

***CRATAEGUS ORIENTALIS* ETANOL  
EKSTRESİNİN  
ANTİNOSESİPTİF, ANTİİNFLAMATUVAR,  
ANTİTROMBOTİK**

**ve  
ANTİOKSİDAN  
ETKİLERİ**

**Zeynep BOR**

Yüksek Lisans Tezi

**CRATAEGUS ORIENTALIS ETANOL  
EKSTRESİNİN  
ANTİNOSİSEPTİF, ANTİİNFLAMATUVAR,  
ANTİTROMBOTİK  
ve  
ANTİOKSİDAN  
ETKİLERİ**

**Zeynep BOR**  
Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Farmakoloji Anabilim Dalı  
Eskişehir, Haziran 2010

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Rana ARSLAN**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Zeynep BOR'un "*Crataegus Orientalis* Etanol Ekstresinin Antinosiseptif, Antiinflamatuvar, Antitrombotik ve Antioksidan Etkileri" başlıklı Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek lisans tezi **04/06/2010** tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Adı-Soyadı**

**İmza**

**Üye (Tez Danışmanı): Yrd. Doç. Dr. Rana ARSLAN**

.....

**Üye : Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK**

.....

**Üye : Prof. Dr. Kevser EROL**

.....

**Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun  
28/05/2010 tarih ve 13/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

**Enstitü Müdürü**

**Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK**

## ÖNSÖZ

Bitkilerle tedavi oldukça sık bir şekilde ele alınmaktadır. Özellikle bazı hastalıkların tedavisinde farmakopelere girmiş olan droglar uzmanlar tarafından da tavsiye edilerek kullanılmaktadır. Değişik ülkelerdeki farmakopelerde yer alan değişik alıç türlerinin kullanıldığı bilinmektedir. Ülkemizde de alıç yaygın bir şekilde yetişmekte olup halk arasında da kullanımı bildirilmektedir. Günümüzde halk arasında kullanılan bitkilerin daha doğru bir şekilde kullanılabilmesi için farmakolojik etkileri ve içerdikleri kimyasallar açısından değerlendirilmeleri gerekmektedir. Bu araştırmalar, tıbbi bitkilerin hastalıkların tedavisinde daha doğru bir şekilde kullanılabilmelerini sağlayacaktır.

Yüksek lisans eğitimim süresince ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, bana fikirleriyle yol gösteren, tecrübeleri ve bilgileriyle beni yönlendiren, hoşgörüsünü ve anlayışını hiçbir zaman eksik etmeyen, her şeyden önemlisi farmakolojiyi bana sevdiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Rana ARSLAN'a,

Deneysel çalışmalarım esnasında her türlü konuda bana yardımcı olan ve destekleyen, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Nurcan BEKTAŞ'a,

Yüksek lisans döneminde bana yardımcı olan ve engin bilgilerinden yararlandığım Anadolu Üniversitesi Farmakoloji A.B.D. Başkanı Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e ve eğitimim süresince bana emeği geçen bütün hocalarıma,

Çalışmam boyunca yardım ve destekleriyle katkıda bulunan arkadaşlarım Sinem ER ve Ayça ÇAKMAK'a,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi gerek maddi gerek manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme ve tüm yakınlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep BOR

**CRATAEGUS ORIENTALIS ETANOL EKSTRESİNİN  
ANTİNOSİSEPTİF, ANTIİNFLAMATUVAR, ANTİTROMBOTİK  
ve  
ANTIOKSİDAN ETKİLERİ**

**ÖZET**

*Crataegus* (alıç) bitkisinin türlerinin farklı kısımlarından hazırlanan ekstrelerinin ilaç olarak kullanımı çok eski zamanlara dayanmaktadır. Alıcın kalp ve damar hastalıkları için kullanımı çok yaygındır ve bu yararlı terapötik etkilerinin antioksidan içeriğinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada *Crataegus orientalis* yapraklarının etanol ekstresinin *in vitro* antioksidan aktivitesinin belirlenmesi ve olası antinosiseptif, antiinflamatuvar ve antitrombotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ekstrenin nosisepsiyon üzerindeki etkilerinin fareler üzerinde değerlendirilmesi için hot-plate, tail-immersion ve asetik asit ile indüklenen kıvranma testleri uygulanmıştır. Antiinflamatuvar ve antitrombotik etkileri ise karragenin ile indüklenen pençe ödem testi ve kuyruk tromboz testi kullanılarak belirlenmiştir. Ekstrenin antioksidan aktivitesi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve  $\beta$ -karoten-linoleik asit sistemi kullanılarak tayin edilmiştir.

Antinosiseptif ve antiinflamatuvar etkilerin belirlenmesi için uygulanan testlerde ekstrenin 50, 100 ve 200 mg/kg olarak hazırlanan dozları intraperitoneal olarak 30 dakika öncesinden verilmiştir. Hot-plate testinde 50 mg/kg dozunda kontrole karşılaştırıldığında anlamlı bir etki görülmezken, 100 ve 200 mg/kg dozlarında antinosiseptif etkide anlamlılık gözlenmiştir. Tail-immersion testinde tüm dozlarda görülen antinosiseptif etki kontrole göre anlamlılık göstermiştir. Asetik-asit ile indüklenen kıvranma testinde ise doz arttıkça kıvranma sayılarında önemli bir düşüş görülmüştür. Antiinflamatuvar etki testinden elde edilen sonuçlar doza bağımlı bir etkinlik göstermiştir ve 200 mg/kg dozda inflamasyonun inhibisyon aralığı %68,02 ve %96,8'dir. Antitrombotik aktivite testinde kuyruklarda tromboz oluşumunun önemli derecede baskılandığı gözlenmiştir. DPPH-radikal süpürücü aktivite testinde ve  $\beta$ -karoten-linoleik asit sisteminde ekstrenin antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Deneylelerden elde edilen bulgulara göre, *Crataegus orientalis* etanol ekstresinin antinosiseptif, antiinflamatuvar, antitrombotik ve antioksidan aktivitelerinin dikkate değer olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Crataegus orientalis*, alıç, antinosiseptif, antiinflamatuvar, antitrombotik, antioksidan

**ANTINOCICEPTIVE, ANTI-INFLAMMATORY, ANTITHROMBOTIC  
and  
ANTIOXIDANT EFFECTS of the ETHANOL EXTRACT of  
*CRATAEGUS ORIENTALIS***

**ABSTRACT**

The medicinal use of extracts prepared from plant parts of the genus *Crataegus* (hawthorn) dates back to ancient times. The use of hawthorn in cardiovascular diseases is very common and it has been proposed that its antioxidant constituents account for this beneficial therapeutic effects.

In this study, the aim was to determine the *in vitro* antioxidant activity and to investigate for possible antinociceptive, anti-inflammatory and antithrombotic effects of ethanol extract of leaves of *Crataegus orientalis*. In order to evaluate the effects of extract on nociception namely hot-plate test, tail-immersion test and acetic acid-induced writhing test were used. Anti-inflammatory and antithrombotic effects were evaluated by using carrageenan-induced hind paw edema and tail thrombosis models. Moreover, the antioxidant activity of the extract was determined by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and  $\beta$ -carotene–linoleic acid assay system.

In the tests that were used to determine antinociceptive and anti-inflammatory effects, the extract was administered 30 min prior to pain induction in dose range of 50, 100, 200 mg/kg intraperitoneally. In the hot-plate test, there was no significant effect in the dose of 50 mg/kg when compared to control whereas the doses of 100 and 200 mg/kg exerted significant antinociceptive effect. The antinociceptive effects, which were observed in tail-immersion test, were significant in all doses when compared to control. In the acetic acid induced writhing test, as the dose increases an important decrease in the writhing responses were observed. The results that were obtained from anti-inflammatory test showed a dose-dependent activity and the anti-inflammatory activity ranging was between 68.02 and 96.8% at 200 mg/kg dose. In the antithrombotic activity test, it was observed that formation of tail thrombosis was suppressed significantly. The extract was shown to possess antioxidant activity in DPPH-radical scavenging test and  $\beta$ -carotene–linoleic acid assay system.

According to experimental findings, it was concluded that ethanol extract of *C.orientalis* displayed remarkable antinociceptive, anti-inflammatory, antithrombotic and antioxidant activities.

**Keywords:** *Crataegus orientalis*, hawthorn, antinociceptive, anti-inflammation, antithrombotic, antioxidant

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	i
<b>ÖNSÖZ</b>	ii
<b>ÖZET</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	v
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	ix
<b>SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	x
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>KAYNAK BİLGİSİ</b>	3
<b>Ağrı (Nosisepsiyon)</b>	3
<i>Ağrının İletim Mekanizması</i>	3
<i>Ağrı Mediyatörleri</i>	5
<i>Bazı ağrı mediyatörlerinin etkileri</i>	7
<i>Kininler</i>	7
<i>Prostaglandinler</i>	7
<i>Serotonin</i>	7
<i>Histamin</i>	7
<i>P maddesi</i>	7
<i>Adenozin trifosfat (ATP)</i>	8
<b>Modern Analjeziklerin Gelişmesinde Kullanılan Bitkiler</b>	8
<i>Papaver somniferum</i>	8
<i>Canabis sativa</i>	9
<i>Capsicum türleri</i>	9
<i>Salix türleri</i>	9
<i>Kafein</i>	10
<i>Hypericum türleri</i>	10
<b>Bitkilerden Türetilen Antinosiseptif Özellikli Diğer Maddeler</b>	10
<i>Alkaloitler</i>	10
<i>Terpenoitler ve steroidler</i>	10
<i>Flavonoitler</i>	11
<b>Kan Pıhtılaşması ve Tromboz</b>	11

<i>Trombosit aracılı hemostaz ve trombosit tıkaç mekanizması</i>	12
<i>Pıhtılaşma (koagülasyon) mekanizması</i>	12
<b>Antioksidan Aktivite</b>	13
<i>Serbest radikaller</i>	14
<i>Reaktif oksijen türleri (ROT)</i>	14
<i>Reaktif nitrojen türleri (RNT)</i>	15
<b>Antioksidanlar</b>	16
<i>Flavonoit Antioksidanlar</i>	17
<b>Alıç (<i>Crataegus</i>) Türleri</b>	18
<b>Aktif Bileşenleri</b>	19
<b>Tıbbi Özellikleri</b>	20
<i>Etkileri</i>	20
<i>Geleneksel kullanımı</i>	20
<i>Diğer kullanım alanları</i>	20
<i>Kullanılan dozlar</i>	20
<i>Yan etkileri ve doz aşımı</i>	20
<i>Etkileşimleri</i>	20
<b>Farmakolojik Özellikleri</b>	20
<i>Antioksidan Etkileri</i>	20
<i>Antiinflamatuvar Etkileri</i>	21
<i>Analjezik Etkileri</i>	21
<b>GEREÇLER</b>	23
<b>Hayvanlar</b>	23
<b>Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar</b>	23
<b>Kullanılan Cihazlar</b>	24
<b>YÖNTEMLER</b>	25
<b>Ekstrenin Elde Edilmesi</b>	25
<b>Kullanılan Diğer Maddelerin Hazırlanması</b>	25
<b>Akut Toksikite</b>	25
<b>Antinosiseptif ve Antiinflamatuvar Aktivitenin Deneysel Modellerle Ölçümü</b>	25
<i>Hot-plate testi</i>	25
<i>Tail-immersion testi</i>	26
<i>Asetik asit kıvrınma testi</i>	26



<i>Karragenin ile indüklenen pençe ödem testi</i>	26
<b>Antitrombotik Aktivite Deneyi</b>	27
<i>Karragenin ile indüklenen kuyruk tromboz testi</i>	27
<b>In Vitro Antioksidan Aktivite Tayin Deneyleri</b>	27
<i>Toplam Fenol Tayini</i>	27
<i>DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki</i>	27
<i><math>\beta</math>-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini</i>	27
<b>Verilerin İstatistiksel Analizi</b>	28
<b>BULGULAR ve TARTIŞMA</b>	29
<b>Akut Toksikite</b>	29
<b>Antinositif ve Antiinflamatuvar Aktivite Sonuçları</b>	30
<i>Hot-plate testi sonuçları</i>	30
<i>Tail-immersion testi sonuçları</i>	31
<i>Kıvrınma testi sonuçları</i>	32
<i>Karragenin ile indüklenen pençe ödem testi sonuçları</i>	34
<b>Antitrombotik Aktivite Sonuçları</b>	36
<i>Karragenin ile indüklenen kuyruk tromboz testi sonuçları</i>	36
<b>Antioksidan Aktivite Sonuçları</b>	44
<i>Toplam fenol miktarı</i>	44
<i>DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki sonuçları</i>	45
<i><math>\beta</math>-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini sonuçları</i>	46
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	48
<b>KAYNAKLAR</b>	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO VE ADI	SAYFA
Çizelge 1 Bazı Antioksidanlar ve Serbest Radikaller Üzerindeki Etkileri	17
Çizelge 2 <i>Crataegus monogyna</i> 'nın Kimyasal Bileşenleri	19
Çizelge 3 <i>Crataegus orientalis</i> 'in Karragenin ile İndüklenen Pençe Ödemi Üzerine Etkileri	35
Çizelge 4 <i>C.orientalis</i> Etanol Ekstresinin 4 Farklı Konsantrasyonda Serbest Radikal Süpürücü etkileri (% inhibisyon)	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Ağrı İletim Yolları	4
Şekil 2 Ağrı Mekanizması ve Yolakları	5
Şekil 3 Birincil Aferent Nöronların Doku Hasarında Salıverilen İnflamatuvar Mediyatörlere Cevabı	6
Şekil 4 Kanın Pıhtılaşma Mekanizması	13
Şekil 5 Bazı Antioksidanların Hücredeki Etki Yerleri	17
Şekil 6 <i>Crataegus orientalis</i> Etanol Ekstresinin Farklı Dozlarda Hot-Plate Testi Sonuçları	30
Şekil 7 <i>Crataegus orientalis</i> Etanol Ekstresinin Farklı Dozlarda Tail-immersion Testi Sonuçları	31
Şekil 8 <i>Crataegus orientalis</i> Etanol Ekstresinin Farklı Dozlarda Kıvrınma Testi Sonuçları	33
Şekil 9 Karragenin ile İndüklenen Kuyruk Tromboz Testinin 24. Saat Sonuçları	37
Şekil 10 Karragenin ile İndüklenen Kuyruk Tromboz Testinin 48. Saat Sonuçları	38
Şekil 11 Karragenin ile İndüklenen Kuyruk Tromboz Testinin 72. Saat Sonuçları	39
Şekil 12 Karragenin ile İndüklenen Tromboz Modelinde 24. Saat Kuyruk Görüntüleri	40
Şekil 13 Karragenin ile İndüklenen Tromboz Modelinde 48. Saat Kuyruk Görüntüleri	41
Şekil 14 Karragenin ile İndüklenen Tromboz Modelinde 72. Saat Kuyruk Görüntüleri	42
Şekil 15 Karragenin ile İndüklenen Tromboz Modelinde 1. Hafta Kuyruk Görüntüleri	43
Şekil 16 <i>C.orientalis</i> Etanol Ekstresinin Absorbans Grafiği	47
Şekil 17 <i>C.orientalis</i> Etanol Ekstresinin $\beta$ -karoten Metodu ile (%) Antioksidan Aktivitesi	47

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-HT	: 5-hidroksitriptamin, Serotonin
AA	: Araşidonik Asit
ATP	: Adenozin Trifosfat
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitoluol
COX	: Siklooksijenaz
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
ELİZA	: İmmünoenzimatik Yöntem
IASP	: Uluslar arası Ağrı Araştırmaları Derneği (International Association for the Study of Pain)
IL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
LOX	: Lipoksijenaz
LT	: Lökotrien
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NSAİİ	: Non-Sterodial Antiinflamatuvar İlaçlar
OPS	: Oligomerik Proantosiyanidin
PAF	: Trombosit (Platelet) Aktive edici Faktör
PG	: Prostaglandin
PLA <sub>2</sub>	: Fosfolipaz A <sub>2</sub>
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
sAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
SF	: Serum Fizyolojik
sGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TxA <sub>2</sub>	: Tromboksan A <sub>2</sub>
μ	: Mü
δ	: Delta
κ	: Kappa

## GİRİŞ ve AMAC

Bitkilerin hastalıklardan korunmak adına, binlerce yıl öncesinde başlayan kullanımı modern tıp ilaçlarının geliştirilmesinde büyük rol oynamıştır. Son zamanlarda ise günümüz tıbbında bitkisel ilaçlarla tedaviye ilgi oldukça artmıştır. Şifalı bitkilerle tedavi çok uzun yıllar boyunca deneme-yanılma yöntemiyle elde edilen tecrübeler sonucu ortaya çıkmıştır. Ancak günümüzde ilerleyen tıp bilimi ve teknolojiler sayesinde halk arasında şifalı olduğu bildirilen bitkilerin etkileri ve bu etkilere aracı olan kimyasal ya da kimyasallar belirlenebilmektedir. Bitkilerle tedavi "fitoterapi" adı altında incelenmektedir. Bitkiler dünyada yaygın bir şekilde gıda desteği, geleneksel olarak halk ilacı veya bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda bitkisel ilaçların kontrolsüz kullanımı ve sağlığı kötü yönde etkileyen durumların ortaya çıkmasından dolayı bitkisel ilaçların yan etkileri, etkileri ve yapıları gibi konularda pek çok araştırma yapılmaya başlanmıştır (Süzer, 2005).

En eski zamanlardan beri insanoğlu için kontrol altına alınması zor olan duygulardan biri ağrıdır. Ağrı, hasar oluşturacak uyarının ortadan kaldırılmasını sağladığı için aslında uyarı sistemi şeklinde çalışan koruyucu bir mekanizmadır (http-11). Ağrı duyusunun üstesinden gelebilmek için geçmişte çeşitli bitki türlerinde çareler aranmıştır ve böylece bugün kullandığımız modern analjeziklerin gelişimine katkıda bulunulmuştur.

Çağımızın en çok mücadele edilen hastalıklarından olan kanser, artrit ve ateroskleroz gibi hastalıkların patogeneğinde oksidan etkileri olan reaktif türler (reaktif oksijen ve nitrojen türleri) rol oynamaktadır. Günümüzde bu hastalıklardan kurtulmak ya da korunmak için kullanılan ilaçların yanı sıra insanlar destekleyici olarak antioksidan etkinliği olan bitkilerden de yararlanmaktadır. Böylece reaktif türlerin üretim hızları hücre savunma mekanizmaları tarafından giderilme hızını aştığında oluşan oksidatif stresi önlenmek veya hücrelerin antioksidan savunma sistemlerini güçlendirmek amaçlanmaktadır (Gümüştas ve Atukeren, 2008; İnal ve ark., 2007).

Tıbbi değeri olduğu bilinen bitkilerden biri olan alıç (*Crataegus*), yaprak, çiçek ve meyvelerinden hazırlanan ekstreler ve tentürler ile tedavi amaçlı olarak halk arasında kullanılmaktadır (Barnes ve ark., 2002; Bahorun ve ark., 2003). Halk arasındaki bu kullanım genellikle kalp problemlerini tedavi etmeye ve kolesterolü düşürmeye dayalı geleneksel bir kullanımdır (Mills ve Bone, 2000). Konjestif kalp yetmezliğinin erken safhalarında (Weihmayr ve Emst, 1996; Schussler ve ark., 1995) ve anjina pektorisin tedavisinde pozitif etkilere sahip olan alıcın (Hanack ve Bruckel, 1983) bu etkilerinin bitkinin antioksidan aktivitesinden ileri geldiği düşünülse de halen mekanizma tam olarak bilinmemektedir. *Crataegus monogyna*, *aronia* ve *pinatifida* türlerinin antioksidan etkileriyle ilgili yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Rakotoarison, 1997; Ljubuncic ve ark., 2005; Mills ve Bone, 2000). Çeşitli alıç türlerinin (*Crataegus monogyna* & *pinatifida*) antiinflamatuvar etkinliklerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmaların bazılarında prostaglandin I<sub>2</sub> ve tromboksan A<sub>2</sub>'nin bu alıç türleri tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Vibes ve ark., 1994; Kao ve ark., 2005). Bununla birlikte, alıç türlerinin ağrı üzerindeki etkileriyle ilgili çalışmalar mevcut değildir. Ancak flavonoidlerce zengin ve aynı zamanda antioksidan etkileri olan

bitkilerin analjezik etkilere sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Erdemoğlu ve ark., 2009; Güvenç ve ark., 2010).

Tez kapsamında, alıç türlerinden *Crataegus orientalis*'in yapraklarının etanol ekstresinin yukarıda bahsedilen bilgilerden yola çıkılarak antinosiseptif, antiinflamatuvar, antitrombotik ve antioksidan etkinliğinin, olup olmadığının çeşitli deneysel yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

## **KAYNAK BİLGİSİ**

### **Ağrı (Nosisepsiyon)**

Ağrı, vücudun belli bir bölgesinden kaynaklanan, kuvvetli bir doku harabiyetine bağlı olan ya da olmayan, insanın geçmişte edindiği, subjektif, primitif, protektif deneyimleri ile ilgili, sensoryal, hoş olmayan emosyonel bir duyum, davranış şeklidir. Bu tanım, Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (International Association for the Study of Pain=IASP) tarafından yapılan ve bütün dünyada kabul gören bir tanımdır (Güzeldemir, 1999). Ağrı, herhangi bir doku hasarlandığı zaman ortaya çıkan ve kişiyi ağrılı uyarıyı ortadan kaldırmak için bir reaksiyon göstermeye zorlayan koruyucu bir mekanizmadır (Guyton ve Hall, 2007).

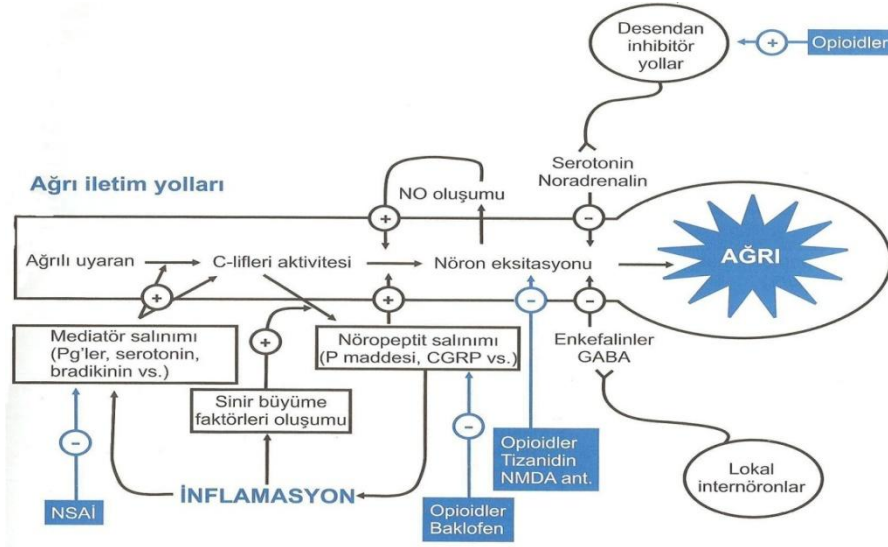
Vücudun herhangi bir bölgesinde bir doku harabiyeti olduğu zaman, özelleşmiş sinir uçları olan nosiseptörlerin bu bölgede lokal olarak salıverilen mediyatörler ve aljezikler aracılığıyla uyarılmaları ile ağrının algılanması sağlanıp, merkezi sinir sisteminin belirli bölgelerinde nöral yapılarda değerlendirilip, zararlı uyarının algılanması ve buna karşı gereken fizyolojik, biyosimik ve psikolojik önlemlerin harekete geçirilmesine ise nosisepsiyon denilir (Güzeldemir, 1999).

### ***Ağrının iletim mekanizması***

Ağrı iletimi, deri yüzeyinden santral serebral kortekse kadar periferik ve santral yapıların kompleks etkileşimini içeren bir mekanizmadır (Fürst, 1999). IASP'a göre, ağrı asıl ya da potansiyel doku hasarı ile ilişkili hoş olmayan duyuşsal ve duygusal deneyimler olarak tanımlanmıştır (Merskey ve Bogduk, 1994). Buna ek olarak, ağrıları olan hastalarda hiperaljezi (ağrı uyarısına aşırı duyarlılık), allodini (normalde ağrı oluşturmayacak mekaniksel bir uyarıya cevap olarak ağrı oluşumu) ve hiperestezi (duyuşsal uyarana karşı anormal duyarlılık) gibi bazı ortak sorunlar oluşabilir (Besson, 1999). Birçok değişik ağrı çeşidi vardır. Bunlar, mekanizmalarına göre 'nosiseptif', 'nörojenik', 'nöropatik' ve 'psikojenik' olarak adlandırılırlar ve sırasıyla nosiseptörlerin uyarılması, nöronal dokuda hasarlanma, bir sinirin disfonksiyonu ve psikolojik faktörlerle ilişkililerdir (Fürst, 1999; Millan, 1999).

Zaman açısından bakılacak olursa, ağrı dönemleri geçici, akut ya da kronik olabilir. Geçici olan tipinde, nosiseptif etki iletiminin aktivasyonu doku hasarına bağlı olmadan ortaya çıkar. Akut tipinde, bölgesel doku hasarı ile birlikte nosiseptör hasarı ve aktivasyonu meydana gelir. Kronik ağrı, daha çok yaralanma ya da hastalıklar ile tetiklenir ve sürekli hale gelmesinde ağrıya neden olan faktörler dışında başka faktörler rol oynuyor olabilir (Loeser ve Melzack, 1999). Doku hasarına bağlı olarak meydana gelen akut ağrı 1 aydan az sürebilir ama bazen 6 aydan bile uzun sürer. Klinik öncesi çalışmalar göstermiştir ki, yeni genlerin nöronal ekspresyonu hasarın ilk 20 dakikası içinde gerçekleşir. Kronik ağrı bir gün içinde uzun süreli davranışsal ve histolojik değişiklikleri başlatabilir. Ayrıca akut ağrının hızlı bir şekilde kronik ağrıya dönüşebileceği bilinmektedir (Carr ve Goudas, 1999).

Son yıllarda aferent lif fizyolojisinin altında yatan mekanizma ve omuriliğin (spinal kord) dorsal boynuzundaki sinaptik işlemlerin açıklığa kavuşmasıyla, ağrı sürecine ilişkin bilgiler çok gelişmiştir (Dray, 1997; Besson ve Chaouch, 1987; Grubb, 1998; Fürst, 1999; Millan 1999; Wall ve Melzack, 1999).



