

**BAZI *HYPERICUM* TÜRLERİNİN
UÇUCU YAĞ BİLEŞİMLERİ VE
ANTİANJİYOJENİK
AKTİVİTELERİ**

H. Tuba Kıyan
Yüksek Lisans Tezi

**BAZI *HYPERICUM* TÜRLERİNİN UÇUCU
YAĞ BİLEŞİMLERİ VE
ANTİANJİYOJENİK AKTİVİTELERİ**

H. Tuba Kıyan

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Eskişehir, Şubat 2010

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Betül DEMİRCİ

Bu tez çalışması, TÜBİTAK-107S262 numaralı proje tarafından kısmen desteklenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı	H. Tuba Kıyan
Doğum Tarihi ve Yeri	1984, Antalya
Uyruğu	T. C.
Medeni Durumu	Bekar
İletişim Adresleri	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir 0222 3350580 (3715 dahili) htkiyan@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlkokul	Cumhuriyet İlköğretim Okulu (1995)
Ortaokul	Alanya Ayşe Melahat Erkin Anadolu Lisesi (1999)
Lise	Alanya Ayşe Melahat Erkin Anadolu Lisesi (2002)
Lisans	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2007)
Yüksek Lisans	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı (2010)
Yabancı Dil	İngilizce
Mesleki Deneyim	Araştırma Görevlisi (2007 -)

Yayınlar

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster ve Sözlü Bildiriler

- 1) Kıyan, H. T., Demirci, B., Demirci, F., Başer, K. H. C., *in vivo* Angiogenic Evaluation and Chemical Composition of *Ruta chalepensis* L. Essential Oil, 57. Uluslararası Tıbbi Bitkiler ve Doğal Ürünler Araştırma Birliği Yıllık Toplantısı ve Kongresi (GA 2009), 2009, Cenevre, İsviçre.

2) Kıyan, H. T., Kürkçüoğlu, M., Duran, A., Öztürk, M., Başer, K. H. C., The Determination of Volatile Compounds of Two *Achillea* Species from Turkey, 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (9th ISOPS), 23-26 June 2009, Ankara.

3) Demirci, F., Kıyan, H.T., Demirci, B., Başer, K.H.C., *in vivo* Angiogenic Evaluation and Chemical Composition of *Pinus pinea* L. Essential Oil, 8th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (8th SCNC), 15-17 June 2009, Eskişehir.

4) Demirci, B., Kıyan, H.T., Demirci, F., Başer, K.H.C., Antiangiogenic Effects of *Hypericum perforatum* L. Essential Oil, PSE-Natural Products In Cancer Therapy, 2008, Naples, Italy.

5) Başer, K.H.C., Duman, H., Kıyan, H.T., Demirci, B, The Chemical Composition of *Stenotaenia macrocarpa* Essential Oil and Bioactivity, Dünya Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi (WOCMAP IV), 2008, Capetown, Güney Afrika.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildiriler

1) Demirci, B., Kıyan, T., Başer, K. H. C., *Hypericum hircinum* L. Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi, 18. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (18. BİHAT), 2008, İstanbul.

Bilimsel Etkinlikler

Organizasyonunda bulunan toplantılar

: 8th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (8th SCNC), 15-17 June 2009, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.

Katılan kurslar ve eğitim programları

: UNIDO-ICS, Uçucu Yağların Üretim ve Teknolojileri, Kalite Kontrolü ve Kullanımı Eğitim Kursu, 21-25 Temmuz 2008, Eskişehir, Türkiye.

ÖNSÖZ

Günümüzde, doğal kaynaklı hammaddelerin tedavideki önemi giderek artmaktadır. Bu maddelerin bir kısmını ilaç, koku ve tat bileşiği olarak kullanılabilen uçucu yağlar oluşturmaktadır.

Çalışmamızda bazı *Hypericum* türlerinin antianjiyojenik etkileri incelenerek ilaç olma potansiyellerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi olarak beni destekleyen her zaman yol gösterici olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Betül DEMİRCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Engin tecrübe ve bilgisiyle her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER'e ve desteğini her zaman hissettiğim hocam Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e,

Tezin her aşamasında bilgi ve tecrübelerini paylaşan hocam Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Deneysel çalışmalarım esnasında maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Arş. Gör. Hale Gamze DUYMUŞ'a ve her zaman yardım ve desteğini gördüğüm Uzm. Bio. Fatih GÖGER'e,

Aktivite çalışmalarım süresince yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Kim. Sultan BÜTÜN ve Bio. Gökhan DUALI'ya,

Çalışmalarım sırasında her zaman manevi desteklerini hissettiğim Farmakognozi Anabilim Dalı üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak eğitim hayatım süresince maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan ve destekleyen dedeme ve anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

BAZI *HYPERICUM* TÜRLERİNİN UÇUCU YAĞ BİLEŞİMLERİ VE ANTİANJİYOJENİK AKTİVİTELERİ

ÖZET

Anjiyojenez terimi, önceden var olan kan damarlarından yenilerinin oluşmasını ifade eder. Günümüzde, antianjiyojenik özellikteki doğal bileşikler, kanser ve enflamasyon gibi anjiyojeneze bağlı hastalıkların tedavisinde büyük rol oynamaktadırlar. Uçucu yağlar günlük hayatta gıdalarda tat verici veya koruyucu, kozmetik ürünlerde özellikle parfümlerde koku verici ajan olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca antioksidan, antiviral, antimikrobiyal, analjezik, sedatif, antikanser ve antienflamatuvar özellikleri nedeniyle hastalıkların tedavisinde önem taşımaktadırlar.

Bu çalışmada *Hypericum perforatum* L., *H. hircinum* L., *H. confertum* Choisy ve *H. hyssopifolium* Chaix. subsp. *elongatum* (Ledeb.) Woron var. *microcalycinum* (Boiss. & Heldr.) Boiss. türlerinin uçucu yağ bileşimleri Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) sistemi, antianjiyojenik aktiviteleri ise bir *in vivo* model olan koryon allantoik membran (CAM) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Uçucu yağların GK ve GK/KS analizleri sonucunda ana bileşik *H. perforatum*, *H. hircinum*, *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* uçucu yağları için α -pinen (% 33.3, % 88.3, %57.8); *H. confertum* uçucu yağı için ise germakren D (% 30.2) olarak tespit edilmiştir. CAM aktivite deneyi sonucunda en fazla etki *H. perforatum* uçucu yağının 50 μ g/pellet konsantrasyonunda zayıf-orta antianjiyojenik etki olarak görülmüştür. 50 μ g/pellet konsantrasyonda *H. hircinum*, *H. hyssopifolium* ve *H. confertum* uçucu yağları ise hiçbir etki göstermemiştir. Test edilen uçucu yağlar denenen konsantrasyonlarda hiçbir toksik ya da iritan etki göstermemiştir.

H. confertum ve *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri, *H. perforatum*, *H. hircinum*, *H. confertum* ve *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* uçucu yağlarının CAM aktiviteleri ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler:

Hypericum perforatum, *Hypericum hircinum*, *Hypericum confertum*, *Hypericum hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum*, uçucu yağ, koryon allantoik membran (CAM).



THE CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIANGIOGENIC ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF SOME *HYPERICUM* SPECIES

ABSTRACT

The term angiogenesis means the formation of new blood vessels from existing ones. Nowadays, natural compounds which have antiangiogenic properties play a major role in therapy of angiogenesis-dependent diseases like cancer or inflammation. In daily life, essential oils are used as flavour or preservative agent in food and fragrance agent in cosmetics especially in perfumes. They are also important in the treatment of diseases due to their antioxidant, antiviral, antimicrobial, analgesic, sedative, spasmolytic, anticancer and antiinflammatory properties.

In this present work, chemical compositions of the essential oils of *H. perforatum* L., *H. hircinum* L., *H. confertum* Choisy ve *H. hyssopifolium* Chaix. subsp. *elongatum* (Ledeb.) Woron var. *microcalycinum* traditionally used for their wound healing properties, were determined by using Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Antiangiogenic activity of the essential oils were screened by an *in vivo* model chorioallantoic membrane (CAM) assay. As a result of both gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of the essential oils, the main compound of *H. perforatum*, *H. hircinum*, *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* was determined as α -pinene (% 33.3, % 88.3, %57.8) and the oil of *H. confertum* germacrene D (% 30.2) was determined as the main constituent. In the CAM assay, *H. perforatum* essential oil showed antiangiogenic activity with weak-medium effect at the concentration of 50 μ g/pellet. *H. hircinum*, *H. hyssopifolium* and *H. confertum* essential oils did not show any activity. At the tested concentrations essential oils showed neither membrane irritation nor toxicity.

To the best of our knowledge, this is the first investigation on the chemical composition of *H. confertum*, *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* and on the CAM activity of *H. perforatum*, *H. confertum*, *H. hircinum*, *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum*.

Key words: *Hypericum perforatum*, *Hypericum hircinum*, *Hypericum confertum*, *Hypericum hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum*, essential oil, chorioallantoic membrane (CAM).

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Anjiyojenezin Tanımı	2
Yeni Kapiler Damarların Oluşumu	3
Anjiyojenezin Mekanizmaları ve Medyatörleri	4
Anjiyojeneze Bağlı Hastalıklar	5
<i>Tümör Anjiyojenezi ve Metastaz</i>	5
Antianjiyojenez	6
<i>Talidomit</i>	6
<i>Antianjiyojenezde Bitkisel Kaynaklı Doğal Bileşiklerin ve Fonksiyonel Gıdaların Rolü</i>	7
Uçucu Yağlar	8
<i>Antikanser Etkileri</i>	9
<i>Antiinflamatuvar Etkileri</i>	10
Anjiyojenez Araştırmalarında Kullanılan Deney Modelleri	10
<i>in vitro Modeller</i>	11

<i>in vivo Modeller</i>	12
<i>CAM Modeli</i>	12
Uçucu Yağlar ve Uçucu Bileşikler Üzerinde Yapılan CAM Aktivite Çalışmaları	13
<i>Hypericum</i> Cinsinin Genel Botanik Özellikleri	15
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	16
<i>Hypericum</i> Türlerinin Uçucu Yağları	16
Aktivite Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
Kullanılan Cihazlar	17
Civciv Yumurtaları	17
Uçucu Yağların Elde Edilmesi	18
Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Şartları	18
CAM Deneyi	18
<i>Numune Hazırlanması</i>	18
<i>CAM Deneyi</i>	18
<i>Sonuçların Değerlendirilmesi</i>	20
BULGULAR VE TARTIŞMA	21
Distilasyon Sonuçları	21
Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Sonuçları	21
CAM Aktivite Sonuçları	29
<i>Uçucu Yağların ve Standart Kontrol Maddelerin CAM Üzerindeki Etkilerinin Stereomikroskop Görüntüleri</i>	29
SONUÇ VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	36
EKLER	45



