derişim parametreleri açısından modelin anlamlı olduğu F-testi ile belirlendi. Deney sonuçlarına göre optimum şartlar % 95 yüzde asetonitril derişimi ile % 0.2 su içerisinde bulunan ortofosforik asidin yüzde derişimi belirlendi Tablo 4.6. Bu değerler ile yapılan modellemede 319.52 pik alan değeri matematiksel olarak saptandı. Daha sonra yapılan deneysel çalışmada da bu değere çok yakın değerler bulundu. Yöntem kümülatif olarak F-testine göre ve 9.09 değeri ile yöntemin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirlendi (p=0.0057) ve modelin ve optimizasyonun anlamlı olduğu ve

deneysel verilerle karşılaştırıldığında da modelin gerçek örneklerle uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı.

Yöntemin optimum koşulları MKT yöntem ile belirlendikten sonra, yöntemin validasyonu için klorojenik asidin belirtilen kromatografik şartlarda kromatogramı alındı ve 330 nm’de bir pik gözlemlendi Şekil 4.2. Klorojenik asidin stok çözeltisi, asetonitril ile 10 farklı derişimde (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5,10, 20, 40, 60 ve 100 µg/mL) standart çalışma çözeltileri hazırlandı ve kromatogramları alındı Şekil 4.3. Klorojenik asidin derişimine karşı pik alan değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi Şekil 4.4. Bu kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinin istatistiksel analiz sonuçlarına göre regresyon doğrusu denklemi $Y=32.421x - 8.530$ (Y: pik alanı, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r^2) 0.9999 olarak; yöntemin LOD değeri 0.03 µg/mL; LOQ değeri ise 0.1 µg/mL olarak tespit edildi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği için % BSS ve doğruluğu için BH değerleri sırasıyla %3.32 ve ± 4.05 ’den küçük olarak belirlendi. Yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla bitki ekstraktının 10 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlandı (Bölüm 3.3.1.5) kromatogramı alındı ve daha sonra kalite kontrol çözeltileri bu ekstraktlara eklenerek geri kazanım çalışması yapıldı ve % 99.85’den büyük geri kazanım değerleri elde edildi Tablo 4.9 ve bu da yöntemin doğruluğunun bir göstergesi olarak kabul edildi. Klorojenik asit için geliştirilen, optimize edilen ve valide edilen HPLC yöntemi, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* çiçeklerinde klorojenik asidin miktar analizi için uygulandı. Bu amaç ile Bölüm 3.3.1.5’de belirlen şekilde bitki çözeltileri hazırlandı ve kromatogramları alındı ve Elde edilen pik alanı kalibrasyon grafiği kullanılarak bitki ekstraktında klorojenik asit miktarı 9.77 ± 1.818 (µg/mg ekstrakt) olarak tespit edildi. Çalışmamız ile ilk kez *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin çiçeklerinde klorojenik asit miktarı tespit edilmiştir. Klorojenik asidin diğer *Helichrysum*

türlerinde olduğu gibi *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin çiçeklerinde bulunan önemli bir doğal ürün olduğu hipotezini doğrulamaktadır.

Yara iyileşmesi, iltihaplanma, hücre göçü ve çoğalması, matris üretimi ve anjiyogenez gibi bir dizi ardışık olayı içeren bir süreçtir. İyileşme sürekliliği sayesinde, cilt hasarından sonra hemostaz, iltihaplanma, proliferasyon ve yeniden şekillenme aşaması dahil olmak üzere hemen iyileşme süreci başlatılır⁹³. Hemostaz aşamasında trombosit ve fibrin pıhtı oluşumu ve birikimi oluşur. Trombosit ve fibrin pıhtı oluşumu ve birikmesi hemostaz fazını oluşturur⁹⁴. Nötrofiller ve makrofajların yaralı bölgede bulunan bazı zararlı bakterileri ve ölü hücreleri temizlenmesi iltihaplanma fazında gerçekleşir. Proliferasyon fazında anjiyogenez, kollajen üretimi ve epitel dokusu yeniden ortaya çıkmaktadır. Bu aşamada fibroblastlar kollajen üretimine, vasküler endotel hücreleri ise anjiyogeneze yardımcı olur⁹⁵. Son olarak, yeniden şekillenme aşamasında yeni skar dokusu oluşur⁹⁶.