Şekil 1. Ağrı İletim Yolları (Süzer, 2005)

Nosisepsiyon, ağrılı uyarıların santral sinir sistemine (SSS) iletildiği bir mekanizmadır (Fürst, 1999). Nosiseptörler deri ve deri altı, damarlar, kaslar, fasiya, eklemler ve viseralde (testisler, üreter, biliyer sistem) bulunan, ağrının periferik algılanmasında tetik noktalar olan serbest sinir sonlanmalarıdır (Güzeldemir, 1999). Bunlar, ağrılı uyarımlarla (mekaniksel, ısı, soğuk ve kimyasal) aktive edilerek bu sinyalleri SSS'ne taşıyan miyelinli (A $\delta$ ) ve miyelinsiz (C) liflerdir (Grubb, 1998; Russo ve Brose, 1998; Besson, 1999; Fürst, 1999; Millan, 1999). A-delta lifleri aksiyon potansiyelini hızlı iletirler ve geniş çaplı liflerdir. Ani ve batıcı ağrıları düzenlerler. Bu liflerin sinir sonlanmalarından glutamatın salgılandığına inanılır. C lifleri ise aksiyon potansiyelini yavaş iletirler, küçük çaplı liflerdir ve yavaş, yanıcı, kronik ağrılardan sorumludurlar. C liflerinin terminalinden ise hem glutamat hem de P maddesinin salındığı iddia edilmektedir (Stucky ve ark., 2001; Guyton ve Hall, 2007). Bu nosiseptörlerin hücre gövdeleri, spinal korda yapışık olan dorsal kök gangliyonunda bulunur.

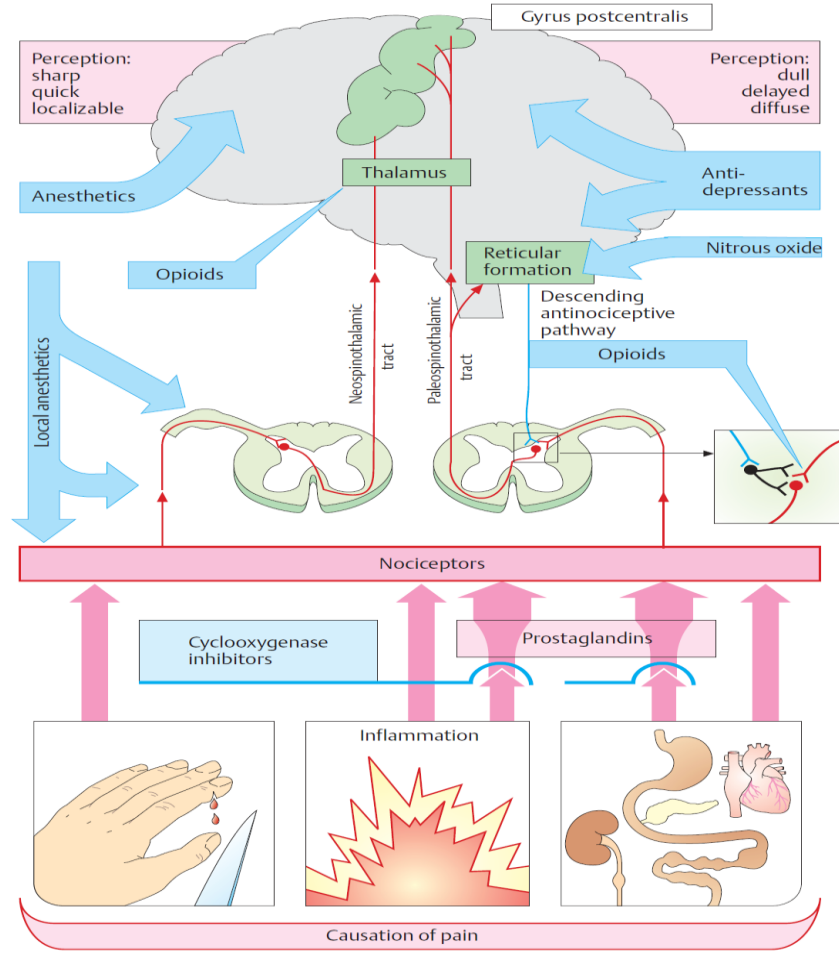
A-delta ağrı lifleri omuriliğin arka boynuzlarında lamina I (lamina marjinalis)'de sonlanırlar. Burada neospinotalamik (spinotalamik yolağın lateral kısmı) yolun uyarılan ikinci sıra nöronları beyne giderler ve bu yola ait liflerin çoğu talamusa kadar giderken, az bir kısmı beyin sapının retiküler bölgelerinde sonlanır. Talamusta, üçüncü sıra nöronlar aksonlarını ağrılı uyarımların olduğu somatosensoryal kortekse ya da ağrının duyuşsal komponentleriyle ilgili olan anteriyor singulat girusa yollarlar. Somatosensoryal kortekse impuls kalın liflerle geldiğinden iletim hızlı olur. Bu sistem ağrılı uyarımların lokalizasyonu, başlangıcı, süresi ve şiddeti hakkında bilgi verir (Guyton ve Hall, 2007; Güzeldemir, 1999).

Paleospinotalamik yolak (spinotalamik yolağın spinoretiküler ve spinomezensefalik kısmı) da ise ağrı özellikle periferik yavaş-kronik tip C lifleri ile iletilir. Bazı sinyaller yine de A-delta lifleri ile taşınabilir. Birincil nosiseptörler, spinal kordun lamina II (substansiya jelatinoza) bölgesinde bulunan ikinci sıra nöronlar ile sinaps yapar. İkinci sıra nöronlar spinal kordun geçerek spinotalamik trakta (STT) çıkarlar ve hızlı A-delta lifleri ile birleşirler. Bu liflerin bir kısmı talamusa giderken geri kalanları ise periakvaduktal gri bölgede ve mezensefalonda, medulla ve ponsun retiküler çekirdeklerinde sonlanır. Bu yolak



ağrının algılanmasında değil, ağrının meydana getirdiği izdirabın anatomik temelini oluşmasında rol oynar. (Guyton ve Hall, 2007; Süzer, 2005; Güzeldemir, 1999).

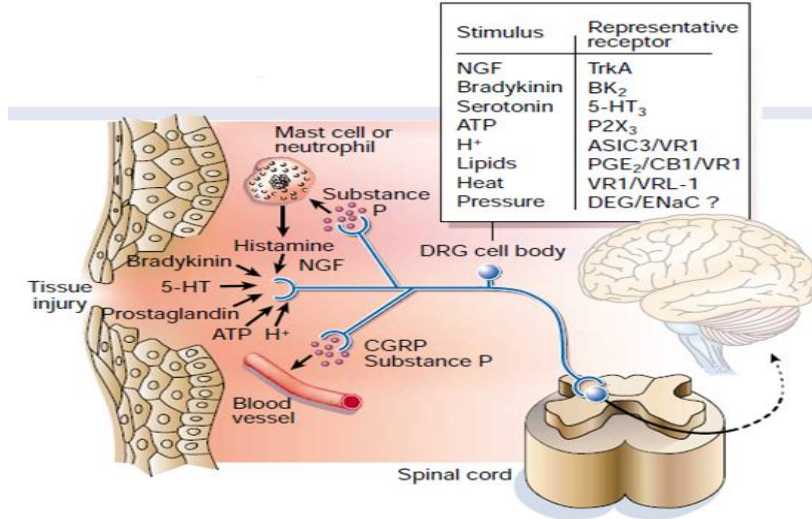
Nosiseptörlerin uyarılmaları ağrı oluşumunda önemlidir. Ancak ‘deafferentasyon, fantom ağrıları, nevralji’ gibi ağrılarda ağrı oluş mekanizması farklıdır ve nosiseptörlerin uyarılmaları söz konusu değildir. Bu ağrı, somatosensoryal uyarı iletiminin yaralanması sonucu merkezi sinir sistemine akışının kesilmesi ile ortaya çıkar (Güzeldemir, 1999).



Şekil 2. Ağrı Mekanizması ve Yolakları (Lüllmann ve ark., 2005)

### *Ağrı mediyatörleri*

Yaralanmalar sonucunda oluşan ağrılarda, termal ve mekanik uyarılara karşı nosiseptörlerin duyarlılığının artmasıyla ağrı duyusu daha da kötü bir hal alır. Bu durum, birincil duyu sonlanmaları ve fibroblast, mast hücreleri, nötrofiller ve trombositler gibi hücrelerden salıverilen kimyasal mediyatörlerden kaynaklanır. İnflamasyon oluşumunda görev alan bileşenlerden bazıları (protonlar, ATP, serotonin ve lipitler) nosiseptörlerin yüzeyindeki iyon kanallarıyla etkileşerek nöronların uyarılabilirliklerini direkt olarak değiştirebilirler. Diğerleri ise (bradikinin ve nörotrofin) metabotropik reseptörlere bağlanır ve etkilerini ikincil mesajcılar yoluyla gösterirler.



**Şekil 3. Birincil Aferent Nöronların Doku Hasarında Salıverilen İnflamatuvar Mediyatörlere Cevabı**

Şekil 3’de görülen faktörlerin hepsi hücre yüzey reseptörleriyle etkileşerek nosiseptör sonlanmalarını daha duyarlı hale getirir ve harekete geçirirler. Bu nosiseptörlerin aktivasyonu aferent mesajı omuriliğin dorsal boynuzuna (ve buradan beyine) iletmekle kalmaz, ayrıca nörojenik inflamasyonu başlatır (Julius ve Basbaum, 2001).

Ağrılı uyarıların desendan (descending, inen yolak) inhibisyonunda görev alan nörotransmitterler (endojen opioidler, serotonin ve noradrenalin gibi) ağrılı uyarı varlığında ikinci sıra nöronların ateşlenmesini inhibe ederler (Russo ve Brose, 1998; Fürst, 1999; Millan, 1999). Ancak, nosisepsiyon tekdüze bir duygu değildir. Ağrının kalitesi ile koruyucu cevapların başlaması omurilik içindeki birçok faktör ve üst beyinde integrasyon ve modifikasyon ile ilgili olan nosiseptif sinyaller aracılığıyla belirlenir (Calixto ve ark., 2000).

Üretilen, ya da doku hasarı veya eksojen iritanlara (formalin, asetik asit, kapsaisin, bazı zehirler) bağlı olarak salıverilen araşidonik asit metabolitleri (prostaglandinler ve lökotrienler) gibi kimyasal mediyatörlerin, peptitlerin (kinin, taşikinin, kalsitonin geni ile ilişkili peptit, galanin, kolesistokinin, vazoaktif intestinal peptit), serotoninin, asetilkolinin, sitokinlerin, sinir büyüme faktörünün, glutamatın, nitrik oksit, ATP (adenozin trifosfat)’ın, ADP (adenozin difosfat)’ın, adenzinin ve protonların direkt ya da indirekt aktiviteleri, ağrı iletimi sırasında oluşan çoklu olaylardan hem periferik hem de santral sinir sisteminde sorumludur (Collis ve Hourani, 1993; Belfrage ve ark., 1995; Dray, 1997; Sawynok, 1998; Fürst, 1999; Besson, 1999; Millan, 1999).

Patofizyolojik mediyatörlerin üretildiği birçok önemli kaynak vardır: hasarlanmış doku, vaskülatür (bir organdaki damarlaşma veya damar ağı), bağışıklık hücreleri ile duyuşal ve sempatik sinirler. Bu mediyatörler, santral ve periferik sinirlere genişçe dağılmış olan reseptörleri etkileyerek etki gösterirler. Bu reseptörlerin birçoğu heterotrimerik G-proteinlerine bağlıdır ve protein kinaz A, C ve G, sAMP (siklik adenzin monofosfat), sGMP (siklik guanozin monofosfat) gibi ikincil mesajcıların oluşumunda ve dolayısıyla kalsiyum mobilizasyonunda rol oynar. Eksitator aminoasitler ve asetilkolin (nikonitik reseptörlere etki eden) gibi diğer

nörotransmitterler, direkt olarak iyon kanallarını aktive ederler ve sonuç olarak membranın iyon geçirgenliğini kontrol ederler (Wood ve Docherty, 1997; Millan 1999). Dokularda fiziksel hasar ve prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, bradikinin, P maddesi, histamin, adenzin, serotonin gibi bazı inflamatuvar mediyatörlere maruz kalmak da dâhil olmak üzere birçok faktörün nosiseptörleri mekanik ve termal uyarılara karşı duyarlılaştırdığı bilinmektedir (Besson, 1999; Millan, 1999).

### ***Bazı ağrı mediyatörlerinin etkileri***

#### *Kininler*

Plazmadan salıverilen kininler prostanoitler, sitokinler ve serbest radikallerin hücrelerden salıverilmesinde etkilidir. Mast hücrelerinin degranülasyonlarına neden olarak histamin ve diğer inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını sağlarlar. Kininler kuvvetli algojen maddelerdir ve deri, eklem ve kaslardaki nosiseptörleri doğrudan uyararak ağrı oluştururlar. Bradikininin, prostaglandinler ve serotonin (5-HT, 5-hidroksitriptamin) gibi diğer algojen maddeler ile arasında güçlü bir sinerjistik etki vardır (Dray, 1995).

#### *Prostaglandinler*

Bradikinin gibi inflamatuvar mediyatörlerin etkileri ile açığa çıkan prostaglandinler tek başlarına ağrı oluşturamazlar ve nosiseptörleri hassaslaştırarak etki gösterirler (Güzeldemir, 1999). İltihaplı dokulardan salıverilen serotonin, histamin ve bradikininin etkilerini potansiyalize eder. Araşidonik asitten meydana gelen prostaglandinler ve özellikle PGE<sub>2</sub> hiperaljezi yapan mediyatörlerin başında gelir (Kayaalp, 2005).

#### *Serotonin*

Serotonin inflamasyon ya da zedelenme sonucunda trombositlerden ve mast hücrelerinden salıverilerek 5-HT<sub>3</sub> reseptörünü aktive eder ve duyuşal nöronları direkt olarak harekete geçirir (Dray, 1995). Nosiseptörlere doğrudan etki eden serotonin vasküler tabanlı ağrıların patogeneğinde rol oynar (Güzeldemir, 1999). Ayrıca G protein kenetli olan 5-HT<sub>1</sub> ve 5-HT<sub>2</sub> reseptörlerini aktive ederek de duyuşal nöronları uyarır. Bu durum potasyum iyon geçirgenliğini ve membran depolarizasyonunu azaltır. Buna bağılı olarak da nosiseptörlerin duyarlılığı artarak, ısı ve basınç uyarılarına karşı ağrı eşiğı düşebilir (Dray, 1995).

#### *Histamin*

P maddesi, interlökin-1 (IL-1) ve sinir büyüme faktörü (NGF) gibi bazı inflamatuvar mediyatörler mast hücrelerinin degranülasyonunu gerçekleştirerek histaminin salıverilmesini sağlar. Duyuşal nöronlar histamin H<sub>1</sub> reseptörlerini ekspres ederler ve bu reseptörlerin aktivasyonu da birçok duyuşal nöron membranının kalsiyum geçirgenliğı artar. Bu durum duyuşal nöropeptitleri, prostaglandinleri ve endotel hücrelerindeki monohidroksieikozatetraenoik asitlerini (HETE) uyararak hiperaljeziye yol açar (Rang ve ark., 1994).

#### *P maddesi*

Periferden gelerek nosiseptif uyarıları SSS'ne taşıyan primer duyuşal nöronların (C ve A- $\delta$ ) akson uçlarında bulunur. P maddesi, ağırlı impulsların birinci duyuşal nöronlardan ikinci duyuşal nöronlara taşınmasında görevlidir (Kayaalp, 2005).

### *Adenozin trifosfat (ATP)*

Duyusal nöronları aktive eder ve bunların katyonlara olan geçirgenliğini artırır. ATP'nin yıkılması ile oluşan adenozin intradermal (*i.d*) ve intravenöz (*i.v*) yolla verildiğinde ağrıyı ve hiperaljeziyi uyarır (Bleehan ve Keele, 1977). Bu durumun adenozinin, adenilat siklaz ile kenetli olan reseptörlerini aktive etmesinden ileri geldiği düşünülmektedir. Siklik adenozin monofosfat (sAMP) üretiminin ve potasyum iyonuna geçirgenliğin azalması aferent liflerin aşırı derecede uyarılmasına neden olur (Levine ve ark., 1993; Dray, 1995). Adenozin en az dört tane G protein kenetli reseptörle etkileşir (A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub>, A<sub>3</sub>). A<sub>1</sub> ve A<sub>2</sub> reseptörleriyle etkileşim antinosisseptif etki sağlarken, A<sub>3</sub> reseptörlerinin aktivasyonunun nosisepsiyonu uyardığına dair kanıtlar vardır (Sawynok ve Liu, 2003).

### **Modern Analjeziklerin Gelişmesinde Kullanılan Bitkiler**

Şifalı bitkilerin hastalıklardan korunmak amacıyla kullanılışı beş bin yıl öncesine dayanan bir gelenek halini almıştır. Yıllar boyunca, doğal ürünler modern tıpta kullanılan terapötik ilaçların geliştirilmesine büyük katkı sağlamışlardır (Cragg ve ark., 1997; De Smet, 1997; Shu, 1998). Dünya çapında varlığı tahmin edilen 250 000 bitki türünün sadece az bir kısmı fitokimyasal olarak araştırılmışken, biyolojik ve farmakolojik taramalar için kullanılan parçalar çok daha azdır (Hamburger ve Hostettmann, 1991). Bitkilerden elde edilen ve farmakolojik yönden aktif olan yeni ajanların aranmaya başlanması, hastalıkların tedavisinde büyük rol oynayan ve klinik açıdan kullanışlı birçok ilacın keşfinde rol oynamıştır. Kullanımda olan bütün modern ilaçların yaklaşık %25'i direkt ya da indirekt olarak bitkilerden türetilmiştir (De Smet, 1997).

### ***Papaver somniferum***

*P. somniferum* (haşhaş) bitkisinin yaş meyve kapsülünün çizilmesiyle çıkan özsuju spontan buharlaşma ya da yapay sıcaklıkla kurutularak afyon (opium) elde edilmiştir (Kayaalp, 2005). Afyon; morfin, kodein, tebain ve papaverin de dâhil olmak üzere yaklaşık 25 alkaloid içerir. 1805 yılında, Alman eczacı Sertüner afyondaki aktif maddeyi izole etmiş ve bu maddeye 'morfin' adını vermiştir (Brownstein, 1993; Benyhe, 1994). Morfinin *P. somniferum*'daki varlığı dışında süt, serebrospinal sıvı ve ayrıca hayvanların sinir dokusu ekstrelerinde bulunduğu gösterilmiştir. İleri sürülen kanıtlar, morfinin biyosentetik yollarının hayvan ve hatta karaciğer, kan ve beyin gibi insan dokularında bulunduğunu göstermektedir (Benyhe, 1994).

Morfinin ağrı uyarısının eşliğini yükselterek ağrı algısını değiştirdiği ve bu antinosisepsiyonu membran opioid reseptörleri indükleyerek gerçekleştirdiği bilinmektedir.  $\mu$  (mü),  $\delta$  (delta) ve  $\kappa$  (kappa) olmak üzere bilinen üç opioid reseptör tipi bulunmaktadır ve bu reseptörleri kodlayan genler 1990'ların başlarında klonlanmıştır (Chen ve ark., 1993; Evans ve ark., 1992; Kieffer ve ark., 1992; Yasuda ve ark., 1993). Sonraları tanımlanan bir reseptör ORL<sub>1</sub> olarak adlandırılmıştır (Mollereau ve ark., 1994). Bu reseptörler ortak bir yapı olan yedi transmembranal domain içerirler ve opioidlerle aktive edildiklerinde boğmaca (pertussis) toksinine duyarlı G<sub>i</sub> proteinlerine etki ederek adenilat siklaz ve/veya voltaj kapılı Ca<sup>2+</sup> kanallarını inhibe eder veya içeriye doğrultucu (inwardly

rectifying) K<sup>+</sup> iletkenliğini uyarır (Dhawan ve ark., 1996). Endojen opioid ligandlar, enkefalin, dinorfin, endorfin, endomorfin ve nosiseptinleri içerir ve bunlar memelilerde proenkefalin, pro-dinorfin, pro-opiomelanokortin ve pro-nosiseptinden türetilir (Dhawan ve ark., 1996; Meunier, 1997; Stone ve ark., 1997). Opioid reseptörler ağrı iletiminde omurilik, orta-beyin, talamus ve periferik duyuşal-sinir lifleri gibi çeşitli bölgelerde yerleşmişlerdir. Bu yüzden, bu reseptörlerin aktivasyonu spinal, supraspinal ve periferik analjezi ile ilişkilidir (Fürst, 1999). Morfin analjezik etkilerini MOR (morfin opioid reseptör) geninin ürünü olan  $\mu$ -opioid reseptörü üzerinden gösterir (Calixto ve ark., 2000).

### ***Cannabis sativa***

Tarih boyunca *Cannabis sativa* L. doğal terapötik bir bitki olarak kullanılmıştır. Esrar (marihuana, hint keneviri) kullanımı 5000 yıl öncesine dayanır (Lemberger, 1980). *Cannabis*'in aktif komponentini kanabinoid adı verilen maddeler oluşturur ve bunların içinde bulunup esrarın farmakolojik etkilerinden sorumlu olan madde (-)  $\Delta^9$ -*trans*-tetrahidrokanabinol (THC)'dür (Gaoni ve Mechoulam, 1964; Mechoulam, 1970; Kayaalp, 2005). Farmakolojik çalışmalar THC ve diğer aktif kanabinoidlerin belirli reseptör bölgelerine etki ettiklerini göstermiştir (Hirst ve ark., 1998). CB<sub>1</sub> ve CB<sub>2</sub> olarak adlandırılan bu reseptörler G-protein kenetli reseptörlerdir ve adenilat siklaz aktivitesini inhibe ederler. CB<sub>1</sub> reseptörü hem perifer hem de SSS'de bulunurken, CB<sub>2</sub> ise yalnızca periferde bulunur (Hirst ve ark., 1998). Yapılan hayvan çalışmaları, THC'nin antinosiseptif aktivitesini CB<sub>1</sub> reseptörü üzerinden gerçekleştirdiğini göstermiştir (Formukong ve ark.,1989; Hirst ve ark., 1998). CB<sub>1</sub> agonistleri sıçanların spinal kordunda formalin ile indüklenen c-fos ekspresyonunu baskılamıştır ve bu agonistlerin intratekal enjeksiyonu antinosisepsiyon sağlamıştır. Bu durum, kanabinoidlerin ağrılı uyarıların spinal işlemini inhibe ettiğini gösterir (Hirst ve ark., 1998).

### ***Capsicum türleri***

Solanaceae ailesine ait olan *Capsicum* türlerinin aktif maddesi 1846 yılında izole edilerek kapsaisin (kırmızıbiberin acılığını veren alkaloid) adı verilmiştir ve kapsaisinin antinosiseptif etkisi olduğu bildirilmiştir (Jansco ve Lynn, 1987; Lynn 1990; Szallasi ve Blumberg, 1993). *Euphorbia*'dan elde edilen güçlü bir iritan olan resiniferatoksin (RTX) kapsaisin analogu olarak tanımlanmıştır (Hergenhahn ve ark., 1975). Kapsaisin ve RTX, nosiseptif aferent sinir uçlarında bulunan vaniloid reseptörü ile etkileşerek nörokinin A ve P maddesi gibi taşıkininlerin salıverilmesine neden olur. Bir vaniloid reseptör olan VR1 protein, termal enerjiyi elektriksel sinyale dönüştürerek (aksiyon potansiyeli) santral sinir sistemine iletir ve böylece uyarının sıcak olarak hissedilmesini sağlar (Stucky ve ark., 2001). Kapsazepin ise vaniloid reseptörleri antagonize eder (Kayaalp, 2005). Oh ve ark. (1996) kapsaisinin dorsal kök gangliyonunda iyon kanallarını aktive ederek mono ve divalent değerlikli katyonların (Na<sup>+</sup> veya Ca<sup>++</sup>) geçişini sağladığını göstermiştir.

### ***Salix türleri***

*Salix* (Salicaceae) sınıfı yaklaşık 500 değişik bitki türünü içerir ve söğüt olarak bilinir. *Salix* (saliks) türlerinin aktif bileşeni salisindir. Ancak yapılan çalışmalar, salikortin, frajilin ve tremulasin gibi fenolik glikozitlerin de bu bitkinin kabuğunda bulunduğunu göstermiştir (Robbers ve Tyler, 1999). Salisinin

izolasyonundan sonra elde edilen salisilik asit ilk olarak antiseptik ve antipiretik ve ayrıca romatizma ve gut hastalığının tedavisinde kullanılmıştır. Daha sonra salisilik asitten asetilsalisilik asit sentezlenmiş ve güçlü ateş düşürücü etkinliği keşfedildiği zaman 'aspirin' adını alarak terapötik önem kazanmıştır (Hass, 1983; Walker, 1995). Asetilsalisilik asit (ASA), yani aspirin non-sterodial antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) içinde en fazla kullanılanıdır. Analjezik etkisi siklooksijenaz enzimleri (COX-1 ve COX-2) inhibisyonu aracılığıyla prostaglandinlerin sentezini geri-dönüşsüz (irreversibl) inhibe etmesinden ileri gelir (Ferreira, 1972; Kayaalp, 2005). COX-1 enzimini inhibe edici etkisi COX-2'den daha fazladır. PGE<sub>2</sub> sentezini azaltarak da antipiretik etkinlik gösterir (Süzer, 2005).

### ***Kafein***

Kafein (1,3,7-trimetilksantin) kahve çekirdeği, çay yaprakları ve kola cevizi ile yapılan içeceklerden elde edilmiştir ve ergotamin ile kombine edilerek migren ağrıları için, non-sterodial antiinflamatuvar ilaçlarla kombine olarak da analjezik formülasyonlarda kullanılmaktadır. Kafein tek başına farklı baş ağrıları tedavi etmek için uyarıcı olarak da kullanılmaktadır (Sawynok, 1995). Kafeinin analjezik adjuvan özelliklerinin, aspirin benzeri ilaçlar ile kombine edildiğinde, ağrı iletiminin düzenlenmesinde rol oynayan periferik ve santral adenozin reseptörlerinin blokajıyla alakalı olduğu gösterilmiştir (Sawynok, 1995, 1998; Sawynok ve Reid, 1996).