EK 1	Daha Önce Çalışılan <i>Hypericum</i> Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimleri	45
EK 2	<i>Hypericum</i> Türlerinin Yara İyileştirici, Antikanser ve Antiinflamatuvar Aktivite Çalışmaları	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 Bitkisel Kaynaklı Bazı Anjiyojenik ve Antianjiyojenik Bileşikler	7
Çizelge 2 CAM Modelinin Avantajları ve Dezavantajları	14
Çizelge 3 Çalışılan <i>Hypericum</i> Türleri ve Toplanma Bilgileri	16
Çizelge 4 CAM Üzerinde Anjiyojenik Etkinin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Skor Değerleri	20
Çizelge 5 <i>Hypericum perforatum</i> Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi	22
Çizelge 6 <i>Hypericum hircinum</i> Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi	24
Çizelge 7 <i>Hypericum confertum</i> Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi	25
Çizelge 8 <i>Hypericum hyssopifolium</i> subsp. <i>elongatum</i> var. <i>microcalycinum</i> Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi	27
Çizelge 9 CAM Aktivite Sonuçları	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Anjiyojeneze Bağlı Hastalıklar	2
Şekil 2 Anjiyojenezin Evreleri	3
Şekil 3 Talidomit	6
Şekil 4 CAM Deneyinin Yapılışı	19
Şekil 5 Dölllenmiş Cıvciv Yumurtası	19
Şekil 6 İnkübasyonun 5. Gününde Yumurtaların Açılma İşlemi	20
Şekil 7 <i>Hypericum perforatum</i> Uçucu Yağının GK Kromatogramı	22
Şekil 8 <i>Hypericum hircinum</i> Uçucu Yağının GK Kromatogramı	24
Şekil 9 <i>Hypericum confertum</i> Uçucu Yağının GK Kromatogramı	25
Şekil 10 <i>Hypericum hyssopifolium</i> subsp. <i>elongatum</i> var. <i>microcalycinum</i> Uçucu Yağının GK Kromatogramı	27
Şekil 11 Agar'da Normal Embriyo Gelişimi (% 2.5)	29
Şekil 12 Kortizon'un CAM Üzerinde Orta-kuvvetli Antianjiyojenik Etkisi (50 µg/pellet)	29
Şekil 13 Prednizon'un CAM Üzerinde Orta-kuvvetli Antianjiyojenik Etkisi (50 µg/pellet)	29
Şekil 14 (+)-Talidomit'in CAM Üzerinde Orta-kuvvetli Antianjiyojenik Etkisi (50 µg/pellet)	29
Şekil 15 (±)-Talidomit'in CAM Üzerinde Orta-kuvvetli Antianjiyojenik Etkisi (50 µg/pellet)	30
Şekil 16 SDS'nin CAM Üzerinde İritan Etkisi (50 µg/pellet)	30



ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 17 (-)-Talidomit'in CAM Üzerinde Zayıf Antianjiyojenik Etkisi (50 µg/pellet)	30
Şekil 18 Suramin'in CAM Üzerinde Zayıf Antianjiyojenik Etkisi (50 µg/pellet)	30
Şekil 19 <i>H. perforatum</i> Uçucu Yağının 50 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	30
Şekil 20 <i>H. perforatum</i> Uçucu Yağının 10 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	30
Şekil 21 <i>H. perforatum</i> Uçucu Yağının 5 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	31
Şekil 22 <i>H. hircinum</i> Uçucu Yağının 50 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	31
Şekil 23 <i>H. hircinum</i> Uçucu Yağının 10 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	31
Şekil 24 <i>H. hircinum</i> Uçucu Yağının 5 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	31
Şekil 25 <i>H. confertum</i> Uçucu Yağının 50 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	31
Şekil 26 <i>H. confertum</i> Uçucu Yağının 10 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	31
Şekil 27 <i>H. confertum</i> Uçucu Yağının 5 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	32
Şekil 28 <i>H. hyssopifolium</i> subsp. <i>elongatum</i> var. <i>microcalycinum</i> Uçucu Yağının 50 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	32

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 29 <i>H. hyssopifolium</i> subsp. <i>elongatum</i> var. <i>microcalycinum</i> Uçucu Yağının 10 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	32
Şekil 30 <i>H. hyssopifolium</i> subsp. <i>elongatum</i> var. <i>microcalycinum</i> Uçucu Yağının 5 µg/pellet Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi	32

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

μg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
FID	: Alev iyonlaşma dedektörü
GK	: Gaz kromatografisi
KS	: Kütle spektrometresi
RRI	: Relatif tutunma indisi
CAM	: Koryon allantoik membran
ECM	: Ekstrasellüler matriks
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
PGF	: Plasental büyüme faktörü
PGE2	: Prostaglandin E2
IL-1	: İnterlökin-1

GİRİŞ VE AMAÇ

Anjiyojenez, yeniden damarlanma sürecini ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Bu süreç, embriyogenez ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik oluşumların yanı sıra enflamatuvar hastalıklar, kanser ve metastaz gibi patolojilerin de temelini oluşturmaktadır.

Kanser tedavisinde kullanılan doğal kaynaklı anjiyojenez inhibitörleri düşük yan etki profilleri ve farklı etki mekanizmaları nedeniyle klasik sitotoksik ilaçlara alternatif olarak görülmektedir. Bu doğal kaynaklı bileşiklerin büyük bölümünü daha çok aromaterapi ve kozmetikte kullanılan uçucu yağlar oluşturmaktadır.

Uçucu yağlar antioksidan, antikanser, antiviral, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, analjezik, sedatif, spazmolitik, lokal anesteziye etkilere sahip aromatik bileşiklerdir. Çok eski çağlardan günümüze kadar tedavide kullanılmaya gelmişlerdir. Günümüzde önemleri daha da artmıştır.

Anjiyojenik sürecin karmaşıklığı, doku ve moleküllerin heterojenitesi nedeniyle anjiyojenez araştırmalarında tek bir ölçüm yöntemi yeterli olamamaktadır. Bu nedenle hem proanjiyojenik hem de antianjiyojenik bileşiklerin etkinliğinin test edilmesine olanak veren birçok *in vitro* ve *in vivo* anjiyojenez deney modeli önerilmektedir. *in vivo* modeller arasında anjiyojenik etkinin kantitatif ölçümüne imkan veren, uygulanması en kolay ve tekrarlanabilir sonuç veren yöntemlerin koryon allantoik membran (CAM) ve tavşan kornea yöntemlerinin olduğu kabul edilmektedir.

CAM modeli embriyonik araştırmaların yanı sıra kanser ve metastaz araştırmalarında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Uçucu yağların da aralarında bulunduğu doğal maddelerin, kozmetiklerin ve diğer kimyasalların antianjiyojenik, antiinflamatuvar, antiirritan özellikleri hakkında bilgi veren ayrıca olası membran iritasyonu, dekompozisyonu, koagülasyonu ve toksisitesi gibi özelliklerini de ortaya koyan bir yöntemdir. Kimyasalların özellikle de kozmetiklerin etki ve iritasyon profillerinin belirlenmesinde kullanılan ve çok sayıda hayvanın ölümüyle sonuçlanan *in vivo* hayvan deneylerine alternatiftir.

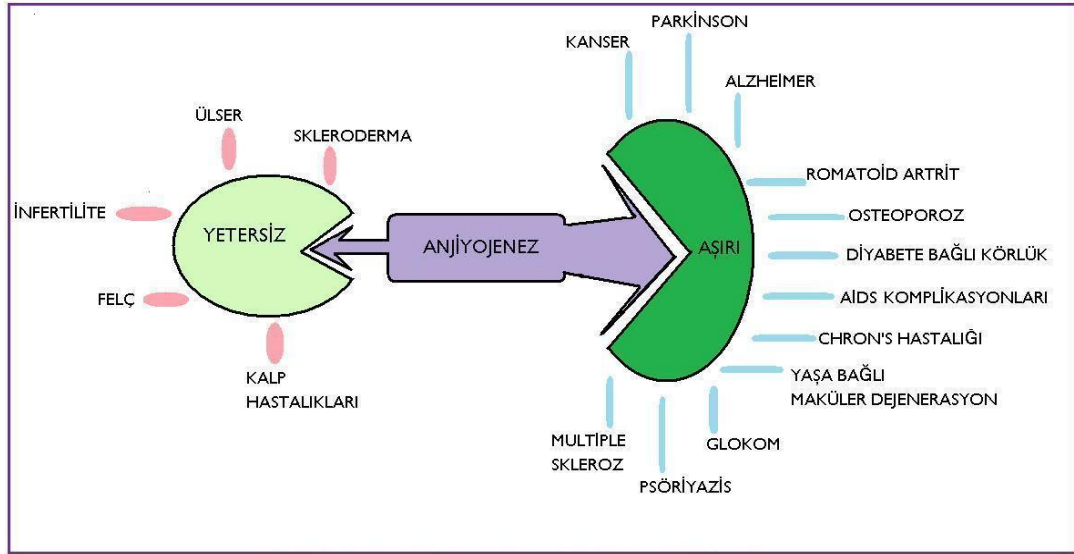
Bu düşüncelerden hareketle tez kapsamında bazı *Hypericum* türlerinin uçucu yağları kullanılmıştır. Bu uçucu yağların kimyasal kompozisyonlarının ve antianjiyojenik etkilerinin yanı sıra iritasyon profillerinin de belirlenmesi amaçlanmıştır. Etkinin belirlenmesinde bir *in vivo* anjiyojenez modeli olan koryon allantoik membran (CAM) modeli kullanılmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Anjiyojenezin Tanımı

Anjiyojenez terimi ilk olarak 17. yüzyılın sonunda İngiliz cerrah Dr. John Hunter tarafından “mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşumu” olarak tanımlanmış olup 1935 yılında ise patolog Dr. Arthur T. Hertig hamile maymun plasentasında anjiyojenezi tarif etmiştir (Ribatti, 2009).

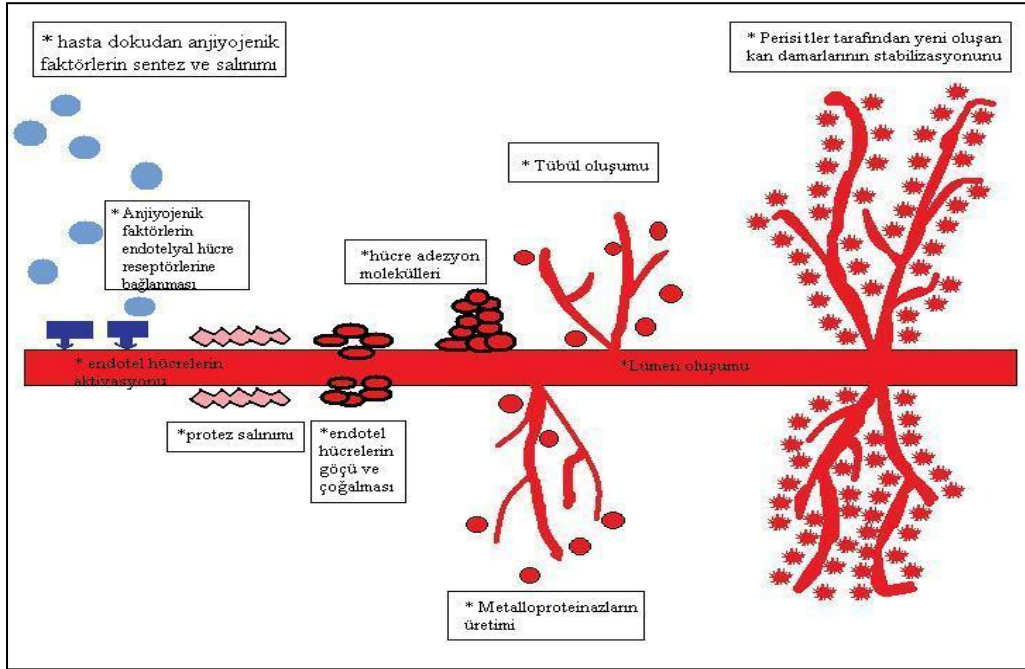
Anjiyojenez, vücutta fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Fizyolojik anjiyojenez, sağlıklı bir yetişkin vücudunda embriyogenezde yani plasenta oluşumunda, yara iyileşme sürecinde ve kadın üreme sisteminde örneğin korpus luteumun oluşması sırasında gözlenir. Patolojik anjiyojenez ise ateroskleroz, romatoid artrit, psöriyazis, kronik enflamasyon, enflamatuvar bağırsak hastalıklarında, tümör gelişimi ve metastazda (özellikle meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, rahim, serviks, glioblastom gibi çeşitli kanser türlerinde), juvenil hemanjiomda ayrıca yaşa bağlı maküler dejenerasyon, diyabetik retinopati gibi göz ve kardiyovasküler hastalıklarda ortaya çıkabilir (Paper, 1998; Ataerğın ve ark., 1999; Brower, 1999; Ribatti ve ark., 2000; Liekens ve ark., 2001; Konukoğlu ve Turhan, 2005; Sagar ve ark., 2006; Özgürtaş, 2009). Anjiyojenezin yetersiz ve aşırı olduğu durumlarda ortaya çıkan hastalıklardan bazıları **Şekil 1**'de verilmiştir.