Yara iyileşmesi, anabolik faktörler, vitaminler ve eser elementler (bakır ve çinko) gibi çok sayıda besinin varlığını gerektirir. Ayrıca iyileşme sürecinde zaman ve süreklilik açısından yara iyileşmesi için antioksidan savunma önemlidir. Mikrobesein eksiklikleri yaralanmalardan sonra görülebilir; bundan sonra besin desteğine ihtiyaç duyulabilir⁹⁷. Yara iyileşmesinde biyoaktif bileşenler, yeni ajanlar ve biyobelirteç moleküllerin araştırılması üzerine in vitro ve in vivo çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle, son yıllarda yara iyileşmesinin tedavisi üzerine alternatif yeni bitkisel biyolojik ve kimyasal ajanların keşfi araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir.

Helichrysum türleri üzerinde yapılan farmakolojik çalışmalarda bu bitkinin antimikrobiyal, antienflamatuvar ve antioksidan etkiye sahip olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir^{33, 54}. Yine *Helichrysum* bitkisinin fenolik bileşikler açısından ve özellikle klorojenik asit açısından zengin olduğu bilinmektedir. Klorojenik asidin antiseptik,

antioksidan, antienflamatuar, antipiretik, antiviral ve anti-mikrobiyal ajan olarak birçok hastalığın tedavisinde kullanımı ve yara iyileşmesi üzerine etkinliği bilinmektedir.

Klorojenik asitlerin kuvvetli antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bağdaş ve ark⁵⁴ yaptıkları çalışmada, klorojenik asit tedavisinin yara iyileşmesi ve oksidatif stres belirteçleri üzerindeki potansiyel rolünü ve tedavinin vital organlar ve kemik iliği üzerine yan etkileri olup olmadığını deneysel yara modeli kullanarak in-vivo olarak araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada çeşitli dozlarda ıp olarak klorojenik asit uygulamışlar ve ilk kez klorojenik asit tedavisinin yara iyileşmesini hızlandırıldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada, klorojenik asidin yara bölgesinde malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeylerini azaltıp, indirgenmiş glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeylerini arttırdığı ve yara dokusunda hidroksiprolin içeriğini arttırdığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, klorojenik asit tedavisinin antioksidan savunmayı arttırarak yara iyileşmesini hızlandırıldığı düşünülmüştür. Ayrıca klorojenik asidin uzun süre yüksek doz kronik kullanımı ise karaciğer, böbrek ve kemik iliği üzerinde prooksidan etkiye bağlı olarak yan etkilere neden olabileceği gösterilmiştir ⁵⁴.

Yine Chen ve ark⁵⁵ tarafından klorojenik asit ile yapılan bir başka çalışmada, topikal klorojenik asit tedavisinin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmış ve klorojenik asidin yara kontraksiyonu üzerinde belirgin artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada klorojenik asidin, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyonu arttırarak ve lipid peroksidasyonunu azaltarak güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında (12-72 saat) TNF- α ve TGF- β seviyelerinin upregülasyonuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak çalışmada TNF- α ve TGF- β upregülasyonu yoluyla kollajen sentezini arttırarak ve antioksidan etkinliği ile yara iyileşmesi sürecini arttırdığı tespit edilmiştir ⁵⁵.

Bu bilgiler ışığında, klorojenik asit açısından zengin olduğu düşünülen *Helichrysumun* Erzurum yöresinde yetişen türü olan *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitkisinin yara iyileşmesi üzerine etkili olabileceği düşünülmektedir.

