

**SIĞALA (*Liquidambar orientalis* Miller)
UÇUCU BİLEŞENLERİNİN KİMYASI VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

Betül Büyükkılıç
Yüksek Lisans Tezi

**SİĞALA (*Liquidambar orientalis* Miller)
UÇUCU BİLEŞENLERİNİN KİMYASI VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

Betül Büyükkılıç

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Eskişehir, Mart 2013

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Betül Demirci

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1202S036).

Bilimsel Etkinlikler

Burslar	:TÜBİTAK Yurt İçi Bilimsel Etkinlikleri Destekleme Bursu (20. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Antalya, 10-13 Ekim 2012.)
Projeler	:“Sistatin’in İzolasyonu Karakterizasyonu ve Antibakteriyal Etkilerinin İncelenmesi” AÜBAP Projesinde Bursiyer, 01.07.2011-30.06.2012
Katılınan toplantılar	:20. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Antalya, 10-13 Ekim 2012.
Katılınan eğitim programları	:İlkyardım Eğitimliği Programı, Ankara, 12-19 Mayıs 2009
Dinleyici Olarak Katılınan Sempozyumlar	:Antiviral Kemoterapinin Gelişimi/ Molekülerden Tıbbı, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 28 Eylül 2009

ÖNSÖZ

Sığıla ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.), Türkiye'nin güney-batısında yayılış gösteren relik endemik bir türdür. Ekolojik ve biyocoğrafik öneminin yanı sıra, ağacın gövde kabuğunun yaralanması sonucu sığıla balzamu (*Styrax Liquidus*) elde edilmesi nedeniyle ekonomik açıdan da önemli bir türdür. 20. yüzyılın başlarında 6321 ha'lık bir alanda dağılım gösteren tür, ~ % 80'lik bir daralma ile günümüzde 1337 ha'lık bir alanda sınırlı kalmıştır.

Tez çalışmamızda balzamin ve uçucu yağının antiinflamatuvar etkisinin *in vitro* lipooksijenaz (LOX) ve siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyon aktiviteleri ile incelenmesi, uçucu yağın bileşiminin ve katı faz mikroekstraksiyon yöntemiyle elde edilen uçucu bileşiklerin Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) ile analiz edilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda uçucu yağın *Helicobacter pylori* üzerinde antimikrobiyal etkisi incelenmiştir.

Tez konusunun belirlenmesinde, yüksek lisans eğitimim süresince tüm çalışmalarında yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri ile sabır ve hoşgörülerini benden esirgemeyen, sevgi ve saygı duyduğum değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Betül Demirci'ye, yardımlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Neşe Kırimer'e, enzim aktivite çalışmalarında yardımcı olan, değerli zamanını ayıran Sayın Yrd. Doç. Dr. Halide Edip Temel'e, antimikrobiyal çalışmalarla ilgili sağladığı imkanlardan dolayı Sayın Prof. Dr. Fatih Demirci'ye, yüksek lisans eğitimim boyunca teorik derslerimde değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan tüm Anadolu Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyelerine, anti-*Helicobacter pylori* aktivite çalışmasında destek ve yardımlarını gördüğüm Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Nilgün Kaşifoğlu'na, yüksek lisansa başladığım günden bugüne, desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Hale Gamze Duymuş ve Araş. Gör. Hülya Tuba Kıyan ile değerli ağabeyim Uzm. Fatih Göger'e,

Hayatımın her anında bana destek olan, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim canım anneme, babama ve ağabeyime, hep yanımda oldukları, bana güvendikleri için sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Betül Büyükkılıç

SIĞALA (*Liquidambar orientalis* Miller) UÇUCU BİLEŞENLERİNİN KİMYASI VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Sığala balzamu genellikle tıbbi ve teknik açıdan değerlendirilmektedir. Tıpta yaraların tedavi edilmesinde, astım, bronşit gibi üst solunum yolu hastalıklarında buharla dezenfeksiyon, balgam söktürücü olarak toz ve pastil, mantar ve uyuz gibi cilt hastalıklarında pomat ve yakı halinde kullanılmaktadır. Sığala balzamu antiseptik ve parazit öldürücüdür. Ayrıca ülser hastalığında ağrı dindirici olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada, sığala balzamından su distilasyonu yöntemi ile elde edilen uçucu yağın bileşiminin yanı sıra katı faz mikroekstraksiyon (Solid phase microextraction (SPME)) yöntemiyle balzamda bulunan uçucu bileşenlerin Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) ile analizi yapılarak, elde edilen uçucu yağın ve balzamin antiinflamatuvar etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Antiinflamatuvar aktiviteler *in vitro* lipooksijenaz (LOX) ve siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyonu yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca uçucu yağın, agar dilüsyon yöntemiyle *Helicobacter pylori* üzerinde antimikrobiyal etkisi incelenmiştir.

İnflamasyon (yangı), tehlikeli ve zararlı iç ve dış uyarılara karşı verilen doğrudan bir yanıt olup organizmayı korumaya yönelik mekanizmalardan biridir. İnflamasyonda çeşitli hücre ve mediyatörler rol alır. İnflamasyon günümüzün en büyük sağlık problemlerinden biridir ve tıbbın hemen her branşını yakından ilgilendirmektedir. Antiinflamatuvar etki, yangısal reaksiyonu diğer mediyatörlerin aksine baskılar. Vücutta doğal antiinflamatuvar mediyatörler olduğu gibi dışardan alınan birçok etken maddenin de antiinflamatuvar etkisi vardır. Bu maddeler inflamasyondan sorumlu olan mediyatörlerin sentezini azaltarak antiinflamatuvar etkinlik gösterirler.

GK ve GK/KS analizleri sonucunda uçucu yağın ana bileşikleri olarak stiren (%84.6), α -pinen (%8.3) ve β -pinen (%2.1) bulunurken, SPME yöntemi ile balzam uçucu bileşenleri olarak stiren (%75.0), benzen propanol (%9.5) ve 4-etil fenol (%4.5) tespit edilmiştir. Enzim aktivite deneyleri sonucunda, uçucu yağın LOX inhibisyonunda IC₅₀ değeri 50.33±3.22 μ g/mL olarak hesaplanıp, zayıf-orta antiinflamatuvar etki gösterdiği görülmüştür. Balzam ve uçucu yağın 200 μ g/mL'lik konsantrasyonlarının COX inhibisyonu göstermediği görülmüştür. Uçucu yağın, agar dilüsyon yöntemiyle 2222.2 μ g/mL konsantrasyonda anti-*Helicobacter pylori* etkisi olmadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Liquidambar orientalis*, uçucu yağ, balzam, antiinflamatuvar, lipooksijenaz (LOX), siklooksijenaz (COX), *Helicobacter pylori*.

INVESTIGATION OF SWEETGUM (*Liquidambar orientalis* Miller) CHEMISTRY OF ESSENTIAL COMPONENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES

ABSTRACT

Oriental sweetgum or Turkish sweetgum balsam is generally evaluated from medically and technically. In medicine, it is used to treat of wounds, asthma, bronchitis, upper respiratory tract diseases, such as fumigation and an expectorant in the form of powder and pastille, skin diseases like scabies and fungal in the form of pomade and plaster. Sweetgum balsam is antiseptic and parasiticide. In addition, it is evaluated to be pain-killers for ulcer disease.

In this present study, the essential oil of sweetgum balsam was obtained by hydro distillation. Composition of the essential oil and volatile components which were obtained by the solid phase microextraction (SPME) method were determined by using Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). This study was aimed to investigate the anti-inflammatory effects of the essential oil and balsam. Anti-inflammatory activities were investigated by *in vitro* lipoxygenase (LOX) and cyclooxygenase (COX) enzyme inhibition methods. In addition, antimicrobial effect of essential oil was examined on *Helicobacter pylori* with agar dilution method.

Inflammation is a direct response to be one of the mechanisms to protect the organism against dangerous and harmful internal and external stimuli. In inflammation, variety cells and mediators play role. Inflammation is one of the most important health problem and in almost every branch of medicine are closely related. Anti-inflammatory activity suppress inflammatory reaction unlike other mediators. Although there are natural anti-inflammatory mediators in the body, many active ingredient which are taken from outside, have anti-inflammatory effect. These substances show anti-inflammatory activity by reducing the synthesis of inflammation mediators.

In result of GC and GC/MS analysis of the essential oil, the main compounds were determined as styrene (84.6%), α -pinene (8.3%) and β -pinene (2.1%), balsam volatile components were identified as styrene (75.0%), benzene propanol (9.5%) and 4-ethyl phenol (4.5%) by SPME method. In results of enzyme activity assays, essential oil showed anti-inflammatory activity with weak-medium effect and LOX inhibition IC_{50} value was calculated as 50.33 ± 3.22 $\mu\text{g/mL}$. Balsam and essential oil didn't inhibit COX in the 200 $\mu\text{g/ml}$ concentrations. Essential oil wasn't showed the effect of anti-*Helicobacter pylori* by agar dilution method in the 2222.2 $\mu\text{g/ml}$ concentration.

Keywords: *Liquidambar orientalis*, essential oil, balsam, anti-inflammatory, lipoxygenase (LOX), cyclooxygenase (COX), *Helicobacter pylori*.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
<i>Liquidambar orientalis</i> 'in Botanik Özellikleri	2
Sığala Balzamının Elde Edilişi	4
Sığala Balzamının Bileşimi	5
Sığala Balzamının Kullanımı ve Biyolojik Etkileri	5
İNFLAMASYON (YANGI/İLTİHAP)	9
Siklooksijenaz Yolağı	10
Lipooksijenaz Yolağı	11
Lökotrienlerin Biyolojik Etkileri	11
Antiinflamatuvar Etkili Bitkisel Kaynaklı Doğal Bileşikler	13
<i>Helicobacter pylori</i>	14
GEREÇLER ve YÖNTEMLER	15
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyaller, Kimyasal	15

Madde ve Gereçler	
<i>Bitkisel Materyal</i>	15
<i>Kullanılan Kimyasallar</i>	15
<i>Kullanılan Cihaz ve Apeyler</i>	16
Deneysel Çalışmalar ve Yöntemler	16
Su Distilasyonu	16
Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) ile Uçucu Yağın Kimyasal Analizi	17
<i>GK Analiz Koşulları</i>	18
Katı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi (SPME)	18
Kolon Kromatografisi	21
AKTİVİTE ÇALIŞMALARI	22
<i>In vitro</i> Lipooksijenaz (LOX) İnhibisyonu	22
<i>In vitro</i> Siklooksijenaz (COX) Enzim İnhibisyonu	23
COX Reaksiyon Prosedürü	24
EIA Prosedürü	25
COX Reaksiyonlarının Dilüsyonları	26
Analiz Prosedürü	27
Sonuçların Hesaplanması	28
<i>Anti-Helicobacter pylori</i> Aktivitesi	28
BULGULAR ve TARTIŞMA	31
Uçucu Yağın Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Sonucu	31
SPME – GK/ KS Analiz Sonucu	31
Aktivite Çalışmaları Sonuçları	32
<i>In vitro</i> LOX İnhibisyonu Sonuçları	32
Kolon Kromatografisi Sonuçları	33

<i>In vitro</i> COX İnhibisyonu Sonuçları	33
Anti-<i>Helicobacter pylori</i> Aktivite Sonucu	35
SONUÇ VE ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE ADI VE NO	SAYFA	
Çizelge 1	<i>Liquidambar orientalis</i> Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi	8
Çizelge 2	<i>Liquidambar styraciflua</i> Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi	8
Çizelge 3	Bitkisel Kaynaklı Bazı Antiinflamatuvar Bileşikler	13
Çizelge 4	<i>Helicobacter pylori</i> Duyarlılık Testi İçin Önerilen Standart Yöntemler	14
Çizelge 5	Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	15
Çizelge 6	Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Apeyler	16
Çizelge 7	Uçucu Yağ ve Standart Çözeltilerin Konsantrasyonları	23
Çizelge 8	Deneyin Uygulandığı Mikropleyt	27
Çizelge 9	Mikropleyte İlave Edilen Reaktif Miktarları	27
Çizelge 10	Styrax Liquidus Uçucu Bileşikleri	31
Çizelge 11	Styrax Liquidus'un SPME Sonucunda Tanımlanan Uçucu Bileşikleri	31
Çizelge 12	"Myassays Analysis Software" Programı Analiz Sonuçları	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA	
Şekil 1	Sığıla Yaprağı, Erkek ve Dişi Çiçekler, Olgunlaşmamış Meyvesi, Olgunlaşmış Meyvesi	2
Şekil 2	Yıllara Göre Sığıla Yağı Üretimi	3
Şekil 3	Stiren	7
Şekil 4	Araşidonik Asit Metabolizması	10
Şekil 5	Clevenger Apareyi	17
Şekil 6	Styrax Liquidus	17
Şekil 7	Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS)	17
Şekil 8	Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME) ile Ekstraksiyon Aşaması	19
Şekil 9	SPME ile Desorpsiyon Aşaması	19
Şekil 10	SPME Enjektörü	19
Şekil 11	SPME Yöntemi	20
Şekil 12	SPME Yöntemi – GK Analizi	20
Şekil 13	Kolon Kromatografisi	21
Şekil 14	Kuvartz Küvet ve Spektrofotometre Cihazı	22
Şekil 15	PG Standartların Hazırlanışı	26
Şekil 16	Agar Dilüsyon Yöntemi ile Anti- <i>Helicobacter pylori</i> Aktivitesi	30
Şekil 17	McFarland Cihazı, SF Solüsyonları ve Anaerobik Kavanoz	30
Şekil 18	Sığıla Uçucu Yağı IC ₅₀ Grafikleri	32
Şekil 19	NDGA IC ₅₀ Grafikleri	32
Şekil 20	Stiren-LOX İnhibisyonu Grafiği	33
Şekil 21	Standartların PG Konsantrasyonlarına Karşı Yüzde Bağlanmalarını Gösteren Grafik	33
Şekil 22	<i>Helicobacter pylori</i> Mikroskopik Görüntüsü	35
Şekil 23	<i>Helicobacter pylori</i> 60 mm'lik Petrideki Görüntüsü	35
Şekil 24	Hızlı üreaz, Katalaz ve Oksidaz Testleri	35

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
AChE	: Asetilkolinesteraz
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CCUG	: Göteborg Üniversitesi Kültür Koleksiyonu
COX	: Siklooksijenaz
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
CYP450	: Sitokrom P ₄₅₀
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EET	: Epoksieikozatrienoik Asit
EIA	: Enzim İmmunoassay Yöntemi
EUFORGEN	: Avrupa Orman Genetik Kaynakları Programı
FID	: Alev İyonlaşma Dedektörü
g	: Gram
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GK	: Gaz Kromatografisi
GK/KS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi
HCl	: Hidroklorik Asit
HEME	: Fe-protoporfirin-IX
HETE	: Hidroksieikosatetraenoik Asit
HPETE	: Hidroperoksieikozatetraenoik Asit

http	: Hiper Metin Transfer Protokolü
IC ₅₀	: Maksimum İnhibisyonun % 50'sini Oluşturan Madde Konsantrasyonu
IgG	: İmmünglobülin G
IUCN	: Uluslararası Doğa Koruma Birliği
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum Hidrojen Fosfat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
KOH	: Potasyum Hidroksit
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LOX	: Lipooksijenaz
LT	: Lökotrien
LX	: Lipoksin
M	: Molar
MALToma	: Mide Mukoza Lenfoid Doku Lenfoması
mg	: Miligram
MHA	: Müeller–Hinton Agar
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
NCCLS	: Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi
NDGA	: Nordihidroguaiaretik Asit
NSAİ	: Nonsteroidal Antiinflamatuvar
OD	: Optik Dansitometre
PDMS/DVB	: Polidimetilsiloksan/Divinilbenzen
PG	: Prostaglandin

PGD ₂	: Prostaglandin D ₂
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	: Prostaglandin F _{2α}
pH	: Hidrojen İyonu Konsantrasyonunun Negatif Logaritması
PGH ₂	: Prostaglandin H ₂
PGHS	: Prostaglandin Endoperoksit Hidrojen Sentaz
PGI ₂	: Prostatiklin
SF	: Serum Fizyolojik
SnCl ₂	: Stannöz Klorür
SPME	: Katı Faz Mikroekstraksiyon
TX	: Tromboksan
TXA ₂	: Tromboksan A ₂
U	: Enzim Ünitesi
UV	: Ultra Viyole (Mor Ötesi Işık)

GİRİŞ ve AMAÇ

Liquidambar orientalis Miller (Sığala ağacı, Günlük ağacı) Türkiye'ye özgü endemik ve relikt bir tür olup, Hamamelidaceae familyasının ülkemizdeki tek üyesidir, Güneybatı Anadolu'da yetişir. Ağacın gövde kabuğunun yaralanması sonucu sığala balzamu elde edilir (Tanker ve Sayron, 1974). Tarihte, Mısır Kraliçesi Kleopatra'nın "aşk iksiri" ve parfüm olarak kullandığı sığala yağı, Hipokrat döneminden beri ilaç olarak da kullanılmıştır. Eski Mısırlılar sığala yağını mumyalama işlemleri sırasında kullanmışlardır. Batmış Fenike gemilerinden çıkarılan içi sığala yağı dolu amforalar geçmişte sığala yağının Akdeniz ticaretinde önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir (Deniz, 2010).