Şekil 1. Anjiyojeneze Bağlı Hastalıklar

Yeni Kapiler Damarların Oluşumu

Anjiyojenez veya başka bir ifade ile neovaskülarizasyon, önceden var olan kan damarlarından endotel hücrelerinin aktivasyonu, adezyonu, göçü ve çoğalması gibi basamaklardan oluşan kompleks bir süreçtir (Paper, 1998; Ferrara, 2007). Ekstraselüler matriks (ECM) ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan birçok büyüme faktörü, sitokinler ve reseptörleri anjiyojenezde temel rol oynar. Bu sürecin temel hücreleri olan endotel hücreleri perisitler ile birlikte kapiler damar duvarlarını oluşturur ve ana damarları, dalları ve kapiler ağı oluşturan genetik bilgileri içerir (Konukoğlu ve Turhan, 2005). Sağlıklı, yetişkin bir organizmada endotel hücrelerinin döngüsü ve anjiyojenezi çok yavaş (3 aydan 1 yıla kadar) seyreder. Ancak yara iyileşme süreci, embriyogenez veya korpus luteumun oluşumu gibi sadece belli koşullardaki anjiyojenez çok kısa bir sürede gerçekleşir (Paper, 1998).



Şekil 2. Anjiyojenez Evreleri

Yeni kapiler damar oluşum süreci :

1. Bazal membranın proteolitik enzimlerle yıkılması,
2. Endotel hücrelerinin aktivasyonu, adezyonu, göçü ve çoğalması,
3. Kapiler oluşumu ve damar olgunlaşması basamaklarını kapsar.

1. Bazal membranın proteolitik enzimlerce degradasyonu:

Anjiyojenez; damar endotelini oluşturan kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan meydana gelen bazal membranın yıkımı ile başlar (Konukoğlu ve Turhan, 2005; Mc Donald, 2008). Belli koşullar altında endotel hücrelerini uyarmak üzere normal, hastalıklı ya da hasarlı hücre veya

dokulardan fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) gibi anjiyojenik uyarılar salınır. Salınan anjiyojenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yoluyla geçerler. Yakınlarında önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerindeki spesifik reseptörlere bağlanırlar ve böylece endotel hücrelerini uyarırlar. Sonrasında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Normal koşullarda tek tabaka halinde bulunan ve yayılma etkisi göstermeyen endotel hücreleri neovaskülarizasyon sırasında çoğalma ve yayılma gösterir. Uyarılmış endotel hücreleri proteazları (özellikle plazminojen aktivatörleri ve kollajenazları) salgılar. ECM ve parenteral kan damarlarının bazal membranı bu proteolitik enzimlerce yıkılır.

2. Endotel hücrelerin aktivasyonu, adezyonu, göçü ve çoğalması:

ECM'nin proteolitik enzimlerce yıkımından sonra aktive olan endotel hücreleri parçalanmış matrikse göç ederler. Sonrasında çoğu parçalanmış ECM'den salınan büyüme faktörleri tarafından uyarılan endotel hücreleri çoğalırlar (Liekens ve ark., 2001). Bu basamakta en etkili anjiyojenik faktör vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)'dür (Konukoğlu ve Turhan, 2005).

3. Kapiler oluşumu ve damar olgunlaşması:

Endotelyal proliferasyondan sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler parçalanma mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiler filizlenme oluşuktan sonra bu filizlenmenin ucunda yeni oluşan ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede ileri yayılımı mümkün olur. Bazal membranın yıkılması endotel hücre göçüne ve kapiler filizlenmeye izin verir. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası boşlukta lümenler gelişir. Sonrasında lümenlerden damarlar oluşur. Böylece ECM proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyonları ve inhibisyonları sonucunda yeni kapiler oluşumu gerçekleşir. Proteolitik yıkılma ve endotel hücrelerinin göçünden sonra yeni oluşmuş kapilerler bazal membranı oluştururlar. Endotel hücrelerinin yeni kapilerleri oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ECM'e tutunmaları gerekir. Yeni oluşan kapilerler olgunlaştıktan ve uygun anjiyojenez meydana geldikten sonra anjiyojenik faktörler azalır, antianjiyojenik faktörler artar. Böylece endotel hücreleri sessiz hale geçer ve kapilerler kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur (Konukoğlu ve Turhan, 2005).

Anjiyojenezin Mekanizmaları ve Medyatörleri

Anjiyojenez vücutta anjiyojenik uyarının yanı sıra endojen pro-anjiyojenik, anjiyostatik (Paper, 1998) yani antianjiyojenik (anjiyojenezi inhibe eden) özellikteki düzenleyici faktörler tarafından kontrol edilir (Özgürtaş ve ark., 2009). Bu düzenleyiciler ECM ve ECM'yi çevreleyen hücrelerden salınan VEGF veya Plasental büyüme faktörü (PGF) gibi büyüme faktörleri, İnterlökin-1 (IL-1) veya Prostaglandin E2 (PGE2) gibi sitokinler ve bunların reseptörleri (Konukoğlu ve Turhan, 2005), düzenleyici proteinler ve hücre adezyon molekülleridir (Paper, 1998). Anjiyojenez bu düzenleyici faktörler arasındaki denge ile fizyolojik durumlarda normal olarak gerçekleşir (Ribatti ve ark., 2000; Losso, 2003). Çoğunlukla hipoksi kaynaklı (Ataergin ve ark., 1999) patolojik durumlarda bu denge bozulur; vücutta anjiyojenik faktörlerin seviyesinin artışı veya aktivasyonu, anjiyojenez inhibitörlerinin seviyesinin azalması veya inaktivasyonu sonucu anjiyojenez başlar (Paper, 1998).

Anjiyojeneze Bağlı Hastalıklar

Anjiyojenez kontrol mekanizmalarının işleyişi metabolik stres (hipoglisemi, düşük pH, dokularda O₂ basıncının düşmesi yani hipoksi durumu), mekanik stres (çoğalan hücrelerin yaptığı basınç), immün/enflamatuvar cevap ve genetik mutasyon (onkojenlerin aktivasyonu veya anjiyojenez düzenleyicilerin üretimini kontrol eden tümör baskılayıcı genlerin silinmesi gibi) gibi sinyallerle bozulduğunda anjiyojenez yanlış zamanda veya yanlış dokuda aktive olur (Carmeliet ve Jain, 2000). Yeni kapiler damarlar patolojik olarak gelişir ve anjiyojeneze bağlı hastalıklar ortaya çıkar (**Şekil 1**). Romatoid artrit, sedef hastalığı ve kanser gibi patolojik durumları da kapsayan bu hastalıklarda antianjiyojenik faktörlerin eksikliği ve anjiyojenik faktörlerin aşırı üretimi söz konusudur. Patolojik anjiyojenez, göz rahatsızlıklarının ana nedeni olabilir; (örneğin; korneanın neovaskülarizasyonu körlüğe yol açabilir) katı tümörlerin gelişiminde rol oynayabilir (Paper, 1998; Folkman, 2003; Ribatti, 2009). Hastalıklı dokular fazla miktarda anjiyojenez uyarıcı faktör salgıarlarsa vücut bu dokuların gelişimi için daha fazla kan damarı üretir ki bu durumda aşırı anjiyojenez meydana gelir. Diğer taraftan eğer vücut yeterli anjiyojenik faktör üretemez veya aşırı anjiyojenez inhibitörü üretirse yetersiz anjiyojenez gerçekleşir. Yetersiz anjiyojenez koroner arter ve iskemik kalp rahatsızlıkları gibi komplikasyonlara neden olabilir (Yew ve ark., 2004). İskemik kalp rahatsızlıklarında endotel hücrelerinin fonksiyonu bozulur dolayısıyla revaskülarizasyon gerçekleşemez ve iyileşme gecikir. Ayrıca rejenerasyon bozulur. Anjiyojeneze bağlı patolojilerde anjiyojenik düzenleyicilerin rolü şüphesiz büyüktür. Örneğin VEGF vasküler aktivitenin yanı sıra sinir hücreleri, akciğer epitel hücreleri ve kalp kası lifleri için önem teşkil etmektedir. Yetersiz VEGF düzeyleri sinirlerde dejenerasyona yol açar, solunum zorluğuna ve kalp yetmezliğine neden olur (Carmeliet, 2005). Anjiyojeneze bağlı patolojiler yeniden damarlanmanın oluşup oluşmamasına göre iki sınıfa ayrılabilir: ‘neo-plastik hastalıklar’ ve ‘neo-plastik olmayan hastalıklar’dır. Neo-plastik hastalıklar adından da anlaşılacağı üzere neo-vaskülarizasyon yani yeniden damarlanmanın temel süreç olduğu tümör anjiyojenezini kapsayan hematolojik habis tümörler ve hemanjiyomalardır. Neo-plastik olmayan hastalıklarda neo-plastik hastalıkların aksine yeniden damarlanma söz konusu değildir sadece damarlar yeniden düzenlenir. Alzheimer, diyabet anjiyojeneze bağlı neo-plastik olmayan hastalıklara örnektir. Konu ile ilgili olmasından dolayı burada sadece tümör anjiyojenezi ve metastazdan bahsedilmiştir.

Tümör Anjiyojenezi ve Metastaz

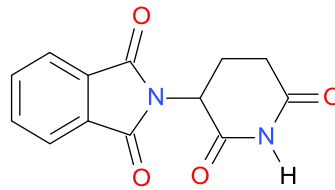
Yaklaşık yüz yıl önce tümör içerisinde yeni damar gelişiminden bahsedilmiştir. Ancak o dönemde yeni damarların oluşmasının tümör metabolitlerine bağlı basit bir dilatasyon olduğu düşünülmüş ve tümör hiperemisi olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda tümör nakillerinde oluşan yeni damarların konakçı damarlardan köken aldığı yani anjiyojenez kaynaklı olduğu görülmüştür (Konukoğlu ve Turhan, 2005). 1971’de ise Judah Folkman ‘tümör gelişimi anjiyojeneze bağlıdır ve anjiyojenezin inhibisyonu terapötik olabilir’ hipotezini ortaya atmıştır (Folkman, 1990; Ferrara ve Kerbel, 2005; Konukoğlu ve Turhan,