### ***Hypericum türleri***

*Hypericum* eski zamanlardan beri farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. *Hypericum perforatum*'un koksalji, baş ağrısı, hipersensitivite, nevralsi ve felç gibi nörolojik hastalıklar için kullanıldığı bilinmektedir (Duke, 1985). *Hypericum perforatum* ve *Hypericum calycinum* ekstreleri ile fareler üzerinde yapılan tail-flick testinde, bu iki türün önemli ölçüde analjezik aktivitesi olduğu tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 1996a), (Öztürk ve ark., 1996b).

## **Bitkilerden Türetilen Antinosiseptif Özellikli Diğer Maddeler**

### ***Alkaloitler***

Rios ve ark. (1989) aforfinoit (aporphinoid) alkaloitlerin kimyasal ve farmakolojik etkilerini inceleyerek bunlardan bazılarının (pronusiferin, glausin, nusiferin ve pukatein) antinosiseptif özellikleri olduğunu göstermiştir. *Sophora alopeculooides* bitkisinden izole edilen matrin benzeri (+)-allomatrin ve (+)-matrin adlı iki lupin alkaloidinin, sırasıyla  $\kappa$ - opioid reseptör ve  $\mu$ - ve  $\kappa$ - opioid reseptörleri etkileyerek antinosiseptif etki gösterdikleri bulunmuştur (Xiao ve ark., 1999). *Psychotria colorata* bitkisinden izole edilen alkaloitlerin hayvanlarda nalokson-reversibl antinosiseptif etkisi olduğu gösterilmiştir (Elisabetsky ve ark., 1995). *Mitragyna speciosa*'nın başlıca alkaloiti mitrajininin opioid benzeri etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur (Matsumoto ve ark., 1996; Thongpradichote ve ark., 1998).

### ***Terpenoitler ve steroitler***

Terpenoit ve steroit bileşikleri sebzelerde geniş bir dağılım gösterir. Diğer etkilerinin yanı sıra, doğal olarak oluşan terpenoitler, antiinflamatuvar ve antinosiseptif etkinlik gösterirler, trombosit agregasyonunu inhibe ederler ve

sinyal transdüksiyonu mekanizmasının bazı basamaklarına intraselüler düzeyde müdahale ederler (Calixto ve ark., 1998; Mahato ve ark., 1992; Safayhi ve Sailer, 1997).

*Cymbopogon citratus* bitkisinin yağında bulunan monotерpenler farklı ağrı modellerinde antinosiseptif etkinlik göstermişlerdir. Bu yağın en aktif bileşeni olan myrcene periferik etkili opiatlar ya da aspirin benzeri antinosiseptif etkiye sahiptir (Lorenzetti ve ark., 1991). İzole edilen ve tanımlanan çeşitli terpenler (örn: marrubiin, moretonon, glutinol,  $\alpha$ -amirin asetat,  $\beta$ -amirin asetat, vb.) doza bağımlı olarak asetik asit, formalin ve kapsaisin testlerinde antinosiseptif etkinlik göstermişlerdir (De Jesus ve ark., 2000; Krogh ve ark., 1999).

### **Flavonoitler**

Önceden yapılan çalışmalar, doğada en yaygın ve bol bulunan flavonoitlerden olan rutin ve kuersetin dahil, *Wedelia paludosa*'dan izole edilen luteloinin (Block ve ark., 1998a, 1998b), *Caralluma attenuata*'dan elde edilen luteloin türevi luteloin-4'-O-neohesperidozitin (Ramesh ve ark., 1998), birçok bitkiden izole edilen kuersetin-3-O-glikozitin (izokuersetin), *Hymenae martiana*'dan izole edilen taksifolinin (Cechinel-Filho ve ark., 2000), *Hedyosmum bonplandianum*'dan izole edilen kamferol glikozit türevlerinin (Cardenas ve ark., 1993), *Cirsium subcoriaceum*'dan izole edilen pektolinarinin (Martinez-Vazquez ve ark., 1998) ve gossipinin (Viswanathan ve ark., 1984) asetik asit, formalin ve kapsaisin ile indüklenen nosiseptif uyarılara karşı anlamlı antinosiseptif etkiye sahip olduklarını göstermiştir. Kuersetin-3-O-galaktoz (hiperozitin) sinir uçlarında anestetik etki olmaksızın kalsiyum akışını azaltarak analjezik etkinlik gösterir (Chen ve ark., 1989). *Ginkgo biloba* yapraklarından izole edilen biflavon ginkgetin, asetik asitle indüklenen kıvrınma testinde antinosiseptif aktivite göstermiştir (Kim ve ark., 1999).

Alkaloitler, terpenoitler, streoitler ve flavonoitler dışında, ksantonlar, tanenler ve saponinler gibi doğal olarak oluşan birçok maddenin antinosiseptif özelliğe sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. *Nepeta casearea* bitkisinden ekstre edilen ve bir lakton olan nepetalakton bu bitkinin ana antinosiseptif bileşenidir ve spesifik bir opioid reseptör alt tipine karşı agonistik aktivite gösterir (Aydın ve ark., 1998)

### **Kan Pıhtılaşması ve Tromboz**

Hemostaz, kan kaybının önlenmesi anlamına gelir ve bu sistem kanamayı durdurur. Tromboz, kan damarları içinde istenmeyen pıhtı veya trombüs oluşumudur ve en sık rastlanan pıhtılaşma bozukluğudur. Oluş şekli bakımından birbirine yakından benzemelerine rağmen hemostaz fizyolojik bir olay iken tromboz ise patolojik bir olaydır. Pıhtılaşma (koagülasyon); hemostaz sırasında damar dışında ve tromboz sırasında damar içinde meydana gelir. Trombotik bozukluklar, derin ven trombozu, pulmoner emboli, akut miyokard infarktüsü ve akut iskemik inmeyi içerir (Kayaalp, 2005; Howland ve Mycek, 2006).

Sağlam endotel hücreleri tarafından prostasiklin ve nitrik oksit gibi kimyasal mediyatörler sentezlenir ve bu mediyatörler trombosit agregasyon inhibitörleri olarak görev alırlar. Prostatiklin ( $PGI_2$ ) ve sAMP trombosit membran reseptörlerine bağlanarak etki eder. Hücre içerisinde sAMP düzeylerinin

artmasıyla  $Ca^{2+}$  düzeyleri düşer ve böylece trombosit agregasyon ajanlarının salıverilmesi inhibe edilir (Howland ve Mycek, 2006). Damar endotelinde hasar meydana geldiğinde trombositler, plazmadaki koagülasyon faktörleri ve endotel hücreleri kan damarlarındaki sızıntıyı önlemek için birlikte çalışır. Hasarlanan damar büzülür (endotel salıverilmesi) ve kesilen ya da yırtılan bölgede trombositler toplanarak (diğer trombositleri de bölgeye çekerek) trombosit tıkaçını oluştururlar. Hasarlanan bölgenin kapatılması için geçen süreye kanama zamanı denir. Daha sonra koagülasyon sistemi bir fibrin ağı oluşturur. Fibrinlerin kovalent çapraz bağlarla bağlanması sonucu fibrin pıhtısı ya da trombüs oluşur ve böylece sıkı ve dayanıklı bir tıkaç oluşmuş olur. Damarın yeniden kanalize olabilmesi için fibrinoliz gerçekleşir (Silbernagl ve Despopoulos, 2009). Fibrinoliz aşamasında, plazminojen dokuda bulunan plazminojen aktivatörleri ile enzimatik olarak plazmine (fibrinolizin) dönüştürülür. Plazmin, pıhtının büyümesini kontrol eder ve yaranın iyileşmesi için fibrin ağını çözer (Howland ve Mycek, 2006).

### ***Trombosit aracılı hemostaz ve trombosit tıkaç mekanizması***

Trombositler yuvarlak ya da oval, küçük, çekirdeksiz kan hücreleridir. Kemik iliğindeki megakaryositler, kemik iliğinde ya da kana geçtikten bir süre sonra parçalanarak trombositleri oluştururlar. Endotelde hasar meydana geldiği zaman, normalde inaktif olan trombositler yapışkan hale gelerek dokulardaki kollajen liflere ve plazmadan hasarlı doku içine sızan von Willebrand faktörü (vWF) adı verilen bir proteine yapışırlar. Bu yapışma sonucunda trombositler aktive olur ve maddeler salıverilir. Bu maddelerden vWF trombositlerin yapışkanlığını artırırken, serotonin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve tromboksan  $A_2$  ( $TxA_2$ ) de vazokonstrüksiyonu başlatırlar. Vazokonstrüksiyon ve trombosit kümeleşmesi ile kan akışı yavaşlar. Trombositlerden salıverilen ADP,  $TxA_2$  (araşidonik asidin siklooksijenaz enzimi tarafından etkilenmesi sonucu oluşur) ve trombosit aktive edici faktör (PAF) çevredeki trombositlere etki ile onları da aktive ederler ve böylece yeni aktiflenmiş trombositler başlangıçtaki aktiflenmiş trombositlere yapışırlar. Aktif trombositlerde morfolojik değişiklikler meydana gelir. Trombosit agregasyonuna trombosit içindeki  $Ca^{2+}$  düzeyinin yükselmesi ve sAMP konsantrasyonunun düşmesi ile sonuçlanan birçok ulak sistem aracı olur. Trombosit agregasyonu daha sonra trombin ile geliştirilir ve glikoprotein IIB/IIIa ile sağlamlaştırılır. Trombositler şeklini değiştirdiği zaman trombositlerin yüzeyinde glikoprotein IIB/IIIa açığa çıkar ve fibrinojen bağlanması ile trombosit birikimine yol açar. Glikoprotein IIB/IIIa ayrıca trombositlerin yapışkanlığını arttırarak endotel tabakasının altındaki fibronektine bağlanmalarını kolaylaştırır (Guyton ve Hall, 2007; Silbernagl ve Despopoulos, 2009).

### ***Pıhtılaşma (koagülasyon) mekanizması***

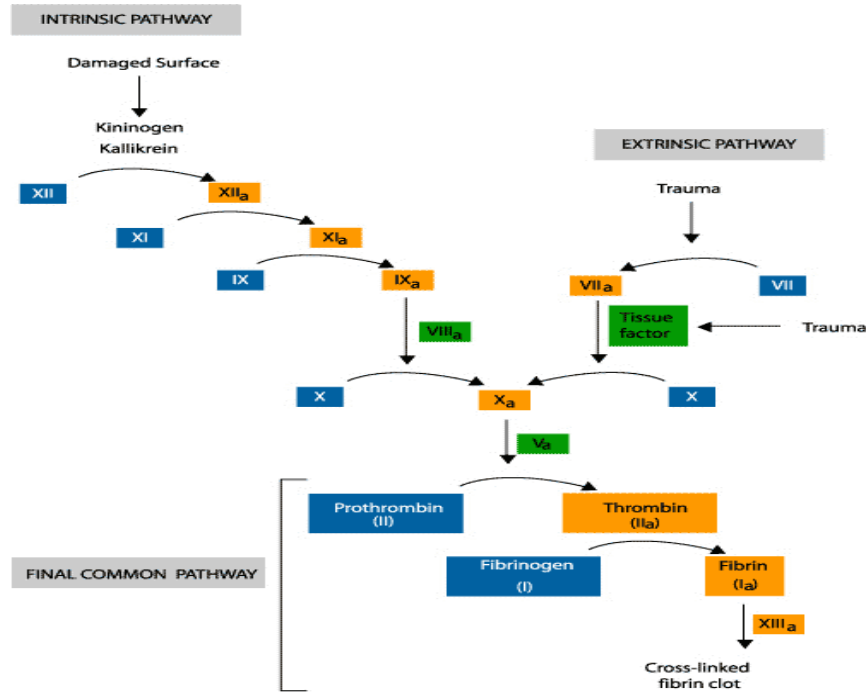
Kan ve dokularda kanın pıhtılaşmasına etki eden birçok madde bulunmaktadır. Bunlardan pıhtılaşmayı sağlayanlara prokoagülan, pıhtılaşmayı inhibe edenlere ise antikoagülan denir. Bu iki grup arasındaki denge kanın pıhtılaşp pıhtılaşmamasının belirlenmesinde rol oynar (Guyton ve Hall, 2007).

Koagülasyon üç ana basamakta meydana gelir: (1) protrombin aktivatörünün oluşması, (2) protrombin aktivatörünün kalsiyum iyonları varlığında protrombinden trombin oluşturması, (3) trombinin fibrinojene etki ederek fibrin



ipliklerini oluşturmaları. Son aşamanın ardından fibrin iplikleri trombositler, kan hücreleri ve plazmayı da içine alarak pıhtıyı oluşturur (Guyton ve Hall, 2007).

Protrombin aktivatörünün oluşumu genellikle kan pıhtılaşmasında hız sınırlayıcı faktördür, çünkü bu noktadan sonraki basamaklar pıhtı oluşturmak için hızlı bir şekilde gelişir. Damar duvarı ve çevresindeki dokuların travmaya uğramasıyla başlayan ekstrinsek yol ve kanın kendi içinde başlayan intrinsek yol sürekli iletişim halinde olan ve protrombin aktivatörünün oluşmasını sağlayan iki yoldur (Guyton ve Hall, 2007). Şekil 4’de (http-12) görüldüğü gibi intrinsek sistem, damarların endotelsiz bölgelerinde faktör XII’nin (Hageman faktör) aktif şekli olan faktör XII<sub>a</sub>’ya dönüşümü, ekstrinsek sistem ise doku kaynaklı bir lipoprotein (faktör III, doku tromboplastini) etkisiyle faktör VII’nin (serum protrombin konversiyon akseleratörü, prokonvertin) faktör VII<sub>a</sub>’ya dönüşümü ile başlar. Her iki mekanizma da faktör X (Stuart faktörü) üzerinden ortak bir yolda birleşir. Protein molekülleri olan pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu çoğu kez proteoliz (protein fragmanlarının yarılması) ve fibrin hariç, protein hidrolizi yapan enzimlere (proteaz) dönüşüm ile gerçekleşir. Aktif faktörlerden bazıları proteolitik etkinlik için fosfolipitlere ve kalsiyuma ihtiyaç duyar. Çeşitli enzimlerin bir sıra aktivasyonu sonucu oluşan reaksiyonlar fibrinin meydana gelmesiyle sonlanır (Lüllmann ve ark., 2005).



Şekil 4. Kanın Pıhtılaşma Mekanizması

### Antioksidan Aktivite

Organizmalar, ilerleyen yaşlarda ve toksinlere, psikolojik ve fiziksel strese maruz kaldıkları zaman, serbest radikallerin üretimi arttığında ve de savunma mekanizmalarının etkinliği yeterli olmadığında moleküler hasar kaçınılmazdır (Cadenas, 1997; Eşrefoğlu, 2009). Oksidatif stres adı verilen bu durum, kanser, ateroskleroz, malarya ve romatoid artrit gibi hastalıkların patofizyolojisinde rol oynar (Aruoma, 1997). Oksidatif stres, başta oksitlenme olmak üzere, bazı

kimyasal süreçlerden sonra serbest radikallerin oluşması ile ortaya çıkar. Yağların otooksidasyonunu yavaşlatan maddeler olan antioksidanlar ise, serbest radikallerle tepkimeye girerek bunların hücre üzerindeki zararlı etkilerini ortadan kaldırırlar (http-3). Kısacası, serbest radikalleri süpürerek nötralize eden ve hücreyi reaktif türlerden kurtaran maddelere antioksidan denir (Diplock, 1995).

### ***Serbest radikaller***

Serbest radikaller tek sayılı elektronları olan moleküllerdir. Tek ya da eşlenmemiş olan elektron, eşleşebileceği serbest bir elektron ararken oldukça reaktiftir. Serbest radikaller vücutta oksidatif metabolizma ve enerji üretimi sırasında ortaya çıkarlar (Packer ve ark., 2004). Oksijen serbest radikalleri ya da daha genel adıyla reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) normal hücrel metabolizmanın ürünleridir. ROT ve RNT canlı sistemler için hem zararlı hem de yararlı olabilirler (Valko ve ark., 2006). ROT'un yararlı etkileri düşük/normal konsantrasyonlarda görülür ve zararlı uyaranlara karşı hücrel cevapta fizyolojik rol oynar (Valko ve ark., 2007). Serbest radikaller enzim katalizleme reaksiyonları, mitokondride elektron transportu, sinyal iletimi ve gen ekspresyonu, nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, moleküller, hücreler ve dokularda oksidatif hasar, nötrofil ve makrofajların antimikrobiyal aktivitesi ve ayrıca yaşlanma ve hastalıklarda rol oynarlar (Packer ve ark., 2004).

Serbest radikallerin meydana getirdiği potansiyel biyolojik hasarlar oksidatif stres ve nitrosatif stres olarak adlandırılırlar (Kovacic ve Jacintho, 2001; Ridnour ve ark., 2005; Valko ve ark., 2001). Biyolojik sistemlerde bu durum, hem ROT/RNT üretimi normalden fazlaysa hem de enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlarda yetersizlik varsa meydana gelir. Diğer bir deyişle, oksidatif stres oksijen kullanan metabolik reaksiyonlardan ve pro-oksidan/antioksidan reaksiyonların dengesindeki düzensizlikten ileri gelir. Aşırı ROT hücrel lipitlerin, proteinlerin veya DNA'nın normal fonksiyonlarını inhibe ederek hücreye zarar verir. Bu nedenle oksidatif stres, yaşlanma ile birlikte birçok hastalığın da nedenidir (Dröge 2002).

### ***Reaktif oksijen türleri (ROT)***

Atomik ya da moleküler orbitallerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektronu bulunan moleküller, serbest radikaller olarak tanımlanır (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Bu eşlenmemiş elektron ya da elektronlar serbest radikallere yüksek derecede reaktivite kazandırır. Oksijenden türeyen radikaller, radikal türlerinin en önemli sınıfını oluştururlar (Miller ve ark., 1990). Kısa ömürlü ve güçlü oksitleyici özelliği olan bu oksijen metabolitleri; süperoksit anyon ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve singlet oksijendir (Kayaalp, 2005)

Eşsiz bir elektronik konfigürasyonu olan moleküler oksijen (dioksijen)'in kendisi bir radikaldir ve bir elektron eklenmesiyle süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) oluşur (Miller ve ark., 1990). Süperoksit anyon, ya bir metabolik işlem sonucu ya da fiziksel irradasyon sonrasında oksijen aktivasyonu ile ortaya çıkar ki buna 'birincil' ROT denilir. Daha sonra diğer moleküllerle etkileşerek 'ikincil' ROT oluşturulur. Süperoksit üretimi çoğunlukla hücrenin mitokondrisinde gerçekleşir (Cadenas ve Sies, 1998). Memeli hücrelerinde mitokondriyal elektron taşıma zinciri ATP'nin ana kaynağıdır ve bu yüzden yaşam için gereklidir. Enerji

transdüksiyonu (belli bir enerjinin diğer enerjiye dönüşmesi) sırasında az miktarda elektron oksijene bağlanarak oksijen serbest radikal süperoksiti oluşturur, ki bu durum birçok hastalığın patofizyolojisinde görülür (Kovacic ve ark., 2005; Valko ve ark., 2007). Süperoksit, ksantin oksidaz enzimi başta olmak üzere çeşitli enzimler ile de üretilebilir. Süperoksit bağışıklık sistemi tarafından istilacı mikroorganizmaların öldürülmesinde kullanılır. Fagositlerde ise NADPH oksidaz enzimi ile yüksek miktarlarda üretilir ve istilacı patojenlerin oksijene bağımlı olarak öldürülmesinde kullanılır (http-1).

Reaktif oksijen radikalleri arasında en reaktif ve sitotoksik olan hidroksil radikali ( $\bullet\text{OH}$ ), hidroksit iyonunun nötral formudur. Oldukça yüksek bir reaktivitesi olduğundan yaklaşık  $10^{-9}$  saniye gibi kısa bir yarılanma ömründe hücre içerisinde çok tehlikeli bir radikal haline gelir (Pastor ve ark., 2000, Kayaalp, 2005). Tiyoller ve yağ asitlerinden, tiyil radikalleri ( $\text{RS}\bullet$ ), karbon merkezli organik radikaller ( $\text{R}\bullet$ ) ve organik peroksitler ( $\text{RCOO}\bullet$ ) gibi yeni radikallerin oluşmasında rol oynar (http-2).

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) asıl üretimi, iki süperoksit ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) molekülünün iki proton almasıyla gerçekleşir. Bu reaksiyon ya kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla gerçekleştirilir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmasa da demir ve diğer metallerin varlığında hidroksil radikali oluşturur. Bu nedenle oksitleyici özelliği hidrojen peroksiti bu gruba dâhil eder (http-2). Peroksizomların fizyolojik şartlar altında  $\text{H}_2\text{O}_2$  ürettiği bilinmektedir (Valko ve ark., 2007). Peroksizomlar hücrelerde oksijen tüketiminin ana bölgeleridir ve oksijeni kullanan çeşitli metabolik fonksiyonlarda görev alırlar. Peroksizomlardaki oksijen tüketimi  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretimine neden olur ve daha sonra farklı moleküllerin oksitlenmesinde kullanılır. Bu organel ayrıca katalaz enzimi içerir ve hidrojen peroksiti parçalayarak toksik etkilerini engeller. Kısacası peroksizom, ROT oluşumunu engellemek için bu enzimlerin aktiviteleri arasında önemli bir denge kurulmasını sağlar. Organelin bu dengeyi nasıl sağladığı net olmamakla beraber, hasarlandığı zaman  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin sitozole yayılarak oksidatif stresin oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir (Valko ve ark., 2006).

#### *Reaktif nitrojen türleri (RNT)*

$\text{NO}\bullet$  (nitrik oksit) küçük bir moleküldür ve bir tane eşlenmemiş elektronu bulunduğundan radikal olarak adlandırılır. Biyolojik dokularda  $\text{NO}\bullet$  üretimi, nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla arjininin sitriline dönüştürülmesiyle gerçekleşir (Ghafourifar ve Cadenas, 2005; Kayaalp, 2005). Nitrik oksit vücutta yaygın dağılımı bulunan reaktif bir radikaldir ve fizyolojik işlemlerde oksidatif bir sinyal molekülü olarak davranır. Hücre koruyucu, kan basıncını düzenleyici, düz kas proliferasyonunu engelleyici, nörotransmitter, nöromodülatör, vazodilatör ve immün modülatör etkileri, bilinen etkilerindedir (Bergendi ve ark., 1999; Kayaalp, 2005).  $\text{NO}\bullet$ 'nin sulu ortamlardaki yarılanma ömrü sadece bir kaç saniye iken, oksijen konsantrasyonunun düşük olduğu ortamlarda ki kararlılığı çok yüksektir (yarılanma ömrü  $> 15$  sn). Ancak hem sulu hem de lipid ortamlarda çözünebilir olduğundan sitoplazmadan ve plazma membranından kolaylıkla difuze olur (Chiueh, 1999). Ekstraselüler ortamda  $\text{NO}\bullet$ , oksijen ve su ile reaksiyona girerek nitrat ve nitrit anyonlarını oluşturur (Valko ve ark., 2006; Carr ve ark., 2000).

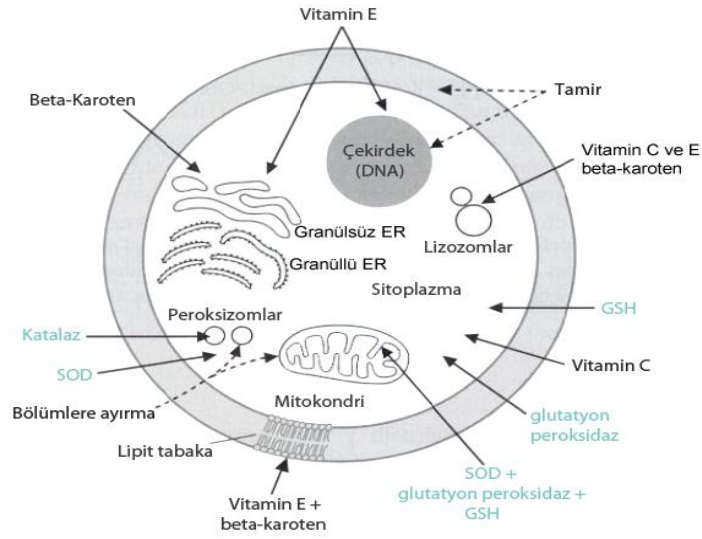
Reaktif nitrojen türlerinin aşırı üretimine nitrosatif stres adı verilir (Klatt ve Lamas, 2000; Ridnour ve ark., 2004). Bu durum, reaktif nitrojen türlerinin üretimi sistem tarafından nötralize ve elimine edilemeyecek kadar fazla olduğunda gerçekleşir. Nitrosatif stres, proteinlerin yapısının değişmesine ve dolayısıyla normal fonksiyonlarını yerine getirememelerine neden olabilir (Valko ve ark., 2006).

### ***Antioksidanlar***

Antioksidanlar, DNA hasarının ve lipit peroksidasyonunun azaltılmasında rol oynarlar ve ayrıca bazı kanser tipleri ve iskemik kalp rahatsızlıkları, katarakt gibi dejeneratif hastalıkların insidansının düşmesinde etkililerdir (Sies ve Stahl, 1995).

Hücreler, dokular ve vücut sıvıları (örn, lipoproteinler) geniş ölçüde çeşitli pro-oksidanlara maruz kalır (Sies ve Stahl, 1995). Serbest radikallere maruz kalmak organizmanın çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmesini sağlar (Cadenas, 1997). Bu mekanizmalar aracılığıyla normal biyokimyasal reaksiyonlar sırasında az miktarda ortaya çıkan radikaller nötralize edilebilir. Ancak pro-oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasıyla antioksidan mekanizmalar tükenir ve buna bağlı olarak sitotoksik radikal etkinliğinin artmasıyla da hücre ölümü gerçekleşir (Kayaalp, 2005). Serbest radikallerle indüklenen oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları şunlardır: (i) önleyici mekanizmalar, (ii) tamir mekanizmaları, (iii) fiziksel defanslar, (iv) antioksidan defansları. Enzimatik antioksidan defansları süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, katalaz (CAT) gibi enzimleri içerir. Bunlar reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştürürler. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise, askorbik asit (C vitamini),  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini), glutatyon (GSH), karotenoidler, polifenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler), poliaminler, taurin, adenosin, koenzim Q-10, resveratrol ve melatonin gibi antioksidanlardır. Bunlar etkilerini radikalleri yakalayıp nötralize ederek gösterirler (Valko ve ark., 2006; Kayaalp, 2005; Mates, 2000).