Sığala balzamu halk arasında yaraların tedavi edilmesinde, astım, bronşit gibi üst solunum yolu hastalıklarında buharla dezenfeksiyon, balgam söktürücü olarak toz ve pastil, mantar ve uyuz gibi cilt hastalıklarında pomat ve yakı halinde ayrıca ülser hastalığında ağrı dindirici olarak kullanılmaktadır. Sığala yağı antiseptik ve parazit öldürücüdür (Baytop, 1999).

Sığala yağından sabun ve parfüm sanayiinde fiksator olarak, tütüne koku vermede, verniklerde, ayrıca yağı alınmış yongalarından ise cami ve kiliselerde tütsüleme amacı ile yararlanılmaktadır (Velioğlu ve ark., 2008).

Antiinflatuvar ilaçlar yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Bu tür ilaçlar etkili olmalarına rağmen uzun süre kullanıldığında ciddi yan etkilere neden olurlar. Bitkisel ilaçlar nispeten daha az yan etkileri nedeniyle giderek daha popüler hale gelmektedir. Antik çağlardan beri bitkilerde bulunan fitokimyasallar inflamatuvar süreci kısaltmak için kullanılmaktadırlar. Örneğin, söğüt ağacı kabuğu, Yunanlılar ve Romalılar tarafından 2400 yıl önce ağrı kesici ve ateş düşürücü ilaç olarak kullanılmıştır. Aspirinin 1899 yılında keşfi, bu gözleme dayanır.

Bu tez kapsamında *in vitro* lipooksijenaz (LOX) ve siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyonu yöntemleri kullanılarak balzamin ve uçucu yağının antiinflatuvar etkisi ilk defa incelenmiş, yanısıra katı faz mikroekstraksiyon yöntemiyle ve su distilasyonu yöntemiyle elde edilen uçucu bileşenlerin Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) analizleri gerçekleştirilmiştir.

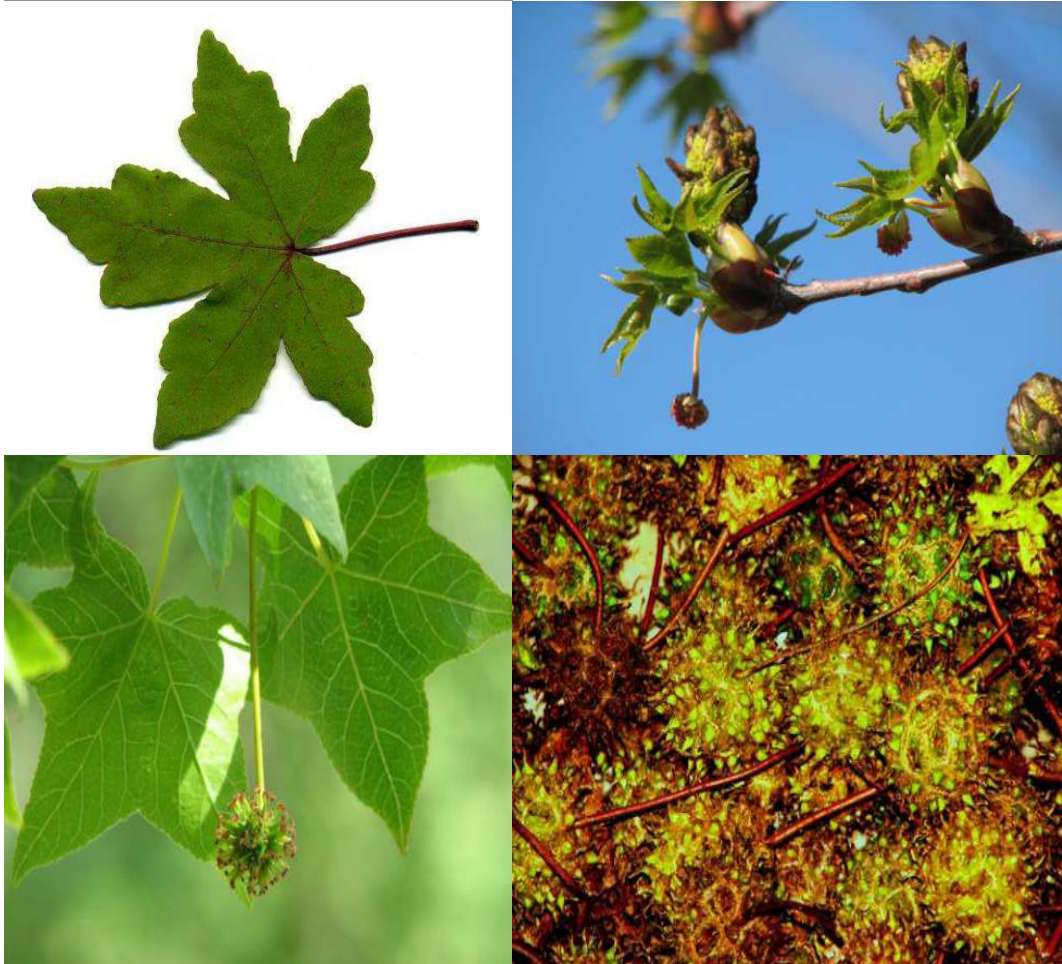
Bu çalışma kapsamında *Styrax Liquidus*'un geleneksel tıbbi kullanımdan yola çıkarak balzamin ve uçucu yağının antiinflatuvar etkisi araştırılmıştır. *Helicobacter pylori* üzerinde de uçucu yağın antimikrobiyal etkisi incelenmiştir.

KAYNAK BİLGİSİ

Liquidambar orientalis'in Botanik Özellikleri

Anadolu sığalası, günlük ağacı ya da sıgala ağacı olarak bilinen *Liquidambar orientalis*, Hamamelidaceae familyasının Bucklandioidae alt familyasının, *Liquidambar* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren tek türüdür. *Liquidambar*; Latince *liquidus*, Arapça amber sözcüklerinin birleşmesinden meydana gelmiş, güzel kokulu sıvı demektir (Velioglu ve ark., 2008).

Liquidambar orientalis, geniş tepeli, çok dallı, genellikle 30-35 metreye kadar uzayabilen ve 200-300 yıl yaşayabilen, çınar görünüşünde, yaprak döken monoik bir ağaçtır. Yaprakları çınarinkinden daha küçük ve açık renkli olup alternan dizilişte, palmat, ince uzun saplı ve stipulasızdır. Lamina 3-7 lopludur, lopların kenarları keskin dişlidir.



Şekil 1. Sığala Yapağı, Erkek ve Dişi Çiçekler, Olgunlaşmamış Meyvesi, Olgunlaşmış Meyvesi

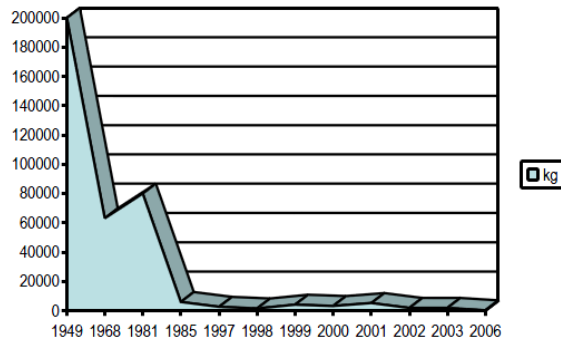
Gençken kabuklar çatlaksız, grimsi renkte, yaşlı iken çatlaklı, grimsi-kahverengi veya kahverengidir. Erkek çiçekler salkım, dişi çiçekler sarkık kürecikler şeklindedir ve mart-nisan aylarında açarlar. Meyveleri küresimsi, odunlaşmış, septisit kapsül şeklindedir (Şekil 1). Kasım-aralık aylarında olgunlaşırlar.

Tohumları 4-5 mm uzunluğunda, oval, yassı ve kısa kanatlıdır, rüzgar ile yayılırlar (Kaya, 2005).

Sığala ağaçlarının sürgün verme kabiliyetleri çok yüksek olmasının yanında tohumdan ve filizden yetiştirilebilmesi sığala ormanların gençleştirilmesi açısından çok önemlidir (Fıçıcıoğlu, 1988).

Tür, jeolojik dönemler içerisinde 4. zamandaki Buzul çağından önce Kuzey Amerika ve Avrasya’da geniş bir yayılma alanına sahipken Buzul çağından sonra bugünkü yayılış sahalarına çekilmiştir. Bunun nedeni Anadolu’da buzullaşmanın daha az hissedildiği, korunaklı ve nemli-sıcak iklim koşullarının hüküm sürdüğü yerlerin bulunmasıdır (Ketenoğlu ve ark., 2003). Ülkemiz için relict ve endemik tür oluşu ile bir dünya mirası olan sığala ağacı, Aydın, Çine Çayı boyunca, Datça-Marmaris Yolu, Marmaris, Kaş-Kalkan, Antalya-Sini Çayı, Burdur-Bucak, Fethiye ve Köyceğiz’de dağılım göstermektedir (Davis, 1972). Ekolojik özelliklerinden dolayı sınırlı bir alanda yayılış gösteren sığalanın 1940’lı yıllarda 6312 ha olarak bildirilen toplam alanı, 1980’li yıllarda 1337 ha’a düşmüştür (Veliöğlu ve ark., 2008). Bu nedenle tür, Uluslararası Doğa Koruma Birliği’nin (IUCN) tehlike kriterlerine göre hazırlanan listede “doğada orta vadeli gelecekte yüksek tehdit altında” kategorisinde gösterilmektedir (Ekim ve ark., 2000). Sığala ormanlarındaki daralmaya paralel olarak, elde edilen sığala balzamu üretimi de azalmıştır.

- 1949- 200.000 kg
- 1968- 63.100 kg
- 1981- 80.000 kg
- 1985- 6.000 kg
- 1997- 2.707 kg
- 1998- 1.570 kg
- 1999- 4.198 kg
- 2000- 3.286 kg
- 2001- 5.284 kg
- 2002- 2.000 kg
- 2003-2005- 2.000 kg
- 2006- 400 kg
- 2007- 127 kg



Şekil 2. Yıllara Göre Sığala Yağı Üretimi (Küçükala ve ark., 2010)

Ayrıca sığala ağacı 2001 yılında EUFORGEN (European Forest Genetic Resources Programme) tarafından değerli yapraklılar (Noble Hardwoods) grubuna alınarak, Avrupa çapında korunacak bir tür olarak kabul edilmiştir (Veliöğlu ve ark., 2008; Küçükala ve ark., 2010).

Türkiye dışında yayılış gösteren diğer *Liquidambar* türlerinden; *L. styraciflua* Amerika Birleşik Devletleri, Guatemala ve Honduras’ta, *L. formosana* ve *L. altingia* türleri Formosa ve Güney Çin’de yetişmektedir. Bu türlerden de çeşitli balzamlar elde edilmektedir. *L. styraciflua*’dan elde edilen, kimyasal yapısı *Styrax Liquidus*’a benzeyen ve aynı amaçlarla kullanılan balzama *Styrax Americanus* (Honduras Balzamu) denilmektedir (Tanker ve Sayron, 1974).

Sığala Balzamının Elde Edilişi

Halk arasında sığala yağı denilen balzam bir oleorezindir, ağacın gövdesinde belirli usullere göre yapılan yaralanmalar sonucu elde edilen patolojik bir üründür. Balzam yarı akıcı, kahverengi, yapışkan, opak ve aromalı bir maddedir. Sığala ağacının odunu ve kabuğu normal olarak balzam kanalları içermez. Fakat ağacın herhangi bir şekilde yaralanması sonucu meydana gelen tahrik etkisiyle yara civarında patolojik olarak fazla miktarda balzam kanalları oluşur. Bu nedenle sığala yağının oluşabilmesi için doğal ya da yapay olarak bir yara etkisinin bulunması gereklidir. Sığala yağı elde etmek için mart ayı sonuna doğru gövde kabuğu 50 cm yüksekliğinde şeritler oluşturacak şekilde yontularak inceltilir. Bu olaya “kızartma” işlemi denir. İşlem gövde çapı en az 20 cm olan ağaçlarda yapılır. Mayıs ayı sonunda, kaşık adı verilen aletle yaraların açılmasına başlanır. Yaralar (damarlar) dış kabuktan, kambiyuma ve çok az miktarda da diri oduna girecek şekilde açılır. Bir hafta sonra, yaralar tazelenir ve bu işleme “yara açma (göz çekme)” adı verilir. Böylece daha çok sayıda salgı kanalı oluşumu sağlanır. İki hafta sonra, damarlar içinde biriken sığala yağı kaşık ile sıyrılarak alınır ve bu işleme “balzam alma veya sur devresi” denilir. Daha sonra asıl sığala balzamu alınması işlemi başlar (sur ardı). Bu olay temmuz ortasından ekim sonuna kadar devam eder. Her 15 günde bir yaralar üzerinde biriken balzam, kabuk, kambiyum ve odun tabakları ile birlikte kaşıkla yontularak alınır. Böylece toplanan balzam ile kabuk, kambiyum ve odun tabakaları yongacıklar halinde olur, buna “kapçık” denilmektedir. Bunlar işçilerin önlerine astıkları torbalar içerisinde toplanır. Ekim ayı sonunda yaralardan sızan ve sertleşen, oksidasyon nedeniyle koyu renk alan balzam kalıntıları yine kaşıkla kazınarak toplanır. Bu işleme de “karakabuk devresi” denilmektedir.

Balzam ile birlikte kabuk, kambiyum ve diri odun içeren yongalar bakır kazanlarda su içerisinde 0.5-1.5 saat süre ile kaynatılır. Kaynatılan yongalar özel kaşıklarla kazandan alınarak preslerde sıkıştırılır ve balzam ile su, beton havuzlarda toplanır. Dibe çöken balzam, su uzaklaştırıldıktan sonra galvenizli kaplara doldurulur. Ham sığala balzamu bir miktar su ve kirlilikler içerir. Sığala balzamu üretimi sırasında arta kalan ve günlük veya buhur adı verilen madde “Cortex thymiatıs” ise cami ve kiliselerde tütsü amacı ile yakılarak kullanılır (Küçükala ve ark., 2010).