Yeni terepötik ajanların bulunması amacıyla çeşitli primer yada sekonder insan ya da murin (kemirgen) keratinosit ve fibroblast hücrelerinden elde hücre hatları ve yöntemler kullanılarak *in vitro* yara iyileşmesi modelleri kullanılabilir²⁰. Hücre kültürü çalışmalarında en sık kullanılan yara modellerinden biride *Scratch* deneyidir²². Bu amaçla çalışmamızda, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin ve klorojenik asidin yara iyileşmesi üzerine etkinliği *in vitro* şartlarda insan dermal fibroblast hücre dizini kullanılarak gösterilmesine karar verildi.

Çalışmamızda hücre canlılığı üzerine proliferatif etki çeşitli derişimlerde klorojenik asit (her bir kuyucukta final derişimi 10-1000 μ M derişimlerinde olacak şekilde) ve *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi (her bir kuyucukta final derişimi 0.1-1000 μ g/mL derişimlerinde olacak şekilde) kullanarak 24 ve 48 inkübasyonu takiben XTT testi ile değerlendirildi. XTT test sonuçlarına göre, 75-250 μ M doz aralığında klorojenik asidin ve 0.5 ve 10 μ M doz aralığında *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin doz bağımlı olarak önemli proliferatif etkiye sahip oldukları tesbit edildi.

Farklı özelliklerde ki oksidan türlerin tek tek ölçülmesi pahalı, zaman alıcı ve yoğun iş gücü gerektirmesi sebebiyle son yıllarda araştırmacılar tarafından kolay uygulanabilen, kısa süren, yüksek doğrusalılık gösteren güvenilir ve duyarlı bir yöntem olan TAS-TOS düzeylerinin ölçülmesi tercih edilir. Bu nedenle çalışmamızda da klorojenik asidin ve *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin oksidatif stres üzerine etkinlikleri TAS-TOS kiti kullanılarak değerlendirildi. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak doz bağımlı olarak antioksidan etkiye sahip oldukları gözlemlendi. Özellikle

100-250 μ M derişimlerinde klorojenik asidin ve yine 1-10 μ g/mL derişimlerinde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin kontrol grubu ile karşılaştırdığında önemli oranda TAS düzeyini arttırdığı görüldü. Bu sonuçların XTT sonuçları ile uyumlu olduğu tesbit edildi.