Askorbik asit, suda çözünebilir başlıca antioksidandır. İnsan plazma lipitlerinde yapılan çalışmalar, peroksil radikaliyle başlatılan lipit peroksidasyonunu en etkili şekilde inhibe eden antioksidanın askorbik asit olduğunu göstermiştir. Lipofilik özelliği olan karotenoidler 500'den fazla bileşik içerir.  $\beta$ -karoten bunlardan en önemli olanıdır ve akciğer, adrenal bez, böbrek, yumurtalık ve yağlarda bulunan başlıca karotenoiddir. Vitamin E, tokoferol ve tokotrienollerin farklı bileşenlerini özetleyen bir isimdir.  $\alpha$ -tokoferol insanlar için en önemli olanıdır. Vitamin E plazma ve kırmızı kan hücrelerinde lipitleri peroksidatif hasara karşı koruyan başlıca antioksidandır (Sies ve Stahl, 1995). Bu doğal antioksidanların yanı sıra sentetik olarak üretilen antioksidanlar da mevcuttur. Bunlar gıdalarda eksojen antioksidanlar olarak bulunurlar ve gıdaların tadını, rengini koruyarak vitaminlerin yıkımını önler. Bu grupta bulunan bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluol (BHT), tersiyer butil hidrokinon (t-BHQ) ve propil galatlar, yağlı yiyeceklere konulur ve böylece lipit oksidasyonu yavaşlatılarak önlenir (Güre Alaca ve Arabacı, 2005; http-2). BHA, BHT ve t-BHQ bir dizi genin ekspresyonunu uyarır ve bu genlerin ürünleri hücreleri oksidatif strese karşı korur (Mates, 2000).



**Şekil 5. Bazı Antioksidanların Hücredeki Etki Yerleri**

**Çizelge 1. Bazı Antioksidanlar ve Serbest Radikaller Üzerindeki Etkileri**

<b>Antioksidanlar</b>	<b>Etkileri</b>
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit anyonu oksijen ve hidrojen peroksite katalizler.
Glutasyon Peroksidaz	Hidrojen peroksiti suya indirger, eritrositlerde oksidatif strese karşı etkilidir.
Katalaz (CAT)	Hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalar.
C vitamini	Nötrofillerdeki oksidanları, hidroksil radikali ve hidrojen peroksidi yakalar.
E vitamini	Oksijen radikallerinin lipit peroksidasyonunu engeller.
A vitamini ve $\beta$ -karoten	Singlet oksijeni nötralize eder ve süperoksit radikalini temizler.
Glutasyon	Hidroksil radikali ve singlet oksijeni direkt yakalar, hidrojen peroksidi detoksifiye eder, vitamin C ve E'nin aktif formlarına dönmesini sağlar.
Flavonoitler	Peroksinitrit ve süperoksidi nötralize ederler. Süperoksit dismutaz ve katalazın ekspresyonunu indüklerler.
Fenolik asitler	Hidroksil, singlet oksijen, peroksinitrit radikallerini yakalar. Lipit peroksidasyonunu önler.

#### *Flavonoit antioksidanlar*

Flavonoitler bitkilerin yaprak, tohum, kabuk ve çiçeklerine geniş ölçüde dağılmışlardır ve şimdiye kadar 4.000'in üzerinde flavonoit tanımlanmıştır. Bitkilerde bu bileşikler ultraviyole ışınlar, patojenlere ve otçullara karşı bir savunma mekanizması şeklinde görev görür (Harborne ve Williams, 2000). Çiçeklerdeki antosiyanin pigmentleri çilek, vişne ve şaraptaki kırmızı ve mavi renklerden sorumludur (Hammerstone ve ark, 2000; Reinli ve Block, 1996).

Şifalı bitkilerin ve bitkilerin türlerinin antioksidan aktiviteleri genellikle fenolik bileşiklere bağlıdır (Skerget ve ark., 2005). Bazı tıbbi ürünlerin aktif maddeleri polifenolik bileşiklerdir. Antimutajenik aktivite gösteren flavonlar, antiviral, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkileri olan flavononlar ve ksantonlar ve ayrıca insanlarda fizyolojik etkileri olan izoflavonlar antioksidan etkinlik gösterir (Moure ve ark., 2001). Ayrıca flavonoidlerin, analjezik, antihepatotoksik, antiallerjik, antiosteoporotik, antitümör, enzim inhibe edici ve santral vasküler sistem üzerine etkileri gibi birçok farmakolojik etkileri vardır (Di Carlo ve ark., 1999). Bitkisel flavonoidlerin alımı, kardiyovasküler hastalıkların meydana gelme riskini azaltmaktadır. Çeşitli flavonoidlerin, reaktif oksijen türlerinin etkilerini bastırduğu ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin *in vitro* oksidasyonunu inhibe ettikleri ve bu özelliklerinden dolayı da trombotik eğilimi düşürdüğü bildirilmiştir. Flavonoidler siklooksijenaz enzimini inhibe ederek ve buna bağlı olarak arazişidonik asit (AA) metabolizmasını düzenleyerek inflamasyonu önleyebilirler (Skerget, 2005). Bazı hayvan modellerinde, flavonoidlerin anti-karsinojenik etkileri olduğu da gösterilmiştir (Karakaya ve Sedef Nehir, 1999; Merken ve Beecher, 2000; Mian ve Mohammed, 2001). Doğal flavonoidler yiyeceklerde lipidlerin oksidasyonunu önleyebilirler ve bunlardan bazılarının etlerde, balık yağında ve domuz yağında lipid oksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Chen ve ark., 1999).

#### **Alıç (*Crataegus*) Türleri**

Alıç olarak bilinen *Crataegus* bitkisinin meyveleri ve çiçekleri gülgiller (Rosaceae) familyasına aittir. Bu şifalı bitki dünyanın ılıman kuzey bölgelerinde geniş ölçüde yayılmıştır ve yaklaşık 280 türü en çok Doğu Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da bulunur. *Crataegus*'un 21 tane türü Türkiye'de bulunmaktadır. En çok çalışılan ve en yaygın tür olan *C.monogyna* (sinonim: *C.oxycantha*) Türkiye'de kuzey doğu kesimleri hariç yaygın halde bulunmaktadır. Bu bitki halk arasında beyazdiken, ekşi muşmula, enişen, yemişen ve yemişken gibi isimlerle de anılır. Hipertansiyon, aritmiler ve konjestif kalp yetmezliği gibi durumlarda kardiyak tonik olarak, uykusuzluk için ve sinirleri yatıştırıcı etkilerinden dolayı halk arasında kullanımı yaygındır (Baytop, 1984; Dönmez, 2004; Demirezer 2007).

Yaygın alıç (*C.monogyna*), 10 metreye kadar yükselebilen, Nisan ve Mayıs aylarında beyaz veya pembe renkte çiçek açan, dikenli çalı tipinde bir ağaçtır. Ters yumurta şeklinde olan yaprakları 3-5 parçalıdır. Meyveleri 6-10 mm çapında, koyu kırmızı ve küremsi ya da hemen hemen elips şeklindedir. Hafif ekşimsi ve lezzetli bir tadı vardır (Browicz, 1972; http-4; http-5). *C.laevigata*'nın özü batı ve orta Avrupa'ya dayanır. İngiltere, İspanya, Çek Cumhuriyeti ve Macaristan'da yaygın olarak bulunur (http-6). *C.tanacetifolia* Türkiye'de kurak yamaçlarda ya da genellikle kalkerli kayalar olmak üzere kayalık alanlarda bulunur (http-7). *C.azarolus* Akdeniz havzasında (zeytin ağaçlarının bulunduğu bölge) yetişir ve bunun dışında süs bitkisi olarak da kullanılır. Tarihte pek çok alanda şifalı bitki olarak kullanılmıştır (http-8). *C.pinnatifida* açık kırmızı renkte meyveleri olan ve Çin alıcı olarak bilinen başka bir alıç türüdür. Kao ve ark. (2007), bu türün deri kanseri hastalarında terapötik bir kullanımı olabileceğini göstermiştir (http-9). *C.davisii* ise Türkiye'ye ait yöresel bir bitkidir ve botanik yönden *C.pentagyna* ile çok benzerdir (Dönmez 2004, Sözer ve ark., 2006). Bu tez kapsamında

kullanılacak olan *C.orientalis* de Akdeniz Bölgesi, Türkiye, Kırım ve Batı İran'da bulunur. Meyveleri turuncu ya da kırmızının farklı tonlarındadır (http-10).

Alıcın farklı türlerinin yaprak, çiçek ve meyvelerinin ekstrelerinin ve tentürlerinin tedavi amaçlı kullanılışı eski zamanlara dayanır (Barnes ve ark., 2002; Bahorun ve ark., 2003). Çin'de skorbüt, konstipasyon, sindirim rahatsızlığı, böbrek taşları ve nefes darlığı gibi hastalıklara karşı şifalı bitki olarak geniş bir kullanımı vardır. Son zamanlarda Çin ve Avrupa'da alıç meyveleri öncelikli olarak kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Ammon ve Handel, 1981a; Rigelsky ve Sweet, 2002). Alıç meyvelerinin tüketilmesinin kardiyovasküler sistem üzerinde uzun süreli yararlarının olduğu gösterilmiştir (Ammon ve Handel, 1981b; Ammon ve Handel, 1981c). Alıç meyvesi konjestif kalp yetmezliğinin erken safhalarında (Weihmayr ve Emst, 1996; Schussler ve ark., 1995) ve anjina pektorisin tedavisinde pozitif etkilere sahiptir (Hanack ve Bruckel, 1983). Ayrıca alıç ekstresinin kan basıncını ve total plazma kolesterolünü düşürmede klinik açıdan etkili olduğu gösterilmiştir (von Eiff, 1994). Fakat alıç ekstrelerinin bu koruyucu etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. İçeriğinde bulunan antioksidanlar, serbest radikallerin üretimini azalttıkları, kalp dokusuna karşı olası zararları hafiflettikleri ve kolesterolün arterlere çökmesini azalttıkları için bu yararlı etkilerin ortaya çıkmasında antioksidanların rol oynadığı düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2001).

#### **Aktif bileşenleri**

Alıç türlerinin temel bileşenleri (**Çizelge 2**) aminler, triterpen saponinler, flavonoidler ve bunların glikozitleri, kateşinler ve oligomerik proantosiyanidin (OPS)'lerdir (Miller, 1998). Çiçekleri daha yüksek miktarda flavonoid içerirken, yapraklarındaki OPS miktarları daha fazladır (Mills ve Bone, 2000).

**Çizelge 2. *Crataegus monogyna*'nın Kimyasal Bileşenleri**

<b>Aminler</b>	$\beta$ - Feniletilamin, Tiramin, Asetilkolin
<b>Flavonoid ve Glikozitleri</b>	Kuersetin, Hiperozit, Rutin, Viteksin, İzoviteksin, Orientin, İzorientin, Apigenin
<b>Triterpen Saponinler</b>	Oleanolik asit, Ursolik asit, Krataegolik asit
<b>Oligomerik Proantosiyanidinler</b>	Prosiyanidin dimerleri B1,B2,B5, Trimer C1, Oligomer ve polimerler
<b>Kateşinler</b>	(+) Kateşin, (-) Epikateşin

Tez kapsamında kullanılan *C.orientalis* yapraklarının flavonoid içeriği Melikoğlu ve ark. (1998) tarafından araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 300 g yaprak ekstresinden yüksek miktarda hiperozit (kuersetin-3-O-galaktozit) (1550 mg) olmak üzere apigenin (30 mg), apigenin 7-glikozit (45 mg), viteksin (55 mg), viteksin 4'-ramnozid (66 mg) izole edilmiştir. *C. orientalis* yapraklarının çiçek ve meyvelerine göre daha yüksek oranda flavonoid içerdiği ve bitkinin bütün kısımlarında hiperozitin ana bileşen olduğu gösterilmiştir.

## ***Tıbbi özellikleri***

### ***Etkileri***

Alıç meyvesi miyokardiyal kasılma gücünü artırır, koroner kan akışını artırır, miyokart için gerekli oksijen miktarını azaltır, miyokardiyal hasara karşı korur. Hipotansiftir, antiaritmiktir ve kalp hızı değişimlerini düzenler. Antioksidandır, kollajenleri dengeler ve kolesterolü düşürür (Mills ve Bone, 2000).

### ***Geleneksel kullanımı***

Alıç meyveleri, miyokart zayıflığıyla birlikte meydana gelen hipertansiyon, anjina pektoris, taşikardi ve diğer dolaşım bozukları gibi (ateroskleroz, Buerger hastalığı) birçok kalp problemlerinin tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak çiçekleri ve meyveleri, boğaz ağrısında, ödem oluşumunda, böbrek sorunları için de diüretik olarak kullanılmaktadır. *C.pinnatifida* ve *C.cuneata* gibi türleri Çin tıbbında sindirimi kolaylaştırmak ve dolaşımı uyarmak gibi durumlarda geleneksel olarak kullanılmaktadır (Mills ve Bone, 2000).

### ***Diğer kullanım alanları***

Antisebore (sebore; sebasöz bezlerin salgısının artışı) olarak kozmetik ve saç bakımı ürünlerinde, antiinflamatuvar etki elde etmek amacıyla ve derinin hidrasyonunu ve esnekliğini arttırmak amacıyla kullanılır (Mills ve Bone, 2000).

### ***Kullanılan dozlar***

Konjestif kalp yetmezliği ve hafif bradiaritmilerin tedavisinde toz edilmiş droğu günde 2-5 g kullanılırken, etanollü ve metanollü ekstratlarını içeren drog günde 3 kez toplam 160-900 mg olacak şekilde kullanılır (Bisset, 1994).

### ***Yan etkileri ve doz aşımı***

Bilinen hiçbir yan etkisi olmamakla beraber, doz aşımı durumunda sedasyon, tremor, dispne ve piloereksiyon görülebilir (Demirezer, 2007).

### ***Etkileşimleri***

Hipotansif etkili olan alıç, beta blokörlerle kullanıldığında hipertansif etki yapabilir. Drog ve preparatları kardiyak glikozitlerin etkisini arttırabilirler. 3. sınıf antiaritmiklerle aynı etkileri gösterdiklerinden, birlikte kullanımı sırasında dikkatli olunmalıdır. Doz ayarı gerekebilir (Mills ve Bone, 2000).

## ***Farmakolojik özellikleri***

### ***Antioksidan etkileri***

Alıç meyveleri ile ilgili yapılan farmakolojik çalışmalar, alıç türlerinin daha çok kardiyovasküler sistemi koruyucu, hipotansif ve kolesterol düşürücü etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır (Weihmayr ve ark, 1996; Hanack ve ark., 1983). Ancak bu yararlı etkilerin mekanizmaları halen araştırılmaktadır. Perhiz yemekleriyle alınan antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu ve yayılmasını önleyebilir, bu nedenle serbest radikallerden kaynaklanan kalp dokusu ve kardiyovasküler damar hasarları en aza indirilebilir. Son zamanlarda, insan LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonunun kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde risk faktörlerinden biri olduğu kabul edilmiştir (Steinberg ve ark., 1989; Knipping ve ark., 1990). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar alıç



meyvelerinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu desteklemektedir (Zhang ve ark., 2001).

*Crataegus monogyna* çiçek tomurcuklarının %70 metanollü ekstresi ile yapılan *in vitro* bir çalışmada, sıçan karaciğer mikrozomlarında lipit peroksidasyonunun inhibe edildiği gözlenmiştir (Bahourun ve ark., 1994; Rakotoarison, 1997). Droğun etilasetatlı ekstresinin  $Cu^{+2}$  ile indüklenen LDL oksidasyonunu inhibe edici etkisinin toplam polifenol içeriği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Qoettier-Deleu ve ark., 2003). *In vitro* olarak yüksek antioksidan etkili olan *C.monogyna* çiçeklerinin antioksidan etkinliği içeriğindeki polifenol miktarı artıktır (Rakotoarison, 1997). *Crataegus aronia* (*Crataegus azarolus* türü) sulu ekstresi ile yapılan bir *in vitro* çalışmada bu türün sıçan karaciğer homojenatlarında,  $\beta$ -karoten oksidasyonunu, 2,2'-azobis (2-amidino-propan) dihidroklorür (AAPH) ile indüklenen plazma oksidasyonunu ve  $Fe^{+2}$  ile indüklenen lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Buna ek olarak,  $O_2^{\cdot-}$  radikalini süpürücü etkinliği olduğu belirtilmiştir (Ljubuncic ve ark., 2005). Çinli araştırmacıların Çin alıcı (*C.pinnatifida*) ile farelerde yaptığı bir çalışmada da alıcın sulu ekstresinin oral dozları kullanılmış ve süperoksit dismutaz aktivitesi kırmızı kan hücrelerinde ölçülmüştür. Sonuçlara göre, alıcın SOD aktivitesini başlatmada güçlü bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Mills ve Bone, 2000).

#### *Antiinflamatuvar etkileri*

Flavonoitlerin terapötik uygulamada kullanıldığı başka bir alan da inflamasyondur. Çeşitli flavonoitlerin trombosit ve peritoneal lökositlerde AA metabolizmasını düzenlediği bildirilmiştir (Laughton ve ark., 1991). Bu etkilerin altında yatan hüresel mekanizma hala çok net olmasa da flavonoitlerin antioksidan etkinlikleriyle ilişkilendirilmektedir (Kao ve ark., 2005). Bu nedenle, flavonoitlerce zengin olan bitkilerin antiinflamatuvar etkilere sahip olabileceği düşünülmektedir.

*C.monogyna* heksan ekstresinden elde edilen sikloartenol ana bileşenli triterpen fraksiyonunun *in vitro* olarak fosfolipaz  $A_2$ 'yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Farelerle yapılan *in vivo* çalışmada, aynı fraksiyonun 40 mg/kg dozda oral olarak verilmesiyle, karragenin ile indüklenen pençe ödemi testinde 3 saat içinde %61,5 ve 5 saat içinde de %52,5 oranında inhibisyon gerçekleştiği belirtilmiştir (Ahumada ve ark., 1997). *C. monogyna*'nın sulu/alkollü ekstresi ile antiinflamatuvar etkisini göstermek üzere yapılan başka bir *in vitro* çalışmada, tromboksan  $A_2$  ve prostaglandin  $I_2$ 'nin oluşumlarının inhibe edildiği gösterilmiştir (Vibes ve ark., 1994). *C.pinnatifida* ile yapılan bir çalışmada ise, bu bitkinin kurutulmuş meyvelerinden elde edilen flavonoitlerin lipopolisakkaritlerle indüklenen inflamasyon cevaplarını *in vivo* ve *in vitro* deneylerde inhibe ettiği gösterilmiştir (Kao ve ark., 2005).

#### *Analjezik etkileri*

Alıcın antinosiseptif etkinliğinin değerlendirilmesiyle ilgili yapılan çok fazla çalışma olmasa da, bu etkinin varlığını destekleyebilecek başka çalışmalar mevcuttur.

Erdemoğlu ve ark. (2009) tarafından *Arctium minus*'un sulu ve etanol ekstratlarıyla yapılan çalışmada, bu bitkinin analjezik etkileri olduğu bildirilmiştir.

Antinosiseptif aktiviteyi ölçmek için farelerde, *p*-benzokinin ile indüklenen abdominal kasılma testi uygulanmıştır. Bitkinin etanol ekstresinde analjezik etki görülürken, sulu ekstresinde bu etkiye rastlanmamıştır. Gözlemlenen antinosiseptif etkiden flavonoidlerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir çünkü kuersetin ve kaemferol gibi flavonoidlerin güçlü antinosiseptif etkileri olduğu bildirilmiştir.

*Sideritis brevibracteata*'nın farklı ekstreleri ile yapılan diğer bir çalışmada da, yine *p*-Benzokinin ile indüklenen abdominal kasılma testi kullanılarak antinosiseptif etkiye bakılmış ve *n*-butanol (BuOH) ekstresinin diğerlerine göre (metanol ve kloroform ekstresi) daha yüksek analjezik etkisi olduğu gözlenmiştir. *n*-butanol fraksiyonunun başlıca bileşenleri flavonoidler olduğundan antinosiseptif etkinliğin flavonoidlerden ileri geldiği düşünülmüştür (Güvenç ve ark., 2010).

Farklı bitkilerle yapılan bu çalışmalardan yola çıkarak ve flavonoid içeriğinden, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerinden dolayı *Crataegus orientalis*'in analjezik etkisi olabileceği düşünülerek bu çalışma planlanmıştır.

## **GEREÇLER**

### **Hayvanlar**

DeneYlerimizde Anadolu Üniversitesi DeneY Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'nden alınmış olan her iki cinsten seçilmiş, yaklaşık 30-40 g ağırlığında Swiss albino fareler kullanılmıştır. Fareler 12 saat gece/gündüz aydınlatmalı, 18-25°C'de, iyi havalandırılmış odalarda barındırılmışlardır. DeneYler öncesinde hayvanların, gürültü gibi stres faktörlerinden uzak tutulmasına özen gösterilmiştir. Beslenmeleri amacıyla verilen standart yem peletlerini ve suyu istedikleri kadar tüketmelerine izin verilmiştir. Ayrıca deneY hayvanları ile yapılacak çalışmalar için Anadolu Üniversitesi DeneY Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi'nden Etik Kurul onayı alınmıştır.

### **Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar**

Asetik asit	(Sigma-Aldrich, ABD)
β-karoten	(Sigma-Aldrich, ABD)
Gallik Asit	(Sigma-Aldrich, ABD)
BHT	(Sigma-Aldrich, ABD)
Diklofenak	(Sigma-Aldrich, ABD)
DMSO	(Fluka, Chemica, ABD)
DPPH	(Sigma-Aldrich, ABD)
Folin-Ciocalteu reaktifi	(Sigma-Aldrich, ABD)
Heparin	(Sanofi-aventis, Türkiye)
Karragenin Tip I	(Sigma-Aldrich, ABD)
Kloroform	(Sigma-Aldrich, ABD)
Linoleik asit	(Fluka, Chemica, ABD)
Metanol	(Merck, Almanya)
Morfin	(Sigma-Aldrich, ABD)
Nalokson	(Sigma-Aldrich, ABD)
Sodyum karbonat	(Sigma-Aldrich, ABD)
Serum fizyolojik	(Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye)
Tris-HCl buffer	(Sigma-Aldrich, ABD)
Tween 80	(Merck, Almanya)

### **Kullanılan Cihazlar**

Çalkalamalı su banyosu	(Heto-tbvs, HETOMIX)
Dijital kumpas 150 mm	(Torq 6)
ELİZA (mikroplak okuyucu)	(Bio.Tek. EL <sub>x</sub> 808 <sub>IU</sub> )
Etüv	(Venticell, MMM Medenter)
Hassas terazi	(OHAUS)
Isı tablası (Hot-plate)	(UGO BASILE 7280)
UV-VIS Spektrofotometre	(Shimadzu UV 1601)
Vortex karıştırıcı	(Heidolph, REAX top)

## YÖNTEMLER

### Ekstrenin Elde Edilmesi

*Crataegus orientalis* türüne ait ekstre İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyeleri tarafından sağlanmıştır. Çalışmada yaprak kısımları kullanılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında gölgede kurutulmuş, toz edilmiştir. Tam olarak tartılan örnekler %50'lik etanol ile 110°C'lik su banyosunda 18 saat süreyle Soxhlet Apareyinde tüketilmiştir ve elde edilen ekstralar liyofilize edilmiştir.

Elde edilen ekstre antinosiseptif ve antiinflamatuvar testleri için gerekli miktar stok çözeltide (%20 DMSO) çözülerek 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında, antitrombotik aktivite testi için ise 100, 200 ve 300 mg/kg dozlarında hazırlanmıştır.

### Kullanılan Diğer Maddelerin Hazırlanması

Kıvrınma testi için gerekli olan asetik asit solüsyonu %0,6 hazırlanmıştır.

Pençe ödem testi ve antitrombotik aktivite için gerekli olan karragenin %1'lik hazırlanmıştır.

Analjezik etkiyi kıyaslamak amacıyla referans olarak kullanılan diklofenak çözeltisi 10 mg/kg dozunda, morfin ve nalokson çözeltileri ise 5 mg/kg dozunda hazırlanmıştır. Antitrombotik etkinin kıyaslanması amacıyla kullanılan heparin 10 IU ve 100 IU olarak hazırlanmıştır.

Analjezi ve antiinflamatuvar testlerinde kontrol grubuna %20 DMSO (80 ml SF, 20 ml DMSO), antitrombotik aktivite testinde ise SF uygulanmıştır.

Kontrol grubuna verilen %20 DMSO, *C.orientalis*'in tüm dozları, asetik asit solüsyonu, diklofenak, morfin ve nalokson çözeltileri hayvanlara eşit hacimlerde *i.p.* yolla verilmiştir.

### Akut Toksikite

Swiss-albino fareler her grupta altı hayvan olacak şekilde yedi gruba ayrılmışlardır. İlk grup kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Diğer gruplara da 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000 mg/kg olacak şekilde hazırlanan *C.orientalis* dozları *i.p.* yolla verilmiştir. Toksik semptomların ve mortalitenin takip edilmesi amacıyla hayvanlar 72 saat boyunca gözlenmiştir (Hosseinzadeh ve ark., 2002; Walker ve ark., 2008). Hayvanların standart yem peletlerini ve suyu istedikleri kadar tüketmelerine izin verilmiştir.

### Antinosiseptif ve Antiinflamatuvar Aktivitenin Deneysel Modellerde Ölçümü

#### *Hot-plate testi*

Hot-plate (sıcak zemin) testi, en sık kullanılan termal analjezi ölçüm yöntemlerinden biridir. Bu test kapsamında kullanılan ve etrafı pleksiglas bir silindir ile sınırlandırılmış olan Ugo Basile (No: 7280) ısı tablası, 56°C'ye kadar ısıtılmıştır. Hayvanın sıcak zemine bırakıldığı andan, arka ayaklarını çekme, yalama, bacakları üzerinde yükselme veya sıçrama hareketlerinden birinin gözlemlendiği ana kadar geçen zaman ölçülmüştür (Eddy ve Leimback, 1953; Uzbay, 2004).

Ölçümler, hayvanlara hem madde verilmeden önce hem de madde verildikten 30 dk sonra yapılmıştır. Hayvanların ayaklarının sıcaktan zarar görmesini engellemek için deneyin bitirilme süresi 20 sn olarak belirlenmiştir (Bastos ve ark., 2006; Kılıç ve ark., 2006).

Nalokson enjeksiyonundan 10 dk sonra test maddeleri uygulanmıştır.