Sığala balzamının üretim esasları ve verimine etki eden çeşitli faktörler vardır. Gövdede açılacak damarların sayısı, ağacın gövde çapına bağlı olarak değişir. Ağacın hayatını devam ettirebilmesi için gövde çapı boyunca, gövde yüzeyinin en az 1/3’ünün yaralanmış olması gereklidir. Yaraların kapanması çeşitli etkilere bağlı olarak değişmekle beraber genel olarak 6-10 yıl sürer. Yeni açılan yaranın gövde üzerinde önceki yaranın üstünden tepe yönüne doğru açılması gerekir. Yaralar gövde üzerinde toprak seviyesinin 25-30 cm yukarısından itibaren dallanma mesafesine kadar açılabilir. Sığala balzamu veriminde, kalıtsal etmenler, yetiştirme ortamı koşulları, ağaçların büyüklükleri, üretim metodu ve uygulanma tarzı gibi birçok faktör etkilidir (Küçükala ve ark., 2010).

Sığala Balzaminin Bileşimi

Bütün balzamlarda olduğu gibi reçine, uçucu yağ ve serbest olarak sinnamik asit içermektedir. “Sitorezinol” içeren reçine, balsamın %30-40’ını oluşturmaktadır.

Balzamın %20-25’lik kısmını uçucu yağ oluşturmaktadır. Uçucu yağın büyük bir kısmını da benzil sinnamat ile etil sinnamat oluşturur. Bunun yanında terpenik ve aromatik bazı maddeler de bulunur. Serbest sinnamik asit balzamın %20-25’ini oluşturmaktadır (Tanker ve Tanker, 1990).

Balzamın su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ stiren, vanilin, sinnamik asit ve sinnamik asit esterleri içerir. Kalan reçinede, serbest veya sinnamik asit esterleri halinde rezinoller bulunmaktadır.

Parfümeride fiksatif özelliğinden dolayı “Styrax depuratus” denilen temizlenmiş balzam kullanılmaktadır. Balzam su banyosunda ısıtılarak suyundan kurtarılır, sıcakken eşit ağırlıkta 90°’lik etanolde çözülür. Çözünmeyen kısımlar sıcakta bezden süzülerek ayrılır. Sonra etanol uçurularak temizlenmiş sığala balzamu elde edilir (Tanker ve Sayron, 1974). Parfümlere katılan temizlenmiş balzam, farklı uçuculuklara sahip olan parfüm bileşenlerinin buhar basıncını arttırmakta, buna bağlı olarak da hızlı buharlaşmalarını önlemektedir (Fıçırcıoğlu, 1988).

Balzam, ısıtıldığı zaman tarçın kokusu vermektedir. Zamanla koyu ve açık renkli iki tabakaya ayrılır. Sığala balzamu genellikle koyu bal kıvamında olup, özgül ağırlığı 1.091-1.113 gr/cm³’tür. Temizlenmemiş (rafine edilmemiş) sığala balzamu içerisinde %11-14 oranında su bulunmasına rağmen, temizlenmiş ürünlerde ya hiç su bulunmamakta ya da çok az miktarda bulunmaktadır. Suda çözünmez, fakat kloroform, etanol, asetik asit, eter, aseton ve petrol eteri gibi organik çözücülerde büyük oranda çözünür (Deniz, 2010).

Sığala Balzaminin Kullanımı ve Biyolojik Etkileri

Sığala balzamu Hipokrat döneminden bu yana birçok hastalıkta haricen ve dahilen kullanılmıştır. Mısır piramitlerindeki mumyalarda sığala yağının varlığı tespit edilmiş, buhar kalıntılarında rastlanmıştır. Mısır kral mezarlarında M.Ö. 14. yüzyılda sığala balzamu içeren kaplar bulunmuştur. Eski Mısır kraliçesi Kleopatra bu balzamdaki elde edilen maddeyi parfüm olarak kullanmıştır. Batık Fenike gemilerinden içinde sığala balzamu bulunan amforalar çıkarılmıştır. Antik dönemde Fenikelilerin en önemli ihraç ürünlerinden olan balzam, o yıllarda insanları ve hayvanları rahatsız eden haşerelere karşı doğal bir böcek ilacı olarak kullanılmıştır. Osmanlı İmparatorluğu döneminde sığala balzamu sünnet olan çocukların yaralarının çabuk iyileşmesi için kullanılmıştır. Asur kil tabletlerinde de adından söz edilmektedir. Sığala balzamu, güzel kokusu ve tedavi edici özellikleri nedeniyle en eski Akdeniz uygarlıklarından beri kullanılmaktadır.

Ülkemizde yöre halkı tarafından çok eski zamanlardan beri başta tıbbi amaçla olmak üzere değişik amaçlar için hala kullanıldığı bilinmektedir. Halk arasında balgam söktürücü etkisinden dolayı astım, bronşit gibi çeşitli akciğer hastalıklarında kullanılmaktadır. Kuru üzümle birlikte yenirse zihni açtığına

inanılıp, kusmayı önlemek ve ter kokularını gidermek için de kullanılmıştır. Yatıştırıcı ve analjezik özelliği olduğuna inanıldığından özellikle romatizma ağrılarına karşı kullanılmıştır. Parazit kovucu özelliğinden dolayı mantar, uyuz gibi çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde ve yaraların iyileşmesinde kullanılmıştır. Dişetlerini güçlendirmek amacıyla ağızda çiğnenip, mide ülseri başta olmak üzere, mide hastalıklarında şekerle, leblebi tozuyla ya da balla karıştırılarak kullanılmaktadır. Sığıla yağı içeren sabunlar güzel kokusu, cildi yumuşatıcı etkisinden dolayı kullanılmaktadır (Karadeniz, 2011; Fıçıcıoğlu, 1988; Deniz, 2010; <http://>).

Balzamın farklı konsantrasyonlarının bazı bakteri türleri üzerinde kuvvetli antibakteriyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Antibakteriyal aktivitesinin araştırıldığı en kapsamlı çalışmalardan birinde; balzamın %10'luk konsantrasyonunun *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı, %1'lik konsantrasyonunun *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *P. fluorescens* bakterilerine karşı, %0.4'lük konsantrasyonunun *E. aerogenes*, *P. vulgaris* bakterilerine karşı, %0.2'lik konsantrasyonunun *E. aerogenes*, *P. vulgaris* bakterilerine karşı antibakteriyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanında %0.1'lik konsantrasyonunun ise antibakteriyal etki göstermediği bildirilmiştir (Sağdıç, 2005).

Bir ağaç nematodu olan *Bursaphelenchus xylophilus* türüne karşı 28 bitkinin uçucu yağlarının antiparaziter etkisi incelenmiş ve *Coriandrum sativum*, *Liquidambar orientalis*, *Valeriana wallichii* yağlarının 2 mg/mL'lik konsantrasyonda %100 nematidisial etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Kim and Seo, 2008).

Sığıla balzamının anyon-katyon içeriği zengin olduğundan hemoroid tedavisinde kullanılabilir (Güleç ve ark., 2009).

Sığıla balzamının tavşanlarda beyin felç parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir, %10'luk konsantrasyondaki balzam çözeltileri felçli hale getirilen tavşanlara 0.01, 0.03, 0.07 ve 0.90 mL'lik dozlarda verilmiş ve gelişmeler 9 hafta boyunca takip edilmiştir. Felce neden olan hemorajik ve embolik pıhtıların azaltılmasında balzamın önemli derecede etkili olduğu bulunmuştur (Bayazit, 2009).

Diğer bir çalışmada 200 mg/mL'lik *L. orientalis* ekstresinin nalidisik asit, penisilin G, novobiyosin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklere direnç gösteren Gram (+) ve Gram (-) 14 bakteri türü ve 1 maya mantarın gelişimleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. *Bacillus cereus* ve *Candida albicans* dışındaki *Staphylococcus aureus*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter*

aerogenes gibi bakterilerinin gelişimlerini inhibe ettiği ve geniş spektrumda antibakteriyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Oskay and Sarı, 2007).

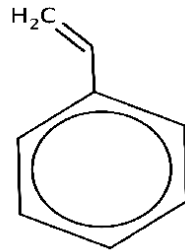
Balzamdan elde edilen alkolde hazırlanmış ekstraların hiperlipidemi ve hiperkolesterolemili erkek farelerde (*Mus musculus*) kan, kalp ve karaciğerdeki toplam kolesterol ve toplam lipid konsantrasyonlarına etkileri araştırılmıştır. Çalışma neticesinde kan ve organlardaki lipid ve kolesterol seviyelerinin düştüğü görülmüştür (Yılmaz, 2005).

Balzam, merhem, toz, emülsiyon gibi çeşitli farmasötik preparasyonlarının antineoplastik etkisi görülmüştür. Etkiye büyük oranda sinamik asitin neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca sığala balzamından elde edilen sinamik asit ve türevleri güneş yanıklarını önlemek amacıyla merhem şeklinde preparatlarla uygulanmıştır (Fıçıcıoğlu, 1988).

Sıçanlar üzerinde yara iyileştirici etkisinin, kollagenaz içeren pomatlarla karşılaştırmalı olarak incelendiği bir çalışmada, sığala balzamu ve kollagenaz içeren pomatların yara iyileşmesinde hızlandırıcı etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Deniz, 2010).

Sığala balzamının insan lenfosit kültürleri üzerine genotoksik ve sitotoksik etkilerini Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve Hücre Proliferasyon (WST-1) Test yöntemlerini kullanarak yapılan çalışmada, balzamın 0.4, 0.8, 1.6 ve 4.0 µg/mL'lik konsantrasyonlarının genotoksik ve sitotoksik etkileri incelenmiştir. 1.6 ve 4.0 µg/mL'lik konsantrasyonların hücrelerde toksik etkiye neden oldukları ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği belirlenmiştir (Karadeniz, 2011).

Liquidambar orientalis ve *L. styraciflua* balzamlarını karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada, su distilasyonu yöntemi ile elde edilen uçucu yağların Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) ile yapılan analizlerinde, *L. orientalis* uçucu yağının ana bileşiğinin stiren (%70.4) olduğu belirtilmiştir (Fernandez ve ark., 2005). Bu çalışmada rapor edilen uçucu yağların kimyasal bileşimleri **Çizelge 1** ve **Çizelge 2**'de, stiren formülü **Şekil 3**'te verilmiştir.



Şekil 3. Stiren

Çizelge1. *Liquidambar orientalis* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

	Bileşik adı	%
1	Stiren	70.4
2	α -Pinen	19
3	β -Pinen	4.3
4	Etil benzen	0.5
5	Kamfen	0.7
6	Tuya-2,4(10)-dien	0.1
7	Mirsen	0.4
8	α -Fellandren	0.1
9	α -Metilstiren	0.2
10	<i>p</i> -Simen	0.1
11	Limonen	1.2
12	Asetofenon	0.2
13	γ -Terpinene	0.1
14	Terpinolen	0.1
15	3-Fenilpropanal	0.1
16	<i>p</i> -Etilfenol	0.2
17	Terpinen-4-ol	0.1
18	α -Terpineol	0.2
19	Fenilpropil alkol	0.2
20	Allil fenol (kavikol)	0.1
21	Sinnamik alkol	0.3
22	α -Longipinen	0.1
23	Longifolen	0.1
24	β -Karyofillen	0.2
25	α -Humulen	0.1
26	Kadinen	0.1
27	3-Fenil propil sinamat	0.2
28	Sinnamil sinamat	0.4

Çizelge 2. *Liquidambar styraciflua* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

	Bileşik adı	%
1	Stiren	30.9
2	Etil benzen	0.5
3	α -Thujen	0.1
4	Benzaldehit	0.6
5	α -Pinen	19.6
6	Kamfen	0.6
7	Thuja-2,4(10)-dien	1.5
8	β -Pinen	4.1
9	α -Fellandren	0.1
10	(E)- β -Metilstiren	0.8
11	<i>p</i> -Simen	0.2
12	Limonen	0.5
13	Asetofenon	3.2
14	γ -Terpinene	0.1
15	Terpinolen	0.1
16	3-Fenilpropanal	0.2
17	<i>p</i> -Etilfenol	1.7
18	Östragol	0.3
19	Mirtenol	0.1
20	Fenilpropil alkol	1.4
21	Allil fenol (kavikol)	0.2
22	Sinnamik alkol	0.9

Çizelge 2. (Devam) *Liquidambar styraciflua* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

23	3-Fenilpropil asetat	0.1
24	α -Kubeben	2.1
25	α -Yılanen	0.4
26	α -Kopaen	0.9
27	β -Sedren	0.3
28	Longifolen	0.9
29	β -Karyofillen	20.2
30	Kalaren	0.7
31	α -Humulen	1.1
32	Germakren D	0.3
33	α -Murolen	0.9
34	Kalamenen	0.3
35	δ -Kadinen	1.6
36	Valensen	0.1
37	α -Kalakoren	0.1
38	Karyofillen oksit	0.4
39	δ -Kadinol	0.2
40	Benzil sinnamat	0.1
41	3-Fenil propil sinnamat	0.4
42	Sinnamil sinnamat	0.2

İNFLAMASYON (YANGI/İLTİHAP)

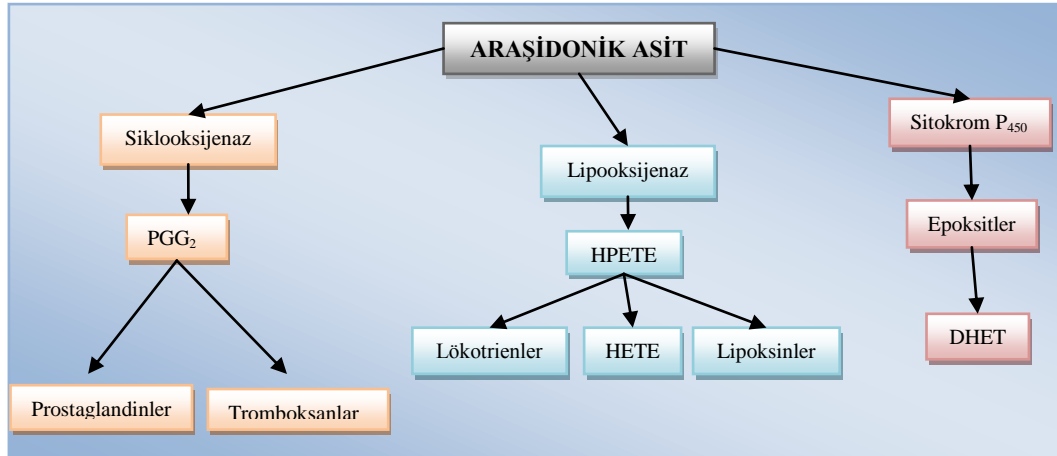
İnflamasyon, çeşitli fiziksel, kimyasal etkilerin, mikroorganizma ve parazit enfeksiyonlarının neden olduğu doku hasarına karşı vücutta oluşan fizyolojik bir tepkidir. Hücre hasarını ortaya çıkaran nedeni ve hücre hasar sonucu oluşan nekrotik hücreleri ortamdaki uzaklaştırmak için gerekli koruyucu yanıtıdır.

İnflamasyon etkenlerine bağlı olarak vücutta immünolojik değişiklikler ortaya çıkar. Otoimmün hastalıklarda ise vücudun kendi dokularına karşı inflamasyon tetiklenir. Kızarıklık, ödem, ağrı, artmış sıcaklık veya fonksiyon bozukluğu inflamasyonun belirtileridir. Ancak pek çok insanda hiçbir belirti olmadan da ortaya çıkabilir. Her organ ve doku tipi inflamasyona duyarlı olmakla birlikte, yanıtın derecesi ve niteliği kişinin bağışıklık durumuna, zarar verici uyarının niteliğine, şiddetine bağlıdır (Kayaalp, 2002).