Klorojenik asidin ve *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin yara iyileşmesi üzerine etkileri ise *Scratch* deneyi kullanılarak değerlendirildi. Çalışmada, 50-250 μ M derişimlerinde klorojenik asidin hücre göçü üzerine belirgin etkiye sahip olduğu, özellikle 75-125 μ M derişimlerinde klorojenik asidin 12. saatte hücre göçünü arttırmaya başlayıp 24. saatte belirgin şekilde yara bölgesini kapattığı tesbit edildi. Özellikle 75-125 μ M derişimlerde klorojenik asidin hem hücre canlılığını hem antioksidan etkiye hemde yara iyileşmesinde en güçlü etkiye sahip olduğu ve bu sonuçlarda literatürle uyumlu olarak klorojenik asidin doz bağımlı olarak yara iyileştirici etkisinin antioksidan etkisine bağımlı olabileceğini gösterdi. Yine çalışmamızda 0.5-10 μ g/mL derişimlerde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin hücre göçü üzerine belirgin etkiye sahip olduğu, özellikle 1-5 μ g/mL derişimlerinde *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin 24. saatte belirgin şekilde yara bölgesini kapattığı tesbit edildi. Özellikle, 1-5 μ g/mL *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin hem hücre canlılığını hemde yara iyileşmesinde en güçlü etkiye sahip olduğu tesbit edildi. Bu çalışmada, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin ilk kez insan dermal hücre hattı kullanılarak yara iyileşmesi üzerine etkileri doz bağımlı uyarıcı etkiye sahip olduğu gösterildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda yara iyileşmesi üzerine etkinliği bilinen mevcut tedavilere alternatif olan yeni bitkisel ajanlar araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Bu nedenle, yeni bitkisel biyolojik ve kimyasal ajanlar geliştirilmesi üzerinde durulmaya başlanmıştır. Bu amaçla bu çalışmada *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin ve klorojenik asidin yara iyileşmesi üzerine etkinliği araştırıldı ve sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak klorojenik asidin daha geniş terapötik aralıkta antioksidan etkisine bağlı hücre göçünü artırdığını ve yara iyileşmesini hızlandırdığını ve insan dermal fibroblast hücre hattında doza bağlı proliferatif etki gösterdiğini gösterdi. Aynı zamanda sonuçlarımız *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinin daha düşük dozlarda ve terapötik aralığı daha dar olarak hücre göçünü artırdığını ve yara iyileşmesini hızlandırdığını ve insan dermal fibroblast hücre hattında ilk kez doza bağlı proliferatif etki gösterdiğini tesbit edildi. Bu durum, ekstre içinde klorojenik asit dışında diğer fenolik bileşikler içermesinden ve bu bileşiklerin yüksek derişimlerde prooksidan etkisi göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresi ve özellikle klorojenik asidin, yara iyileşmesinin tedavisinde tek başına veya diğer ilaçlar, bileşenler veya moleküller ile kombinasyon halinde mevcut tedavilere alternatif olacağı sonucuna varıldı. Fakat *H. plicatum* subsp. *pseudoplicatum* bitki ekstresinde klorojenik asidin izole edilerek in vitro ve in vivo yara modellerinde daha detaylı çalışmalarla etkinliğinin gösterilmesinin daha faydalı olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Raina R, Prawez S, Verma P, Pankaj N. Medicinal Plants and their Role in Wound Healing. *VetScan*, 2008, 3.
2. Demirci S, Özhatay N. An ethnobotanical study in Kahramanmaraş (Turkey); wild plants used for medicinal purpose in Andirin, Kahramanmaraş. *Turk J Pharm Sci*, 2012, 9: 75-92.
3. Umar DÇ, Damar HT. Akut ve Kronik Yaralar ve Hemşirelik Bakımı. *Türkiye Klinikleri Surgical Nursing-Special Topics*, 2017, 3: 157-163.
4. Falanga V. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2004, 32: 88-94.
5. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 1999, 341: 738-746.
6. Strodbeck F. Physiology of wound healing. *Newborn and infant nursing reviews*, 2001, 1: 43-52.
7. Archana D, Dutta J, Dutta P. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies. *International journal of biological macromolecules*, 2013, 57: 193-203.
8. O'toole E. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clinical and experimental dermatology*, 2001, 26: 525-530.
9. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 2003.
10. Öztöpalan DF, Recep I, Durmuş AS. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin rolü. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2017, 10: 83-88.
11. Baktır G. Wound Repair and Experimental Wound Models. *Experimed*, 9: 130-137.
12. Gence H. Fötal Yara İyileşmesi. 2008.

13. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 1997, 77: 509-528.
14. Waldrop J, Doughty D. Wound healing physiology. İçinde: *Acute and chronic wounds: Nursing management*, Mosby, 2000: 17-39.
15. Clark RA. Wound repair. İçinde: *The molecular and cellular biology of wound repair*, Springer, 1988: 3-50.
16. Levenson S, Geever E, Crowley L, Oates III J, Berard C, Rosen H. Healing of rat skin wounds. *Annals of surgery*, 1965, 161: 293.
17. Kerstein MD. The scientific basis of healing. *Advances in Skin & Wound Care*, 1997, 10: 30-36.
18. Cooper D In *Wound healing: new understandings*, Nurse Practitioner Forum, (editör).^(editörler). 1999; 74-86.
19. Martin M. Physiology of Wound Healing İçinde: Flanagan M (editör). *Wound healing and skin integrity: principles and practice*, 1. Baskı. UK., John Wiley & Sons, 2013: 35-36.
20. Villegas J, McPhaul M. Establishment and culture of human skin fibroblasts. *Curr Protoc Mol Biol*, 2005, Chapter 28: Unit 28.3.
21. Fedarko NS, D'Avis P, Frazier CR, Burrill MJ, Fergusson V, Tayback M, Sponseller PD, Shapiro JR. Cell proliferation of human fibroblasts and osteoblasts in osteogenesis imperfecta: influence of age. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 1705-12.
22. Muniandy K, Gothai S, Tan WS, Kumar SS, Mohd Esa N, Chandramohan G, Al-Numair KS, Arulselvan P. In Vitro Wound Healing Potential of Stem Extract of *Alternanthera sessilis*. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2018, 2018: 3142073-3142073.