#### ***Tail-immersion testi***

Analjezi çalışmalarında kullanılan başka bir termal metottur. Hayvanın kuyruğunun ucundan itibaren 3 cm'lik kısmı bir beher içerisinde bulunan  $52,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığındaki suya daldırılmıştır. Kronometre ile yapılan ölçümler hayvanın kuyruğunun suyun içine daldırıldığı andan, suyun dışına doğru hızlıca çekmesine kadar geçen süreyi kapsar (Schmauss ve Yaksh, 1984; Aydın ve ark., 1998; Aydın ve ark., 2003).

Ölçümler, hayvanlara madde verilmeden önce ve madde verildikten 30 dk sonra yapılmıştır. Veriler % maksimum olası etki olarak hesaplanmıştır. Hayvanların kuyruklarının sıcaktan zarar görmesini engellemek için deneyin bitirilme süresi 15 sn olarak belirlenmiştir (Aydın ve ark., 2003).

Opioid antagonist nalokson enjekte edildikten 10 dk sonra test maddeleri verilmiştir.

#### ***Asetik asit kıvrınma testi***

Kimyasal analjezi ölçüm yöntemidir. Hayvanlarda güçlü viseral ağrı oluşturabilmek için asetik asit solüsyonu kullanılmaktadır. Hayvanlarda, asetik asitin intraperitoneal olarak uygulanmasından sonra karın kaslarında kasılma ile başlayıp daha sonra arka ayakların geriye doğru gerilmesi ve karnın yere sürtünmesi ile karakterize bir kıvrınma durumu oluşur (Koster ve ark., 1959; Hayashi ve Takemori, 1971; Önkol ve ark., 2004; Bastos ve ark., 2006). Maddenin enjeksiyonundan 30 dk sonra, %0,6'lık asetik asit solüsyonu hayvanlara *i.p* yolla verilmiştir. 5 dk'lık bekleme süresinin sonunda, her hayvanda bahsedilen kıvrınma hareketleri 10 dk boyunca gözlenmiştir. Bu deneyin 16 saat öncesinden itibaren hayvanlar aç bırakılmıştır (Raji ve ark., 2002).

Nalokson enjeksiyonu test maddesi verilmeden 10 dk önce yapılmıştır.

#### ***Karragenin ile indüklenen pençe ödem testi***

Karragenin ile indüklenen pençe ödem testi antiinflamatuvar aktivite tayini için kullanılmaktadır (Kasahara ve ark., 1985; Yeşilada ve Küpeli, 2002; Erdemoğlu ve ark., 2009). Test maddesinin *i.p* enjeksiyonundan 35 dakika sonra, farelerin her birinin sağ arka pençelerinin plantar dokusuna serum fizyolojik ile hazırlanmış %1'lik karragenin (Sigma-Aldrich, ABD) 40 µl olacak şekilde verilmiştir. Kontrol olarak, 40 µl serum fizyolojik sol arka pençelerine enjekte edilmiştir. İnflamasyon oluşturulduktan sonra pençe ödemi sonucunda oluşan kalınlık 6 saat boyunca, her 90 dakikada bir dijital kumpas ile ölçülmüştür. Test maddesi verilen grupların ortalama değerleri, kontrol grubunun ortalama değerleri ile karşılaştırılmış ve analiz edilmiştir. Referans ilaç olarak diklofenak (10 mg/kg) kullanılmıştır.

## **Antitrombotik Aktivite Deneyi**

### ***Karragenin ile indüklenen kuyruk tromboz testi***

Dişi ve erkek karışık olan Swiss-albino fareler her grupta 6 hayvan olacak şekilde altı gruba ayrılmıştır. Serum fizyolojik verilen grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Diğer üç gruba ise sırasıyla stok çözelti içerisinde çözülmüş 100, 200 ve 300 mg/kg *Crataegus orientalis* etanol ekstresi *i.p* yolla verilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılacak hayvanlara 10 ve 100 I.U (ml/kg)<sup>-1</sup> heparin enjekte edilmiştir. Test maddelerinin enjeksiyonundan 1 saat sonra farelerin her birinin sağ arka pençesinin plantar dokusuna serum fizyolojik ile hazırlanmış %1'lik karragenin 40 µl olacak şekilde enjekte edilmiştir. Fareler karragenin enjeksiyonundan sonraki 24, 48 ve 72. saatlerde gözlenen kuyruklarındaki trombozların uzunluğu ölçülerek görüntüleri fotoğraflarla belirlenmiştir (Hagimori ve ark., 2009; Yan ve ark., 2009).

## **In Vitro Antioksidan Aktivite Tayin Deneyleri**

### ***Toplam fenol tayini***

Toplam fenoller gallik asit eşdeğeri (GAE) şeklinde hesaplanmıştır ve gram ekstrede mg gallik asit (mg gallik asit/g ekstre) olacak şekilde ifade edilmiştir. 6 ml distile su ve ekstrenin 100 µL'si 10 ml'lik volumetrik flaska aktarılmıştır ve daha sonra karışıma 500 µL seyreltilmemiş Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. 1 dakika sonra karışıma 1,5 ml sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) çözeltisi (%20'lik, a/h, suda) eklenmiş ve hacim distile su ile 10 mililitreye tamamlanmıştır. Karışım 25 °C'de 2 saat bekletildikten sonra absorbans değeri 760 nanometrede (nm) ölçülmüştür ve gallik asit kalibrasyon eğrisiyle karşılaştırılmıştır. Elde edilen veri üç farklı analizden ortalamasıdır (Singleton ve ark., 1999).

### ***DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki***

Serbest radikal süpürücü etkinin tayini için kararlı bir radikal olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reaktifi kullanılmıştır (Burits ve Bucar, 2000). Ekstrenin DPPH radikallerini süpürücü etkisi Gyamfi ve ark. (1999) metoduna göre tayin edilmiştir. Ekstrenin 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7,4) içerisinde hazırlanan farklı konsantrasyonlarının (1, 3, 5, 10 mg/ml) 50 µl'si, 450 µL Tris-HCl buffer ve 0,1 mM DPPH·'ın 1 ml'si ile metanol içerisinde karıştırılmıştır. Karışım 1 dakika boyunca vortex ile karıştırıldıktan sonra, karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Çözeltinin 517 nm de absorbans değerleri ölçülmüştür ve serbest radikal DPPH·'ın inhibisyon (%İ) değeri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \dot{I} = (A_{\text{boş}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{boş}}) \times 100$$

A<sub>boş</sub> = kontrol maddesinin (test maddesi dışında bütün reaktifleri içerir) absorbans değeri

A<sub>örnek</sub> = test maddesinin absorbans değeri

### ***β-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini***

Bu yöntemle, linoleik asit oksidasyonu sonucunda ortaya çıkan uçucu organik bileşiklerin ve konjuge dien hiperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesi sonucu antioksidan kapasite tayin edilir (Dapkevicius ve ark., 1998). Kuru bir kaba

tartılan 40 mg linoleik asit ve 400 mg Tween 80 ile β-karoten çözeltisinin tamamı (3mg/ml kloroformda) vorteksde iyice karıştırılmış, kloroform alçak basınç altında 40°C’de rotavaporda ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bakiye su ile emülsifiye edilerek 100 ml ye tamamlanmıştır. Portakal renkli bu stok çözelti deneyler sırasında karanlıkta saklanmıştır. 3 ml β-karoten çözeltisi içerisine 0.2 ml numune çözeltisi (1 mg/ml konsantrasyonda) ilave edilerek vorteksde iyice karıştırılmış, her bir numune çözeltisi (0.2 ml) mikroplaklara yerleştirilerek işlem sırasında 40°Cde etüvde tutulmuş ve 15 dakika aralıklarla 490 nm de ELİZA mikroplak okuyucuda absorbansları ölçülmüştür. Herbir deney 3 kez tekrarlanmış, sonuçların zamana (dakika) karşı okunan absorbans değerleri tablo ile verilmiştir. Ayrıca antioksidan aktivite fenolik asit ilave edilmeksizin kontrole karşı oksidasyonun inhibisyon yüzdesi olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve sentetik antioksidanlar BHT’nin sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak metanol kullanılmıştır (Oomah ve Mazza, 1996; Velioglu ve ark., 1998).

$$\% \text{ Antioksidan aktivite} = 100 \times [1 - (A_s^0 - A_s^{120}) / (A_k^0 - A_k^{120})]$$

$A_s^0$  = örneğin başlangıçtaki absorbansı (490 nm)

$A_s^{120}$  = örneğin 120 dakika sonraki absorbansı (490 nm)

$A_k^0$  = kontrolün başlangıçtaki absorbansı (490 nm)

$A_k^{120}$  = kontrolün 120 dakika sonraki absorbansı (490 nm)

#### **Verilerin İstatistiksel Analizi**

Hayvanlardan elde edilen tüm değerler, tek tek deneysel verilerin aritmetik ortalamasıdır. Kontroller ile *C.orientalis* uygulanan hayvanlar arasında görülen farklılıklar One-way ANOVA testi uygulanarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Deney sonuçları olarak elde edilen tüm verilerin istatistik analizleri için GraphPad Prism version 5.0 istatistik programı kullanılmıştır.

Hot-plate ve tail-immersion testlerinde elde edilen değerler aşağıdaki formülde yerine koyularak %’ye çevrilmiştir:

$$\% \text{ maksimum olası etki} = \frac{[\text{ilaç sonrası reaksiyon zamanı} - \text{ilaç öncesi reaksiyon zamanı}]}{[(\text{cut-off=test kesme süresi}) - \text{ilaç öncesi reaksiyon zamanı}]} \times 100$$

Karragenin ile indüklenen pençe ödemi testinden elde edilen kalınlık değerleri aşağıdaki formülde yerine koyularak her 90 dakikada bir alınan ölçümlerin %inhibisyon değerleri hesaplanmıştır:

$$\% \text{ inhibisyon} = [(\text{Kalınlık}_{(\text{kontrol})} - \text{Kalınlık}_{(\text{test maddesi})}) / \text{Kalınlık}_{(\text{kontrol})}] \times 100$$



## BULGULAR ve TARTIŞMA

Alıç, Türkiye'nin kuzey bölgeleri hariç hemen hemen kalan tüm bölgelerinde yaygın olarak yetişmekte olan ve halk arasında sıklıkla kullanılan bir bitkidir. Dünyada alıcın 20'den fazla türü bitkisel ilaç ya da ilaç materyali olarak kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları Almanya, Fransa, Çin ve İngiltere gibi ülkelerde ilaç kılavuzunda (farmakope) listelenmiştir (Chang ve ark., 2002; Barnes ve ark., 2002; Bahorun ve ark., 2003). Bazı preparatlarının standardizasyonu içeriğindeki flavonoidlerin ve oligomerik proantosiyanidinlerin (OPS) varlığı baz alınarak yapılmıştır (Chang ve ark., 2002; Barnes ve ark., 2002). Bu nedenle alıcın antioksidan etkilerinden ve buna bağlı olarak gerçekleştiği düşünülen kolesterol düşürücü etkilerinden dolayı kullanıldığı bildirilmektedir. Bunlara ek olarak, yapılan birçok çalışma flavonoidlerin ve OPS'lerin antinositif ve antiinflatuvar etkilerinin de olduğunu göstermektedir (Erdemoğlu ve ark., 2009; Xu ve ark., 2010).

Bu bilgilere dayanarak tez kapsamında, *C. orientalis*'in yapraklarından elde edilen etanol ekstresinin antinositif, antiinflatuvar, antitrombotik ve antioksidan potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ekstrenin 50, 100, 200 mg/kg dozları uygulanarak antinositif ve antiinflatuvar etkinliği incelenmiştir. Antinositif aktivitenin değerlendirilmesi için kısa süreli uyaran kullanılarak oluşturulan, "fazik ağrı modeli" olarak tanımlanan ve termal uyarı aracılığıyla gerçekleştirilen hot-plate ve tail-immersion testleri uygulanmıştır. Uzun süreli uyaranlarla oluşturulan "tonik ağrı modeli" oluşturmak için de asetik asit ile indüklenen kıvrınma testi uygulanarak antinositif etkinlik değerlendirilmiştir. İnflatuvar ağrının değerlendirilmesi amacıyla karragenin enjeksiyonu ile lokal inflamasyon modeli oluşturulmuş (Le Bars ve ark., 2001) ve tüm dozların inflamasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Antitrombotik aktivitenin değerlendirilmesi için ekstrenin 100, 200 ve 300 mg/kg dozlarının, karrageninin subplantar enjeksiyonu sonucu farelerin kuyruklarında oluşan tromboz uzunlukları üzerindeki etkisi ölçülmüş ve trombozun 24., 48. ve 72. saat ile 1. haftadaki görüntüleri fotoğraflanmıştır. *In vitro* antioksidan aktivite tayininde, ekstrenin DPPH radikallerini süpürme yeteneği ekstrenin 1, 3, 5 ve 10 mg/ml konsantrasyonları ile denenmiştir. Bunun yanı sıra,  $\beta$ -karoten-linoleik asit sisteminde ekstrenin antioksidan aktivite gücü ölçülmüştür.

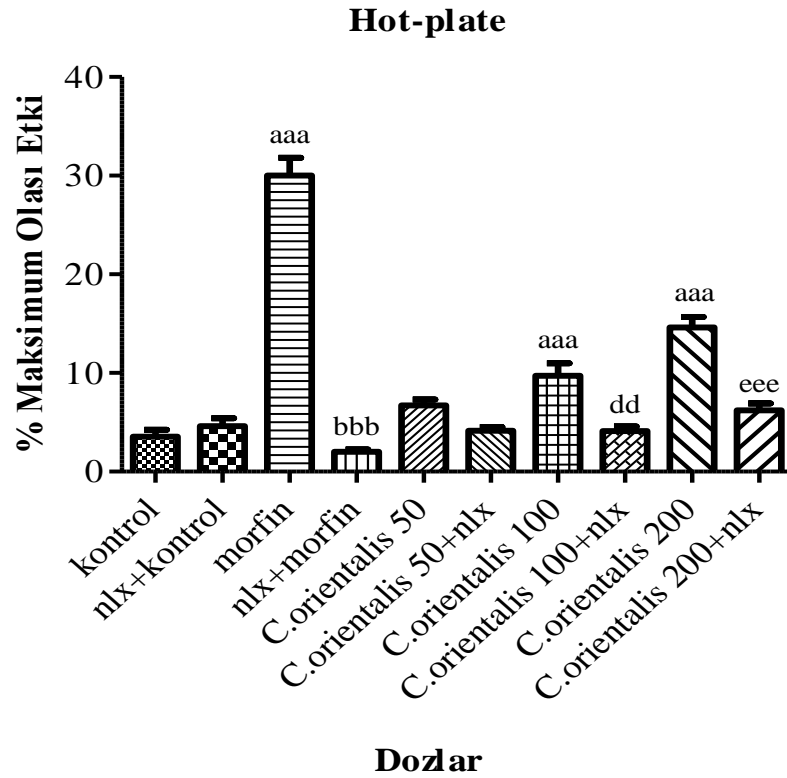
### Akut Toksikite

Deneyler öncesinde 50-1000 mg/kg dozlar arasında yapılan akut toksisite uygulamasında, bu dozlar aralığında 72 saat boyunca yapılan incelemelerde ölüm gözlenmemiştir. Bu nedenle toksik etkinin 1000 mg/kg'dan daha yüksek dozlarda olabileceği düşünülmektedir. 400, 800 ve 1000 mg/kg *C.orientalis* etanol ekstresi verilen hayvanlarda, doz verildikten yaklaşık 40 dakika sonra hareketlerde azalma ve sedasyon başladığı ve 10 saat boyunca yapılan gözlemlerde bunun devam ettiği belirlenmiştir. 200 mg/kg ve daha düşük dozlarda sedasyon süresinin kısaldığı gözlenmiştir.

## Antinosiseptif ve Antiinflamatuvar Aktivite

### Hot-plate testi

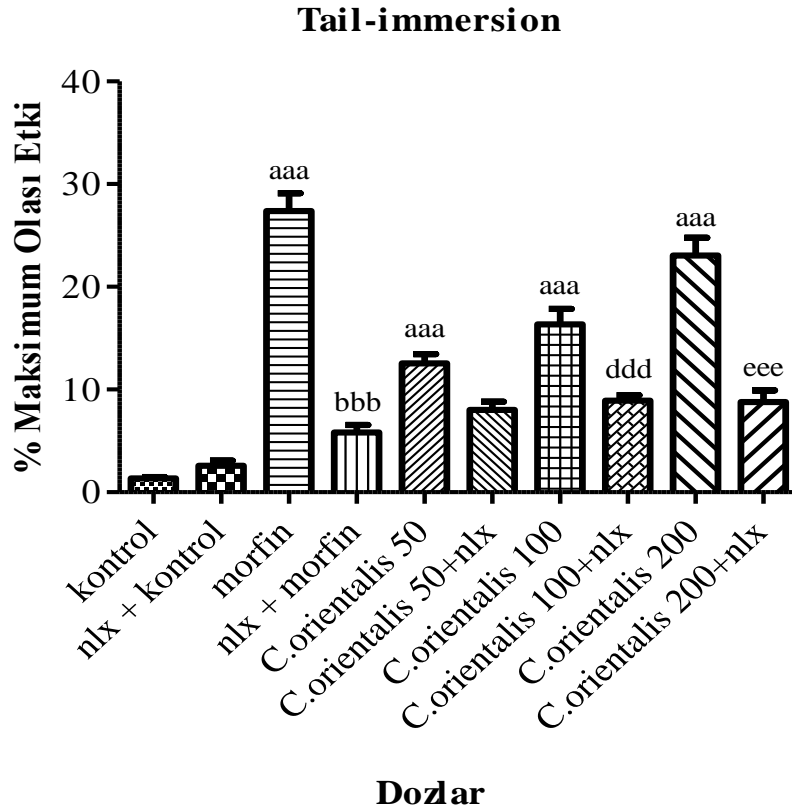
*Crataegus orientalis* etanol ekstresi ile santral düzeydeki nosisepsiyonun değerlendirilmesi amacıyla yapılan hot-plate testi sonuçları Şekil 6'da verilmiştir. Hot plate analjezi testinde, 100 mg/kg ve 200 mg/kg *C.orientalis* kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir antinosiseptif aktivite gösterirken ( $p<0,001$ ), 50 mg/kg'da bu etki gözlenmemektedir. Ancak santral etkili güçlü bir analjezik olan morfin ile test maddemiz karşılaştırıldığında, en yüksek dozda bile morfine yakın bir etki gözlenmemektedir. *C.orientalis*'in 100 ve 200 mg dozlarda naloksonla geri dönüşünde anlamlılık ( $p<0,05$  ve  $p<0,001$ ) görülmektedir. *C.orientalis*'in (100 ve 200mg/kg) analjezik etkisinin naloksonla inhibisyonu morfin üzerindeki etkisi kadar güçlü olmamakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir. Bu nedenle ekstrenin etkilerinin bir kısmını santral opioid reseptörler üzerinden gösteriyor olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 6. *Crataegus orientalis* Etanol Ekstresinin Farklı Dozlarda Hot-Plate Testi Sonuçları (n=7). Kontrol gurubuna göre karşılaştırma <sup>aaa</sup> $P<0.001$ ; Nlx (nalokson)+morfinin morfinle karşılaştırılması <sup>bbb</sup> $P<0.001$ ; Nlx+C.*orientalis* 100'ün *C.orientalis* 100 ile karşılaştırılması <sup>dd</sup> $P<0.05$ ; Nlx+C.*orientalis* 200'ün *C.orientalis* 200 ile karşılaştırılması <sup>eee</sup> $P<0.001$

### *Tail-immersion testi*

Uygulanan diğ er bir santral antinosisepsiyon testi olan tail-immersion testinin sonuçları **Ş ekil 7**'de verilmiştir. *C.orientalis*'in bütün dozlarında kontrol grubuna göre anlamlılık ( $p<0,001$ ) göz lenmektedir. Ancak hot-plate testinde de göz lendiğ i gibi burada da test maddemizin dozları morfinle karşı laştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir etki göz lmemektedir. Ancak 200 mg/kg *C.orientalis*'in antinosiseptif etkisinin morfinin oluşturduğ u antinosiseptif etkiye yakın bir düzeyde olduğ u göz lmemektedir. 50 mg/kg *C.orientalis*'in antinosiseptif etkisinin naloksonla antagonizmasında anlamlılık göz lmezken, 100 mg/kg ve 200 mg/kg'da anlamlı ( $p<0,001$ ) bir antagonizma göz lmemektedir.



**Ş ekil 7.** *Crataegus orientalis* Etanol Ekstresinin Farklı Dozlarda Tail-immersion Testi Sonuçları (n=7). Kontrol gurubuna göre karşı laştırma <sup>aaa</sup> $P<0.001$ ; Nlx (nalokson)+morfinin morfinle karşı laştırılması <sup>bbb</sup> $P<0.001$ ; Nlx+C. *orientalis* 100'ün *C.orientalis* 100 ile karşı laştırılması <sup>ddd</sup> $P<0.001$ ; Nlx+C.*orientalis* 200'ün *C.orientalis* 200 ile karşı laştırılması <sup>eee</sup> $P<0.001$

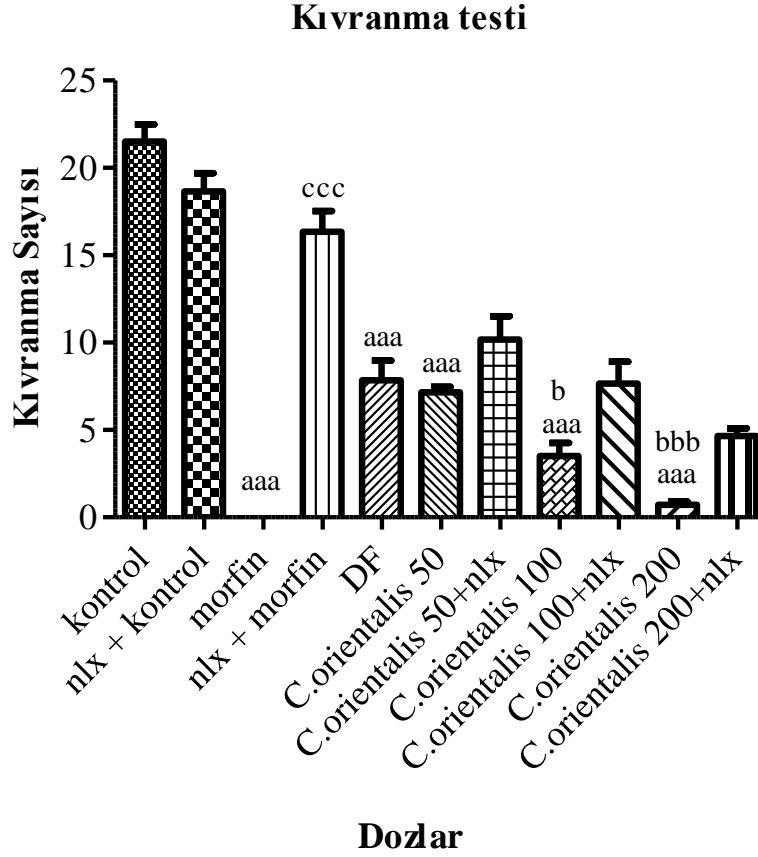
Tail-immersion santral analjezik aktivitenin değerlendirmesi için uygulanan bir testtir. Spinal düzeydeki antinosiseptif etkileri değerlendirmek için tail-immersion testi kullanılmaktadır. Spinal analjezide opioid ajanların etkileri  $\mu_2$ ,  $\kappa_1$ ,  $\delta_2$  reseptörler üzerinden gerçekleşmektedir (Reisine ve Pasternack, 1996). Olası santral antinosiseptif etkileri supraspinal düzeyde değerlendirmek için hot-plate testi kullanılmaktadır. Opioid ajanların supraspinal düzeyde etkilerini  $\mu_1$ ,  $\kappa_3$ ,  $\delta_1$  ve  $\sigma_2$  reseptörleri üzerinden gösterdiği bildirilmektedir (Reisine ve Pasternack, 1996). Güçlü bir opioid analjezik olan morfinin daha çok  $\mu$  reseptörler üzerinde etkili olduğu,  $\kappa$  reseptörler üzerindeki agonistik etkisinin zayıf olduğu ve  $\delta$  reseptörlere karşı da etkisiz olduğu ileri sürülmektedir. Nalokson santral sinir sistemindeki  $\mu$  opioid reseptörlere karşı yüksek afinite gösterirken  $\kappa$  ve  $\delta$  opioid reseptörlere düşük afinite ile bağlanmaktadır. Sigma reseptörler üzerine zayıf parsiyel agonistik etki göstermektedir (Kayaalp, 2009).

Bu bilgilerin ışığında tail-immersion ve hot-plate sonuçlarımızı değerlendirecek olursak, *C. orientalis* ekstresi her iki testte de kontrolle kıyaslandığında analjezik etki göstermektedir. Ancak spinal analjezinin değerlendirilmesi için kullanılan tail-immersion testindeki antinosiseptif etkinliğin daha güçlü olduğu görülmektedir (**Şekil 6-7**). Spinal analjezide opioid ajanların etkilerinin  $\mu_2$ ,  $\kappa_1$ ,  $\delta_2$  reseptörler üzerinden gerçekleştiği düşünülecek olursa, *C. orientalis*'in 100 ve 200 mg/kg dozlarda tail-immersion testinde göstermiş olduğu etki ve bu etkinin naloksonla antagonizması değerlendirilirse, antinosiseptif aktivitenin  $\mu$  reseptörlerden daha çok  $\kappa$  ve  $\delta$  reseptörler üzerinden gerçekleştiği düşünülebilir. Özellikle hot plate testinde gözlenen antinosisepsiyon tail-immersiona göre daha düşük olsa da, uygulanan dozların nalokson ile geri dönüşünden (antagonizmasından) elde edilen etki benzerlik göstermektedir. Ayrıca, akut toksisite deneyinde gözlendiği üzere *C.orientalis* ekstresi sedasyona neden olmaktadır. Serebral kortekste bulunan  $\kappa$  reseptörlerin, morfin ve benzeri opioidlerin yaptığı sedasyonda ve omurilikteki  $\kappa$  reseptörlerin  $\delta$  reseptörlerle birlikte spinal analjezide rol oynadığı bilinmektedir (Kayaalp, 2009). Ekstrenin sedasyona da (100 mg/kg ve daha yüksek dozlarda) neden olması, analjezik etkisinde  $\kappa$  ve  $\delta$  reseptörlerin rol oynuyor olabileceğini düşündüren bir diğer etkendir.