İnflamasyon akut ve kronik olmak üzere iki ana formda gruplandırılır. Akut inflamasyon nispeten kısa süreli olup birkaç dakika ile birkaç gün arasında sonlanır. Plazma sıvısı ve protein eksüdasyonu, belirgin nötrofil birikimi ile karakterizedir. Kronik inflamasyon daha uzun sürelidir. Günler hatta yıllar sürebilir. Lenfosit ve makrofaj toplanması ile doku yıkım ve onarımı karakteristik histolojik bulgularıdır.

Vazoaktif aminler, plazma proteazları, platelet aktive eden faktör, sitokinler, nitrik oksit ve oksijen kaynaklı serbest radikaller, lizozomal unsurlar ve araşidonik asit metabolitleri inflamasyonun kimyasal mediyatörleridir (Erdoğan, 2004; Abacıoğlu, 2000; Scott ve ark., 2004). Mediyatörler, hasarlı dokudaki hücrelerce lokal olarak veya dolaşımdaki lökositler tarafından üretilebilirler ya da plazmada inaktif prekürsör olarak dolaşım inflamasyon bölgesinde aktive olurlar.

Araşidonik asit, hücre membranı fosfolipitlerinin hidrolizi sonucu serbest hale geçen doymamış yağ asitidir. Araşidonik asit üç önemli yolakla metabolize olur (**Şekil 4**). Bunlar; siklooksijenaz (COX), lipooksijenaz (LOX) ve sitokrom P₄₅₀ (CYP450) epoksijenaz yolaklarıdır.



Şekil 4. Araşidonik Asit Metabolizması

COX yolağı ile prostaglandinler (PG) ve tromboksanlar (TX), LOX yolağı ile lökotrienler (LT), lipoksinler (LX), hidroksieikosatetraenoik asitler (HETE) ve hepoksilinler, epoksijenaz yolağıyla ise epoksieikozatrienoik asitler (EET) oluşur. Hücreler her üç yolağı da içermezler, çoğu bir temel ürün oluştururlar. Örneğin endotel hücrelerinde öncelikle prostaglandin, nötrofil lökositlerde lipooksijenaz ürünleri sentezlenir. Trombositler ise hem siklooksijenaz hem de lipooksijenaz ürünü sentezlerler (Gökşen ve Keleşçi, 2010).

COX ve LOX yolları ile oluşan eikozanoidler birçok biyolojik fonksiyonda yer almakla birlikte inflamasyon, ateş, artrit ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda da rol oynamaktadır (Nie ve ark., 2001).

İnflamasyonda ve tümör patolojisinde rol oynadığı bilinen en önemli oksijenazlar COX ve LOX enzimleridir (Nie ve Honn, 2002). Araşidonik asitten sentezlenen prostaglandinlerin inflamasyon, ağrı ve ateş oluşumunda önemli rolleri olduğu ve nonsteroidal antiinflatamatuvar ilaçların prostaglandin biyosentezini inhibe ederek etki gösterdikleri kanıtlanmıştır (Erdoğan, 2004).

Siklooksijenaz Yolağı

Siklooksijenaz (prostaglandin endoperoksit H sentaz) enzimleri, araşidonik asidin prostaglandinlere dönüştürülmesi için gerekli olan anahtar enzimlerdir. Siklooksijenaz yolunda prostaglandin sentezi için, zardan serbestleştirilen araşidonik asit, COX (PGH sentaz (PGHS)) enzimi etkisiyle prostaglandin endoperoksit üzerinden PGH_2 'ye dönüştürülür. Kararsız olan PGH_2 spesifik dokularda spesifik enzimler tarafından PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 (prostasiklin) ve TXA_2 'ye metabolize olmaktadır. Bu COX ürünlerinin biyosentezi hücreye özgüdür ve prostanoid üreten hücre bu bileşiklerden sadece bir tanesini ana ürün olarak oluşturma eğilimindedir. Prostanoidler fizyolojik ve patofizyolojik etkilerini spesifik reseptörlerini uyararak oluştururlar. Vücutta değişik hücrelerde yaygın olarak bulunan prostanoidler inflamasyon, ağrı, ateş gibi patofizyolojik olayların yanısıra kanın pıhtılaşmasında, ovülasyonda, doğumun başlamasında, kemik metabolizmasında, gastrointestinal sistemde, yara iyileşmesinde, sinirlerin

büyüme ve gelişmesinde, böbrek fonksiyonu ve damar tonusunun sürdürülmesinde ve immün yanıtta rol alırlar (Fitzgerald, 2003; Gonzalez-Periz ve Claria, 2007; Murakami ve ark., 2002).

COX enziminin COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Yapısal olarak çok benzer olan bu izoformlar, organizmadaki dağılımları ve fizyolojik rolleri açısından birbirinden çok farklıdır. COX-1 ilk olarak 1988 yılında koyun, fare ve insandan izole edilmiştir. COX-1 enzimi 576 aminoasit taşırken, COX-2 enzimi 587 aminoasit içermektedir (Ryn ve ark, 2000; Turini ve Dubois, 2002).

COX-1 fizyolojik koşullarda hemen hemen tüm dokularda bulunur ve homeostatik fonksiyonlara aracılık eden prostanoidler üretir. Örneğin mide mukozasında bulunan COX-1, hücreleri mide asidinden korur. Böbrekteki COX-1'in böbrek işleyişine faydalı etkileri vardır. Aynı zamanda normal kan pıhtılaşmasını da düzenler. COX-1 miktarı inflamasyon esnasında artmaz. COX-2 ise inflamatuvar, mitojenik ve onkojenik uyarılar, büyüme faktörleri, hormonlar, yüksek stres, böbreğin tuz/su yoksunluğu gibi diğer fizyolojik uyarılar ile yüksek oranda indüklenir ve inflamasyon sürecini desteklemek için, ağrıyı oluşturan prostaglandinlerin üretimini sağlar. Bu nedenlerle, COX-1'in fizyolojik fonksiyonlardan sorumlu olduğu, COX-2'nin inflamasyondan sorumlu prostaglandinleri ürettiği fikri kabul edilmiştir (Dannhardt ve Kiefer, 2000; Dannhardt ve Laufer, 2000). 1990'lı yıllarda COX-2 izoformunun keşfiyle yeni selektif izoform inhibitörleri arayışı başlamıştır (Flower, 2003).

Lipooksijenaz Yolağı

Memelilerde majör olarak üç farklı lipooksijenaz izoformu bulunmaktadır. Bunlar; 5-LOX, 12-LOX ve 15-LOX'dur. Bu enzimler araşidonik asitin sırasıyla C-5, C-12 ve C-15 konumlarına oksijen katarlar ve sırasıyla 5-hidroperoksiieikozatetraenoik asit (HPETE), 12-HPETE ve 15-HPETE oluştururlar. 5-LOX araşidonik asiti 5-HPETE'ye dönüştürerek lökotrien biyosentezinin başlangıç basamağını katalizler. 12-LOX ve 15-LOX'un biyolojik rolü hakkındaki bilgi sınırlı olduğundan üzerinde daha fazla araştırma yapılmaya ihtiyaç duyulmaktadır. 5-LOX ise tam tersine üzerinde ciddi olarak çalışılmış ve biyolojik olarak en önemli LOX olarak kabul edilmiştir. 5-LOX bitki ve hayvanlarda bulunan bir lipit peroksidaz enzimidir, araşidonik asidin ikinci majör yolağında kuvvetli proinflamatuvar mediyatörlerin (lökotrienler) sentezlenmesinde rol oynar (Kuhn, 2000; Leone ve ark., 2007).

Lökotrienlerin Biyolojik Etkileri

Lökotrienler (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) 5-LOX yolağı üzerinden sentezlenen bir grup araşidonik asit türevi endojen maddelerdir. Parakrin hormonlardır ve G proteini bağlı reseptörlerin aracılığı ile geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptirler (Haeggstrom ve Wetterholm, 2002). Mast hücresi, bazofil ve eozinofiller dahil çeşitli hücrelerden salınan güçlü inflamatuvar eikozanoidlerdir. Aynı zamanda

anafilaksinin yavaş reaksiyona giren maddesinin komponentleridirler. LT'ler inflamasyonlu bölgelere doğru lökosit göçüne neden olurlar. Nötrofillerin vasküler endotelde adezyonunu artırıp dokulardan infiltrasyonunu yükseltirler. Makrofaj ve lenfositlerden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını sağlayarak immün reaksiyonlarda önemli bir rol oynarlar (Samuelsson ve ark., 1987).

LT'ler başta astım olmak üzere romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, psöriazis, alerjik rinit gibi çeşitli inflamatuvar ve alerjik reaksiyonlarda rol oynayan mediyatörlerdir. 5-LOX yolağı, aterosklerozis ve bazı kanser tipleriyle de ilişkilendirilmiştir (Werz ve Steinhilber, 2006; Radmark ve Samuelsson, 2007). Sisteinil lökorienler bronşlarda daraltıcı etkiye, mukus salgılanmasına ve ödeme neden olurlar. Bu nedenle sisteinil lökotrienlerin astımda ve hipersensitivite reaksiyonlarında önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Gastrik mukozada damar daraltıcı etkileri kan akışını azaltarak ülserojenik etkiye neden olmaktadır (Leone ve ark., 2007; Martel-Pelletier ve ark., 2003; Radmark ve Samuelsson, 2007).

Bu enzimlerden birinin ilaçlarla inhibisyonu, o yola ait tüm alt ürünlerin oluşmasını engellemektedir. Siklooksijenazı bloke eden bir ilaç tüm prostaglandin ve tromboksan sentezini engeller. Aspirin ve diğer nonsteroidal antiinflamatuvar (NSAİ) ilaçlar siklooksijenaz blokörüdürler ve terapötik etkilerini bu şekilde gösterirler. Aspirin ve diğer NSAİ ilaçlar lipooksijenazı inhibe etmezler ve lökotrien sentezini azaltıcı etkileri yoktur. Prostaglandinler gibi lökotrienler de proinflamatuvarıdır, ancak alerjik rinit ve astım gibi havayollarını etkileyen inflamatuvar durumlarda daha önemlidirler. Lökotrienlere bağlı inflamasyonu azaltmayı amaçlayan ilaçlar ya lipooksijenaz enzimini inhibe ederler ya da solunum yollarındaki lökotrien reseptörlerini bloke ederler (http:2).

Aspirin romatizmal hastalıkları tedavi etmek amacıyla piyasaya sürülen ilk güçlü antiinflamatuvar ilaçtır. İlerleyen yıllarda fenilbutazon, indometasin, ibuprofen gibi çok sayıda NSAİ ilaç geliştirilmiştir. NSAİ ilaçların etki mekanizmasının keşfedilmesi ise 1971 yılında gerçekleşmiştir. Vane adlı araştırmacı ve arkadaşları siklooksijenaz enziminin bütün bu bileşiklerin ortak moleküler hedefi olduğunu belirlemiştir (Dannhardt ve Kiefer, 2000; Dannhardt ve Laufer, 2000).

Dünya Sağlık Örgütü hastalıkların %90'ının ağrı ile ilişkili olduğunu tespit etmiştir. NSAİ ilaçlar inflamasyon kaynaklı ağrılarda narkotik analjeziklerden daha iyi analjezik etki göstermektedir (Kiefer ve Dannhardt, 2005).

NSAİ ilaçlar antiinflamatuvar, antipiretik ve analjezik etkilerinden dolayı artrit, romatizma gibi çeşitli inflamasyonlu hastalıkların tedavisinde en çok tercih edilen ilaçlardır. Fakat gastrointestinal sistem (GİS) ve böbrekler üzerindeki yan etkileri nedeniyle NSAİ ilaçların kullanılışları sınırlıdır. Selektif COX-2 inhibitörleri; NSAİ ilaçların COX-1'in inhibisyonu ile neden olduğu yan etkileri azaltmak için geliştirilmiştir. Ancak son bulgular COX-2'nin bazı fizyolojik olaylarda önemli bir rol oynadığına işaret ederken, selektif COX-2 inhibitör teorisi hakkındaki soruları da çoğaltmıştır. Ayrıca COX inhibisyonu 5-LOX yolağının aktivasyonunu artırması ile de çeşitli yan etkiler oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda COX ve 5-LOX enzimlerini aynı anda inhibe edebilecek çeşitli yapısal özelliklere sahip dual inhibitörler tasarlanmış ve bazıları prelinik ya da klinik çalışmalara alınmıştır. Bunlar hem LT hem de prostanoitlerin biyosentezini

inhibe ederek kuvvetli antiinflamatuvar etki göstermişlerdir. Bu bileşiklerin GİS toksisitelerinin yok denecek kadar az olmasından dolayı klasik NSAİ ilaçlar ve bir ölçüde de selektif COX-2 inhibitörlerine alternatif, değerli, güçlü terapötik etkili temsilcilerden olmuşlardır (Gökşen ve Keleşçi, 2010).

Antiinflamatuvar Etkili Bitkisel Kaynaklı Doğal Bileşikler

Bazı bitkisel kaynaklı antiinflamatuvar bileşikler ve elde edildikleri bitkiler Çizelge 3’de verilmiştir (Anilkumar, 2010).

Çizelge 3. Bitkisel Kaynaklı Bazı Antiinflamatuvar Bileşikler

Elde Edildiği Bitki	Bileşik
<i>Alchornea cordifolia</i>	Kuersitrin
<i>Allium cepa</i>	Kuersetin
<i>Anacardium occidentale</i>	Epikateşin
<i>Ananas comosus</i>	Bromelain
<i>Apium graveolens</i>	Saponinler
<i>Aristolochia clematitidis</i>	Aristolöşik asit
<i>Berberis aristata</i>	Berberin
<i>Boswellia serrata</i>	Bosvellik asit
<i>Buddleja globosa</i>	Verbakosit, Lüteolin-7
<i>Canarium schweinfurthii</i>	Uçucu yağ (oktil asetat, nerolidol)
<i>Cannabis sativa</i>	Kannabinoidler
<i>Cucurbita andreana</i>	Kukurbitasinler
<i>Curcuma longa</i>	Kurkumin
<i>Eupatorium arnottianum</i>	Flavanoidler (nepetin, jaseosidin, hispudilin)
<i>Foeniculum vulgare</i>	Saponinler
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glisirizin
<i>Hibiscus vitifolius</i>	Gossipin
<i>Kalanchoe crenata</i>	Flavanoidler
<i>Lycopersicon esculenta</i>	Kuersetin
<i>Medicago sativa</i>	Saponinler
<i>Ricinus communis</i>	Flavanoidler, alkaloidler ve tanenler
<i>Sida acuta</i>	Kriptolepin
<i>Solanum trilobatum</i>	Solasodin
<i>Spilanthes acmella</i>	Flavanoidler
<i>Sylibium marianum</i>	Silimarin
<i>Zingiber officinale</i>	Gingerol, mono ve triterpenler
<i>Salix alba</i>	Salisin

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori gram negatif, mikroaerofilik, üreaz pozitif, spiral şekilli flajellat bir basildir. Genellikle gastrik mukozada bulunur ve kronik gastrit, peptik ülser, gastrik hiperplastik polipler, gastrik adenoma, mide kanseri, mide mukoza lenfoid doku lenfoması (MALToma) gibi çeşitli hastalıklara yol açar (Khedmat ve ark., 2007; Wyle, 1991). *H. pylori* infeksiyonu insanlarda en sık görülen kronik bakteriyel infeksiyondur; öyle ki rakamlar dünya popülasyonunun %60'ının bu ajanla kolonize olduğunu göstermektedir (Fabrizi ve Martin, 2000).