2005; Ribatti, 2008). Yine 1976'da Gullino pre-kanseröz dokularda hücrelerin kanseröz niteliği, belli bir anjiyojenik kapasiteye sahip olarak kazandıkları hipotezini ortaya atmıştır. Daha sonraları bu hipotez genetik yaklaşımlarla desteklenmiştir (Carmeliet ve Jain, 2000). Seksenli yılların ortalarında tüm deneysel bulgular tümör gelişiminin anjiyogeneze bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca anjiyogenezin metastazı kolaylaştırdığı varsayımı deneysel ve klinik kanıtlarla ortaya konmuştur (Konukoğlu ve Turhan, 2005). Metastaz, kötü huylu tümör hücrelerinin (kanserli hücreler) salgıladığı enzimle etrafındaki kapsülü eriterek damarı geçmesi, dolaşıma katılması ve vücudun herhangi bir yerinde tekrar yerleşip çoğalabilmesi olayıdır ve tümör gelişiminin son basamağıdır (Liekens ve ark., 2001). Tümör hücreleri ancak metastaz yaparak gelişip yayılabilmektedir. Özetle anjiyogenez olmaksızın katı tümörler gelişemez ve primer tümörlerden metastatik tümörler oluşamaz yani tümör gelişimi ve metastazı anjiyogeneze bağlı bir olaydır. 0.5 mm³'den daha küçük tümörler oksijen ve besin gereksinimini difüzyonla karşılayabilirken, büyüklüğü 0.5 mm³'ün üzerine çıkınca anjiyogeneze bağımlı hale gelir (Konukoğlu ve Turhan, 2005). Tümörün neovaskülarizasyonu daha önce anlatılan anjiyogenez oluşum basamaklarında gerçekleşir ve anjiyojenik düzenleyici faktörler arasındaki dengeyle kontrol edilir (Paper, 1998). Anjiyogenez uyarıcı ve inhibe edici faktörler arasındaki denge bozulur. Bu dengenin bozulmasında tümör ve endotel hücreleri temel rol oynar (Konukoğlu ve Turhan, 2005). Tümör hücrelerinde yeni kapiler oluşumu bir veya daha fazla anjiyojenik uyarının sentezlenmesi sonucu, makrofajlarca ya da hücre adezyon moleküllerinin artışı sonucu uyarılır (Paper, 1998). Fizyolojik anjiyogenezde olduğu gibi patolojik anjiyogenezde de hipoksi anjiyojenik süreci uyarıcı başlıca etkidir. Yine *v-ras*, *K-ras* gibi çeşitli onkojenler VEGF gibi anjiyojenik faktörlerin salınımını uyarır ve böylece sitokinlerin ve proteolitik enzimlerin üretimi artar. Hatta onkojenler kendileri anjiyojenik faktör gibi davranabilirler (Liekens ve ark., 2001). Folkman'a göre ise yeniden damarlanmayı esas olarak tümör hücresinin salgıladığı tümör anjiyogenez faktörleri uyarmaktadır (Ribatti, 2008).

Antianjiyogenez

Spesifik anjiyogenez inhibitörlerinin varlığından ilk olarak 1971'de Folkman söz etmiştir. Bu bölümde CAM aktivite deneyinde standart madde olarak kullanılan etkili antianjiyojenik bir bileşik olan talidomit ile ilgili kısaca bilgi verilmiştir.

Talidomit



Şekil 3. Talidomit

Bu bileşik ilk olarak 1950'lerde Chemie Grunenthal tarafından sedatif bir ilaç olarak geliştirilmiştir. Talidomit insanlarda kol ve bacaklarda noksanlık ile seyreden Dismelia hastalığına neden olan etkili bir teratojendir. 1961'de McBride ve Lenz bebeklerde görülen organ hasarlarının talidomit'in anne adayları

tarafından kullanımına bağlı olduğunu açıklamışlardır (D'Amato ve ark., 1994; Sauer ve ark., 2000). 1994'te ise D'Amato talidomitin bir anjiyojenez inhibitörü olduğunu bildirmiştir (Ribatti, 2008). Ayrıca bazı hidroksillenmiş talidomit metabolitlerinin anjiyojenezi inhibe ettiği rapor edilmiştir (Marks ve ark., 2002).

Antianjiyojenezde Bitkisel Kaynaklı Doğal Aktif Bileşiklerin ve Fonksiyonel Gıdaların Rolü

Antik çağlardan beri şüphesiz bitkiler birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmışlardır. Bitkilerden güvenilir ilaçların elde edilmesi çok uzun ve kronik hastalıkların multifonksiyonel doğası nedeniyle zor bir süreçtir. Buna rağmen bitki kaynaklı yeni ilaç keşfi başarılı bir tarihe sahiptir. *Spirea ulmaria* bitkisinden salisilik asitin izolasyonunu takiben 1897'de Felix Hoffmann'ın aspirini sentezlemesi, 1972'de *Artemisia annua*'dan antimalaryal ilaç artemisinin elde edilmesi, *Taxus brevifolia*'dan taksol'ün izolasyonu bu başarılı keşiflerden yalnızca bir kaçıdır. Çok sayıda bitki anjiyojenezi düzenleyici özelliğe sahip aktif bileşikler içerir. Taksol, vinkristin, vinblastin, kolşisin gibi bir çok bitkisel kaynaklı ilaç antianjiyojenik etkiye sahiptir (Fan ve ark., 2006). Bazı bitkisel kaynaklı anjiyojenik ve antianjiyojenik bileşikler ve elde edildikleri bitkiler **Çizelge 1**'de verilmiştir.

Bitkisel kaynaklı antianjiyojenik fonksiyonel gıdalar sistemik olarak alındığında düşük dozlarda toksisiteye yol açmazlar ve antianjiyojenik özelliklerinden dolayı dejeneratif hastalıkların önlenmesinde kullanılırlar. Soya filizi, yeşil çay, kırmızı üzüm bitkisel antianjiyojenik fonksiyonel gıdalardan bir kaçıdır (Fan ve ark., 2006).

Çizelge 1. Bitkisel Kaynaklı Bazı Anjiyojenik ve Antianjiyojenik Bileşikler

Anjiyojenik Bileşikler		
Elde edildiği bitki	Bileşik	Kaynak
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenzit Rg 1	Yue ve ark., 2005; Fan ve ark., 2006
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenzit Re	Fan ve ark., 2006
<i>Vitis spp.</i>	Rezveratrol	
<i>Aloe vera</i>	β - Sitosterol	
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Salvianolik asit B	
Antianjiyojenik Bileşikler		
<i>Camellia sinensis</i>	EGCG (Epigallokateşin-3-gallat)	Oak ve ark., 2005; Fan ve ark., 2006; Mojzis ve ark., 2008
<i>Vitis ssp.</i>	Rezveratrol	Oak ve ark., 2005; Fan ve ark., 2006

Çizelge 1. (Devam) Bitkisel Kaynaklı Bazı Anjiyojenik ve Antianjiyojenik Bileşikler

Elde edildiği bitki	Bileşik	Kaynak
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin ve deoksoartemisinin türevleri	Oh ve ark., 2004; Jung ve ark., 2006
<i>Sinomenium acutum</i>	Sinomenin	Fan ve ark., 2006
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	İsolikuiritin	Paper, 1998; Fan ve ark., 2006
<i>Panax ginseng</i>	Rb 1, Rb 2, Rg 3 ginsenositler	
<i>Vinca rosea</i>	Vinkristin	Fan ve ark., 2006
<i>Taxus brevifolia</i>	Taksol	Belotti ve ark., 1996; Fan ve ark., 2006
<i>Camptotheca acuminata</i>	Kamptotesin	Fan ve ark., 2006
<i>Combretum caffrum</i>	Kombretastatin	
<i>Glycine max</i>	Genistein	
<i>Glycine max</i>	Daidzein	Losso, 2003
<i>Castanospermum australe ve Alexia leipetala</i>	Kastanospermin	Paper, 1998
<i>Magnolia salicifolia</i>	Magnosalin ve magnoshinin	
<i>Citrus ssp.</i>	Apigenin, kersetin, naringenin	Losso, 2003
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Kampesterol	Choi ve ark., 2007
<i>Silybum marianum</i>	Silibinin ve silimarin	Yang ve ark., 2005; Sagar ve ark., 2006
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Baikalin ve baikalein	Liu ve ark., 2003
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolit B	Sagar ve ark., 2006
<i>Curcuma longa (Turmeric)</i>	Kurkumin	Losso, 2003; Liu ve ark., 2008
<i>Magnolia officinalis</i>	Honokiol	Bai ve ark., 2003; Sagar ve ark., 2006

Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, ılıman ve tropikal ülkelerde yetişen aromatik bitkilerde yaygın olarak bulunurlar ve bu ülkelerin geleneksel farmakopelerinin önemli kısmını oluştururlar. Fiziksel olarak nadiren renkli olup yağda ve organik çözücülerde çözünürler. Yoğunlukları tarçın ve karanfil yağı hariç suyunkinden küçüktür. Aromatik (kokulu) bitkilerin yaprak, çiçek, meyve, tohum, kök ve odun gibi

değişik kısımlarından su distilasyonu, buhar distilasyonu, su-buhar distilasyonu veya kuru distilasyon, nadide çiçek petallerinden sabit yağ yardımıyla uçucu yağın elde edilmesi olarak ifade edilen anfloraj, sıkma, ekstraksiyon veya fermentasyon gibi tekniklerle elde edilen, kokulu bileşiklerin karışımından oluşan sekonder metabolit grubudur. Bitkiyi zararlılara (böcekler), mikroorganizmalara (fungus, bakteri, virüs) veya ışığa karşı koruma, böcek veya kuşları bitkiye çekerek tozlaşmaya yardımcı olma ve allelopati gibi çeşitli fizyolojik amaca hizmet ederler. Genel olarak terpenoit veya hidrokarbon karakterde uçucu bileşikler içerirler. Uçucu yağın bileşimi, kalitesi, farmakolojik özellikleri ve bileşimindeki her bir maddenin oranı izole edildiği bitki kısmına, bitkinin yetiştiği bölgeye, iklim değişimlerine, hasat zamanına ve ekstraksiyon tekniğine göre değişir. Uçucu yağlar eski çağlardan bu yana birçok medeniyet tarafından tedavi edici özelliklerinden dolayı kullanılmışlardır. Günümüzde sahip oldukları biyoaktif etkilerden dolayı tedavideki önemleri giderek artmaktadır. Bu biyoaktif özelliklerin arasında en önemlileri; antioksidan, antikarsinojenik, antiviral, antienflamatuvar, antimikrobiyal, analjezik, sedatif ve spazmolitik etkileridir. Yine günlük yaşamda tüketilen gıdalarda tat verici veya koruyucu, kozmetik ürünlerde özellikle parfümlerde ve aromaterapide kullanılmaktadır (Başer ve Demirci, 2007; Edris, 2007; Bakkali ve ark., 2008; Wei ve Shibamoto, 2009; Baser ve Buchbauer, 2009). Konu ile ilgili olmasından dolayı bu bölümde uçucu yağların antikanser ve antienflamatuvar etkilerinden söz edilmiştir.

Antikanser Etkileri: Uçucu yağlar; hastalıklara karşı koruma, hastalıkları önleme ve tedavi etme özelliği olan bileşikleri içerir. Karsinogenin başlangıç safhasında vücudu karsinogenin DNA ile etkileşimlerine karşı korurlar ki bu kemopreventif etkilerini ifade eder. Karsinogenin gelişim safhasında tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederek, tümörün ölümüne ve tümör hücre farklılaşmasına neden olan etkileri önler bu da uçucu yağların kemoterapötik etkisi olarak tanımlanır (Edris, 2007; Bakkali ve ark., 2008; Wei ve Shibamoto, 2009). Çoğu kanser kemoterapisi uygulamalarında hücre çoğalmasını inhibe etmeyi hedefleyen sitotoksik ajanlar kullanılmaktadır. Seçici olmayan bu ilaçlar vücutta çoğalma özelliği yüksek olan bazı dokularda (kemik iliği veya mide-barsak kanalı gibi) normal hücreler üzerinde yan etkilere neden olmaktadır. Bu yan etki profili sitotoksik ilaçların kullanımını sınırlamaktadır. Etki mekanizmaları bu ilaçlardan tamamen farklı olan uçucu yağlar kanser tedavisinde ve antikanser aktivite çalışmalarında büyük bir öneme sahiptir (Edris, 2007; Wei ve Shibamoto, 2009). Yapılan bir çalışmada uçucu yağlardaki izoprenoitlerin özellikle monoterpenlerin tümör dokularına karşı etkili oldukları bildirilmiştir. Parfümlerde sıkça kullanılan *Santalum album* (Sandal ağacı) yağının ve *Ocimum basilicum* (Fesleğen) yağının antikanser aktivitesi çalışılmıştır. Bir başka çalışmada kekik yağının antitümör etkinliği tespit edilmiştir (Wei ve Shibamoto, 2009). Aktivite çalışmalarında uçucu yağın bütünü test edildiği gibi bileşiminde bulunan aktif bileşikler de test edilmiştir. Örneğin pek çok uçucu yağda bulunan sitralin, *Matricaria chamomilla* (Tıbbi papatya) uçucu yağının ana bileşiği olan seskiterpen alkol yapısındaki α -bisabolol'un, *Eucalyptus globulus* (Ökalyptus) uçucu yağında bulunan 1,8-sineol'un antikanser aktivite deneyleri sonucunda etkili oldukları bildirilmiştir (Edris, 2007).