23. Moreno-Arotzena O, Borau C, Movilla N, Vicente-Manzanares M, García-Aznar JM. Fibroblast Migration in 3D is Controlled by Haptotaxis in a Non-muscle Myosin II-Dependent Manner. *Annals of biomedical engineering*, 2015, 43: 3025-3039.
24. Bolla SR, Mohammed Al-Subaie A, Yousuf Al-Jindan R, Papayya Balakrishna J, Kanchi Ravi P, Veeraraghavan VP, Arumugam Pillai A, Gollapalli SSR, Palpath Joseph J, Surapaneni KM. In vitro wound healing potency of methanolic leaf extract of *Aristolochia saccata* is possibly mediated by its stimulatory effect on collagen-1 expression. *Heliyon*, 2019, 5: e01648-e01648.
25. Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC biotechnology*, 2004, 4: 21.
26. Köşlü A. Yara İyileşmesinde Tarihsel Gelişmeler.
27. Raina R, Parwez S, Verma P, Pankaj NJOVJ. Medicinal plants and their role in wound healing. 2008, 3: 21.
28. Süntar I, Akkol EK, Keles H, Yesilada E, Sarker SD. Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 149: 103-110.
29. Baytop T. *Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün*. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, 1999.
30. Akaberi M, Sahebkar A, Azizi N, Emami SA. Everlasting flowers: Phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*. *Industrial Crops and Products*, 2019, 138.

31. Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Hamzaoglu E. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*, 2010, 119: 114-122.
32. Gouveia SC, Castilho PC. Analysis of phenolic compounds from different morphological parts of *Helichrysum devium* by liquid chromatography with on-line UV and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up- to- the- Minute Research in Mass Spectrometry*, 2009, 23: 3939-3953.
33. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, FangFang X, Modarresi-Ghazani F. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 97: 67-74.
34. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum*'un gıda patojeni *Escherichia coli* O157:H7 üzerine etkisi, Yüksek lisans Tezi, AYŞEGÜL DEMİR. 2005.
35. Smirnov VV, Preobrazhenskaya NE, Kalashnikov ID. Antibacterial properties of *Helichrysum plicatum* DC. *Mikrobiol. Zh. (Kiev)*, 1982, 44: 71-2.
36. Demir A, Taban BM, Aslan M, Yesilada E, Aytac SA. Antimicrobial effect of *Helichrysum plicatum* subsp. *plicatum*. *Pharm. Biol. (London, U. K.)*, 2009, 47: 289-297.
37. Steenkamp V, Mathivha E, Gouws M, Van Rensburg C. Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. *Journal of ethnopharmacology*, 2004, 95: 353-357.

38. Aslan M, Deliorman OD, Orhan N, Sezik E, Yesilada E. In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* capitulum in streptozotocin-induced-diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 2007, 109: 54-9.
39. Bigovic D, Savikin K, Jankovic T, Menkovic N, Zdunic G, Stanojkovic T, Djuric Z. Antiradical and cytotoxic activity of different *Helichrysum plicatum* flower extracts. *Nat. Prod. Commun.*, 2011, 6: 819-822.
40. Albayrak S, Aksoy A, SAĞDIÇ O, BUDAK Ü. Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from eastern Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 2010, 34: 463-473.
41. Bigović D, Šavikin K, Janković T, Menković N, Zdunić G, Stanojković T, Djurić Z. Antiradical and cytotoxic activity of different *Helichrysum plicatum* flower extracts. *Natural Product Communications*, 2011, 6: 1934578X1100600617.
42. Kolaylı S, Sahin H, Ulusoy E, Tarhan Ö. Phenolic composition and antioxidant capacities of *Helichrysum plicatum*. *Hacettepe J Biol Chem*, 2010, 38: 269-276.
43. Aslan M, Orhan DD, Orhan N, Sezik E, Yesilada E. In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* capitulum in streptozotocin-induced-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 109: 54-59.
44. Wang X, Wang J, Yang NJFc. Chemiluminescent determination of chlorogenic acid in fruits. 2007, 102: 422-426.
45. Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules*, 2017, 22: 358.

46. Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding MJJoBC. Inhibition of activator protein-1, NF- κ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. 2005, 280: 27888-27895.
47. Zhong C, Wall NR, Zu Y, Sui GJCmc. Therapeutic application of natural medicine monomers in cancer treatment. 2017, 24: 3681-3697.
48. Plazas M, Andujar I, Vilanova S, Hurtado M, Gramazio P, Herraiz FJ, Prohens J. Breeding for chlorogenic acid content in eggplant: interest and prospects. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2013, 41: 26-35.
49. Ahangarpour A, Sayahi M, Sayahi M. The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2019, 13: 854-857.
50. Gouveia SC, Castilho PC. Validation of a HPLC-DAD–ESI/MSn method for caffeoylquinic acids separation, quantification and identification in medicinal *Helichrysum* species from Macaronesia. *Food Research International*, 2012, 45: 362-368.
51. Tousch D, Lajoix A-D, Hosy E, Azay-Milhau J, Ferrare K, Jahannault C, Cros G, Petit P. Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008, 377: 131-135.
52. Yukawa G, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang X-M, Iwahashi H, Sakamoto W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, 69: 70-74.

53. Laranjinha JA, Almeida LM, Madeira VM. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical pharmacology*, 1994, 48: 487-494.
54. Bagdas D, Gul NY, Topal A, Tas S, Ozyigit MO, Cinkilic N, Gul Z, Etoz BC, Ziyank S, Inan S. Pharmacologic overview of systemic chlorogenic acid therapy on experimental wound healing. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2014, 387: 1101-1116.
55. Chen W-C, Liou S-S, Tzeng T-F, Lee S-L, Liu IM. Effect of Topical Application of Chlorogenic Acid on Excision Wound Healing in Rats. *Planta medica*, 2013, 79.
56. Gouveia SC, Castilho PC. Characterization of phenolic compounds in *Helichrysum melaleucum* by high- performance liquid chromatography with on- line ultraviolet and mass spectrometry detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, 24: 1851-1868.
57. Gouveia S, Castilho PC. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD–(–)–ESI–MSn method. *Food Chemistry*, 2011, 129: 333-344.
58. Silva L, Rodrigues AM, Ciriani M, Falé PLV, Teixeira V, Madeira P, Machuqueiro M, Pacheco R, Florêncio MH, Ascensão L. Antiacetylcholinesterase activity and docking studies with chlorogenic acid, cynarin and arzanol from *Helichrysum stoechas* (Lamiaceae). *Medicinal Chemistry Research*, 2017, 26: 2942-2950.
59. Pereira CG, Barreira L, Bijttebier S, Pieters L, Neves V, Rodrigues MJ, Rivas R, Varela J, Custódio L. Chemical profiling of infusions and decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and in vitro biological activities comparatively with green tea (*Camellia sinensis*) and rooibos tisane