Helicobacter pylori penisilin, ampisilin, amoksisilin, eritromisin, gentamisin, sefalosporinler, tetrasiklin, florokinolonlar, imipenem ve metronidazole duyarlıdır. Ayrıca koloidal bizmut substrat ve bizmut subsalisilat da bakteri üzerinde etkilidir. Bakterinin ilaçlara direnç geliştirebilmesi, ilaçlarla ulaşılması güç olan bölgelerde canlılığını sürdürebilmesi gibi nedenlerden dolayı *H. pylori* infeksiyonunun tedavisi zordur.

Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi (NCCLS) anti-*H. pylori* çalışmaları için tercih edilen test olarak, agar dilüsyon yöntemini onaylamıştır (Mobley ve ark., 2001).

NCCLS ve Avrupa Çalışma Grubunun standart agar dilüsyon yöntemlerinin karşılaştırması **Çizelge 4** 'te gösterilmiştir.

Çizelge 4. *Helicobacter pylori* Duyarlılık Testi İçin Önerilen Standart Yöntemler

PARAMETRE	USA-NCCLS	Avrupa <i>H. pylori</i> Çalışma Grubu
Metot	Agar dilüsyon	Agar dilüsyon
Besiyeri	Müeller-Hinton agar (MHA) + % 5 koyun kanı	Müeller-Hinton agar (MHA) + % 10 at kanı
İnokulum	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ CFU/mL (2.0 McFarland yoğunlukta)	0.5 to 1×10^9 CFU/mL (4.0 McFarland yoğunlukta)
İnkübasyon	35 °C; mikroaerobik atmosferde (gaz sistemi tarafından oluşturulan mikroaerobik atmosferde)	37 °C; mikroaerobik atmosferde
Okuma	3 gün	3 gün
Kalite kontrol suşları	<i>H. pylori</i> ATCC 43504	<i>H. pylori</i> CCUG 38770 <i>H. pylori</i> CCUG 38771 <i>H. pylori</i> CCUG 38772
Kalite kontrol limitleri	Amoksisilin, Siprofloksasin, Klaritromisin, Metronidazol, Tetrasiklin	Amoksisilin, Klaritromisin, Metronidazol

GEREÇLER ve YÖNTEMLER

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyaller, Kimyasal Madde ve Gereçler

Bitkisel Materyal

Styrax Liquidus (Şekil 6) Muğla'nın Marmaris ilçesinden 2011 yılında temin edilmiştir.

Kullanılan Kimyasallar

Deneysel aşamalarda kullanılan kimyasal maddeler ile ilgili bilgiler Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çözücüler	Firma ve Ülke
Dimetil sülfoksit	Sigma-Aldrich, Amerika
Kloroform	Sigma, Almanya
Asetik asit	Sigma, Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich, Amerika
Eter	Merck, Almanya
<i>n</i> -Hekzan	Carlo Erba, İtalya
Etanol	Merck, Almanya
Tween-20	Merck, Almanya
Tetrahidrofuran	Merck, Almanya
Linoleik asit	Sigma, Almanya
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Almanya
Nordihidroguaiaretik asit	Fluka-BioChemika
Lipooksijenaz (Lipoxidase from <i>Glycine max</i> (soybean))	Fluka-BioChemika
Silika jel	Merck (7734), Almanya
COX inhibisyonu tarama kiti	Cayman, Amerika
Mikroaerofilik ortam oluşturma sistemi	Oxoid – Campygen, İngiltere

Kullanılan Cihaz ve Apareyler

Deneyleerde kullanılan cihaz ve apareylere ilişkin bilgiler **Çizelge 6**'da verilmiştir.

Çizelge 6. Deneyleerde Kullanılan Cihaz ve Apareyler

Cihaz ve aparey	Firma
Clevenger apareyi	İldam
Çalkalayıcı	BIOSAN-PST-100HL
Elmasonic karıştırıcı	Elma® S 100 H
GK Sistem (Gaz Kromatografisi)	Agilent 6890 N GC
GK/KS Sistem (Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi)	Agilent 5975 GC-MSD
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001
Rotavapor	Heidolph
Su banyosu	GFL® 1086
UV-Spektrofotometre	Shimadzu
Vortex	Heidolph
pH metre	WTW- Inolab pH 720
SPME enjektörü	Supelco
SPME fiber filamenti	Supelco
Elisa cihazı	Bio Tek-Power Wave XS
Anaerobik Kavanoz	Merck, Almanya
Etüv	MMM Medcenter (37 °C)
Otoklav	HMC Hirayama
McFarland cihazı	Biosan DEN-1

Deneysel Çalışmalar ve Yöntemler

Balzamdan uçucu yağ elde edilmesi laboratuvarında Clevenger apareyinde (**Şekil 6**) su distilasyonu yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Su Distilasyonu

Clevenger apareyinde; 245.3 g balzam 2 litrelik balona tartılıp üzerine balonun 2/3'üne kadar su ilave edilip 3 saatlik distilasyona tabi tutulmuştur. 3 saatin

sonunda elde edilen uçucu yağ analiz ve aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere + 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 5. Clevenger Apareyi



Şekil 6. Styrax Liquidus

Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) ile Uçucu Yağın Kimyasal Analizi

Elde edilen uçucu yağın GK ve GK/KS sistemi (Şekil 7) ile eş zamanlı olarak analizleri gerçekleştirilmiştir. GK sisteminde FID dedektörü ile tespit edilen bileşiklerin bağıl yüzdeleri belirlenmiştir. GK/KS sistemi ile bileşenlerin kütle spektrumları alınmıştır. Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi" yanı sıra Wiley ve MassFinder 3.1 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapılmıştır (McLafferty ve Stauffer, 1989; Koenig ve ark., 2004).



Şekil 7. Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS)

GK Analiz Koşulları

Sistem : Agilent 6890N GC
Kolon : HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
Taşıyıcı Gaz : Helyum (0.8 mL dk⁻¹)

Sıcaklıklar

Enjeksiyon : 250°C
Kolon : 60°C'de 10 dk, 4°C dk artışla 220°C'ye, 220°C'de 10 dk,
1°C dk artışla 240°C'ye
Detektör : 300°C, FID (Alev iyonlaşma dedektörü)

GK/KS Analiz Koşulları

Sistem : Agilent 5975 GC-MSD
Kolon : HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
Taşıyıcı Gaz : Helyum (0.8 mL dk⁻¹)

Sıcaklıklar

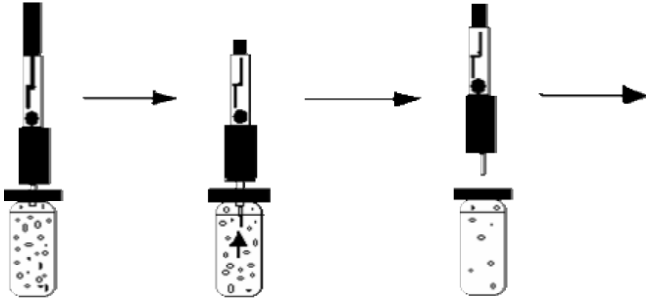
Enjeksiyon : 250°C
Kolon : 60°C'de 10 dk, 4°C dk artışla 220°C'ye, 220°C'de 10 dak,
1°C dk artışla 240°C'ye

Split Oranı : 50:1
Elektron Enerjisi : 70 eV
Kütle Aralığı : 35-450 m/z

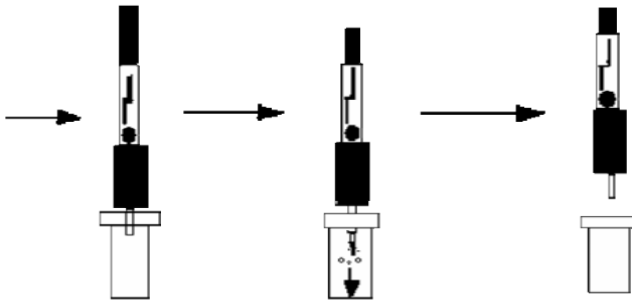
Katı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi (SPME)

Katı faz mikroekstraksiyon (Solid Phase Microextraction (SPME)), basit ve çözücü kullanımı gerektirmeyen bir ekstraksiyon tekniğidir. Uçucu bileşenlerin tayininde yaygın şekilde kullanılan hassas, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Bu teknik uçucu bileşenlerin polimerik bir sabit faz ile kaplanmış fiber üzerine adsorpsiyonuna (**Şekil 8**) ve fiber üzerindeki bu bileşenlerin gaz kromatografisi enjeksiyon portunda ısı ile desorpsiyonuna (**Şekil 9**) dayanmaktadır. Örnekteki uçucu bileşenler, doğrudan veya kapalı bir ortamda örneklerin tepe boşluğundan fiber üzerine adsorbe olurlar. Genellikle 2-30 dakikalık bir süre sonunda dengeye ulaşıldığında adsorbe edilen bileşenleri içeren fiber örnekten uzaklaştırılır. Bu bileşenler bir GK enjektör portunda termal desorpsiyon işlemi ile geri alınarak uygun kolon ve detektör ile analiz edilirler (Ayhan ve Döş, 2004).

Tepe boşluğu (headspace-HS) ve daldırmalı (immersion-IM) olmak üzere iki farklı katı faz mikro ekstraksiyon yöntemi kullanılır. Bu çalışmada balzamin analizinde tepe boşluğu yöntemi uygulanmıştır. Fiberde adsorbant olarak 65 µm kalınlığında Polidimetilsiloksan/Divinilbenzen (PDMS/DVB) kullanılıp adsorbe edilen uçucu bileşenler GK/KS 'de analiz edilmiştir.

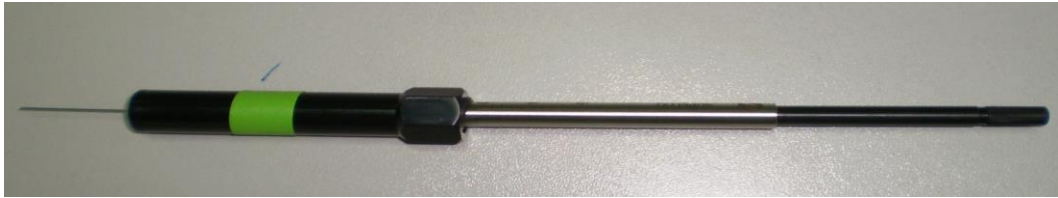


Şekil 8. Katı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi (SPME) ile Ekstraksiyon Aşaması (Harmon, 1997)



Şekil 9. SPME ile Desorpsiyon Aşaması (Harmon, 1997)

1 g balzam flakon içerisine tartılıp üzeri parafilm ile kapatılmıştır. İşlem öncesinde fiber kaplı SPME enjektörünün iğnesi (Şekil 10) GK’de birkaç dakika temizlenmiştir. 50°C’ye ayarlanan ısıtıcı üzerinde flakonun içerisine, balzama temas etmeyecek şekilde enjektörün iğnesi batırılıp fiber kaplı kısmı tepe boşluğunda 15 dakika bekletilmiştir (Şekil 11). Fiber kısım iğne içerisine çekilip flakondan çıkarıldıktan sonra GK’nin enjeksiyon portuna yerleştirilmiş ve fiber indirilerek optimum ısıl deporbsiyonun gerçekleşmesi için 5 dakika enjektörde tutulmuştur. Fiber geri çekilerek iğne porttan çıkarılıp GK/KS sisteminde analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 12).



Şekil 10. SPME enjektörü



Şekil 11. SPME Yöntemi



Şekil 12. SPME Yöntemi – GK Analizi

GK Analiz Koşulları

Sistem : Agilent 5975 GC-MSD

Kolon : HP-Innowax (60m x 0.25mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)

Taşıyıcı Gaz : Helyum (0.8 mL dk⁻¹)

Sıcaklıklar

Enjeksiyon : 250°C

Kolon : 60°C'de 10 dk, 4°C dk artışla 220°C'ye, 220°C'de 10 dk,
1°C dk artışla 240 °C'ye

Split Oranı : Splitsiz

Elektron Enerjisi : 70 eV

Kütle Aralığı : 35-450 m/z

Kolon Kromatografisi

GK ve GK/KS analizleri sonucunda uçucu yağın ana bileşenini oluşturan stirenin (%84.6) kolon kromatografisiyle izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen stirenin LOX inhibisyonu incelenmiştir.

Kolonun Hazırlanması:

Kolon adsorban maddesi olarak silikajel (7734; Merck) kullanılmıştır. 20 g silikajel aktive edilmek üzere 1 saat etüvde bekletilmiştir. Kolon olarak kullanılmak üzere 100 mL'lik büretin alt kısmına cam pamuğu konup bir miktar *n*-hekzanla ıslatılmıştır. Bir beherde silika jel *n*-hekzan ile karıştırılıp hava kabarcığı oluşmayacak şekilde bürete doldurulmuştur. 422 mg sıgala yağı tartılıp *n*-hekzanda çözülüp küçük bir beherde bir miktar silika jele emdirilip bürete ilave edilmiştir. 100 mL *n*-hekzan kolona ilave edilerek elüsyona başlanmıştır. Koku takibi ve İTK ile fraksiyonlar toplanmıştır. Tek leke veren fraksiyonların saflığı GK yöntemi ile kontrol edilmiştir. 1.1 mg saf haldeki stiren 220 µL etanolde çözülüp LOX inhibisyon etkisi incelenmiştir.



Şekil 13. Kolon Kromatografisi

AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

In vitro Lipooksijenaz (LOX) İnhibisyonu

Baylac ve Racine tarafından 2003'te yapılan çalışma temel alınarak lipooksijenaz aktivitesi ölçüm yönteminde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Baylac ve Racine, 2003).

LOX inhibisyon aktivitesi spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Dipotasyum fosfat tamponu (1.94 mL; 100 mM; pH 9.0), 40 µL örnek çözeltisi ve 20 µL LOX çözeltisi karıştırılarak 25°C'de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılıp reaksiyon 50 µL linoleik asit ilavesi ile başlatılmıştır. 234 nm'de 20 dakika boyunca absorbans değişimi kaydedilmiştir.



Şekil 14. Kuvartz Küvet ve Spektrofotometre Cihazı

Tampon, Çözücü ve Diğer Maddelerin Hazırlanması:

a) Tampon: 8.709 g K_2HPO_4 tartılıp üzeri 500 mL'ye tamalanmıştır.

680 mg KH_2PO_4 tartılıp üzeri 50 mL'ye tamalanmıştır.

K_2HPO_4 çözeltisi üzerine KH_2PO_4 ilave edilerek pH 9'a ayarlanmıştır.

b) Enzim: 7 U/mg'lık lipooksijenaz enziminden 5 mg tartılıp 4.3 mL tampon içinde çözülmüştür. Enzim çözeltisi 250 µL'lik porjyonlara ayrılarak -80°C'de muhafaza edilmiştir.

c) Standart inhibitör: Nordihidroguaiaretik asit (NDGA) etanol içerisinde çözümlenerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

d) Substrat: 62.5 µM linoleik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 95 mg linoleik asit etanolde çözümlenip üzerine 3.5 mL Tween-20 eklenip 2 saat evapore edilmiştir (40°C'de). Madde ışığa duyarlı olduğu için evaporasyon işlemi balonun dışı alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 100 mL K_2HPO_4 tamponu ilave edilmiştir.

Deneydeki kinetik ölçümler için kuvartz küvetler kullanılmıştır (Şekil 15). IC_{50} değeri hesaplanarak standartla karşılaştırılmıştır. Tüm ölçümler üç kez tekrar edilerek sonuçlar "ortalama ± standart hata" olarak ifade edilmiştir. Denenen

farklı çözücülere rağmen balzamin son hacimde bulanıklık oluşturması nedeniyle bu yöntemle balzamin LOX inhibisyonu test edilememiştir. Uçucu yağ ve standart için hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonları **Çizelge 7'**de verilmiştir.