### ***Kıvranma testi***

Opioid agonist, opioid parsiyel agonist ve non-steroidal antiinflamatuvar ajanların antinosiseptif aktivitesi kıvranma testi ile belirlenebilmektedir (Vogel ve Vogel, 1997). Asetik asitle indüklenen kıvranma testi sonuçları **Şekil 8**'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *C.orientalis*'in denenen tüm dozları, morfin (5mg/kg) ve diklofenak (10mg/kg), kontrol grubuna göre anlamlılık göstermektedir. Periferik analjezik olduğu bilinen diklofenak ile *C.orientalis*'in 50 mg/kg dozunun antinosiseptif etkisi karşılaştırıldığında, diklofenak'a göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir. Ancak *C.orientalis* etanol ekstresinin 50 mg/kg dozunda gösterdiği antinosiseptif etkinin, diklofenakın gösterdiği etkiyle hemen hemen aynı düzeyde olduğu tespit edilmiştir. 100 mg/kg *C.orientalis* etanol ekstresinin analjezik etkisi diklofenak ile karşılaştırıldığında  $p<0,01$  derecesinde anlamlılık gösterirken, 200 mg/kg ekstrenin anlamlılığının  $p<0,001$  derecesinde olduğu görülmektedir. 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg olarak uygulanan dozların hiçbirinde nalokson ile sağlanan antagonizma istatistiksel olarak anlamlı

değildir. Tail-immersion testinde de olduğu gibi yine 200 mg/kg *C.orientalis*'de morfine yakın bir etki gözlenmektedir. Elde edilen sonuçlardan anlaşılacağı gibi etkinin doza bağlı olarak arttığı görülmektedir.



**Şekil 8. *Crataegus orientalis* Etanol Ekstresinin Farklı Dozlarda Kıvranma Testi Sonuçları (n=6). Kontrol gurubuna göre karşılaştırma <sup>aaa</sup>P<0.001; Nlx (nalokson)+morfinin morfinle karşılaştırılması <sup>ccc</sup>P<0.001; *C.orientalis* 100'ün diklofenak ile karşılaştırılması <sup>b</sup>P<0.01; *C.orientalis* 200'ün diklofenak ile karşılaştırılması <sup>bbb</sup>P<0.001**

Asetik asitle indüklenen kıvranma modelinde ağrı, bradikinin, histamin, serotonin, P maddesi ve prostaglandinler gibi endojen mediyatörlerle oluşturulur ve bunların hepsi periferik nosiseptif nöronları uyarırlar. Bu lifler morfin gibi narkotikler ve non-sterodial antiinflamatuvar ilaçlara karşı duyarlıdırlar (Collier ve ark., 1968). Asetik asitin intraperitoneal enjeksiyonu peritoneal inflamasyona (akut peritonitis) neden olur ve böylece abdominal kasların kasılması, arka ayakların geriye doğru gerilmesiyle karakterize bir durum oluşur. Bu kasılma cevabı viseral inflamatuvar ağrı modeli olarak değerlendirilir (Koster ve ark., 1959). Bu metot peritoneal sıvıda prostaglandinlerin (PGE<sub>2</sub> ve PGF<sub>2α</sub>) artışı ile ilişkilendirilmiştir (Derardt ve ark., 1980). Prostaglandinlerin yanı sıra, semptomimetik aminler, tümör nekroz faktör, IL-1 ve IL-8'de, asetik aside verilen nosiseptif cevapta rol oynarlar (Han ve ark., 2007).

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *C.orientalis* etanol ekstresi asetik asit ile indüklenen kıvranma cevaplarını doza bağımlı olarak önemli ölçüde azaltmıştır.

Kıvrınma sayısında gözlenen düşüş ve yukarıda verilen bilgilere dayanarak, ekstrenin antinosiseptif etki mekanizmasının kısmen siklooksijenazlar ile ilişkili olduğu söylenebilir. Ekstrenin dozlarının kıvrınma testindeki antinosiseptif aktivitesi, istatistiksel bir anlamlılık olmasa da kısmen nalokson ile inhibe edilebildiğinden, *C.orientalis*'in opioid reseptörler üzerinde de etkisi olabileceği düşünülmektedir.

### ***Karragenin ile indüklenen pençe ödem testi***

Farelerin sağ arka pençelerinin plantar dokusuna uygulanan karrageninin oluşturduğu ödem zamana bağlı olarak farelerin pençe kalınlıklarında artışa neden olmuştur (**Çizelge 3**). Kontrol grubunun pençe kalınlıklarındaki artış 90 dakika sonra gözlemlenmiş ve 270. dakikada maksimuma ulaşmıştır. Antiinflamatuvar aktivite tayini için kullanılan karragenin ile indüklenen pençe ödemi testinden elde edilen sonuçlara göre, *C.orientalis* etanol ekstresi doza bağımlı antiinflamatuvar etkinlik göstermiştir. Buna bağlı olarak da ödem kalınlığında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Karragenin verildikten 3 saat sonra 50, 100 ve 200 mg/kg'ın inhibisyon değerleri sırasıyla %27,78, %68,76, %81,46 iken, 6 saatin sonunda 50 mg/kg'ın etkisi geri dönmüş ve 100 ve 200 mg/kg'da (%91,30 ve %93,58) etkili bir artış gözlenmiştir. Diklofenagin 180. dakikada %43,04 olan inhibisyon değeri, 6 saat sonra %73,71'e yükselmiştir. 200 mg/kg *C.orientalis* etanol ekstresi 180. ve 270. dakikalarda diklofenak ile karşılaştırıldığında anlamlılık ( $p<0,01$ ) göstermektedir. Ekstrenin 200 mg/kg dozunda maksimum etki 270. dakikada gerçekleşmiştir.

Bu sonuçlara göre, *C.orientalis* etanol ekstresinin tüm dozlarının ve diklofenagin karragenin ile oluşturulan pençe ödemi üzerinde antiinflamatuvar etkinliği olduğu görülmüştür. *C.orientalis*'in antiinflamatuvar etkisinin siklooksijenaz enzimlerini non-selektif olarak inhibe eden diklofenak'a (10 mg/kg) göre daha güçlü olduğu belirlenmiştir (Shield, 1998).

İnflamasyonun en önemli işaretleri olan ödem, hiperaljezi ve kızarıklık bradikinin, histamin, taşikininler, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi proinflamatuvar ajanların aktivasyonu sonucu karrageninin subkutan enjeksiyonundan hemen sonra ortaya çıkar (Morris, 2003). Karragenin ile indüklenen inflamasyon aktif NSAİ ilaçların tanımlanması için yaygın olarak kullanılan bir *in vivo* modeldir. Bu sayede oluşturulan pençe ödemi bifazik bir olaydır (Winter ve ark., 1962). Başlangıç fazında histamin ve serotoninlerin salınması gerçekleşmektedir. Ödemin takip eden fazında ise bradikinin ve özellikle E serisi olmak üzere prostaglandinler, proteaz ve lizozomlar salınmaktadır (Boughton-Smith ve ark., 1999, Morris, 2003). Hem prostaglandinlerin hem de tromboksanların ön maddesi, siklooksijenaz enzimlerinin (COX) etkileri aracılığıyla AA'den türetilen PGH<sub>2</sub>'dir. Bu enzimlerin inhibisyonu NSAİ'ın temel etkisidir ve bu nedenle ağrı ile inflamasyon tedavisinde klinik bir önemi vardır (Morris, 2003). Klinik etkinliği olan antiinflamatuvar ilaçların birçoğu ikinci faza karşı duyarlıdır (Olajide ve ark., 1999). Bu çalışmada, *C.orientalis* etanol ekstresinin karragenin ile indüklenen akut inflamasyonun ikinci fazında etkili olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3. *Crataegus orientalis*'in Karragenin ile İndüklenen Pençe Ödemi Üzerine Etkileri

Test Maddeleri	Doz (mg/kg)	Şişme kalınlığı ( $\times 10^{-2}$ mm) $\pm$ S.E.M.(% inhibisyon)			
		90 dk	180 dk	270 dk	360 dk
<b>Kontrol (%20 DMSO)</b>		34,9 $\pm$ 0,07	52,4 $\pm$ 0,05	62,6 $\pm$ 0,07	44,6 $\pm$ 0,09
<b><i>C.orientalis</i> EtOH eks.</b>	50	33,6 $\pm$ 0,06	37,9 $\pm$ 0,04 (27,78) <sup>a</sup>	34,3 $\pm$ 0,03 (45,20) <sup>aaa</sup>	31,7 $\pm$ 0,05
	100	25,2 $\pm$ 0,03	16,4 $\pm$ 0,02 (68,76) <sup>aaa, b</sup>	8,4 $\pm$ 0,01 (86,61) <sup>aaa</sup>	3,9 $\pm$ 0,01 (91,30) <sup>aaa</sup>
	200	11,1 $\pm$ 0,02 (68,02) <sup>a</sup>	9,7 $\pm$ 0,02 (81,46) <sup>aaa,bb</sup>	2,0 $\pm$ 0,01 (96,80) <sup>aaa,bb</sup>	2,9 $\pm$ 0,01 (93,58) <sup>aaa</sup>
<b>Diklofenak</b>	10	31,3 $\pm$ 0,05	29,9 $\pm$ 0,03 (43,04) <sup>aaa</sup>	22,6 $\pm$ 0,03 (63,92) <sup>aaa</sup>	11,7 $\pm$ 0,03 (73,71) <sup>aaa</sup>

EtOH eks: etanol ekstresi; SEM: ortalamanın standart hatası

<sup>a</sup> p<0,05 kontrol değerine göre anlamlılık

<sup>b</sup> p<0,05 diklofenak değerine göre anlamlılık

<sup>aa</sup> p<0,01 kontrol değerine göre anlamlılık

<sup>bb</sup> p<0,01 diklofenak değerine göre anlamlılık

<sup>aaa</sup> p<0,001 kontrol değerine göre anlamlılık

Bitkilerden elde edilen flavonoidler, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda antiinflamatuvar etkiler göstermektedirler. Tamamen anlaşılmasa da *in vivo* antiinflamatuvar etkileriyle ilgili çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Flavonoidler radikal süpürücü ve antioksidan aktiviteler gösterirler. Mast hücreleri, makrofajlar, lenfositler ve nötrofiller gibi inflamasyon ile ilişkili

hücrelerin hücrel aktivitesini düzenlerler. Örneğin, bazı flavonoidler mast hücrelerinden histamin salıverilmesini engellerken bazıları ise T-hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederler. Bazı flavonoidler ise arasıdonik asidin (AA) enzim aktivitesini değiştirirler ve böylece fosfolipaz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), siklooksijenaz (COX), lipoksijenaz (LOX) ve nitrik oksit sentaz (NOS) gibi enzimleri inhibe ederler. Flavonoidler bu enzimlerin inhibisyonu sonucunda inflamasyonun en önemli mediyatörleri olan AA, PG, lökotrien (LT) ve NO üretimini azaltırlar. Bu nedenle flavonoidler tarafından bu enzimlerin inhibe edilmesi, anti-inflamasyonun en önemli hücrel mekanizmalarından biridir. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar, bazı flavonoidlerin antiinflamatuvar etkilerinin siklooksijenaz-2 ve indüklenbilir NOS (iNOS) gibi pro-inflamatuvar genlerin ekspresyonlarını değiştirmesinden ileri geldiğini göstermiştir (Kim ve ark., 2004). Bu flavonoidlerden biri olan apigeninin az çok COX-1 inhibe ettiği bulunmuştur (Nakadate ve ark., 1985). Bunun yanı sıra, apigeninin *in vitro* çalışmalarda inflamatuvar cevapta rol oynayan iNOS ekspresyonunu baskılayarak NO üretimini azalttığı ve inhibitör-κB'nin aktivasyonu aracılığıyla nükleer transkripsiyon faktör-κB'yi inhibe ettiği ve böylece COX-2 indüklenmesini durdurduğu bildirilmiştir (Liang ve ark., 1999).

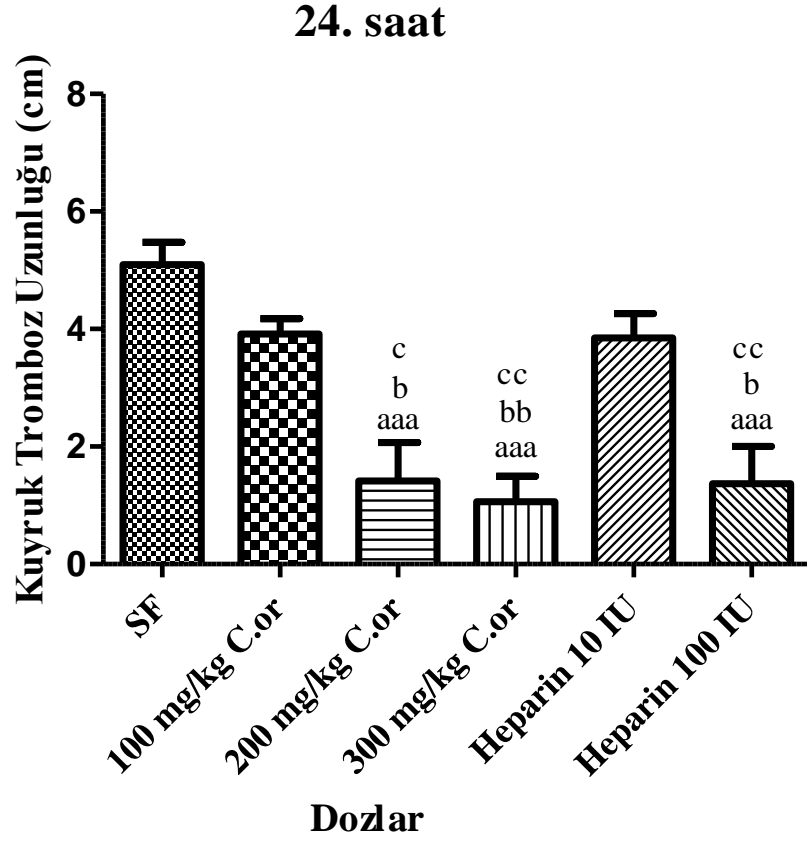
*C.orientalis* yapraklarının apigenin ve apigenin-7-glikozit içerdiği bilinmektedir (Melikoğlu ve ark., 1998). Yukarıda verilen bilgiler de göz önünde bulundurulduğunda ekstrenin inflamasyona karşı gösterdiği güçlü etkinin içeriğindeki flavonoidlerden ve özellikle apigeninden kaynaklanmış olabileceği söylenebilir.

### **Antitrombotik Aktivite**

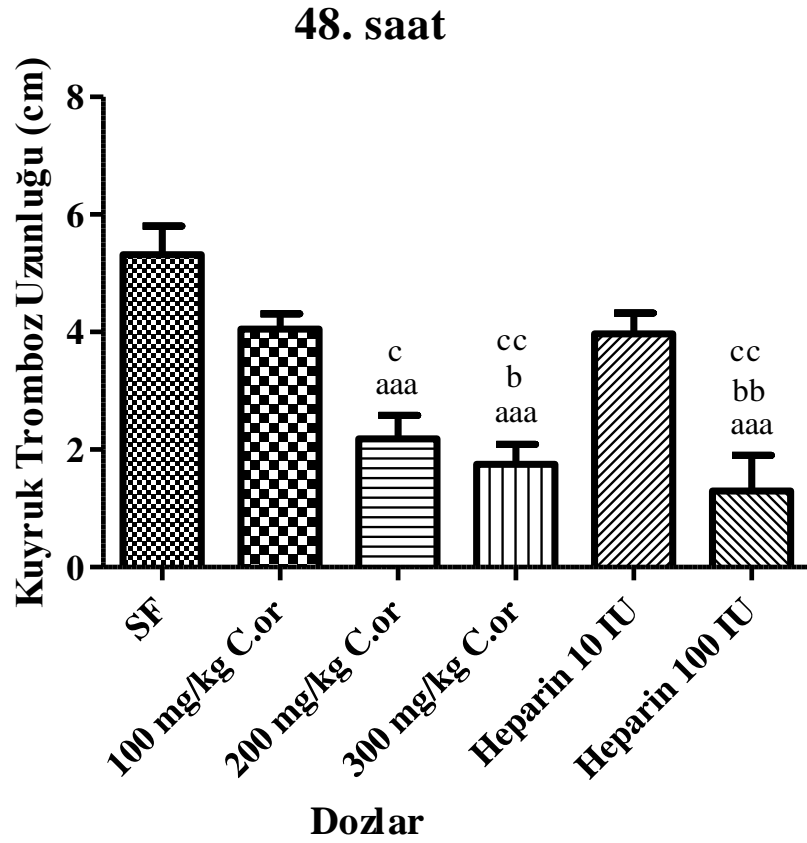
#### ***Karragenin ile indüklenen kuyruk tromboz testi***

Antitrombotik aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla yapılan karragenin ile indüklenen kuyruk tromboz testinin zamana bağlı sonuçları grafiklerle **Şekil 9, 10, 11**'de ve 24., 48. ve 72. saat kuyruk görüntüleri **Şekil 12, 13 ve 14**'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 100 UI heparin kontrol grubuna göre anlamlılık ( $p<0,001$ ) göstermektedir. 24. ve 48. saatlerde ise 200 mg/kg ve 300 mg/kg *C.orientalis* kontrol grubuna göre anlamlılık ( $p<0,001$ ) göstermektedir. Ancak 72. saatte 200 mg/kg'ın anlamlılık derecesinde ( $p<0,05$ ) düşüş gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan 10 UI heparin ile *C.orientalis*'in dozları kıyaslandığında, 24. saatte 200 ve 300 mg/kg anlamlılık ( $p<0,01$  ve  $p<0,05$ ) gösterirken, 48. ve 72. saatlerde yalnızca 300 mg/kg ( $p<0,05$ ) anlamlılık göstermektedir. Doz arttıkça tromboz uzunluklarının ortalamasında azalma olmuştur. Ancak *C.orientalis* dozlarının enjekte edildiği gruplarda zaman geçtikçe tromboz uzunluklarında az da olsa bir artış gözlenirken, 100 UI heparin enjeksiyonu yapılan grupta tromboz uzunluklarında üç gün boyunca değişim gözlenmemiştir. Karragenin enjeksiyonunu takip eden 72. saatte hayvanların kuyrukları kurumaya başlamış, 1 hafta sonra ise bazılarında kopmalar görülmüştür (**Şekil 15**). Sonuç olarak, *C.orientalis*'in karragenin ile indüklenen kuyruk tromboz oluşumunu *in vivo*'da inhibe ettiği ve 24. saatte 300 mg/kg *C.orientalis*'in 100 UI heparine göre daha etkiliyken zaman geçtikçe etkisinde hafif bir azalma olduğu belirlenmiştir.

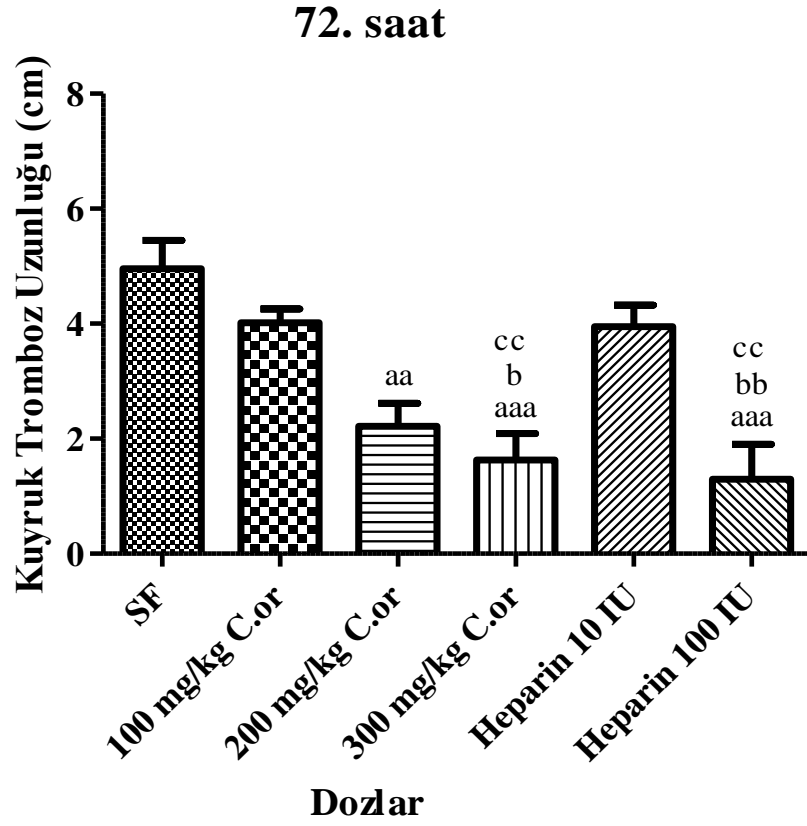




Şekil 9. Karragenin ile İndüklenen Kuyruk Tromboz Testinin 24. Saat Sonuçları (n=6)  
 Kontrol grubuna göre karşılaştırma <sup>aaa</sup>P<0,001; Heparin 10 IU grubuna göre karşılaştırma <sup>b</sup>P<0,01, <sup>bb</sup>P<0,05; 100 mg/kg *C.orientalis* grubuna göre karşılaştırma <sup>c</sup>P<0,01, <sup>cc</sup>P<0,05



Şekil 10. Karragenin ile İndüklenen Kuyruk Tromboz Testinin 48. Saat Sonuçları (n=6) Kontrol grubuna göre karşılaştırma <sup>aaa</sup>P<0,001; Heparin 10 IU grubuna göre karşılaştırma <sup>b</sup>P<0,01, <sup>bb</sup>P<0,05; 100 mg/kg *C.orientalis* grubuna göre karşılaştırma <sup>c</sup>P<0,01, <sup>cc</sup>P<0,05



Şekil 11. Karragenin ile İndüklenen Kuyruk Tromboz Testinin 72. Saat Sonuçları (n=6) Kontrol grubuna göre karşılaştırma <sup>aaa</sup>P<0,001, <sup>aa</sup>P<0,05; Heparin 10 IU grubuna göre karşılaştırma <sup>b</sup>P<0,01, <sup>bb</sup>P<0,05; 100 mg/kg *C.orientalis* grubuna göre karşılaştırma <sup>cc</sup>P<0,05



(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

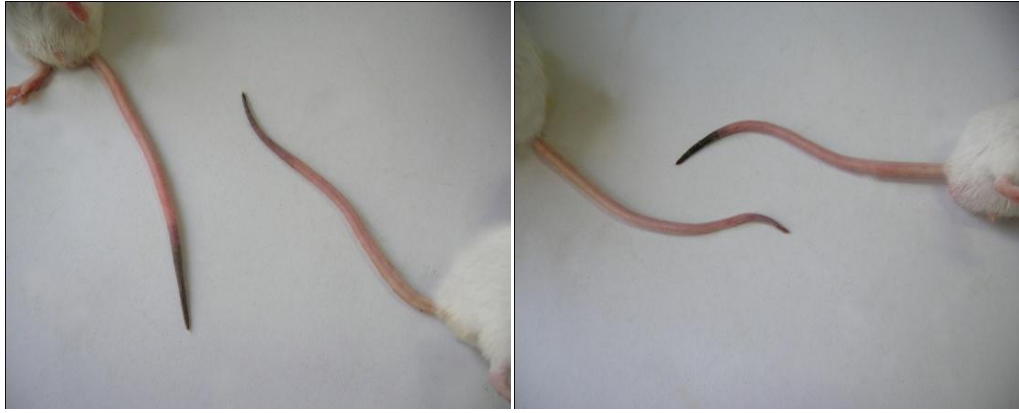
(f)

**Şekil 12. Karragenin ile İndüklenen Tromboz Modelinde 24. saat Kuyruk Görüntüleri (a. SF, b. 100 mg/kg *C.orientalis*, c. 200 mg/kg *C.orientalis*, d. 300 mg/kg *C.orientalis*, e. 10 IU Heparin, f. 100 IU Heparin)**



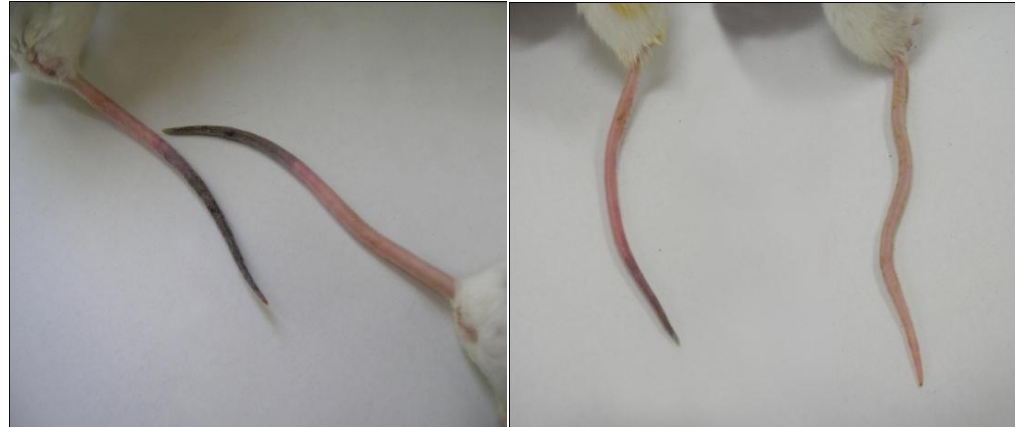
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

(f)

**Şekil 13. Karragenin ile İndüklenen Tromboz Modelinde 48. saat Kuyruk Görüntüleri (a. SF, b. 100 mg/kg *C.orientalis*, c. 200 mg/kg *C.orientalis*, d. 300 mg/kg *C.orientalis*, e. 10 IU Heparin, f. 100 IU Heparin)**



(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

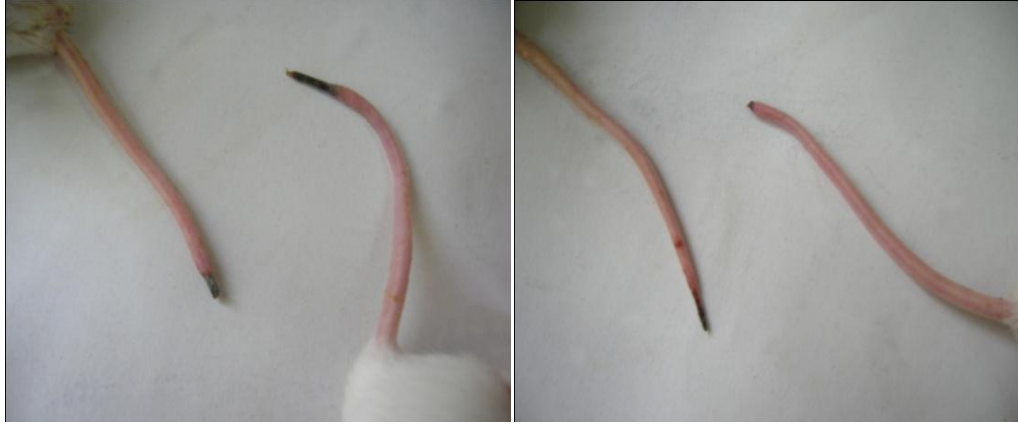
(f)

Şekil 14. Karragenin ile İndüklenen Tromboz Modelinde 72. Saat Kuyruk Görüntüleri (a. SF, b. 100 mg/kg *C.orientalis*, c. 200 mg/kg *C.orientalis*, d. 300 mg/kg *C.orientalis*, e. 10 IU Heparin, f. 100 IU Heparin)



(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

(f)

**Şekil 15. Karragenin ile İndüklenen Tromboz Modelinde 1. Hafta Kuyruk Görüntüleri (a. SF, b. 100 mg/kg *C.orientalis*, c. 200 mg/kg *C.orientalis*, d. 300 mg/kg *C.orientalis*, e. 10 IU Heparin, f. 100 IU Heparin)**

Karragenin kırmızı deniz yosunlarından elde edilen bir çeşit amiloz sulfat maddesidir. Karragenin ile indüklenen kuyruk tromboz testi için kappanın içeriği yüksek olan Tip 1-karragenin kullanılmıştır. κ-karragenin diğer karragenin tipleri arasında en güçlü trombojendir. Karragenin ile indüklenen tromboz modeli, tromboz oluşumunu ve gelişimini görsel ve zamana bağlı olarak inceleme olanağı sunmaktadır. Ayrıca laboratuvar hayvanlarının strese maruz kalmadan kullanıldığı basit ve non-invaziv bir yöntemdir. Fare, sıçan gibi hayvanlara karragenin enjekte edilerek oluşturulan tromboz modelinde mast hücrelerinden salıverilen histamin ve serotonin gibi kimyasal mediyatörlerin rol oynadığı bildirilmiştir (Hagimori ve ark., 2009). Bunun yanı sıra, karragenin ile indüklenen kuyruk trombozunda tromboksan/PGI<sub>2</sub> dengesinin ve kısmen de PAF'ın rolü olduğu düşünülmektedir (Bekemeier ve Hirschelmann, 1988). Karrageninin Hageman faktörü (faktör XII) aktive etmesinden ileri gelen bir intravasal koagülasyonu başlatması trombotik aktivitesi için yapılan açıklamalardan bir diğeridir. Bazı araştırmacılar patolojik gözlemlere dayanarak karrageninin, kan damarlarının inflamasyonuna ve endotel hücrelerin hasarlanmasına bağlı olarak intörlökin-1, tümör nekroz faktör gibi inflamasyon faktörlerinin salıverilmesine neden olduğunu ve bu inflamasyon faktörlerinin normal endotel hücrelerinin, kan hücrelerinin aglütinasyonu ve fibrinoliz arasında denge sağlama fonksiyonunu bozarak tromboz oluşumunu indüklediğini düşünmektedirler. Buna ek olarak, kan damarlarının endotel hücreleri hasarlandığı zaman, kan damarlarını gevşeten faktörlerin salıverilmesinin azaldığı diğer bir yandan da kan damarlarını büzen faktörlerin salıverilmesinin arttığı ve böylece ortaya çıkan kısmi bir vazospazm sonrasında tromboz oluşumunun gerçekleştiği düşünülmektedir (Yan ve ark., 2009).