Antienflamatuvar Etkileri: Enflamasyonun hipertansiyon, kanser, felç gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Uçucu yağlar antienflamatuvar etkiye sahip aktif bileşikler içerirler. Tarçın yaprağı uçucu yağında bulunan sinnamaldehit ve *Eucalyptus globulus* (Ökalyptus), *Melaleuca alternifolia* (Çay ağacı), *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) uçucu yağlarında bulunan 1,8-sineol antienflamatuvar etkili bileşiklerdir (Wei ve Shibamoto, 2009).

Anjiyojenez Araştırmalarında Kullanılan Deney Modelleri

Anjiyojenik reaksiyonların hücresel düzeyde karmaşık prosesleri içermesi, doku ve moleküllerin heterojenitesi nedeniyle anjiyojenez araştırmalarında tek bir ölçüm yöntemi optimum seviyede beklentileri karşılayamayabilir. Bu nedenle bir çok *in vitro* ve *in vivo* anjiyojenez deney modeli önerilmektedir (Norrby, 1997; Vailhé ve ark., 2001; Ucuzian ve Greisler, 2007; Shiba ve ark., 2008; Özgürtaş, 2009). Bu modeller hem proanjiyojenik hem de antianjiyojenik ajanların etkinliğinin test edilmesine yardımcı olur. *in vitro* deneyler hızlı sonuç verir, ölçüm yapmaya olanak tanır ancak pahalıdır, valide edilmeleri zordur, sonuçlarının çok dikkatli yorumlanması gerekir (Auerbach ve ark., 2003) ayrıca *in vivo* etkinin ne olacağını tam olarak göstermez (Özgürtaş, 2009). *in vivo* deneyler ise daha uzun zaman gerektirir ve ölçüm yapmak daha zordur (Auerbach ve ark., 2003). Bu deneylerin bir kısmı tarama amaçlı yapılırken bir kısmı da doz, etkinlik, moleküler düzeyde yapı-aktivite ilişkisi ve birçok ajanın anjiyojenez üzerinde kombine etkilerini araştırmak için kullanılmaktadır (Özgürtaş, 2009).

İdeal anjiyojenez araştırma modelleri şu ihtiyaçları karşılamalıdır (Özgürtaş, 2009) :

-Yeni damar oluşumunun vasküler uzunluk, hacim, damar ağındaki damar sayısı, bazal membran genişliği gibi kantitatif ölçümlerine ve yeni damarın fonksiyonel karakteristiklerinin (endotel hücresinin göç ve çoğalma oranı, tüp oluşum oranı, kan akım oranı gibi) ölçümüne olanak sağlamalıdır.

-Yeni oluşan damarlar daha önceden var olan damarlardan kolayca ayırt edilebilmelidir.

-Doku hasarından kaçınılabilmelidir.

-Herhangi bir *in vitro* modelde alınan yanıt *in vivo* olarak da gösterilebilmelidir.

-Uzun süreli görüntülemeye olanak sağlamalıdır.

-Anjiyojenik/antianjiyojenik ajanın salıverilme oranı önceden tahmin edilebilmelidir.

-Ucuz, hızlı ve kolay uygulanabilir, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntem olmalıdır.

Başlıca *in vitro* modeller şunlardır:

-Hücre çoğalmasına dayalı modeller

-Hücre göçüne dayalı modeller

-Tüp oluşumuna dayalı modeller

-Organ kültürü deneyleri (Auerbach ve ark., 2003)

in vivo modeller ise:

- Tavşan kornea modeli (Micropocket)
- Rodent mezenter modeli
- Matrijel ve klasik tümör modeli
- Zebra balık (zebrafish) modeli (Özgürtaş, 2009)
- Sünger (sponge) implant modeli (Ribatti ve ark., 2006)
- Cıvıv koryon allantoik membran (CAM) modeli (Özgürtaş, 2009)

***in vitro* Modeller**

- Hücre Çoğalmasına Dayalı Modeller

En sık kullanılanı Timidin birleşme yöntemidir (Thymidine incorporation assay). Model; sıgır aort endotel hücrelerinin (BAE) proliferasyonunun inhibisyonu, kemik iliği kaynaklı stroma hücrelerinin (S17) inhibisyonu ve miyokard (kalp kası) kaynaklı mikrovasküler endotel hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonu olmak üzere üç farklı testten oluşur. Testler antianjiyojenik olduğu düşünülen inhibitör maddelerin hücre çoğalmasını baskılaması esasına dayanır. Bu modellerde iki tip endotel hücresi kullanılır. Bunlar sıgır aort endotel hücreleri ile insan göbek bağı (umbilikal) endotel hücreleridir. Literatüre göre sadece farklı türdeki damarlardan gelen endotel hücreleri değil farklı organ kaynaklı endotel hücrelerinin hatta aynı organa ait farklı bölgelerden gelen endotel hücrelerinin kendilerine has özellikler taşıdığı bilinmektedir. Ayrıca endotel hücrelerinin *in vivo* koşullarda bazı özellikler kazanabildikleri ya da kaybedebildikleri bilinmektedir. Laboratuvar koşullarında test edilen bu çoğalan hücrelerin gerçekte buldukları *in vivo* koşullarda verecekleri cevaptan farklı tepki verebilme olasılıkları yüksektir.

- Hücre Göçüne Dayalı Modeller

Endotel hücrelerinin anjiyojenik veya antianjiyojenik faktörlere karşı verdiği göç cevabının test edildiği birçok *in vitro* model mevcuttur. En çok kullanılanı Kemotaksi kaynaklı göç (blind-well chemotaxis chamber) deneyidir.

- Tüp Oluşumuna Dayalı Modeller

Endotel hücrelerinin üç boyutlu yapılar (tüp) oluşturma yeteneklerinin ölçümüne dayalı testleri içerirler. Kaynağı ne olursa olsun bütün endotel hücreleri ECM varlığında *in vitro* koşullarda tüp oluşturma yeteneğine sahiptirler. Tüp oluşumu elektron mikroskobu ile tespit edilebilir.

- Organ Kültürü Deneyleri

Bu modeller *in vivo* koşullarda anjiyogenezin sadece endotel hücreleri ile değil aynı zamanda endotel hücrelerine komşu hücrelerle de ilişkili olması düşüncesinden hareketle geliştirilmiştir. En yaygın kullanılanı sıçan aort halkası (rat aortic ring) modelidir. Yine cıvıv aort halkası (chick aortic ring) modeli, rat aortic ring modeline alternatif olarak bu modelin modifiye edilmesiyle geliştirilmiş bir yöntemdir. Laboratuvar hayvanlarının kullanılmadığı, 1-3 günde hızlı sonuç veren ve serumsuz medium kullanılarak uygulanan bir yöntemdir (Auerbach ve ark., 2003).

in vivo Modeller

in vivo modeller arasında anjiyojenik cevabın kantitatif ölçümüne imkan veren, uygulanması en kolay ve tekrarlanabilir sonuç veren yöntemlerin CAM ve tavşan kornea yöntemlerinin olduğu kabul edilmektedir. Tarama amaçlı ve en çok kullanılanları ise yine CAM, tavşan kornea yöntemi ile matrijel modelleridir (Özgürtaş, 2009).

Tavşan kornea yöntemi; korneanın damarsız bir yapı olması nedeniyle daha önce de belirtildiği gibi en iyi *in vivo* modellerden biridir. Korneanın anjiyojenik uyarıcı doku veya faktörlerce uyarılması sonucu yeni damarların oluşumu esasına dayanır. Fare korneasının da kullanıldığı yöntemler mevcuttur. Kornea modellerinin en büyük avantajlarından biri anjiyojenezin görüntülenmesinin daha kolay olmasıdır yani yeni damar oluşumu korneanın damarsız yapısı nedeniyle daha sağlıklı olarak görüntülenebilmektedir.

Matrijel ve klasik tümör modeli uygulanması ise daha zor bir yöntemdir. Test hücreleri veya maddelerini içeren matrijel (bazal membranca zengin ekstrasellüler matriks) subkütan olarak enjekte edilir ve katılaşması beklenir. Kan damarlarının katılaştıran dolguya ulaşması 7-21 günü bulur (Auerbach ve ark., 2003).

CAM Modeli

50 yıldan daha uzun bir süre önce embriyologlar tarafından geliştirilmiş bir yöntem olup embriyonik araştırmalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir (Auerbach ve ark., 2003). 1956'dan bu yana kanser ve metastaz araştırmalarında kullanılmaktadır. 1976'da Folkman tarafından anjiyojenez çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. CAM, koryon ve allantoisin dört günlük inkübasyonu sonucunda birleşmesi ile oluşan embriyo dışı bir membran olup (Ribatti ve ark., 2000) hem anjiyogenez hem de antianjiyojenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Özgürtaş, 2009). Cıvciv embriyosu ile embriyo dışındaki alan arasında gaz alışverişini sağlar (Ribatti ve ark., 2000) ve atık ürünler için mesane görevi görür (Özgürtaş, 2009). Kabukla direkt temas halinde kapiler damar ağından oluşan bir yapıya sahiptir (Ribatti ve ark., 2000). CAM'da anjiyojenez safhaları, erken faz (5. günden 7. güne kadar), ara faz (8. günden 12. güne kadar) ve geç faz (12. veya 13. günden itibaren) olmak üzere üç safhadan oluşur. Erken fazda kapiler ağ filizlenmeye başlar. Ara fazda mikrovasküler ağda gelişim öne çıkar ve filizlenme bu aşamada sona erer. Son fazda ise koryonallantoik ögeler tam bir koruyucu membrana dönüşür ve genişlemesini tamamlar. (Özgürtaş, 2009). Vasküler sistemin düzenlenmesi 18. günde sona erer (Ribatti ve ark., 2000).

in ovo (yumurta içinde) ve *in vitro* olmak üzere iki CAM metodu bulunmaktadır. En çok kullanılan yöntem test maddelerinin membran üzerine kabukta açılan bir pencere vasıtasıyla uygulanmasını esas alan *in ovo* yöntemidir (Ribatti ve ark., 2000). Bu yöntemde cıvciv yumurtaları sabit nemde ve 37 °C'de üç gün süreyle inkübe edilirler. 3. gün 2-3 ml albumin ve üst kısımdaki kabuk yumurtadan uzaklaştırılır. Daha sonra açılan kısım streç film ile kapatılarak test maddesinin uygulanacağı güne kadar aynı şartlarda inkübasyona bırakılır (Ribatti ve ark.,

2000). *in vitro* modelde inkübasyon süresinin 3. veya 4. gününde embriyo ve embriyoyu çevreleyen membranlar bir petri kabına alınır ve test maddeleri membran üzerine *in vitro* koşullarda uygulanır (Ribatti ve ark., 2000; Auerbach ve ark., 2003).