Çizelge 7. Uçucu Yağ ve Standart Çözeltilerin Konsantrasyonları

Uçucu yağ/Etanol	NDGA/Etanol
5 mg/mL	5 mg/mL
4 mg/mL	0.85 mg/mL
3.5 mg/mL	0.75 mg/mL
3 mg/mL	0.5 mg/mL
2.75 mg/mL	0.3 mg/mL
2.5 mg/mL	0.25 mg/mL
2.25 mg/mL	0.2 mg/mL
1.5 mg/mL	0.1 mg/mL
1 mg/mL	0.05 mg/mL
0.5 mg/mL	0.025 mg/mL

***In vitro* Siklooksijenaz (COX) Enzim İnhibisyonu**

COX inhibisyon aktivitesi “COX İnhibitör Tarama Deneyi Kiti” ile incelenmiştir.

Çalışmamızda COX İnhibitor Screening Assay Kit (Katalog No:560131) kullanılmıştır.

COX inhibitör tarama yöntemi COX türevli prostaglandin H_2 'nin (PGH_2) $SnCl_2$ (stannöz klorür) redüksiyonu sonucu COX reaksiyonunda oluşan $PGF_{2\alpha}$ 'nın doğrudan ölçülmesi ilkesine dayanır. Prostanoid ürünü enzim immunoassay (EIA) yöntemi ile; tüm major PG bileşiklerine bağlanabilen geniş spektrumlu bir antiserum kullanılarak; ölçülür. Bu yöntem izoenzime spesifik inhibitörlerin aydınlatılmasına izin veren koyun orijinli COX-1 ve insan rekombinant COX-2 enzimlerinin her ikisinin de kullanılmasını kapsar. Yine bu yöntem genel olarak inhibitör bileşiklerin aydınlatılmasında kullanılan ve belirleyiciliği daha az olan metodların yolaçtığı yanlış pozitif fikirlerin elimine edilmesini sağlayan bir deneydir.

Kit içerisinde bulunan materyal aşağıda belirtilmiştir.

- PG (prostaglandin) EIA (Elisa) antiserumu
- PG AChE (asetilkolinesteraz) konjugatı
- PG EIA Standartı
- Konsantre EIA tamponu
- Konsantre yıkama tamponu
- Polisorbata 20

- Fare anti-tavşan IgG (immünglobülin G) kaplı mikropleyt, 96 kuyucuklu
- Mikropleytin üzerinin kapatmak için şeffaf film
- Ellman's reaktifi
- Konsantre reaksiyon tamponu
- COX-1 enzimi
- COX-2 enzimi
- HEME (Fe-protoporfirin-IX)
- Araşidonik asit (substrat)
- Potasyum hidroksit (KOH)
- Hidroklorik asit (HCl)
- Stannöz klorür (SnCl_2)

Örneklerin Hazırlanması:

Balzam ve uçucu yağın;

10 mg/mL, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 0.5 mg/L, 0.05 mg/L, 0.005 mg/L, 0.0005 mg/L, 0.00005 mg/L'lik konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Çözücü olarak saf DMSO kullanılmıştır.

COX Reaksiyon Prosedürü

Reaksiyon Tamponu: 5 mL konsantre reaksiyon tamponu 45 mL ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

COX-1 ve COX-2 Enzimleri: Reaksiyonda kullanılmak üzere çözüldüğünde buz üzerinde bekletilmiştir.

HEME: DMSO içerisinde çözülmüş halde bulunan HEME'den 100 μL alınıp 400 μL reaksiyon tamponu ile karıştırılmıştır.

Araşidonik Asit (substrat): Etanol içerisinde çözülmüş halde bulunan araşidonik asitten 50 μL alınıp 50 μL KOH ile karıştırılmıştır. Üzerine 400 μL ultra saf su ilave edilmiştir.

KOH: Kullanıma hazırdır. Konsantrasyonu 0.1 M'dir.

HCl: Konsantrasyonu 1 M'dir. Stannöz klorürün hazırlanmasında kullanılmak üzere ultra saf suyla 0.1 M'ye seyreltilmiştir.

SnCl₂: Kristalize halde bulunan SnCl₂ üzerine 5 mL 0.1 M HCl ilave edilip karıştırılmıştır.

İnaktif COX-1, COX-2 tüpleri: 20 µL COX-1 ve COX-2 ayrı ayrı mikrofuj tüplerinde, kaynar suda 3 dakika inaktif edilmiştir. 2 adet test tüp içerisine;

1. Test tüp: 970 µL reaksiyon tamponu + 10 µL HEME + 10 µL inaktif COX-1

2. Test tüp: 970µL reaksiyon tamponu + 10 µL HEME + 10 µL inaktif COX-2

COX-1 Başlangıç aktivite tüpleri: 2 adet test tüp içerisine,

950 µL reaksiyon tamponu + 10 µL HEME + 10 µL inaktif COX-1

COX-1 İnhibitör tüpleri: 7 adet test tüp içerisine,

950 µL reaksiyon tamponu + 10 µL HEME + 10 µL inaktif COX-1

COX-2 Başlangıç aktivite tüpleri: 2 adet test tüp içerisine,

950 µL reaksiyon tamponu + 10 µL HEME + 10 µL inaktif COX-2

COX-2 İnhibitör tüpleri: 8 adet test tüp içerisine,

950 µL reaksiyon tamponu + 10 µL HEME + 10 µL inaktif COX-2

COX-1 ve COX-2 başlangıç aktivite tüplerine 20 µL reaktif tamponu, inhibitör tüplerine 20 µL stok örnek çözeltilerinden ilave edilip sıcak su banyosunda 37°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Sonra bütün test tüplerine 10 µL araşidonik asit ilave edilip reaksiyon başlatılmıştır. 37°C’de inkübe edilip her bir test tüpüne 50 µL 1 M HCl eklenerek enzim katalizi durdurulmuştur.

Test tüpleri sıcak su banyosundan alınıp 100 µL doymuş stannöz klörür çözeltisi eklenip vortekste karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımları bulanık olup oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra buzdolabında muhafaza edilmiştir.

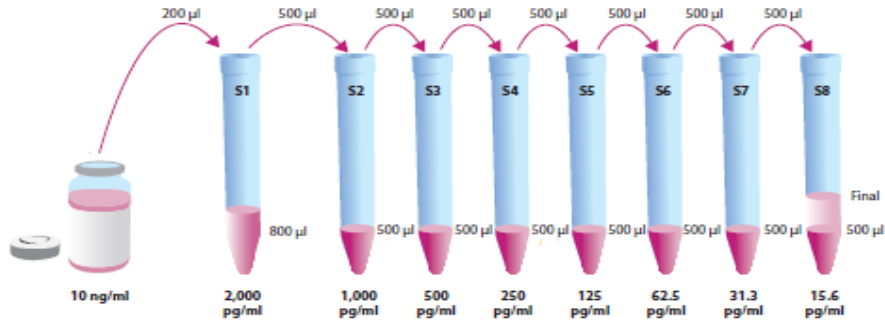
EIA Prosedürü

EIA Tamponu: Konsantre EIA tamponunun tamamı 90 mL ultra saf su ile seyreltilmiştir.

Yıkama tamponu: Konsantre yıkama tamponunun üzerine 1 mL polisorbata 20 ilave edilip toplam hacim ultra saf suyla 2 L’ye tamamlanmıştır.

PG standartların hazırlanması: Liyofilize haldeki standart 1 mL EIA tamponu içerisinde çözülerek 10 ng/mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır.

8 adet test tüp 1'den 8'e kadar numaralandırılmıştır. İlk tüpe 800 µL diğer 7 tüpe 500 µL EIA tamponu ilave edilmiştir. Stok standart çözeltisinden 200 µL 1. tüpe ilave edilip vorteksle karıştırılmıştır. 1. Tüpten 500 µL çözelti 2. tüpe aktarılıp karıştırılmıştır. Bu şekilde her defasında bir önceki tüpten 500 µL çözelti alınıp bir sonrakine ilave edilerek dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 15. PG Standartların Hazırlanışı

PG AChE konjugatı: Üzerine 6 mL EIA tamponu ilave edilerek karıştırılmıştır.

PG antiserum: Üzerine 6 mL EIA tamponu ilave edilerek karıştırılmıştır

COX Reaksiyonlarının Dilüsyonları

2 adet test tüp BC1 ve BC2 olarak adlandırılmıştır. Her birine 990 µL EIA tamponu ilave edilmiştir. BC1 tüpüne, inaktif COX-1 tüpünden 10 µL, BC2 tüpüne inaktif COX-2 tüpünden 10 µL çözelti eklenip iyice karıştırılmıştır (1:100).

COX-1 ve COX-2 için 3'er adet test tüp IA1, IA2, IA3 olarak adlandırılmıştır.

IA1 tüplerine 990 µL EIA tamponu ve başlangıç aktivite tüpünden (COX-1/COX-2) 10 µL çözelti ilave edilip iyice karıştırılmıştır (1:100).

IA2 tüplerine 950 µL EIA tamponu ve IA1 tüpünden 50 µL çözelti ilave edilip iyice karıştırılmıştır (1:2000).

IA3 tüplerine 500 µL EIA tamponu ve IA2 tüpünden 500 µL çözelti ilave edilip iyice karıştırılmıştır (1:4000).

EIA'da IA2 ve IA3 tüpleri kullanılmıştır, IA1 çok konsantre olduğu için kullanılmamıştır.

Her bir COX inhibitör tüpü için 3 adet test tüp C1, C2, C3 olarak adlandırılmıştır.

C1 tüplerine 990 µL EIA tamponu ve COX inhibitör tüpünden 10 µL çözelti ilave edilip iyice karıştırılmıştır (1:100).

C2 tüplerine 950 µL EIA tamponu ve C1 tüpünden 50 µL çözelti ilave edilip iyice karıştırılmıştır (1:2000).

Analiz Prosedürü

Tüm standart ve örnekler çift çalışılmıştır.

Çizelge 8. Deneyin Uygulandığı Mikropleyt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kör	S1	S1	BC1	BC1	B3	B3	U4	U4	B5	B5	U5
B	Kör	S2	S2	BC2	BC2	B4	B4	U5	U5	B6	B6	U5
C	NBS	S3	S3	IA2	IA2	B5	B5	U6	U6	B7	B7	U6
D	NBS	S4	S4	IA3	IA3	B6	B6	U7	U7	B8	B8	U6
E	Bo	S5	S5	IA2	IA2	B7	B7	B1	B1	U1	U1	U7
F	Bo	S6	S6	IA3	IA3	U1	U1	B2	B2	U2	U2	U7
G	Bo	S7	S7	B1	B1	U2	U2	B3	B3	U3	U3	U8
H	TA	S8	S8	B2	B2	U3	U3	B4	B4	U4	U4	U8

TA : Total aktivite

B : Balzam

NBS: Spesifik olmayan bağlanma

U : Uçucu yağ

Bo : En fazla bağlanma

Siyah : COX-1

S₁₋₈ : Standartlar

Kırmızı: COX-2

Çizelge 9. Mikropleyde İlave Edilen Reaktif Miktarları

Kuyucuk	EIA Tamponu	Standart/Örnek	Konjugat	Antiserum	BC1/BC2	IA2/IA3
KÖR						
TA						
NBS	100 µL		50 µL			
Bo	50 µL		50 µL	50 µL		
Std./Örn.		50 µL	50 µL	50 µL		
BC1/BC2			50 µL	50 µL	50 µL	
IA2/IA3			50 µL	50 µL		50 µL

Mikropleyitin üzeri şeffaf film ile örtülüp oda sıcaklığında, karanlıkta, orbital çalkalayıcıda, 18 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra

Ellman reaktifi üzerine 20 mL ultra saf su ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kuyucuklar 300 µl yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkanmıştır. Her kuyucuğa 200 µL Ellman reaktifi, TA kuyucuğuna 5 µL konjugat ilave edilmiştir. Mikropleyitin üzeri tekrar örtülerek orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildikten sonra kuyucukların absorbanı 405 nm’de okunmuştur.

Sonuçların Hesaplanması

Standartlar ve örnekler için optik yoğunluklarının (OD : Optik dansitometre) ortalaması hesaplanmıştır. Bu ortalamalardan NSB kuyucuklarının optik yoğunluk ortalamaları çıkartılarak ortalama net optik yoğunluk hesaplanmıştır.

Ortalama Net OD = Standart veya Örneklerin OD Ortalamaları - NSB OD Ortalaması

Yüzde bağlanma hesabı için, her bir standart kuyucuk için bulunan net ortalama yoğunluk değeri, maksimum bağlanma kuyucukları olan Bo’nun net ortalama yoğunluk değerine bölünüp sonuçlar 100 ile çarpılmıştır.

$$\% \text{Bağlanma} = (\text{Net OD} / \text{Net Bo OD}) \times 100$$

Hesaplamalarda “Myassays Analysis Software” programı kullanılmıştır. Bu programda standartların PG konsantrasyonlarına karşı yüzde bağlanmalarını gösteren logaritmik bir eğri çizilmiştir. Bu eğriden yararlanarak örneklerin PG konsantrasyonları belirlenmiştir.

BC1-BC2 konsantrasyonu, IA2 ve örneklerin konsantrasyonlarından çıkartılmıştır.

IA2 PG konsantrasyonu ile örneklerin PG konsantrasyonu birbirine oranlanarak, örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{(\text{IA2 PG konsantrasyonu} - \text{örnek PG konsantrasyonu})}{\text{IA2 konsantrasyonu}} \times 100$$

Anti-*Helicobacter pylori* Aktivitesi

Anti-*Helicobacter pylori* aktivitesinde agar dilüsyon yöntemi (Şekil 17) uygulanmıştır.

Helicobacter pylori (ATCC 43504 ve ESOGÜ klinik izolatları) suşları, %5 defibrine koyun kanlı Columbia agar besiyerinde, 37°C'de, mikroaerofilik atmosferde, anaerobik kavanoz içerisinde, 7 gün inkübe edilerek geliştirilmiştir. Buradan SF (serum fizyolojik) çözeltilisinde 2 McFarland yoğunlukta bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır (Şekil 17). Columbia agar hazırlanırken içerisine, klinik örneklerden *H. pylori* izolasyonu için seçici bir takviye olan Dent supplement ilave edilmiştir.

Mikroaerofilik ortam, kimyasal olarak mikroaerofilik ortam oluşturma sistemi (Oxoid) ile oluşturulmuştur.