Trombositlerin yapışması ve sonrasında agregasyonları hem ateroskleroza hem de akut tromboz oluşumuna neden olur. Flavonoidlerin antiagregan özelliklerinin TxA<sub>2</sub> oluşumunu inhibe etmelerinden ileri geldiği düşünülmektedir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada, flavonoidlerin antiplatelet etkilerinin asıl olarak tromboksan reseptör antagonizmasına bağlı olduğunu gösterilmiştir. Flavonoidlerden apigeninin G protein-kenetli süper ailesinden olan TxA<sub>2</sub>'ye yüksek bir afinite ile bağlandığı belirtilmiştir (Guerrero ve ark., 2005). Kuersetin de *in vitro* çalışmalarda trombosit agregasyonunu önlediği gösterilen flavonoidlerden biridir (Janssen ve ark., 1998). *C.orientalis* içeriğinde bulunan apigenin, kuersetin ile ilişkili bir bileşik olan kuersetin-3-O-galaktosid (hiperozit) ve diğer flavonoidler *in vivo*'da sinerjizm oluşturarak tromboz oluşumunu engelliyor olabilirler. Bunun yanı sıra alıç türlerinden biri olan *C. monogyna*'nın *in vitro* bir çalışmada TxA<sub>2</sub> oluşumunu inhibe ettiği de gösterilmiştir (Vibes ve ark., 1994).

## **Antioksidan Aktivite**

### ***Toplam fenol miktarı***

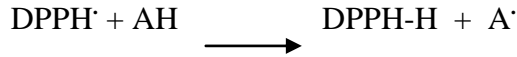
*C.orientalis* etanol ekstresinin Folin-Ciocalteu Metodu kullanılarak tayin edilmiş toplam fenolik madde miktarı 98,24±2,4 (mg<sub>GAE</sub>/g<sub>ekstre</sub>) olarak hesaplanmıştır.



### ***DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki***

Antioksidan maddeler, radikaller ile indüklenen oksidatif stresi nötralize edebilme yeteneğine sahiptirler. Bunun için, antioksidan maddenin radikale karşı reaktif olması ve sonuç olarak açığa çıkan antioksidan radikallerin biyomoleküllere karşı reaktif olmaması gerekir (Naik ve ark., 2005). Bu yeteneğin test edilebilmesi için kararlı bir radikal olan DPPH ile *C.orientalis* ekstresinin reaksiyonu test edilmiştir.

Kısmen organik bir radikal olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), birçok bitki ekstresinin ve bileşiklerin antioksidan aktivitesini değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır (Brand-Williams ve ark., 1995). DPPH serbest radikal süpürücü etki tayini, hidrojen verme potansiyelinin araştırılması için en kısa yöntemlerden birisidir (Kikuzaki ve ark., 2002). Bu metot, hidrojen bağlayan antioksidanların varlığında alkolik DPPH solüsyonundaki azalmaya bağlı olarak değerlendirilir.



DPPH solüsyonu eşlenmemiş nitrojen elektronlarından dolayı koyu mor renktedir. DPPH, hidrojen atomu verebilen bir madde ile reaksiyona girdikten sonra DPPH-H (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazin) oluşur ve renk kaybı gerçekleşir (ancak pikril grubu halen bulunduğu için sarı renk gözlenmesi beklenir). Ortaya çıkan bu renk değişikliği 517 nm de spektrofotometre ile ölçülür ve bu şekilde bir maddenin ya da bitki ekstresinin antioksidan potansiyeli tayin edilir. 517 nm de görülen düşük absorbans ekstrenin radikal süpürücü etkisinin kuvvetli olduğunun göstergesidir (Serteser ve ark., 2008).

DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etkinin tayini için *C.orientalis* etanol ekstresinin dört farklı konsantrasyonu kullanılarak elde edilen sonuçlar %inhibisyon olarak değerlendirilmiştir (**Çizelge 4**). Ekstrenin DPPH süpürücü kapasitesi, antioksidan maddeler olduğu bilinen gallik asit (GA) ve bütillenmiş hidroksitoluol (BHT) ile karşılaştırılmıştır. Standart maddeler (GA ve BHT) minimum konsantrasyonlarda maksimum inhibisyon gösterdikleri için antioksidan aktiviteleri sadece 0,1 mg/ml konsantrasyonda değerlendirilmiştir ve radikal süpürücü aktivite yüzdelerinin (%90 ve 93) çok yüksek olduğu gözlenmiştir. *C.orientalis* ekstresi konsantrasyon arttıkça daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Ekstre %50'nin üzerinde inhibisyon değerlerine sahip olduğundan ve denenen en yüksek konsantrasyonda bile (10mg/ml) standart maddelere yakın bir antioksidan etkinlik göstermemesinden dolayı, ekstrenin orta derecede antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. DPPH'in yüzde inhibisyon değerleri ekstrenin 5 ve 10 mg/ml konsantrasyonları arasında önemli bir farklılık göstermemektedir. Bu durum, beklenen antioksidan etkinin elde edilmesi için fenoliklerin belirli bir konsantrasyonda olmasının yeterli olduğunun göstergesidir. Ayrıca bir doygunluk noktasının olduğunun ve başka fenolik maddelerin eklenmesinin antioksidan aktivite artışına katkıda bulunmayacağını da göstergesi olabilir.

Çizelge 4. *C.orientalis* Etanol Ekstresinin 4 Farklı Konsantrasyonda Serbest Radikal Süpürücü Etkileri (% İnhibisyon)

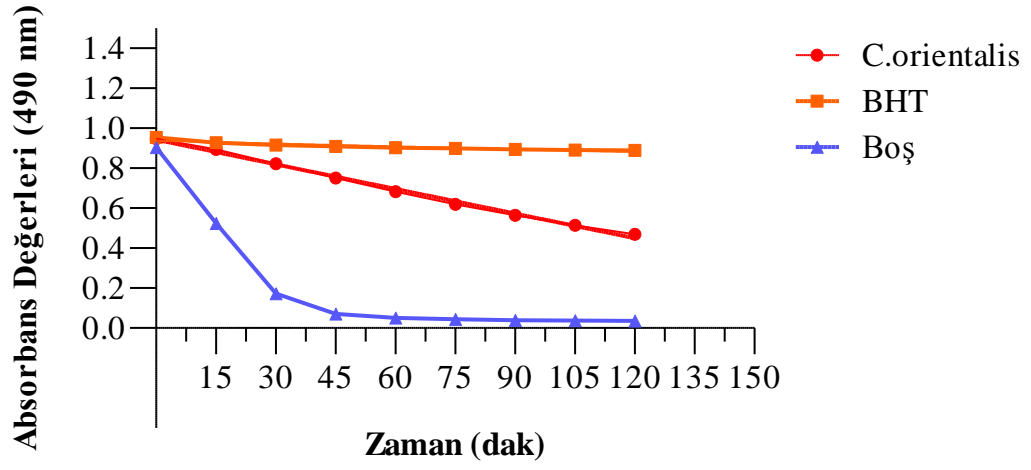
Test Maddeleri	% İnhibisyon± S.S.				
	0,1mg/ml	1mg/ml	3mg/ml	5mg/ml	10mg/ml
EtOH eks.		51,37±4,47	54,12±6,60	62,09±3,50	62,91±3,40
Gallik asit	90,00±2,21	–	–	–	–
BHT	93,00±1,92	–	–	–	–

EtOH eks: etanol ekstresi; SS: standart sapma (Sonuçlar üç farklı deneyin ortalamasıdır).

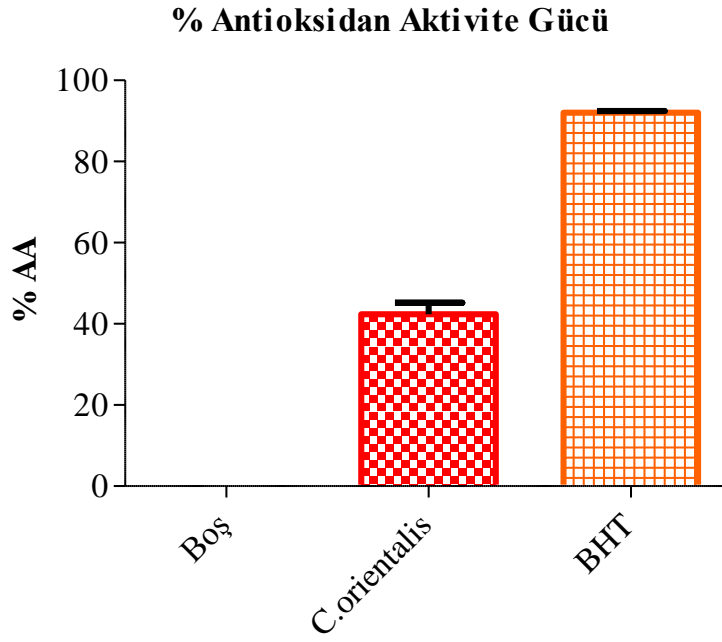
#### ***β-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite tayini***

Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi, linoleik asidin serbest radikalleri ile birlikte ilave reaksiyonlardan oluşan karotenoid bileşiklerine bağlıdır. Antioksidan içermeyen örneklerde renk kaybı gerçekleşir ve buna bağlı olarak meydana gelen absorbansdaki hızlı düşüş spektrofotometre ile gözlemlenir. Gerçekleşen renk solması β-karoten ve linoleik asidin oksidasyonu sonucu ortaya çıkan serbest radikallere bağlıdır. Linoleik asit serbest radikali dialilik metilen gruplarından birinden kopan hidrojen atomu ile oluşur ve doymamış β-karoten moleküllerine saldırır. Sonuç olarak β-karoten oksitlenerek parçalara ayrılır. Böylece sistem kromoforunu (organik bir molekül içinde renkli görünmeyi sağlayan atom, atom grubu ve elektronlar) ve karakteristik özelliği olan turuncu rengini kaybeder. Antioksidan içeren örnekler ise renklerini korurlar ve böylece absorbans değerleri daha kalıcı olur. Farklı antioksidanların varlığı, sistemde oluşan linoleik-serbest radikalleri ve diğer serbest radikalleri nötralize ederek β-karotenin oksitlenmesini ve rengini kaybetmesini önler (Barros ve ark., 2007; Tosun ve ark., 2009). Kısacası, β-karoten-linoleik asit sisteminde test süresi olan 2 saat boyunca β - karotenin solmasının önlenmesi yüksek potansiyel antioksidan aktivitenin varlığını göstermektedir.

*C.orientalis* ekstresinin β-karoten-linoleik asit sisteminde 490 nm’de absorbans ölçümlerinin grafiği **Şekil 16**’da ve %antioksidan aktivite gücü (%AA) **Şekil 17**’de verilmiştir. Linoleik asidin oksidasyonu, *C.orientalis* etanol ekstresinin tek bir konsantrasyonu (1 mg/ml) kullanılarak %45,05 inhibe edilmiştir. Sentetik BHT %92,5 ile *C.orientalis*’e göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. β-karoten metodu, olası antioksidan maddenin lipitlerin ve yağ asitlerinin oksidatif bozulmalarını önleme yeteneğinin ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu nedenle, BHT kadar yüksek bir aktivite gösteremese de %50’ye yakın bir aktivite değeri elde edildiği için *C.orientalis* etanol ekstresinin membran lipitlerin bozunmasını önlemede etkili olduğu söylenebilir.



Şekil 16. *C.orientalis* Etanol Ekstresinin Absorbans Grafiği



Şekil 17. *C.orientalis* Etanol Ekstresinin  $\beta$ -karoten Metodu ile (%) Antioksidan Aktivitesi Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklindedir (n=3).

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada, *C.orientalis* yapraklarının etanol ekstresinin antinosiseptif, antiinflamatuvar, antitrombotik ve antioksidan etkileri olduğu belirlenmiştir. Artan dozlarda ekstrenin daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Uyguladığımız analjezi testleri sonucunda *C. orientalis* ekstresinin santral sinir sistemi üzerindeki etkilerinin spinal düzeyde, supraspinal düzeye göre daha güçlü olduğu gözlenmiştir. Elde edilen antinosiseptif etki opioid antagonist olan nalokson ile antagonize olduğundan ekstrenin etkisini kısmen opioid reseptörler üzerinden gösterdiği düşünülmektedir. Ancak nalokson ile oluşan antagonizmanın morfindaki kadar güçlü olmaması, yüksek dozlarda sedasyonun gözlenmesi ve spinal analjezideki güçlü etkinlikten dolayı ekstrenin  $\mu$ -opioid reseptörlerden daha çok  $\kappa$  ve  $\delta$  opioid reseptörler üzerinden etki ettiği düşünülmektedir. Daha sonraki çalışmalarda etkinin hangi opioid reseptörler üzerinden gerçekleştiğinin kesin olarak belirlenebilmesi için  $\mu$ -opioid reseptörlere karşı daha duyarlı olan nalokson yerine  $\kappa$  ve  $\delta$  opioid reseptör tiplerine karşı daha seçici olan antagonist ajanlar (sırasıyla nor-binaltorfimin ve naltrindol) kullanılarak deneylerin tekrarlanması planlanmaktadır. Ayrıca ekstrenin ağrı üzerindeki etkilerinin daha geniş ölçekte değerlendirilmesi için iyon kanal blokörleri, adrenerjik reseptör antagonistleri vb. ajanlar varlığında da deneylere yön verilmesi ve böylece ağrı üzerindeki etki mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmaktadır. Genellikle periferdeki antinosiseptif etkinliğin değerlendirilmesi için kullanılan asetik asit ile indüklenen kıvrınma testinde, *C.orientalis* etanol ekstresi uygulanan en yüksek dozda neredeyse morfine yakın etki gösterirken, en düşük dozda ise siklooksijenaz enzimlerini inhibe ettiği bilinen diklofenak'a yakın bir etki göstermiştir. Test edilen dozlarda *C.orientalis* hem periferde hem de SSS'de antinosiseptif etkinlik göstermiştir. Bu ekstrenin aktif maddelerinin ağrı üzerindeki etki mekanizması, kısmen AA kaskadının lipoksijenazları ve/veya siklooksijenazları ve/veya opioid reseptörler ile ilişkili olabilir. Eikozanoitler araşidonik asitten iki ayrı yolak ile sentezlenir. Lipoksijenaz enzimleri aracılığıyla lökatrienler, HETE (hidroksi eikozatetraenoik asitler) ve HPETE (hidroperoksi eikozatetraenoik asitler) sentezlenir. Siklooksijenaz yolağı sonucunda prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar oluşur. Başta prostasiklinler (PGI<sub>2</sub>) olmak üzere salınan prostaglandinler ve PGE'nin A $\delta$  liflerini uyararak keskin ağrı duyumuna neden oldukları bildirilmiştir (Rang ve Dale, 1983).

*C.orientalis* ekstresinin antiinflamatuvar ve antitrombotik aktivitedeki güçlü etkileri olduğu görülmektedir. Antitrombotik aktivitenin desteklenmesi ve aydınlatılması için ileriki çalışmalarda özellikle in vitro pıhtılaşma testleri (aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı ve protrombin zamanı) ve fibrinojen miktar tayini, trombosit sayımı gibi bir takım deneylerden faydalanılması düşünülmektedir. Asetik asit ile indüklenen peritoneal damar permabilite ve lökosit migrasyon testleri yapılarak antiinflamatuvar etkinliğin daha iyi değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Akut toksisite deneyleri sırasında gözlemlenen sedatif etkinin değerlendirilmesi için motor fonksiyon ölçümünde kullanılan rota rod ve barbitürat uyku zamanı testlerinin uygulanabileceği düşünülmektedir.

Ekstremizin etkileri hakkında daha kapsamlı bilgi edinilebilmesi için farklı fraksiyonlarının çalışılması düşünülmektedir. Ayrıca çalıştığımız ekstre içerisinde yer alan ana maddelerin belirlenmesi için bu konuyla ilgili ortak çalışmaların yapılması gerekmektedir. Planlanan bu çalışmaların gerçekleştirilmesi bize etkilerin mekanizmasını aydınlatmamızda ve bu etkilere neden olan aktif bileşenlerin tespit edilmesinde kolaylık sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Ahmed, F., Shahid, I.Z., Biswas, U.K., Roy, B.A., Das, A.K., Choudhuri, M.S.K., Anti-inflammatory, antinociceptive, and neuropharmacological activities of *Clerodendron viscosum*, *Pharm. Biol.*, 45, 587-593 (2007).
- Ahumada, C., Saenz T., Garcia, D., De La Puerta, R., Fernandez A., Martinez, E., The effects of triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. on different acute inflammation models in rats and mice. Leukocyte migration and phospholipase A<sub>2</sub> inhibition, *J. Pharm. Pharmacol.*, 49, 329-331 (1997).
- Ammon, H.P.T., Handel, M., *Crataegus*, toxicology and pharmacology I., Toxicity. *Planta Med.*, 43, 105-120 (1981a).
- Ammon, H.P.T., Handel, M., *Crataegus*, toxicology and pharmacology II., Toxicity. *Planta Med.*, 43, 209-239 (1981b).
- Ammon, H.P.T., Handel, M., *Crataegus*, toxicology and pharmacology III., Toxicity. *Planta Med.*, 43, 313-322 (1981c).
- Aruoma, O.I., Extracts as antioxidant prophylactic agents, *Inform*, 8, 1236-1242 (1997).
- Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E., Rossi, Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., Munoz, A., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 449-456 (1996).
- Aydın, S., Beis, R., Can, Ö.D., Analgesic and antispasmodic activities of 2-(2-nitro-phenyl)-1H-benzimidazole 5-carboxylic acid: evidence for the importance of the 2-(o-substitutedphenyl) group, *Pharmazie*, 58, 405-408 (2003).
- Aydın, S., Beis, R., Öztürk, Y., Hüsni, H., Baser, C., Nepetalactone: a new opioid analgesic from *Nepeta casearea* Boiss, *J. Pharm. Pharmacol.*, 50, 813-817. (1998).
- Bahorun, T., Aumjaud, E., Ramphul, H., Rycha, M., Luximon-Ramma, A., Trotin, F., Aruoma, O.I., Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts, *Nahrung*, 47, 191-198 (2003).
- Bahorun, T., Trotin F., Pommery J., Vasseur, J., Pinkas M., Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts, *Planta Med.*, 60, 323-328 (1994).
- Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., *Herbal Medicines: A Guide for Health Care Professionals*, Pharmaceutical Press, Royal Pharmaceutical Society, London, 157-159, 2002.
- Barros, L., Ferreira, M.J., Queiros, B., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities, *Food Chem.*, 103, 413-419 (2007).
- Bastos, G.N.T., Santos, A.R.S., Ferreira, V.M.M., Costa, A.M.R., Bispo, C.I., Silveira, A.J.A., Do Nascimento, J.L.M., Antinociceptive effect of aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. On mice, *J. Ethnopharmacol.*, 103, 241-245 (2006).

- Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (geçmişte ve bugün), İlaveli 2. baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 161-162, 1984.
- Bekemeier, H., Hirschelmann, R., Role of eicosanoids in the kappa-carrageenin rat tail thrombosis, *Biomed. Biochim. Acta.*, 47, 260-263 (1988).
- Belfrage, M., Sollevi, A., Segerdahl, M., Sjölund, K.-F., Hansson, P., Systemic adenosine infusion alleviates spontaneous and stimulus evoked pain in patients with peripheral neuropathic pain, *Anesth. Analg.*, 81, 713-717 (1995).
- Benyhe, S., Morphine: new aspects in the study of an ancient compound, *Life Sci.*, 55, 969-979 (1994).
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M., Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sci.*, 65, 1865–1874. (1999).
- Besson, J.M., Chaouch, A., Peripheral and spinal mechanisms of nociception, *Physiol. Rev.*, 67, 67-186 (1987).
- Besson, J.M., The neurobiology of pain, *Lancet*, 353, 1610-1615 (1999).
- Bisset, N.G., Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 162-165, 1994.
- Bleehan, T., Keele, C.A., Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation, *Pain*, 3, 367-377 (1997).
- Block, L.C., Santos, A.R.S., Souza, M.M., Scheidt, C., Yunes, R.A., Santos, M.A., Monache, F.D., Filho, V.C., Chemical and pharmacological examination of *Wedelia paludosa*, *J. Ethnopharmacol.*, 61, 85-89 (1998a).
- Block, L.C., Scheidt, C., Quintao, N.L.M., Santos, A.R.S., Cechinel-Filho, V., Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa* DC (Compositae), *Pharmazie*, 53, 716-718 (1998b).
- Boughton-Smith, N.K., Deakin, A.M., Follenfant, R.L., Whittle, B.J.R., Coarland, L.G., Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive arthus reaction and carrageenin paw edema in the rat, *Brit. J. Pharmacol.*, 110, 896–902 (1999).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci. Technol.*, 28, 25-30 (1995).
- Brownstein, M.J., A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5391-5393 (1993).
- Burits, M., Bucar, F., Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, *Phytother. Res.*, 14, 323–328 (2000).
- Cadenas, E., Basic mechanisms of antioxidant activity, *Biofactors*, 6, 391–397 (1997).
- Cadenas, E., Sies, H., The lag phase, *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 222-230 (1998).
- Calixto, J.B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A.R.S., Filho, V.C., Yunes, R.A., Naturally occurring antinociceptive substances from plants, *Phytother. Res.*, 14, 401-418 (2000).

- Calixto, J.B., Santos, A.R.S., Cechinel-Filho, V., Yunes, R.A., A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential, *Med. Res. Rev.*, 18, 225-258 (1998).
- Cardenas, L.C., Rodriguez, R., Villaverde, M.C., Riguera, R., Cadena, R., Otero, A., The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: flavonoid glycosides, *Planta Med.*, 59, 26-27 (1993).
- Carr, A., McCall, M. R., Frei, B., Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection, *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 1716–1723 (2000).
- Carr, D.B., Goudas, L.C., Acute pain, *Lancet*, 353, 2051-2058 (1999).
- Cechinel-Filho, V., Vaz, Z.R., Zunino, L., Calixto, J.B., Yunes, R.A., Antinociceptive and anti-edematogenic effects of astilbin, taxifolin and related compounds, *Drug Res.*, 50, 281-285 (2000).
- Chang, Q., Zuo, Z., Harrison, F., Chow, M.S.S., Hawthorn, J. *Clin. Pharmacol.*, 42, 605-612 (2002).
- Chen, Y., Mastek, A., Liu, J., Hurley, J., Yu, L., Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain, *Mol. Pharmacol.*, 44, 8-12 (1993).
- Chen, Z.W., Ma, C.G., Xu, S.Y., Mechanism of analgesic action of hyperin, *Yao Xue Xue Bao.*, 24, 326-330 (1989).
- Chen, Z.Y., Chan, P.T., Ho, K.Y., Fung, K.P., Wang, J., Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups, *Chem. and Phys. Lipids*, 79, 157-163 (1999).
- Chiueh, C.C., Neuroprotective properties of nitric oxide, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 890, 301–311 (1999).
- Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse, *Brit. J. Pharmacol.*, 32, 295–310 (1968).
- Collis, M.G., Hourani, S.M.O., Adenosine receptor subtypes, *Trends Pharmacol. Sci.*, 14, 360-366 (1993).
- Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M., Natural products in drug discovery and development, *J. Nat. Prod.*, 60, 52-60 (1997).
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., Linssen, P. H, Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, *J. Sci. Food Agr.*, 77, 140–146 (1998).
- De Jesus, R.A., Cechinel-Filho, V., Oliveira, A.E., Schlemper, V., Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*, *Phytomedicine*, 7, 111-115 (2000).
- De Smet, P.A.G.M., The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare, *Drugs*, 54, 801-840 (1997).