Deneylemlerin sonuçlarına çok kısa sürede ulaşmak mümkündür. Çalışmaların sonuçları gözle rahatlıkla değerlendirilebildiği gibi uygun şartlarda fikse edilen preparatlarda ışık mikroskobundan elektron mikroskobuna kadar değişik duyarlılıkta histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılabilir. Ayrıca fikse edilmeyen örneklerde DNA ve kollojen ölçülmesi mümkün olduğu gibi istenirse gen ekspresyonunun gösterilmesi amacıyla ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) çalışılabilir.

Test materyalinin uygulanmasından sonra değerlendirmelerin eğer anjiyojenik bir ajan deneniorsa 72-96 saat sonra; antianjiyojenik bir ajan deneniorsa 48 saat sonra yapılmasının uygun olduğu kabul edilmektedir (Özgürtaş, 2009).

CAM modeli, maddelerin antianjiyojenik, antiinflamatuvar, antiirritan özellikleri hakkında bilgi veren ayrıca olası membran irritasyonu, dekompozisyonu, koagülasyonu ve toksisitesi gibi özelliklerini de ortaya koyan bir yöntemdir. Uçucu yağların da aralarında bulunduğu doğal maddelerin, kozmetiklerin ve diğer kimyasalların test edilebildiği hayvan alternatifi bir yöntemdir. Saf maddelere uygulanabildiği gibi kompleks bitkisel ekstraktlara da uygulanabilmektedir. (Demirci ve ark., 2004; Demirci ve ark., 2005). Model kanser davranışlarının ortaya konmasında (Özgürtaş, 2009), tümör metastaz çalışmalarında (Cimpean ve ark., 2008), biyomateryallerin anjiyojenik özelliklerinin incelenmesinde (Azzarello ve ark., 2007; Özgürtaş, 2009), fotodinamik tedavi yaklaşımlarında yaygın kullanılır (Debefve ve ark., 2008; Özgürtaş, 2009). Ayrıca temel tıp branşları dışında göz branşı tarafından da yeni cerrahi aletlerin ve tekniklerin uygulanmasında, damar kanül ve enjeksiyon tekniklerinin araştırılmasında, anjiyografik çalışmalarda, endoskopik cerrahi uygulamalarda da rahatlıkla kullanılabilir (Leng ve ark., 2004; Özgürtaş, 2009). CAM modelinin avantajları ve dezavantajları **Çizelge 2**'de verilmiştir (Özgürtaş, 2009).

Uçucu Yağlar ve Uçucu Bileşikler Üzerinde Yapılan CAM Aktivite Çalışmaları

Uçucu yağlar ve uçucu bileşikler üzerinde yapılmış olan CAM aktivite çalışmalarının sayısı oldukça azdır.

Lavanta, nane gibi bir çok bitkinin uçucu yağında bulunan ve bir monoterpen olan perilla alkol'ün *in vivo* civciv koryon allantoik membran modelinde yeni damar gelişimini önlediği bildirilmiştir (Loutrari ve ark., 2004).

Demirci ve ark. (2003) tarafından *Phlomis linearis* Boiss. & Ball. uçucu yağının civciv koryonallantoik membran üzerinde biyolojik aktivitesi araştırılmış ve 100 µg/pellet konsantrasyonda hiçbir antianjiyojenik, toksik ve iritan etkinin gözlenmediği bildirilmiştir.

Demirci ve ark. (2004) tarafından *Origanum onites* L. uçucu yağının, ana bileşikleri karvakrol ve timol'ün ayrıca bunların metil eter türevlerinin antianjiyojenik etkileri CAM üzerinde araştırılmış ve uçucu yağ ve bileşenlerinin

10-250 µg/pellet konsantrasyonda antianjiyojenik etki göstermediği ancak uçucu yağda bulunan timolün iritasyona neden olduğu bildirilmiştir.

Yine bir diğer çalışmada *Salvia hedgeana* Dönmez, *Salvia huberi* Hedge, *Salvia pisidica* Boiss. & Heldr. ex Bentham. uçucu yağlarının CAM üzerindeki aktivitesi araştırılmış ve uçucu yağların 100 µg/pellet konsantrasyonda hiçbir antianjiyojenik, iritan ve toksik etki göstermediği bildirilmiştir (Demirci ve ark., 2005).

Demirci ve ark. (2006) tarafından *trans*-nerolidol ve *cis*-nerolidol'ün civciv koryon allantoik membran üzerindeki etkileri araştırılmış ve *cis*-nerolidol'ün 100 µg/pellet konsantrasyonda zayıf antianjiyojenik etki gösterdiği bildirilmiştir.

Kumar ve ark. (2009) tarafından allil izotiyosiyanat (AITC) içeren hardal uçucu yağının antianjiyojenik ve proapoptotik etkileri araştırılmış ve AITC'ın CAM üzerinde yeni damar oluşumunu inhibe ederek antianjiyojenik etki gösterdiği bildirilmiştir.

Çizelge 2. CAM Modelinin Avantajları ve Dezavantajları

Avantaj	Dezavantaj
-Basit bir tekniktir	-CAM oksijen değişikliklerine hassastır dolayısıyla kabuk kırıldıktan sonra havayla temasın çok iyi bir şekilde önlenmesi ve izolasyonu sağlanmalıdır
-Ucuzdur	-Yeni damar oluşumunun ayırt edilmesi güçtür
-Yumurtaların temini kolaydır	-Fiziksel veya kimyasal travma sonucu oluşan hücrel hasarın neden olabileceği non spesifik enflamatuvar reaksiyonlar yaygındır (kırık kabuk parçaları iritasyona neden olabilir)
-Geniş taramalar için uygundur	-Memeli olmayan bir modeldir
-Sonuçları kolay ve hızlı değerlendirilebilir	-Metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan ilaç çalışmaları için uygun değildir
-Memeli ksenograflarla uyumludur	-Embriyo üzerinde çalışılır
-Hayvan etik kurul onayı gerektirmez	
-Cerrahi girişimler için oldukça uygundur	
-Güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir	
-Özellikle kozmetiklerin etkinliğinin ve iritasyon profillerinin belirlenmesinde kullanılan ve çok sayıda hayvanın ölümüyle sonuçlanan <i>in vivo</i> hayvan deneylerine alternatiftir	

***Hypericum* Cinsinin Genel Botanik Özellikleri**

Clusiaceae familyasına ait *Hypericum* cinsi dünyanın bütün ılıman iklim bölgelerinde yetişen ağaç formunda, çalimsı ve otsu yaklaşık 450 bitki türü ile temsil edilmektedir (Ernst, 2003). Türkiye’de ise 43’ü endemik olmak üzere 89 tür yetişmektedir (Davis, 1982 ve 1988; Güner ve ark., 2000).

Hypericum türleri Türkiye’de halk arasında ‘kantaron, binbirdelik otu, kan otu, koyun kıran, kuzu kıran, kılıç otu, mayasıl otu, püren, sarı kantaron ve yara otu’ olarak bilinmektedir (Baytop, 1994).

Hypericum türlerinde antifungal, antimikrobiyal ve sitotoksik etkili bileşikler bulunmakta ve pekçok türü halk arasında ilaç olarak kullanılmaktadır (Bertoli ve ark., 2000). Dünyada St. John’s Wort olarak bilinen *Hypericum perforatum* L. çok araştırılan tür olup yaprakları ve çiçek durumları dahilen ekspektoran, kolagog, analjezik, astrenjan, antispazmodik, diüretik, stimülan, sedatif olarak haricen ise yara ve yanıklarda kullanılmaktadır (Bombardelli ve Morazzoni, 1995; Baytop, 1999; Anonymous, 2001; Hänsel ve Sticher, 2003). Ülkemizde *Hypericum* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksasyon dahilen mide spazmlarında ve kabızlık giderici olarak, haricen ise yara iyileştirici ve antiseptik özellikleri nedeniyle yanık tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Baytop, 1984).

Hypericum türlerinin kimyasal bileşimine bakıldığında çok sayıda farklı bileşik gruplarını içerdikleri görülmektedir. Ana grup, hiperisin, psödohiperisin ve bunların prekürsörleri olan protohiperisin ve protopsödohiperisini içine alan naftodiantronlardır. Hiperforin, adhiperforin ve bunların oksijenli türevleri de çok önemlidir. Ayrıca kimyasal bileşimlerinde ksantonlar (örneğin; 1, 3, 6, 7-tetrahidroksiksanton), flavonoidler (örneğin; rutin, hiperosit, kersitrin, izokersitrin), biflavonoidler, tanenler, proantosiyanidinler, fenolik asitler ve uçucu yağ bulunmaktadır (Ernst, 2003).

Uçucu yağlarında ise ana bileşenler hidrokarbonlar ve terpenoidler olarak tespit edilmiştir (Ernst, 2003; Bombardelli ve Morazzoni, 1995; Nahrstedt ve Butterweck, 1997). *Hypericum* türlerinin kimyası ve biyolojik aktiviteleri ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma yer almaktadır. *H. perforatum* L., *H. perforatum* L. var. *angustifolium* DC, *H. perforatum* L. subsp. *veronense* (Schrank) Ces., *H. perforatum* L. subsp. *perforatum*, *H. hircinum* L., *H. hyssopifolium* Chaix. subsp. *elongatum* (Ledeb.) Woron var. *elongatum* ve *H. hyssopifolium* Chaix. var. *microcalycinum* Boiss. et Heldr. türlerinin uçucu yağ bileşimi ile ilgili çalışmalar **EK 1**’de; *H. perforatum* L. türünün yara iyileştirici, antikanser ve antienflamatuvar aktivitesi ile ilgili çalışmalar ise **EK 2**’de çizelge şeklinde özetlenmiştir.

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Hypericum Türlerinin Uçucu Yağları

Tez kapsamında dört farklı *Hypericum* türünün çiçekli kısımlarından su distilasyonu yöntemiyle uçucu yağları elde edilmiştir. Çalışılan *Hypericum* türleri ve bu türlere ait toplanma bilgileri **Çizelge 3**'de verilmiştir. Bitkilere ait herbaryum örnekleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda (ESSE) saklanmaktadır.

Çizelge 3. Çalışılan *Hypericum* Türleri ve Toplanma Bilgileri

<i>Hypericum</i> Türü	Toplanma yeri	Toplanma tarihi	ESSE
<i>H. perforatum</i> L.	Tandır, Eskişehir	Mayıs 2008	14447
<i>H. hircinum</i> L.	Cebireis Dağı, Kızıltaş, Alanya	Mayıs 2008	14448
<i>H. confertum</i> Choisy	Çatacık Tohum Sahası, Eskişehir	Haziran 2008	14490
<i>H. hyssopifolium</i> Chaix. subsp. <i>elongatum</i> (Ledeb.) Woron var. <i>microcalycinum</i> (Boiss. & Heldr.) Boiss.	Kızılınler Sapağı, Eskişehir	Haziran 2008	14491

Aktivite Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agar	(Fluka, İspanya)
Suramin	(Sigma Aldrich, Almanya)
Kortizon	(Sigma Aldrich, Almanya)
Prednizon	(Sigma Aldrich, Çin)
(+)-Talidomit	(Sigma Aldrich, Almanya)
(-)- Talidomit	(Sigma Aldrich, Almanya)
(±)-Talidomit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	(Fluka Biochemika, Almanya)
% 70'lik Etil alkol	

Kullanılan Cihazlar

Clevenger apareyi	(İldam)
Gaz Kromatografisi	(Agilent 6890N GC)
Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi	(Agilent 5975 GC-MSD)
Su banyosu	(Nüve BM 302)
Isıtcılı manyetik karıştırıcı	(Heidolph MR 3001)
Vorteks	(Ika Genius 3)
Stereomikroskop	(Leica EC3)
İklimlendirme kabini	(Ing. Climas CIR / HR 1300)

Civciv Yumurtaları

Döllenmiş civciv yumurtaları Has Tavuk Gıda-Tarım-Hayvancılık Sanayi Ticaret A.Ş. (Bursa ve Sivrihisar) ve T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden (Ankara) temin edilmiştir.