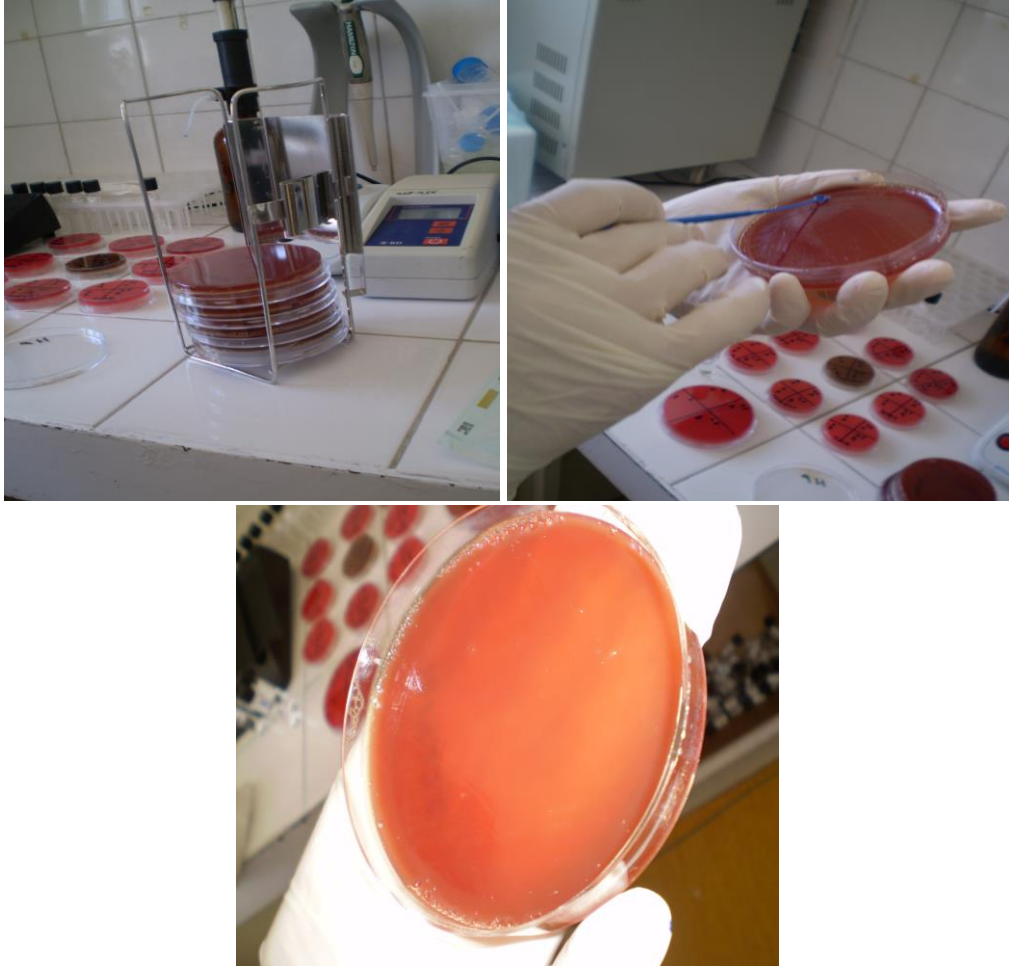
DMSO içerisinde 20 mg/mL'lik, 1 mL uçucu yağ çözeltilisi hazırlanıp 8 mL, %5 koyun kanı içeren Müeller-Hinton agar (MHA) içerisine ilave edilerek 60 mm'lik petriye dökülmüştür.

DMSO'nun etkisini görmek için, 1 mL DMSO, %5 koyun kanlı MHA'ya ilave edilerek 60 mm'lik petriye dökülmüştür.

Pozitif kontrol için 90 mm'lik petriye %5 koyun kanı içeren MHA dökülmüştür.

SF içerisinde hazırlanan süspansiyonlardan, petrilerin belirli yerlerine 3'er µL damlatıldıktan sonra 37°C'de, anaerobik kavanoz içerisinde, mikroaerofilik ortamda, 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra petrilerde üreme olup olmadığı hızlı üreaz, katalaz, oksidaz testleri ve mikroskopta Gram boyama yöntemiyle incelenmiştir.



Şekil 16. Agar Dilüsyon Yöntemi ile Anti- *Helicobacter pylori* Aktivitesi



Şekil 17. McFarland Cihazı, SF Solüsyonları ve Anaerobik Kavanoz

BULGULAR ve TARTIŞMA

Distilasyon Sonucu

Su distilasyonu sonucunda *Styrax Liquidus*dan elde edilen uçucu yağ verimi %0.57 olarak hesaplanmıştır.

Uçucu Yağın Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Sonucu

Elde edilen uçucu yağın eş zamanlı, 3 tekrarlı olarak yapılan GK ve GK/KS analizleri sonucunda yağın %99.3±0.2'üne karşılık gelen 15 bileşik tanımlanmıştır. Ana bileşikler olarak stiren (%84.6±0.1), α-pinen (%8.3±0.1) ve β-pinen (%2.1) olarak tespit edilmiştir. Uçucu yağın kimyasal bileşimi **Çizelge 10**'da verilmiştir.

Çizelge 10. *Styrax Liquidus* Uçucu Bileşikleri

RRI	Bileşik	(%)
1032	α-Pinen	8.3±0.1
1076	Kamfen	0.4±0
1118	β-Pinen	2.1±0
1174	Mirsen	0.2±0
1272	Stiren	84.6±0.1
1466	α-Kubeben	0.7±0
1497	α-Kopaen	0.1±0
1597	β-Kopaen	0.6±0
1671	Asetofenon	0.4±0
1704	γ-Murolen	0.3±0
1740	α-Murolen	0.3±0
1773	δ-Kadinen	0.3±0
1800	Benzen propanol	0.5±0
2195	4-Etil fenol	0.2±0
2308	Sinnamil alkol	0.3±0
Toplam		99.3±0.2
Tanımlanan Bileşik sayısı		15

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır;
% FID verilerine göre hesaplanmıştır.

Katı Faz Mikroekstraksiyonu (SPME) - GK Analiz Sonucu

Balzamın SPME ve GK analizi sonucunda 17 bileşik tanımlanmıştır. Ana bileşikler olarak stiren (%75.0), benzen propanol (%9.5) ve 4-Etil fenol (%4.5) olarak tespit edilmiştir. Uçucu bileşenler **Çizelge 11**'de verilmiştir.

Çizelge 11. *Styrax Liquidus*'un SPME Sonucunda Tanımlanan Uçucu Bileşikleri

RRI	Bileşik	%
1032	α-Pinen	4.0
1272	Stiren	75.0
1466	α-Kubeben	0.5
1497	α-Kopaen	0.1
1541	Benzaldehit	0.1
1597	β-Kopaen	0.5
1671	Asetofenon	0.3
1704	γ-Murolen	0.2

Çizelge 11. (Devam) Balzamin SPME Sonucunda Tanımlanan Uçucu Bileşikleri

RRI	Bileşik	%
1740	α -Murolen	0.2
1773	δ -Kadinen	0.1
1800	Benzen propanal	0.2
1896	Benzil alkol	0.3
2049	<i>p</i> -Etil gayakol	0.2
2065	Benzen propanol	9.5
2068	(<i>E</i>)-Sinnamaldehit	0.7
2195	4-Etil fenol	4.5
2113	Kumin alkol	2.5
Toplam		98.9
Tanımlanan Bileşik sayısı		17

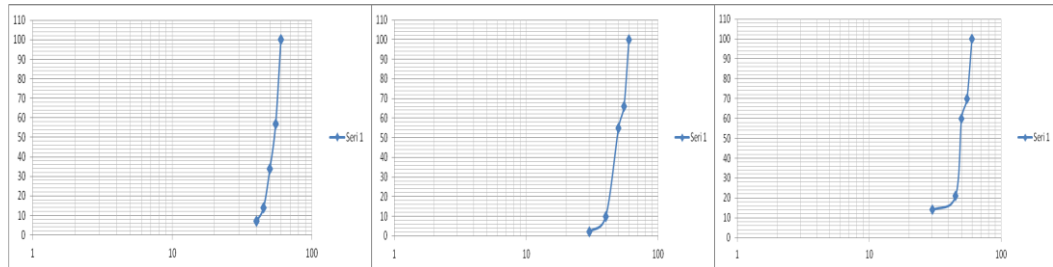
RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır.

Aktivite Çalışmaları Sonuçları

In vitro Lipooksijenaz (LOX) İnhibisyonu Sonuçları

Spektrofotometrede kinetik ölçüm sonucunda 3 mg/mL, 2.75 mg/mL, 2.5 mg/mL, 2.25 mg/mL ve 1.5 mg/mL'lik çözeltilerin final hacimdeki konsantrasyonları ve % inhibisyonlarına göre IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Kinetik okuma 234 nm'de 20 dakikada 40 okuma yapılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde standart IC₅₀ değeri de hesaplanmıştır.

Grafiklerde x koordinatı konsantrasyon, y koordinatı % inhibisyon değerlerini ifade etmektedir.

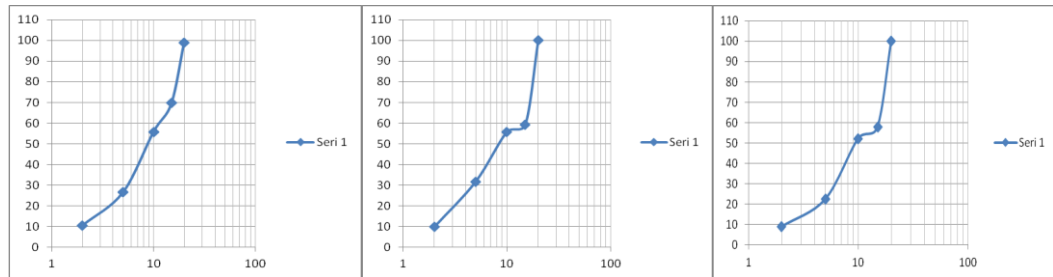


IC₅₀ = 54 µg/mL

IC₅₀ = 48 µg/mL

IC₅₀ = 49 µg/mL

Şekil 18. Sığala Uçucu Yağı IC₅₀ Grafikleri



IC₅₀ = 9 µg/mL

IC₅₀ = 8.5 µg/mL

IC₅₀ = 9.5 µg/mL

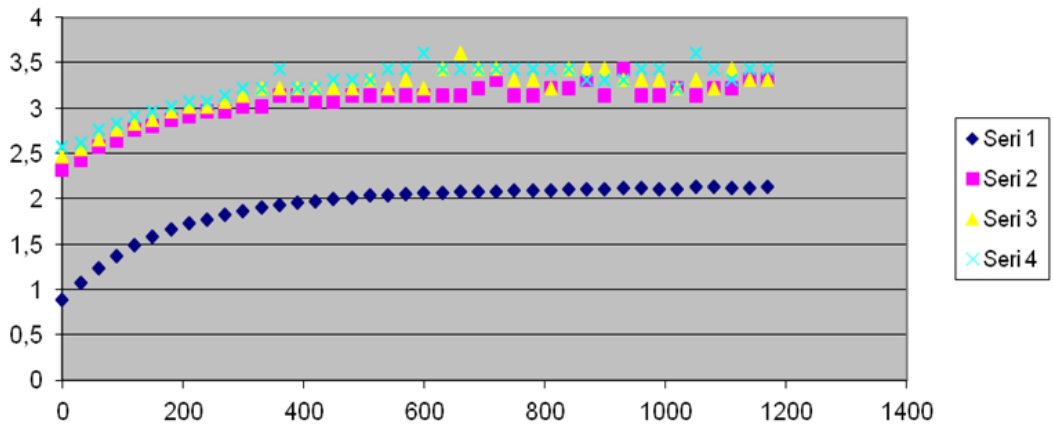
Şekil 19. NDGA IC₅₀ Grafikleri

Sığıla uçucu yağ $IC_{50} = 50.33 \pm 3.22 \mu\text{g/mL}$, NDGA $IC_{50} = 9 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır.

Sığıla uçucu yağın zayıf-orta antiinflamatuar etki gösterdiği belirlenmiştir.

Kolon Kromatografisi Sonuçları

Elde edilen fraksiyonun GK ve GK/KS analizleri sonucunda stiren olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen stirenin LOX inhibisyonu incelenmiştir. $60 \mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonun %35.19 enzim inhibisyonu gösterdiği hesaplanmıştır.

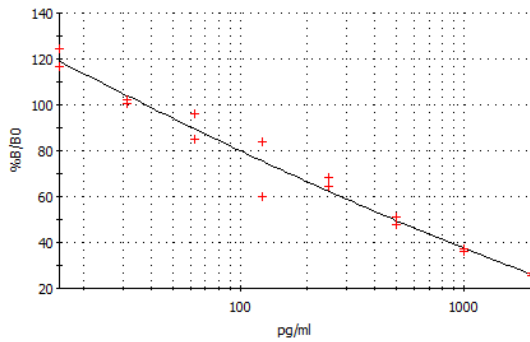


Şekil 20. Stiren-LOX İnhibisyonu Grafiği (Seri 1:Enzim, seri 2-3-4:Stiren)

Stiren $IC_{50} > 60 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır.

In vitro Siklooksijenaz (COX) İnhibisyonu Sonuçları

Balzam ve uçucu yağın PG konsantrasyonları, IA2 PG konsantrasyonlarından daha yüksek olduğu için çalışılan dozların, COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe etmediği görülmüştür.



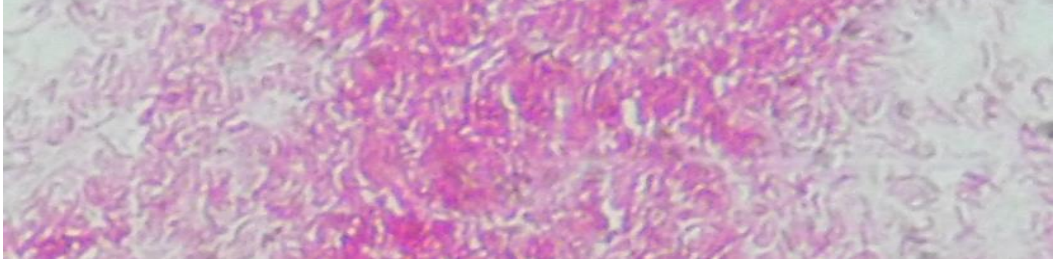
Şekil 21. Standartların PG Konsantrasyonlarına Karşı Yüzde Bağlanmalarını Gösteren Grafik

Çizelge 12. “Myassays Analysis Software” Programı Analiz Sonuçları

Grup	Kuyucuklar	Absorbans	B/B0 %	Kontr.(pg/ml)
Kör	A1, B1	0.172, 0.172	-	-
Standart1	A2, A3	0.38, 0.388	25.9	2020.8
Standart2	B2, B3	0.475, 0.464	36.6	1050.6
Standart3	C2, C3	0.585, 0.559	49.3	504.4
Standart4	D2, D3	0.726, 0.692	66.4	201
Standart5	E2, E3	0.85, 0.657	71.9	181.6
Standart6	F2, F3	0.948, 0.86	90.7	61.1
Standart7	G2, G3	0.998, 0.985	101.6	35
Standart8	H2, H3	1.174, 1.112	120.5	14.8
BC1	A4, A5	0.863, 0.522	64.3	39547.2
BC2	B4, B5	0.772, 0.587	62.7	29285.6
IA2	C4, C5	0.549, 0.509	44	1375793.4
IA3	D4, D5	0.679, 0.575	56.2	1469660.7
IA2	E4, E5	0.533, 0.483	41.4	1611054.3
IA3	F4, F5	0.459, 0.514	38.7	3785690.5
B1	G4, G5	0.407, 0.437	30.6	3026739.9
B2	H4, H5	0.385, 0.408	27.5	3677703.7
B3	A6, A7	0.46, 0.468	35.9	2188029.4
B4	B6, B7	0.443, 0.443	33.3	2560542.9
B5	C6, C7	0.448, 0.446	33.8	2484412.1
B6	D6, D7	0.456, 0.463	35.3	2262552.4
B7	E6, E7	0.536, 0.53	44.5	1322647.6
U1	F6, F7	0.486, 0.476	38	1929417.2
U2	G6, G7	0.459, 0.462	35.4	2245015
U3	H6, H7	0.478, 0.486	38.1	1914738.6
U4	A8, A9	0.889, 0.564	68.6	595545.9
U5	B8, B9	0.435, 0.421	31.4	2874403.1
U6	C8, C9	0.477, 0.422	34.1	2495337.7
U7	D8, D9	0.53, 0.472	40.5	1705809.6
B1	E8, E9	0.429, 0.435	31.9	2784397.5
B2	F8, F9	0.514, 0.473	39.6	1780474.7
B3	G8, G9	0.497, 0.428	35.7	2292211.3
B4	H8, H9	0.529, 0.526	43.8	1375422.7
B5	A10, A11	0.544, 0.599	49.3	1027931.2
B6	B10, B11	0.495, 0.293	27.2	5127565.3
B7	C10, C11	0.477, 0.482	37.8	1949802
B8	D10, D11	0.478, 0.51	39.6	1765557.6
U1	E10, E11	0.497, 0.494	39.8	1733504.4
U2	F10, F11	0.509, 0.508	41.4	1577010.1
U3	G10, G11	0.498, 0.526	41.9	1546123.1
U4	H10, H11	0.433, 0.451	33.1	2586533.8
U5	A12, B12	0.475, 0.492	38.3	1896844.3
U6	C12, D12	0.501, 0.501	40.5	1665258.3
U7	E12, F12	0.519, 0.522	42.9	1446265.6
U8	G12, H12	0.518, 0.55	44.6	1322201.4
NSB1	C1, D1	0.174, 0.178	0	12224.4
B01	E1, F1, G1	0.316, 1.339, 1.281	100	1172.9
TA1	H1	1.721	192.5	0.6