- (*Aspalathus linearis*). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 145: 593-603.
60. Gradinaru AC, Silion M, Trifan A, Miron A, Aprotosoia AC. *Helichrysum arenarium* subsp. *arenarium*: phenolic composition and antibacterial activity against lower respiratory tract pathogens. *Natural Product Research*, 2014, 28: 2076-2080.
61. Unger KK, Ditz R, Machtejevas E, Skudas R. Liquid chromatography—its development and key role in life science applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49: 2300-2312.
62. Ferruzzi MG, Sander LC, Rock CL, Schwartz SJ. Carotenoid determination in biological microsamples using liquid chromatography with a coulometric electrochemical array detector. *Analytical Biochemistry*, 1998, 256: 74-81.
63. Roupe KA. *Pharmacometrics of selected stilbenes: Piceatannol, pinosylvin, and rhapontigenin*. Baskı. Washington State University, 2005.
64. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of instrumental analysis*. Baskı. Cengage learning, 2017.
65. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*. 10. Baskı. Gazi Kitabevi, Ankara, 2007.
66. Weston A, Brown PR. *High performance liquid chromatography & capillary electrophoresis: principles and practices*. Baskı. Elsevier, 1997.
67. Brereton RG. *Multivariate pattern recognition in chemometrics: illustrated by case studies*. Baskı. Elsevier, 1992.
68. Dinç E. Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2007: 61-92.
69. Serbest H. N, N'-Bis (5-Bromo-salisiliden)-etilendiamin ligandı kullanılarak yenilebilen sıvı yağlardan bakır, demir, nikel ve çinko ekstraksiyonu ve FAAS ile tayini. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012.

70. Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J, Bergman R. Experimental design and optimization. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 1998, 42: 3-40.
71. Kumar A, Jawla S, Yadav G. Recent Analytical Method Developed by RP-HPLC. *Global Journal of Pharmacology*, 2013, 7: 232-240.
72. FDA U. Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services. *Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV)*, 2001.
73. Riley CM, Rosanske TW. *Development and validation of analytical methods*. Baskı. Elsevier, 1996.
74. Prof. Dr. Velittin Gürgün DDKH. *Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri*
2. Baskı Baskı. Ankara, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 1990.
75. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 2004, 37: 112-119.
76. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, 2004, 37: 112-9.
77. Pillouer- Prost AL. Fibroblasts: what's new in cellular biology? *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 2003, 5: 232-238.
78. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 1997, 276: 75-81.
79. Micozzi MS. *Fundamentals of complementary and alternative medicine-E-book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2014.
80. Bodeker G, Ong C-K. *WHO global atlas of traditional, complementary and alternative medicine*. Baskı. World Health Organization, 2005.

81. Rigglin RM, Kissinger PT. Determination of tetrahydroisoquinoline alkaloids in biological materials with high performance liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 1977, 49: 530-533.
82. Aslan M. *Helichrysum licatum* ssp. *plicatum* Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Yüksek Lisan tezi*, 1994.
83. Erhan EH, Hamzaoglu E, Aksoy A, Budak Ü. The genotoxic and antimitotic properties of *Helichrysum plicatum* herbal teas widely consumed in turkey. *Caryologia*, 2010, 63: 376-381.
84. Aiyegoro OA, Afolayan AJ, Okoh AI. Synergistic interaction of *Helichrysum pedunculatum* leaf extracts with antibiotics against wound infection associated bacteria. *Biological Research*, 2009, 42: 327-338.
85. Viegas DA, Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 151: 54-65.
86. Akaberi M, Sahebkar A, Azizi N, Emami SA. Everlasting flowers: Phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*. *Industrial Crops and Products*, 2019, 138: 111471.
87. van den Berg RA, Hoefsloot HC, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC genomics*, 2006, 7: 142.
88. Niu Z, Zhang W, Yu C, Zhang J, Wen Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 102: 123-146.