- Demirezer, Ö., Tedavide Kullanılan Bitkiler, Medikal & Nobel Kitapevi, Ankara, 65-70, 2007.
- Derardt, R., Jougney, S., Benzoni, J., Peterfalvi, M., Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition, Eur. J. Pharmacol., 61, 17-24 (1980).
- Dhawan, B.N., Cesselin, F., Raghubir, R., Reisine, T., Bradley, P.B., Portoghese, P.S., Hamon, M., International union of pharmacology, XII. Classification of opioid receptors, Pharmacol. Rev., 48, 567-591 (1996).
- Di Carlo, Mascolo, N., Izzo, A. A., Capasso, F., Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, Life Sci., 65, 337-353 (1999).
- Diplock, A.T., Safety of antioxidant vitamins and beta-carotene, Am. J. Clin. Nutr., 62, 1510-1516 (1995).
- Dönmez, A.A., The genus *Crataegus* L. ( Rosaceae ) with special reference to hybridisation and biodiversity in Turkey, Turk J. Bot., 28, 29-37 (2004).
- Dray, A., In Handbook of Experimental Pharmacology: The Pharmacology of Pain, Springer, Heidelberg, 21-41, 1997.
- Dray, A., Inflammatory mediators of pain, Brit. J. Anaesth., 75, 125-131 (1995).
- Dröge, W., Free radicals in the physiological control of cell function, Physiol. Rev., 82, 47-95 (2002).
- Duke, J.A., Handbook of Medicinal Herbs, CRC Press, Florida, 242-243, 1995.
- Eddy, N.B., Leimback, D., Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines, J. Pharmacol. Exp. Ther., 107, 385-393 (1953).
- Elisabetsky, E., Amador, T.A., Albuquerque, R.R., Nunes, D.S., Carvalho, A.C., Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Wild. ex R. & S.) Muell. Arg. Alkaloids, J. Ethnopharmacol., 48, 77-83 (1995).
- Erdemoğlu, N., Turan, N.N., Akkol Küpeli, E., Şener, B., Abacıoğlu, N., Estimation of anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities on *Arctium minus* (Hill) Bernh. Spp. *minus*, J. Ethnopharmacol., 121, 318-323 (2009).
- Eşrefoğlu, M., Hücre Hasarı ve Ölümü: Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi, Türkiye Klinikleri J. Med. Sci., 29, 6 (2009).
- Evans, C., Keith, Jr. D., Morrison, H., Magendzo, K., Edwards, R., Cloning of a delta opioid receptor by functional expression, Science, 258, 1952-1955 (1992).
- Ferreira, S.H., Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia, Nature, 240, 200-203 (1972).
- Formukong, E.A., Evans, A.T., Evans, F.J., The medicinal uses of *Cannabis* and its constituents, Phytother. Res., 3, 219-231 (1989).
- Fürst, S., Transmitters involved in antinociception in the spinal cord, Brain Res. Bull., 48, 129-141 (1999).

- Gaoni, Y., Mechoulam, R., Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 1646-1647 (1964).
- Ghafourifar, P., Cadenas, E., Mitochondrial nitric oxide synthase, *Trends Pharmacol. Sci.*, 26, 190–195 (2005).
- Grubb, B.D., Peripheral and central mechanisms of pain, *Brit. J. Anaesth.*, 81, 8-11 (1998).
- Guerrero, J.A., Lozano, M.L., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Vicente, V., Rivera, J., Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor, *J. Thromb. Haemost.*, 3, 369-376 (2005).
- Guyton, A.C., Hall, J.E., *Tıbbi Fizyoloji*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 598-609, 2007.
- Gümüştas, M.K., Atukeren, P., Oksidatif ve Nitrozatif Stresin Psikiyatrik Bozukluklarla İlişkisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar, Sempozyum Dizisi No: 62, Mart, İstanbul, 329-340 (2008).
- Güre Alaca, F., Arabacı, O., Bazı Tıbbi Bitkilerdeki Doğal Antioksidanlar ve Önemi, Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül, Antalya, 465-470 (2005).
- Güvenç, A., Okada, Y., Akkol Küpeli, E., Duman, H., Okuyama, T., Çalış, İ., Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*, *Food Chem.*, 118, 686-692 (2010).
- Güzeldemir, M.E., Ağrı ve Tedavisi (Ders Notları), GATA Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD, Ankara, 1999.
- Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y., Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries, *Gen. Pharmacol.*, 32(6), 661-667 (1999).
- Hagimori, M., Kamiya, S., Yamaguchi, Y., Arakawa, M., Improving frequency of thrombosis by altering blood flow in the carrageenan-induced rat tail thrombosis model, *Pharmacol. Res.*, 60, 320-323 (2009).
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, London, 136-137, 1999.
- Hamburger, M., Hostettmann, K., Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine, *Phytochemistry*, 30, 3864-3874 (1991).
- Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods, *J. Nutr.*, 130, 2086-2092 (2000).
- Han, T., Li, H.-L., Zhang, Q.-Y., Han, P., Zheng, H.-C., Rahman, K., Qin, L.-P., Bioactivity-guided fractionation for anti-inflammatory and analgesic properties and constituents of *Xanthium strumarium* L., *Phytomedicine*, 14, 825-829 (2007).
- Hanack, T., Bruckel, M.H., The treatment of mild stable forms of angina pectoris using *Crategutt novo*, *Therapiewoche*, 33, 4331-4333 (1983).

Harborne, J.B., Williams, C.A., Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55, 481-504 (2000).

Hass, H., History of antipyretic analgesic therapy, *Am. J. Med.*, 75, 1-3 (1983).

Hayeshi, G., Takemori, A.E., The type of analgesic-receptor interaction involved in certain analgesic assays, *Eur. J. Pharmacol.*, 16, 63-67 (1971).

Hergenhahn, M., Adolph, W., Hecker, E., Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*, *Tetrahedron Lett.*, 19, 1595-1598 (1975).

Hirst, R.A., Lambert, D.G., Notcutt, W.G., Pharmacology and potential therapeutic uses of cannabis, *Brit. J. Anaest.*, 81, 77-84 (1998).

Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., Fadishei, M., Mahmoudi, M., Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zhumeria majdae*, *Phytomedicine*, 9, 135-141 (2002).

Howland, R.D., Mycek, M.J., Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 227-230, 2006.

**http-1** <http://en.wikipedia.org/wiki/Superoxide> (10.02.2010).

**http-2** <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf> (02.03.2010).

**http-3** <http://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan> (10.02.2010).

**http-4** <http://turankaradeniz.com/alic-crataegus-orientalis-l-crataegus-azarolus-1> (28.04.2010).

**http-5** <http://www.bitkisel-tedavi.com/alic.htm> (27.03.2010).

**http-6** [http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus\\_laevigata](http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus_laevigata) (28.04.2010).

**http-7** [http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus\\_tanacetifolia](http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus_tanacetifolia) (28.04.2010).

**http-8** [http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus\\_azarolus](http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus_azarolus) (28.04.2010).

**http-9** [http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus\\_pinnatifida](http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus_pinnatifida) (28.04.2010).

**http-10** [http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus\\_orientalis](http://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus_orientalis) (28.04.2010).

**http-11** <http://www.agritr.com/onsoz.html> (12.04.2010)

**http-12** <http://www.frca.co.uk/article.aspx?articleid=100096> (05.05.2010).

İnal, M.E., Atik, U., Aksoy, N., Haşimi, A., Mark's Temel Tıbbi Biyokimyası, Klinik Yaklaşım, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 439-440, 2007.

Jansco, N., Lynn, B., Possible use of capsaicin in pain therapy, *Clin. J. Pain*, 3, 123-126 (1987).

Janssen, K., Mensink, R.P., Cox, F.J., Harryvan, J.L., Hovenier, R., Hollman, P.C., Katan, M.B., Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr*, 67, 255-262 (1998).

Julius, D., Basbaum, A.I., Molecular Mechanisms of Nociception, *Nature*, 413, 203-210 (2001).

- Kao, E.-S., Wang, C.-J., Lin, W.-L., Chu, C.-Y., Tseng, T.-H., Effects of polyphenols derived from fruit of *Crataegus pinnatifida* on cell transformation, dermal edema and skin tumor formation by phorbol ester application, *Food Chem. Toxicol.*, 45, 1795-1804 (2007).
- Kao, E.-S., Wang, C.-J., Lin, W.-L., Yin, Y.F., Wang, C.-P., Tseng, T.-H. Anti-inflammatory Potential of Flavonoid Contents from Dried Fruit of *Crataegus pinnatifida* in Vitro and in Vivo, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 430-436 (2005).
- Karakaya, S., Sedef Nehir, E.L., Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods, *Food Chem.*, 66, 289-292 (1999).
- Kasahara, Y., Hikino, H., Tsurufiji, S., Wanatabe, M., Ohuchi, K., Anti-inflammatory actions of ephedrine in acute inflammations, *Planta Med.*, 51, 325-331 (1985).
- Kayaalp, O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 617-618, 796-811, 837-844, 2005.
- Kayaalp, O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Pelikan Yayıncılık, Ankara, 798-800, 2009.
- Kieffer, B., Beford, K., Gaveriaux-Ruff, C., Hirth, C., The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 12048-12052 (1992).
- Kılıç, F.S., Sırmagül, B., Öner, S., Erol, K., Putative antinociceptive effect of alpha-tocopherol in mice, *The Pain Clinic.*, 18(1), 57-62 (2006).
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., Taniguchi, H., Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds, *J. Agr. Food Chem.*, 50, 2161-2168 (2002).
- Kim, H.K., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P., Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by ginkgetin, a biflavone from *Ginkgo biloba* leaves, *Planta Med.*, 65, 465-467 (1999).
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms, *J. Pharmacol. Sci.*, 96, 229-245, 2004.
- Klatt, P., Lamas, S., Regulation of protein function by Sglutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress, *Eur. J. Biochem.*, 267, 4928-4944. (2000).
- Knipping, G., Rothneder, M., Striegl, G., Esterbauer, H., Antioxidants and resistance against oxidation of porcine LDL subfractions, *J. Lipid. Res.*, 31, 1965-1972 (1990).
- Koster, R., Anderson, M., Beer, E.J., Acetic acid for analgesic screening, *Fed. Proc.*, 18, 412 (1959).
- Kovacic, P., Jacintho, J.D., Mechanism of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer, *Curr. Med. Chem.*, 8, 773-796 (2001).
- Kovacic, P., Pozos, R.S., Somanathan, R., Shangari, N., O'Brien, P.J., Mechanism of mitochondrial uncouplers inhibitors and toxins: Focus on electron transfer, free

- radicals and structure-activity relationships, *Curr. Med. Chem.*, 12, 2601-2623 (2005).
- Krogh, R., Kroth, R., Berti, C., Madeira, A.O., Souza, M.M., Cechinel-Filho, V., Delle-Monache, F., Yunes, R.A., Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprea* (L.) R. Br., *Pharmazie*, 54, 464-466 (1999).
- Laughton, M.J., Evans, P.J., Moroney, M.A., Hoult, J.R.S., Halliwell, B., Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives, *Biochem. Pharmacol.*, 42, 1673-1681 (1991).
- Le Bars, D., Gozariu, M., Codden, S.W., Animal models of nociception, *Pharmacol. Rev.*, 53(1), 597-65 (2001).
- Lemberger, L., Potential therapeutic usefulness of marijuana, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 20, 151-172 (1980).
- Levine, J.D., Fields, H.L., Basbaum, A.I., Peptides and the primary afferent nociceptor, *J. of Neurosci.*, 13, 2273-2286 (1993).
- Liang, Y.C., Huang, Y.T., Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.F., Lin, J.K., Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in Mouse macrophages, *Carcinogenesis*, 20, 1945-1952 (1999).
- Ljubuncic, P., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H., Bomzon, A., Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab Medicine in Israel, *J. Ethnopharmacol.*, 101, 153-161 (2005).
- Loeser, J.D., Melzack, R., Pain: an overview, *Lancet*, 353, 1607-1609 (1999).
- Lorenzetti, B.B., Souza, G.E.P., Sarti, S.J., Filho, D.S., Ferreira, S.H., Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea, *J. Ethnopharmacol.*, 34, 43-48 (1991).
- Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., Bieger, D., *Color Atlas of Pharmacology*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 144-145, 2005.
- Lynn, B., Capsaicin: actions on nociceptive C-fibers and therapeutic potential, *Pain*, 41, 61-69 (1990).
- Mahato, S.B., Nandy, A.K., Roy, G., Triterpenes, *Phytochemistry*, 31, 2199-2249 (1992).
- Martinez-Vazquez, M., Apan, T.O.R., Lastra, A.L., Bye, R., A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*, *Planta Med.*, 64, 134-137 (1998).
- Mastumoto, K., Mizowaki, M., Suchitra, T., Murakami, Y., Takayama, H., Sakai, S., Aimi, N., Watanabe, H., Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems, *Eur. J. Pharmacol.*, 317, 75-81 (1996).
- Mates, J.M., Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology*, 153, 83-104 (2000).

- Mechoulam, R., *Marijuana Chemistry*, Science, 168, 1159-1166 (1970).
- Melikoğlu, G., Meriçli, F., Meriçli, A.H., Flavonoids of *Crataegus orientalis*, *Boll. Chim. Farm.*, 138, 351-352 (1999).
- Merken, H.M., Beecher, G., Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review, *J. Agr. Food Chem.*, 50, 2392-2399 (2000).
- Merskey, H., Bogduk, N., In *Classification of Chronic Pain*, IASP Press, Seattle, 209-214, 1994.
- Meunier, J.-C., Nociceptin/orphanin FG and the opioid receptor-like ORL1 receptor, *Eur. J. Pharmacol.*, 340, 1-15 (1997).
- Miean, K.H., Mohamed, S., Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants, *J. Agr. Food Chem.*, 49, 3106-3112 (2001).
- Millan, M.J., The induction of pain: an integrative review, *Prog. Neurobiol.*, 57, 1-164 (1999).
- Miller, A.L., Botanical Influences on Cardiovascular Disease, *Altern. Med. Rev.*, 3(6), 422-431 (1998).
- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D., Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions, *Free Radic. Biol. Med.*, 8, 95-108 (1990).
- Mills, S., Bone, K., *Principles and Practice of Phytotherapy, Modern Herbal Medicine*, Churchill Livingstone, London, 439-447, 2000.
- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J.-L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G., Meunier, J.-C., ORL1, a novel member of the opioid receptor family: cloning, functional expression and localisation, *FEBS Lett.*, 341, 33-38 (1994).
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C., Natural antioxidants from residual sources, *Food Chem.*, 72, 145-171 (2001).
- Naik, G.H., Priyadarsini, K.I., Mohan, H., Evaluating the antioxidant activity of different plant extracts and herbal formulations, *Res. Chem. Intermed.*, 31, 145-151 (2005).
- Nakadate, T., Aizu, E., Yamamoto, S., Kato, R., Effects of chalcone derivatives on lipoxygenase and cyclooxygenase activities of mouse epidermis, *Prostaglandins*, 3, 357-368 (1985).
- Oh, U., Hwang, S.W., Kim, D., Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal ganglion neurons, *J. Neurosci.*, 15, 1659-1667 (1996).
- Olajide, O.A., Makinde, M.J., Awe, S.O., Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice, *J. Ethnopharmacol.*, 66, 113-117 (1999).

- Oomah, B. D., Mazza, G., Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat, *J. Agric. Food Chem.*, 44(7), 1746-1750 (1996).
- Önkol, T., Şahin, M.F., Yıldırım, E., Erol, K., Ito, S., Synthesis and antinociceptive activity of (5-chloro-2(3H)-Benzoxazolone-3-yl) Propanamide derivatives, *Arch. Pharm. Res.*, 27(11), 1086–1092 (2004).
- Öztürk, Y., Aydın, S., Beis, R., Başer, K.H.C., Berberoğlu, H., Effects of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. Extracts on the Central Nervous System in mice, *Phytomedicine*, 3(2), 139-146 (1996a).
- Öztürk, Y., Aydın, S., Beis, R., Başer, K.H.C., Berberoğlu, H., Effects of *Hypericum calycinum* L. Extract on the Central Nervous System in mice, *Phytother. Res.*, 10, 700-702 (1996b).
- Packer, L., Cadenas, E., Marcel Dekker, Series Introduction, Herbal and Traditional Medicine: Molecular Aspects of Health, L. Packer, C.N. Ong, B. Halliwell, New York, iii-v, 2004.
- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M., A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding, *J. Mol. Biol.*, 304, 55–68 (2000).
- Coettier-Deleu, C., Voiselle, G., Fruchart, J.C., Duriez, P., Teissier, E., Bailleul, F., Vasseur, J., Trotin, F., Hawthorn extracts inhibit LDL oxidation, *Pharmazie*, 58, 577-581 (2003).
- Raji, Y., Udoh, U.S., Oluwadara, O.O., Akinsomisoye, O.S., Awobajo, O., Adeshoga, K., Anti-inflammatory and analgesic properties of the rhizome extract of *Zingiber Officinale*, *Afr. J. Biomed. Res.*, 5, 121–124 (2002).
- Rakotoarison, D.A., Antioxidant activities of polyphenolic extracts from flowers, in vitro callus and cell suspension culture of *Crataegus monogyna*, *Pharmazie*, 52, 60-64 (1997).
- Ramesh, M., Rao, Y.N., Rao, A.V., Prabhakar, M.C., Rao, C.S., Muralidhar, N., Reddy, B.M., Antinociceptive and anti-inflammatory activity of a flavonoid isolated from *Caralluma attenuata*, *J. Ethnopharmacol.*, 62, 63-66 (1998).
- Rang, H.P., Bevan, S.J., Dray, A., Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, *Textbook of Pain*, P.D. Wall, R. Melzack, Churchill Livingstone, Edinburgh, 57-78 (1994).
- Rang, H.P., Dale, M.M., *Pharmacology*, 2<sup>nd</sup> edition, Churchill Livingstone, London, 706-711 (1993).
- Reinli, K., Block, G., Phytoestrogen content of foods: a compendium of literature values, *Nutr. Cancer Int. J.*, 26, 123-148 (1996).
- Reisine, T., Pasternack, G., Opioid analgesics and antagonists, In: Goodman and Gilman's, the Pharmacological Basis of Therapeutics, J.G. Hardman, L.E. Limbird (Eds.), 9th edn., McGraw-Hill, New York, 521–526 (1996).
- Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Mancardi, D., Espey, M. G., Miranda, K. M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., Wink, D.A., The chemistry of nitrosative

stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species, Putting perspective on stressful biological situations, *Biol. Chem.*, 385, 1–10 (2004).

Rigelsky, J.M., Sweet, B.V., Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses, *Am. J. Health Syst. Pharma.*, 59, 417-422 (2002).

Rios, J.L., Simeon, S., Villar, A., Pharmacological activity of aporphinoid alkaloids: A review, *Fitoterapia*, 60, 387-412 (1989).

Robbers, J.E., Tyler, V.E., In *Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals*, Haworth Press Inc, New York, 199-209, 1999.

Russo, C.M., Brose, W.G., Chronic pain, *Ann. Rev. Med.*, 49, 123-133. 1998.

Safayhi, H., Sailer, E.R., Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes, *Planta Med.*, 63, 487-493 (1997).

Sawynok, J., Adenosine receptor activation and nociception, *Eur. J. Pharmacol.*, 317, 1-11 (1998).

Sawynok, J., Liu, X.J., Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain, *Prog. Neurobiol.*, 69, 313-340 (2003).

Sawynok, J., Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine, *Drugs*, 49, 37-50 (1995).

Sawynok, J., Reid, A., Caffeine antinociception: role of formalin concentration and adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors, *Eur. J. Pharmacol.*, 298, 105-111 (1996).

Schmauss, C., Yaksh, T.L., In vivo studies on spinal receptor systems mediating antinociception II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta and kappa receptors with visceral chemical and cutaneous thermal stimuli in the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228, 1–12 (1984).

Schussler, M., Holzl, J., Fricke, U., Myocardial effects of flavonoids from *Crataegus* species, *Arzneim-Forsch Drug Res.*, 45, 842-845 (1995).

Serteser, A., Kargioğlu, M., Gök, V., Bağcı, Y., Özcan, M.M., Arslan, D., Determination of antioxidant effects of some plant species wild growing in Turkey, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 59 (7-8), 643-651 (2008).

Shield, M.J., Diclofenac/misoprostol: novel findings and their clinical potential, *J. Rheumatol.*, 25 (Suppl 51), 31–41 (1998).

Shu, Y.-Z., Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective, *J. Nat. Prod.*, 61, 1053-1071 (1998).

Sies, H., Stahl, W., Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene and other carotenoids as antioxidants, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1315-1321 (1995).

Silbernagl, S., Despopoulos, A., *Color Atlas of Physiology*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 102-106, 2009.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventó's, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, In: *Methods in Enzymology*, L. Packer (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 152-315 (1999).



- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z., Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food Chem.*, 89, 191-198 (2005).
- Sözer, U., Dönmez, A.A., Meriçli, A.H., Constituents from the leaves of *Crataegus davisii* Browicz, *Sci. Pharm.*, 74, 203-208 (2006).
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.W., Knoo, J.C., Witztum, J.L., Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity, *N. Engl. J. Med.*, 320, 915-924 (1989).
- Stone, L.S., Fairbanks, C.A., Laughlin, T.M., Nguyen, H.O., Bushy, T.M., Wessendorf, M.W., Wilcox, G.L., Spinal analgesic actions of the new endogenous opioid peptides endomorphin-1 and -2, *Neuroreport*, 8, 3131-3135 (1997).
- Stucky, C.L., Gold, M.S., Zhang, X., Mechanism of Pain, *PNAS*, 98(21), 11845-11846 (2001).
- Süzer, Ö, *Premium Farmakoloji, Klinisyen Tıp Kitapevleri*, Ankara, 241-242, 255, 533-534, 2005.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules), *Adv. Pharmacol.*, 24, 123-155 (1993).
- Szolcsanyi, J., In *Contemporary Issues in Chronic Pain Management*, Kluwer Academic, Boston, 97-124, 1991.
- Thongpradichote, S., Matsumoto, K., Tohda, M., Takayama, H., Aimi, N., Sakai, S.-I., Watanabe, H., Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive actions of supraspinally-administered mitragynine in mice, *Life Sci.*, 62, 1371-1378 (1998).
- Tosun, M., Ercişli, S., Şengül, M., Özer, H., Polat, T., Öztürk, E., Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Eight *Salvia* Species from Turkey, *Biol. Res.*, 42, 175-181 (2009).
- Uzbay, İ.T., *Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Araştırma Teknikleri*, Çizgi Tıp Yayınevi, Ankara, 139-144, 2004.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44-84 (2007).
- Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Raptá, P., Bilton, R.F., Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of vitamin K play a role in etiology of colon cancer?, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1527, 161-166 (2001).
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1-40 (2006).
- Velioğlu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products, *J. Agr. Food Chem.*, 46 (10), 4113-4117 (1998).
- Vibes, J., Lasserre, B., Gleye, J., Declume, C., Inhibition of thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis in vitro by the main components of *Crataegus oxyacantha*

- (Hawthorn) flower heads, Prostagland. Leukotr. Essent. Fatty Acids, 50, 173-175, (1994).
- Viswanathan, S., Sambantham, P.T., Reddy, K., Kameswaran, L., Gossypin-induced analgesia in mice, Eur. J. Pharmacol., 98, 289-291 (1984).
- Vogel, H.G., Vogel, W.H., Drug Discovery and Evaluation, Pharmacological Assays, Springer, Berlin, 402-403, 1997.
- von Eiff, M., Hawthorn/Passionflower extract and improvement in physical capacity of patients with dyspnoea Class II of the NYHM functional classification, Acta. Ther., 20, 47-66 (1994)
- Walker, C.I.B., Trevisan, G., Rossato, M.F., Franciscato, C., Pereirac, M.E., Ferreira, J., Manfron, M.P., Antinociceptive activity of *Mirabilis jalapa* in mice, J. Ethnopharmacol., 120, 169-175, (2008).
- Walker, J.S., NSAID: an update on their analgesic effects, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 22, 855-860 (1995).
- Wall, P.D., Melzack, R., Textbook of Pain, Churchill Livingstone, London, 1-1600, 1999.
- Weihmayr, T., Emst, E., Therapeutic effectiveness of *Crataegus*, Forsch. Med., 114, 27-29 (1996).
- Winter, C.A., Ristey, E.A., Nuss, G.W., Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 544-547 (1962).
- Wood, J.N., Docherty, R., Chemical activators of sensory neurons, Ann. Rev. Physiol., 59, 457-482 (1997).
- Xiao, P., Kubo, H., Ohsawa, M., Higashiyama, K., Nagase, H., Yan, Y.N., Li, J.S., Kamei, J., Ohmiya, S., Kappa-opioid receptor-mediated antinociceptive effects of stereoisomers and derivatives of (+)-matrine in mice, Planta Med., 65, 230-233 (1999).
- Xu, Y., Li, S., Chen, R., Li, G., Barish, P.A., You, W., Chen, L., Lin, M., Ku, B., Pan, J., Ogle, W.O., Antidepressant-like effect of low molecular proanthocyanidin in mice: Involvement of monoaminergic system, Pharmacol. Biochem. Be., 94, 447-453 (2010).
- Yan, F., Yan, J., Sun, W., Yao, L., Wang, J., Qi, Y., Xu, H., Thrombolytic effect of Subtilisin QK on carrageenan induced thrombosis model in mice, J. Thromb. Thrombolysis, 28, 444-448 (2009).
- Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C.D., Takeda, J., Reisine, T., Bell, G. I., Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6736-6740 (1993).
- Yeşilada, E., Küpeli, E., *Berberis crataegina* DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats, J. Ethnopharmacol., 79, 237-248 (2002).

Zhang, Z., Chang, Q., Zhu, M., Huang, Y., Ho, W.K.K., Chen, Z.-Y.,  
Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits, *J. Nutr. Biochem.*, 12,  
144-152 (2001).