Anti-*Helicobacter pylori* Aktivite Sonuçları

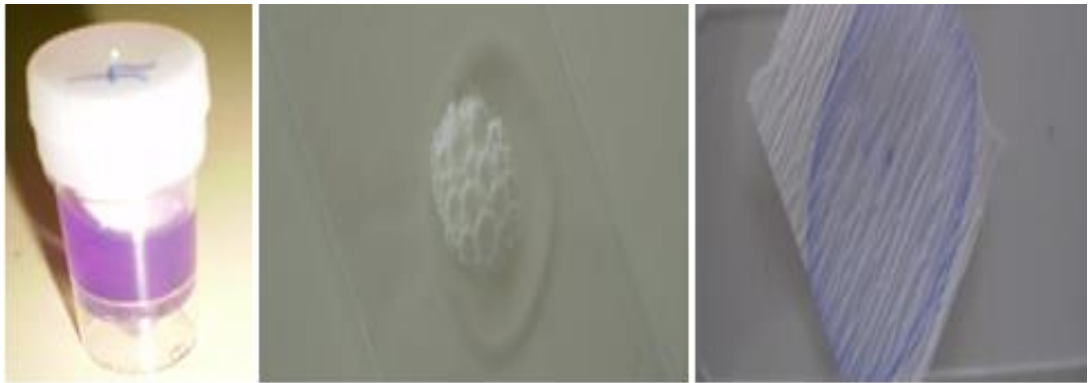
Agar dilüsyon yöntemi sonucunda petrilerde üreme görülmüştür. Hızlı üreaz, katalaz, oksidaz testleri ve mikroskopik inceleme ile uçucu yağın 2222.2 µg/mL konsantrasyonda *Helicobacter pylori* üzerinde antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 22. *Helicobacter pylori* Mikroskopik Görüntüsü



Şekil 23. *Helicobacter pylori* 60 mm'lik Petrideki Görüntüsü



Şekil 24. Hızlı üreaz, Katalaz ve Oksidaz Testleri

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında Styrax Liquidus'un su distilasyonu yöntemi ile elde edilen uçucu yağının Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) analizleri sonucunda yağın %99.3±0.2'üne karşılık gelen 15 bileşik tanımlanıp ana bileşikler stiren (%84.6±0.1), α -pinen (%8.3±0.1) ve β -pinen (%2.1) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 10). Balzamin katı faz mikroekstraksiyon (SPME) ve GK analizi sonucunda ise 17 bileşik tanımlanıp ana bileşikler stiren (%75.0), benzen propanol (%9.5) ve 4-etil fenol (%4.5) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 11).

In vitro lipooksijenaz (LOX) aktivite çalışmalarında, standart madde olarak NDGA kullanılmıştır. Ölçümler spektrofotometrede 234 nm'de 30 saniyelik aralıklarla 40 okuma yapılarak gerçekleştirilmiştir. IC₅₀ değerleri, uçucu yağ için 50.33±3.22 µg/mL, NDGA için 9±0.5 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Standart IC₅₀ değeri ile karşılaştırıldığında uçucu yağın lipooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği ve zayıf-orta antiinflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir.

Sütun kromatografisi ile izole edilen stirenin LOX inhibisyonu incelenip 60 µg/mL'lik konsantrasyonda %35.19 oranında enzim inhibisyonu gösterdiği hesaplanmıştır.

In vitro Siklooksijenaz (COX) aktivite çalışmasında, COX inhibisyonu "COX İnhibitör Tarama Deneyi Kiti" ile incelenmiştir. COX Inhibitor Screening Assay Kit (Katalog No:560131) kullanılmıştır. Balzam ve uçucu yağın 200 µg/mL'lik konsantrasyonlarının COX inhibisyonu göstermediği görülmüştür.

Sığıla balzaminin birçok mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal etkisi bilinmektedir. Ayrıca mide ülseri ağrılarına karşı geleneksel kullanımları bulunmaktadır. Tez çalışmasında uçucu yağın agar dilüsyon yöntemi ile incelenen anti-*Helicobacter pylori* aktivitesi sonucunda 2222,2 µg/mL konsantrasyonda *H. pylori* üzerinde antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir.

Halk tıbbındaki kullanımından ve yapılan bilimsel çalışmalardan dolayı antiinflamatuvar etkisi bilinen sığıla balzaminin, bu çalışma ile uçucu yağından kaynaklanan antiinflamatuvar etkisi belirlenmiştir. Son zamanlarda NSAİ ilaçların yan etkilerinden dolayı selektif ilaçlar geliştirilmektedir. Bu şekilde normal fizyoloji için gerekli prostaglandinleri etkilemeden inflamasyonun azalması sağlanmaktadır. Sığıla uçucu yağın COX'u inhibe etmeyip LOX inhibisyonu göstermesi ile gelecek çalışmalarda yeni bir selektif antiinflamatuvar ilaç keşfine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sıgala balzamu içeriğindeki yüksek stiren miktarından dolayı insan hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkiye sahiptir. Bu nedenle geleneksel tedavide kullanılan dozlarının iyi belirlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abacıoğlu, N., Aljezi, İnflamasyon, Pirezis ve Nonsteroidal Analjezik ve Antiinflatuvar İlaçlar, Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Ders Kitabı, T.A., Bökesoy, İ., Çakıcı, M., Melli (Ed.), Gazi Kitabevi, Ankara, 473-495 (2000).

Adak, S., Bazı 5-Kloro-6-(Tiyazol-4-İl)-2-Okso-3H Benzotiyazol Türevlerinin Sentezi Ve COX İnhibitör Etkileri Üzerinde Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara (2007).

Altındış, M., Özdemir, M., *Helicobacter pylori* and Diagnosis, Kocatepe Tıp Dergisi, 2 (1), 1-12 (2003).

Anilkumar, M., Ethnomedicinal Plants As Antiinflammatory and Analgesic Agents, Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics, D. Chattopadhyay (Ed), Research Signpost, Kerala, India, 37/661 (2), 267-293 ISBN: 978-81-308 0390-6 (2010).

Ayhan, Z., Döş, A., Gıdalarda Katı Faz Mikroekstraksiyon Tekniği ile Flavor Analizi, GIDA 29 (2), 169-175 (2004).

Bayazıt, V., Effects of Sweet Gum (*Liquidambar orientalis*), Mulberry Leaves (*Morus alba*) and the Larval Ganglion Extracts of Silkworm (*Bombyx mori*) on Stroke Parameters (Hemoglobin, Strokin, Cortexin, Frontalin, Temporalin, Parietalin, Occipitalin, Brain Ventriculin, Hemorrhagic Clot) in Rabbits (*Lepus capensis*), Journal of Animal and Veterinary Advances, 8, 2164-2170 (2009).

Baylac, S., Racine, P., Inhibition of 5-Lipoxygenase by Essential Oils and Other Natural Fragrant Extracts, International Journal of Aromatherapy, 13 (2-3), 138-142 (2003).

Baytop, T., Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 215-216, 335-336 (1999).

Dannhardt, G., Kiefer, W., Cyclooxygenase Inhibitors-Current Status and Future Prospects, Eur. J. Med. Chem., 36, 109-26 (2000).

Dannhardt, G., Laufer, S., Structural Approaches to Explain the Selectivity of COX-2 Inhibitors. Is There A Common Pharmacophore?, Curr. Med. Chem., 7, 1101-12 (2000).

Deniz, Ç., Yara İyileşmesinde Bitki Reçinesi Olan Sığla Yağı (*Liquidambar orientalis*) ile Kollagenaz İçeren Pomadların Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Kahramanmaraş (2010).

Ekim, T., Koyuncu M., Vural M., Duman H., Aytaç Z., Adıgüzel N., Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler), Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van 100. Yıl Üniversitesi Yayını (2000).

Erdoğan, H., Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçlar, Farmasötik Kimya, H. Akgün (Ed.), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 235-241 (2004).

Fabrizi, F., Martin, P., *Helicobacter pylori* Infection in Patients with End-Stage Renal Disease. Int. J. Artif. Organs, 23, 157-164 (2000).

Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau A.M., Perichet, C., Delbecque C., Arnaudo, J.F., Chemical Composition of The Essential Oils from Turkish and Honduras *Styrax*, Flav. Frag. J., 20, 70-73 (2005).

Fıçıcıoğlu, S., Safılaştırılmış Sığla Yağının Analitik İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (1988).

Fitzgerald, G.A., COX-2 and Beyond: Approaches to Prostaglandin Inhibition in Human Disease, Nat. Rev. Drug Discov., 2(11), 879-890 (2003).

Flower, R.J., The Development Of COX2 Inhibitors, Nat. Rev. Drug Discov., 2(3), 179-191 (2003).

Gonzalez-Periz, A., Claria, J., New Approaches to The Modulation of The Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase Pathways, Curr. Top. Med. Chem., 7(3), 297-309 (2007).

Gökşen, S, U., Kelekçi, G, N., Antiinflamatuvar Tedavide Yeni Bir Yaklaşım: Siklooksijenaz ve 5-Lipooksijenazın Dual İnhibitörleri. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 30(1), 81-118 (2010).

Güleç, M., Oęur, R., Gül, H., Korkmaz. A., Bakır, B., Investigation of Vasoactive Ion Content of Herbs Used in Hemorrhoid Treatment in Turkey, Pak. J. Pharm. Sci., 22, 187-92 (2009).

Haeggstrom, J.Z., Wetterholm, A., Enzymes and Receptors in the Leukotriene Cascade, Cellular and Molecular Life Science, 59 (5), 742 (2002).

Harmon, A. D., Solid-Phase Microextraction For The Analysis of Flavors Techniques For Analyzing Food Aroma, Marsili, R. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., 81-112, New York (1997).

http://www.yolculuk.com.tr/sayi_85/104_endemik-bitkiler-anadolu-kulturunde-sigla-agaci-yazi-hasan-torlak-fotograflar-faruk-akbas (2011).

<http://www.drdenizdogan.com/2012/05/non-steroid-anti-inflamatuar-ilaclar.html> (2012).

Karadeniz, B., İnsan Lenfosit Kültürlerinde Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis*) Balzamının Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fatih Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul (2011).

Kaya, Y., Aksakal, O., Endemik Bitkilerin Dünya ve Türkiye'deki Dağılımı, Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi, 7(1), 85-99 (2005).

Kayaalp, S.O., Non-steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık, Ankara, (10) 960-986 (2002).

Khedmat, H., Ahmadzad-Asl, M., Amini, M., *Helicobacter pylori* Infection in Uremic Patients and Renal Transplant Recipients, Transplant Proc., 39(4), 1003-1007 (2007).

Kiefer, W., Dannhardt, G., COX-2 Inhibition and Pain Management, A Review Summary, Expert Rev. Clin. Immunol., 1(3), 431-442 (2005).

Kim, J., Seo, S. M., Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). J. Agric. Food Chem. 56, 16 (2008).

Koenig, W.A., Joulain, D., Hochmuth, D.H., Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, MassFinder 3, D. H. Hochmuth (ed.), Hamburg, Germany, 2004.

Kuhn, H., Structural Basis for the Positional Specificity of Lipxygenase, Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 62(3), 255 (2000).

Küçükala, A., Durmuşkahya, C., Koray, Z., Sığla Ağacının Korunmasına Yönelik Eğitim Çalışmaları Projesi Sonuç Raporu, ÖÇKK Başkanlığı, Ankara (2010).

Leone, S., Ottani, A., Bertolini, A., Dual Acting Anti-inflammatory Drugs, Curr. Top. Med. Chem., 7(3), 265-275 (2007).

Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Reboul, P., Pelletier, J.P., Therapeutic Role of Dual Inhibitors of 5-LOX and COX, Selective and Non-selective Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Ann. Rheum. Dis., 62(6), 501-509 (2003).

McLafferty, F.W., Stauffer, D.B., The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, J Wiley and Sons, New York, 1989.

Megraud, F., Hazell, S., Glupczynski, Y., Antibiotic Susceptibility and Resistance, *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics, H. LT Mobley, G. L Mendz, and S. L Hazell (Ed), Chapter 42, Washington (DC), ASM. Press (2001).

Murakami, M., Nakatani, Y., Tanioka, T., Kudo, I., Prostaglandin E Synthase, Prostaglandins Other Lipid Mediat, 68-69, 383-399 (2002).

Nie, D., Che, M., Grignon, D., Tang, K., Honn, K.V., Role Of Eicosanoids in Prostate Cancer Progression, *Cancer Metastasis Rev.*, 20(3-4), 195-206 (2001).

Nie, D., Honn, K. V., Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Tumor Angiogenesis, *Cell. Mol. Life Sci.*, 59, 799-807 (2002).

Oskay, M., Sarı, D., Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants, *Pharmaceutical Biology*, 45, 176-181 (2007).

Radmark, O., Samuelsson, B., 5-lipoxygenase: Regulation and Possible Involvement in Atherosclerosis, Prostaglandins Other Lipid Mediat, 83(3), 162-174 (2007).

Ryn, J. V., Trummlitz, G., Pairet, M., COX-2 Selectivity and Inflammatory Processes, *Curr. Med. Chem.*, 7, 1145-1161 (2000).

Sağdıç, O., Özkan, G., Özcan M., Özcelik, S., A study on Inhibitory Effects of Sigala Tree (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*) Storax Against Several Bacteria *Phytother Res.*, 19, 549-551 (2005).

Samuelsson, B., Dahlen, S. E., Lindgren, J. A., Rouzer, C. A., Serhan, C. N., Leukotriene and Lipoxins: Structures, Biosynthesis and Biological Effects, *Science*, 237(4819), 1171 (1987).

Scott, A., Khan, K. M., Roberts, C. R., Cook, J. L., Duronio, V., What Do We Mean by the Term Inflammation? A Contemporary Basic Science Update for Sports Medicine, *Br. J. Sports Medicine*, 38, 372-380 (2004).

Tanker, M., Sayron, E., *Styrax Liquidus* Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar *Ankara Ecz. Fak. Mec.*, 13, 130 (1974).

Tanker, M., Tanker, N., *Farmakognozi Ders Kitabı*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 65, 378-379, Ankara (1990).

Turini, M. E., Dubois, R. N., Cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target, *Annu. Rev. Med.*, 53, 35-57 (2002).

Velioğlu, E., Kandemir, G., Tayanç, Y., Çengel, B., Alan, M., Kaya, Z., Türkiye'deki Sığla (*Liquidambar orientalis* Miller) Populasyonlarının Genetik Yapısının Moleküler Belirteçlerle Belirlenmesi ve Koruma Stratejileri Geliştirilmesi, T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü, *Teknik Bülten No:20*, Ankara (2008).

Yılmaz, H., Bazı Bitki Özütlерinin Erkek Farelerin Kan ve İç Organlarındaki Toplam Lipid ve Toplam Kolesterol Seviyelerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya (2005).

Werz, O., Steinhilber, D., Therapeutic Options for 5-Lipoxygenase Inhibitors, Pharmacol. Ther., 112(3), 701-718 (2006).

Wyle, F. A., *Helicobacter pylori*: Current Perspectives, J. Clin. Gastroenterol., 13 (1), 114-124 (1991).