89. Baran EK. [N, N'-bis (salisiliden)-2, 2'-dimetil-1, 3-propandiamin] komplekslerinden yararlanılarak zeytinyağında metal analizleri. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.
90. Sarandy MM, Novaes RD, Xavier AA, Vital CE, Leite JP, Melo FC, Gonçalves RV. Hydroethanolic extract of *Strychnos pseudoquina* accelerates skin wound healing by modulating the oxidative status and microstructural reorganization of scar tissue in experimental type I diabetes. *BioMed Research International*, 2017, 2017.
91. Zhong C, Wall NR, Zu Y, Sui G. Therapeutic application of natural medicine monomers in cancer treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 2017, 24: 3681-3697.
92. Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. Inhibition of activator protein-1, NF- κ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 27888-27895.
93. Sun BK, Siprashvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*, 2014, 346: 941-945.
94. Scholl UI, Dave HB, Lu M, Farhi A, Nelson-Williams C, Listman JA, Lifton RP. SeSAME/EAST syndrome—phenotypic variability and delayed activity of the distal convoluted tubule. *Pediatric nephrology*, 2012, 27: 2081-2090.
95. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2012, 26: 812-820.
96. Diegelmann RF. From the selected works of Robert F. Diegelmann Ph. D. *Front biosci*, 2004, 9: 283-289.

97. Berger MM, Binnert C, Chiolerio RL, Taylor W, Raffoul W, Cayeux M-C, Benathan M, Shenkin A, Tappy L. Trace element supplementation after major burns increases burned skin trace element concentrations and modulates local protein metabolism but not whole-body substrate metabolism. *The American journal of clinical nutrition*, 2007, 85: 1301-1306.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Abdalbaki AKPINAR Doğum Tarihi: 04.08.1989 Doğum Yeri: ERZURUM Medeni Hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Bilim Dalı 25240 ERZURUM Tel: 0442 231 52 00 Faks: 0442 231 52 01 E-mail: abdalbakiakpnar@gmail.com
Eğitim
Lise: Erzurum Lisesi (2006) Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya (2010-2014) Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Bilim Dalı (2017-2020) Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta Derecede Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Özel Eğitim ve Öğretim Kurslarında Kimya Öğretmenliği (2016-2020)
İlgi Alanları ve Hobiler
Kitap Okuma, Türk Sanat Musikisi

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans tezi olarak Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU danışmanlığında sunulan “*HELİCHRYSUM PLİCATUM* subsp. *PSEUDOPLİCATUM* BİTKİ EKSTRESİNDEKİ KLOROJENİK ASİTİN HPLC YÖNTEMİ İLE ANALİZİ VE BİTKİ EKSTRESİNİN YARA İYİLEŞTİRME ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez bölümleri	Tezin benzerlik oranı (%)	Max oran (%)
Giriş ve Amaç	%0	15
Genel bilgiler	%15	30
Materyal metod	%9	35
Bulgular	%6	10
Tartışma	%8	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz 31/08/ 2020

Öğrenci Adı-Soyadı

Danışman Adı Soyadı

İmza

İmza

Abdülbaki AKPINAR

Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU



* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. BİRİM ETİK KURULU KARARI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Birim Etik Kurulu

Sayı : 93722986.12/ 01
Konu: Birim Etik Kurul Kararı

03/04/2019

Sayın: Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

İlgi: 01.04.2019 tarih ve 1900107630 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Birim Etik Kurulunun 03.04.2019 tarihinde almış olduğu 03 numaralı karar ile danışmanı olduğunuz Yüksek Lisans öğrencisi Abdülbaki AKPINAR'ın "Helichrysum plicatum subsp. Pseudoplicatum bitki ekstresindeki klorojenik asitin HPLC yöntemi ile analizi ve bitki ekstresinin yara iyileştirmesi üzerine etkisinin in vitro olarak incelenmesi" başlıklı çalışma etik kurulunuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
Başkan

Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Üye

Prof. Dr. Halise İnci GÜL
Üye

Prof. Dr. Yasin BAYIR
Üye

Doç. Dr. Beyzağül POLAT
Üye

Karar -3- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'nun danışmanı olduğu Yüksek Lisans öğrencisi Abdülbaki AKPINAR'ın Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yürüteceği "Helichrysum plicatum subsp. Pseudoplicatum bitki ekstresindeki klorojenik asitin HPLC yöntemi ile analizi ve bitki ekstresinin yara iyileştirmesi üzerine etkisinin in vitro olarak incelenmesi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 01.04.2019 tarih ve 1900107630 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.