Uçucu Yağların Elde Edilmesi

Oda sıcaklığında gölgede kurutulmuş bitkilerin çiçekleri Clevenger aparatı kullanılarak 3 saat su distilasyonuna tabi tutulmuştur (European Pharmacopoeia, 2005).

Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Şartları

GK analizi Agilent 6890N GC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. FID dedektör sıcaklığı 300°C olarak kaydedilmiştir. Uçucu bileşenler kromatografik ve spektroskopik çalışmalar için doğrudan GK ve GK/KS sistemine verilerek kimyasal bileşimi ve relatif yüzdeleri aydınlatılmıştır. Bileşiklerin relatif oranları FID kromatogramdan bilgisayar yardımıyla hesaplanmıştır. GK kolonda ayrılan uçucu bileşikler daha sonra dedektör görevi gören kütle spektrometrisinde herbirinin tek tek kütle spektrumları alınarak tanımlanmıştır.

GK/KS analizi Agilent 5975 GC-MSD sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bileşenlerin ayrımı için Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, film kalınlığı 0.25 µm), taşıyıcı gaz olarak Helyum (0,8 ml/dak) kullanılmıştır. GK fırın sıcaklığı 10 dk 60°C’de 4°C/dk artışla 220°C’ye artırılıp 10 dk tutulmuştur ve sonra 1°C/dk artışla 240°C’ye çıkarılmıştır. Split oranı 40:1 olarak uygulanmıştır. Kütle spektrumları 70 eV enerjisiyle alınmıştır. Kütle değerleri m/z 35 ile 450 arasında kaydedilmiştir. *n*-Alkanlar referans alınarak maddelerin kolondaki tutunma indeksleri (RRI) hesaplanmıştır.

Maddelerin teşhisi maddelere ait kütle spektrumlarının “BAŞER Uçucu yağ bileşenleri”, Wiley, Adams, MassFinder 3.1 (McLafferty ve ark., 1989; Koenig ve ark., 2004) kütüphanelerindeki maddelerin ve MS literatürlerindeki maddelerin kütle spektrumlarına benzerliğinin ve aynı tip kolondaki tutunma indekslerinin karşılaştırılması yapılarak gerçekleştirilmiştir (Joulain ve Koenig, 1998; ESO 2000, 1999; Jennings ve ark., 1980).

CAM Deneyi

1967’de D’Arcy ve Howard ve 2002’de Bürgermeister ve arkadaşları tarafından rapor edilen deney protokolü kullanılmıştır.

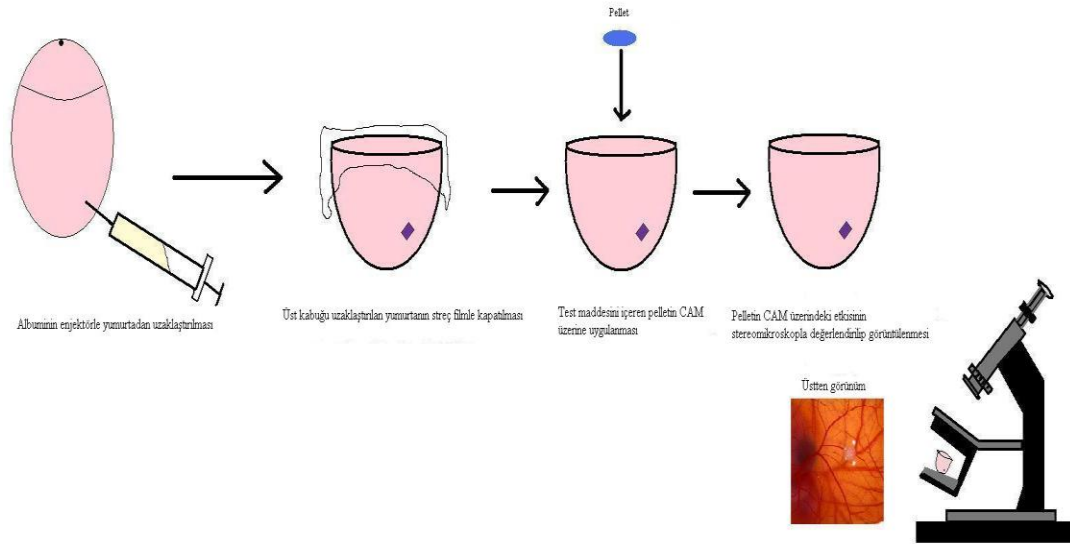
Numune Hazırlanması

Uçucu yağlar 0.5-5 mg.ml⁻¹ (5-50 µg.ml⁻¹); standart kontrol maddeleri suramin, sodyum dodesil sülfat (SDS), kortizon, prednizon, (-)-talidomit, (+)-talidomit ve (±)-talidomit 50 µg.ml⁻¹ sonuç konsantrasyonlarında olmak üzere ısıtılarak (60°C<), % 2.5 (a/h) agar içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir. Daha sonra bu süspansiyondan 10µl alınıp 5 mm çapındaki paslanmaz çelik silindir desteklere uygulanarak oda sıcaklığında donarak pellet haline gelmeleri sağlanmıştır. Pelletler CAM yüzeyine uygulanmıştır.

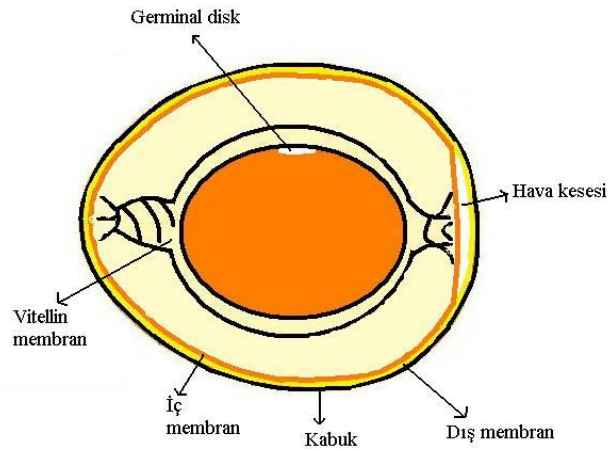
CAM Deneyi

Deneyde kullanılacak döllenmiş civciv yumurtaları deney öncesi 36.5°C’de ve % 80 relatif neme sahip bir inkübatörde (iklimlendirme kabini) yatay pozisyonda 72 saat inkübe edilmiştir. Bu süre içerisinde yumurtalar zaman zaman dikkatlice çevrilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda önce steril enjektörler yardımıyla

yumurtaların alt kısmından yavaş bir şekilde 10-15 ml albumin (yumurta akı) sonra da yumurtaların üst kısmındaki (daha dik ve sivri olan kısım) kabuk ve zar pens yardımıyla özenle uzaklaştırılmıştır. Canlı ve gelişmekte olan embriyo CAM hemen bir streç film ile koruma altına alınıp yine 36.5°C’de ve % 80 relatif neme sahip inkübatörde 72 saat daha bekletilmiştir. CAM çapı yaklaşık 2 cm’yi bulduğu tespit edildiğinde taze olarak hazırlanmış numune pelleti her yumurtaya bir adet olmak üzere CAM’ın üzerindeki kapilerlere yerleştirilmiştir. Her bir maddeden 10-15 adet pellet eşit sayıda yumurtalardaki CAM üzerine uygulanır ve streç film ile kapatılmıştır. Değerlendirme işlemleri yapılmadan önce belirtilen koşullarda pellet yerleştirilmiş halde yumurtalar 24 saat daha inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda madde içeren pelletin kapilerler üzerindeki etkileri stereomikroskop yardımıyla değerlendirilmiştir (Şekil 4). Standart kontrol maddeleri olarak suramin, sodyum dodesil sülfat (SDS), kortizon, prednizon, (-)-talidomit, (+)-talidomit ve (±)-talidomit, kör olarak agar kullanılmıştır. Deneyin yapılışı Şekil 4’de verilmiştir.



Şekil 4. CAM Deneyinin Yapılışı



Şekil 5. Döllenen Civciv Yumurtası



Şekil 6. İnkübasyonun 5. Gününde Yumurtaların Açılma İşlemi

Sonuçların değerlendirilmesi

Kontrol maddelerinin ve numunelerin CAM üzerindeki etkilerini değerlendirmek için Krenn ve Paper tarafından geliştirilen bir skor sistemi kullanılmıştır (Krenn ve Paper, 2009). Bu sisteme (**Çizelge 4**) göre elde edilen skorlar aşağıda verilen formüle uygulanarak sonuçlar hesaplanmıştır. Değerlendirme sonuçları **Çizelge 9**'da verilmiştir.

Çizelge 4. CAM Üzerinde Anjiyojenik Etkinin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Skor Değerleri

Skor	Etki	İzlenim/Açıklama
< 0.5	Yok	Normal embriyo oluşumu
0.5-0.75	Zayıf	Kapiler damarsız alan yok. Kapillerlerin yoğunluğu azalmış ancak pelletten çok daha geniş değil.
> 0.75-1	Kuvvetli	Kapilersiz alan az veya kapiler yoğunluk belirli bir alanda azalmış. Etki pellet alanının iki katından fazla değil.
> 1	Çok kuvvetli	Pelletin etrafında en az iki kat mesafe olacak şekilde kapilersiz alan mevcut.

Değerlendirme İçin Kullanılan Formül :

$$\text{Ortalama Skor} = \frac{\text{Yumurta sayısı (Skor 2)} \times 2 + \text{Yumurta sayısı (Skor 1)} \times 1}{\text{Toplam Yumurta sayısı (Skor 0, 1, 2)}}$$

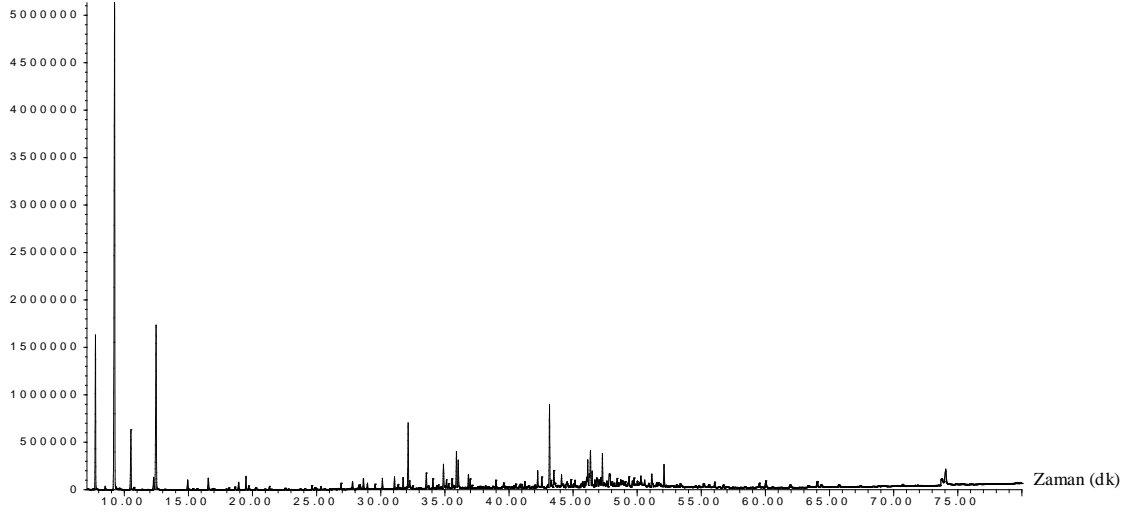
BULGULAR VE TARTIŞMA

Distilasyon Sonuçları

H. perforatum, *H. hircinum*, *H. confertum* ve *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* türlerinin su distilasyonu sonucunda uçucu yağ verimleri kuru drog üzerinden bu sıraya göre % 0.35, % 0.73, % 0.39, % 0.1 olarak hesaplanmıştır.

Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Sonuçları

Çalışmada elde edilen uçucu yağların eş zamanlı olarak yapılan GK ve GK/KS analizleri sonucunda *H. perforatum* yağının % 89.7'sine karşılık gelen 59 bileşik; *H. hircinum* yağının % 98.7'sine karşılık gelen 18 bileşik; *H. confertum* yağının % 93.5'ine karşılık gelen 57 bileşik ve *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* yağının % 96.3'üne karşılık gelen 46 bileşik belirlenmiştir. Bu uçucu yağlarda ana bileşik olarak *H. perforatum*, *H. hircinum*, *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* uçucu yağları için α -pinen (% 33.3, % 88.3, %57.8); *H. confertum* uçucu yağı için ise germakren D (% 30.2) tespit edilmiştir. Uçucu yağların GK kromatogramları **Şekil 7-10**'da ve kimyasal bileşimleri **Çizelge 5-8**'de verilmiştir.



Şekil 7. *Hypericum perforatum* Uçucu Yağının GK Kromatogramı

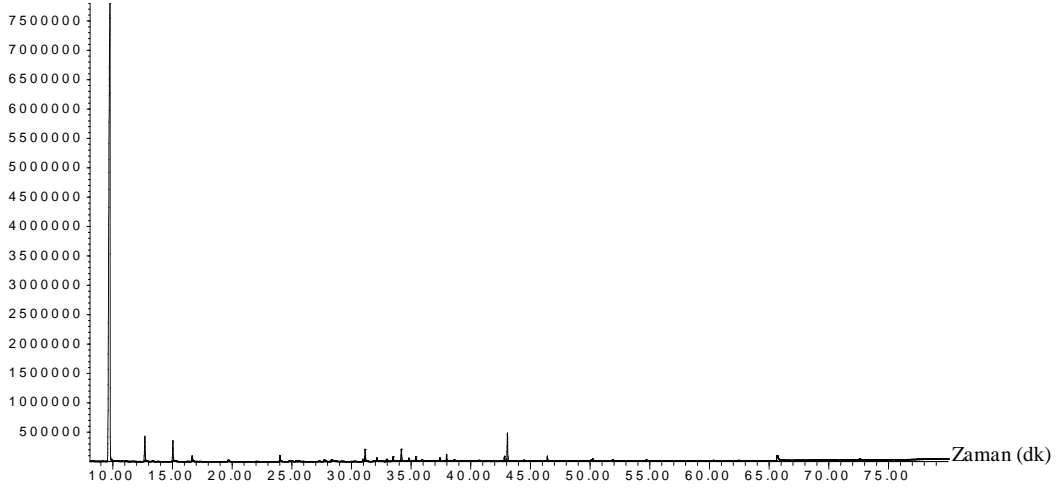
Çizelge 5. *Hypericum perforatum* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

RRI	Bileşik	%
965	3-Metil nonan	8.0
1032	α -Pinen	33.3
1065	2-Metil dekan	4.0
1100	Undekan	0.8
1118	β -Pinen	12.5
1174	Mirsen	0.7
1203	Limonen	0.8
1246	(Z)- β -Osimen	0.1
1255	γ -Terpinen	0.1
1266	(E)- β -Osimen	0.4
1280	p-Simen	0.7
1290	Terpinolen	0.1
1300	Tridekan	0.1
1348	6-Metil-5-hepten-2-on	0.1
1400	Nonanal	0.1
1400	Tetradekan	e
1482	Longipinen	0.4
1493	α -Ylangen	0.2
1497	α -Kopaen	0.4
1499	α -Kamfolen aldehit	0.2
1500	Pentadekan	0.2
1535	β -Burbonen	0.3
1553	Linalol	0.6
1600	Hekzadekan	0.4
1612	β -Karyofillen	3.2
1668	(Z)- β -Farnesen	0.4
1687	α -Humulen	0.2

Çizelge 5. (Devam) *Hypericum perforatum* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

RRI	Bileşik	%
1688	Selina-4,11-dien	0.2
1700	Heptadekan	0.5
1704	γ -Muurolen	1.0
1742	β -Selinen	1.7
1744	α -Selinen	1.2
1773	δ -Kadinen	0.4
1776	γ -Kadinen	0.1
1849	Kalamenen	0.2
1880	Benzil 2-metilbütirat	0.1
1900	Nonadekan	0.1
1929	2-Metil bütil benzoat	0.2
1941	α -Kalakoren	0.1
1973	Dodekanol	0.7
2008	Karyofillen oksit	4.3
2050	(<i>E</i>)-Nerolidol	0.5
2071	Humulen epoksit-II	0.4
2131	Hekzahidrofarnesil aseton	0.3
2144	Spatulenol	1.6
2179	Tetradekanol	1.3
2211	Klovenol	0.5
2256	Kadalen	0.1
2273	Selin-11-en-4 α -ol	0.5
2300	Trikosan	0.1
2316	Karyofilla-2(12),6(13)-dien-5 β -ol (= <i>Karyofilladienol I</i>)	0.4
2384	Hekzadekanol	1.0
2389	Karyofilla-2(12),6-dien-5 α -ol (=Karyofillenol <i>I</i>)	0.6
2500	Pentakosan	0.1
2503	Dodekanoik asit	0.4
2655	Benzil benzoat	0.4
2700	Heptakosan	0.2
2900	Nonakosan	1.9
2931	Hekzadekanoik asit	0.3
Toplam		89.7
Tanımlanan Bileşik sayısı		59

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; % FID (alev iyonlaşma dedektörü) verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser miktar (< % 0,1).

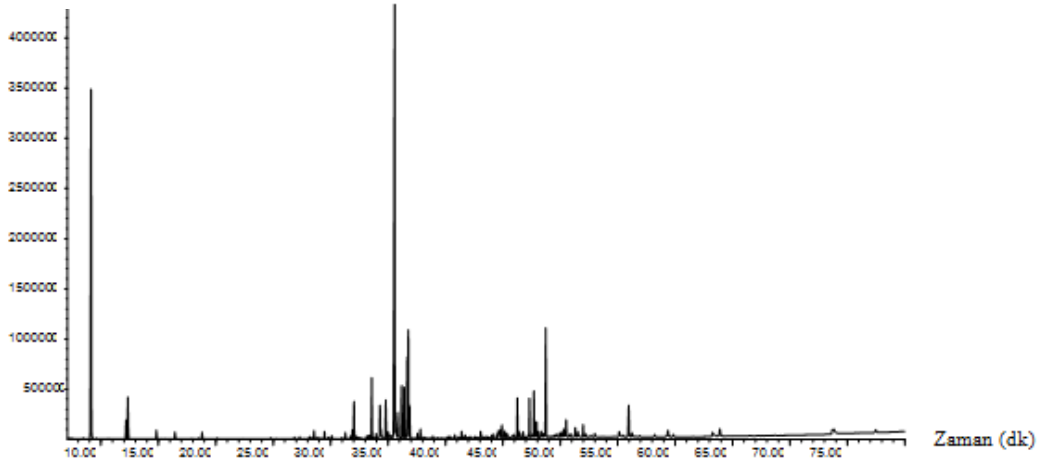


Şekil 8. *Hypericum hircinum* Uçucu Yağının GK Kromatogramı

Çizelge 6. *Hypericum hircinum* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

RRI	Bileşik	(%)
1032	α -Pinen	88.3
1076	Kamfen	e
1100	Undekan	e
1118	β -Pinen	2.8
1174	Mirsen	3.0
1188	α -Terpinen	e
1203	Limonen	0.6
1246	(Z)- β -Osimen	0.2
1255	γ -Terpinen	0.1
1266	(E)- β -Osimen	1.4
1290	Terpinolen	e
1612	β -Karyofillen	1.5
1655	(E)-2-Dekenal	e
1687	α -Humulen	e
1706	α -Terpineol	0.2
1764	(E)-2-Undekenal	e
2008	Karyofillen oksit	0.4
2131	Hekzahidrofarnesil aseton	0.2
Toplam		98.7
Tanımlanan Bileşik sayısı		18

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; % FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser miktar (< % 0,1).



Şekil 9. *Hypericum confertum* Uçucu Yağının GK Kromatogramı

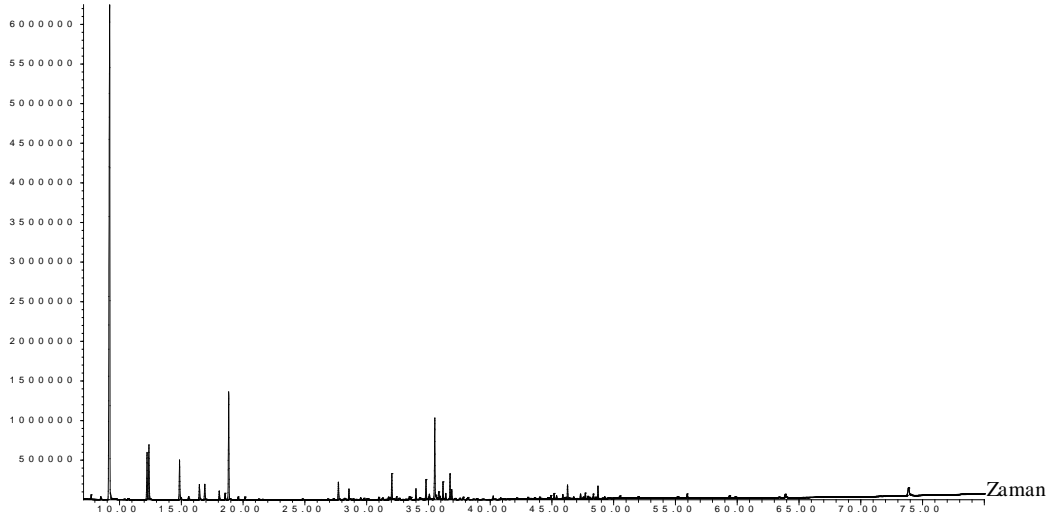
Çizelge 7. *Hypericum confertum* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

RRI	Bileşik	(%)
1000	Dekan	e
1032	α -Pinen	21.5
1076	Kamfen	e
1100	Undekan	1.0
1118	β -Pinen	2.7
1174	Mirsen	0.5
1176	α -Fellandren	e
1203	Limonen	0.4
1244	2-Pentil furan	e
1266	(<i>E</i>)- β -Osimen	0.4
1290	Terpinolen	e
1400	Nonanal	e
1466	α -Kubeben	e
1493	α -Ylangen	e
1497	α -Kopaen	0.3
1535	β -Burbonen	0.5
1589	β -Ylangen	0.4
1597	β -Kopaen	0.4
1600	β -Elemen	e
1612	β -Karyofillen	1.5
1639	Kadina-3,5-dien	e
1661	Alloaromadendren	2.7
1677	<i>epi</i> -Zonaren	e
1687	α -Humulen	1.5
1704	γ -Muurolen	1.4
1726	Germakren D	30.2

Çizelge 7. (Devam) *Hypericum confertum* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

RRI	Bileşik	(%)
1740	α -Muurolen	2.3
1755	Bisiklogermakren	2.2
1758	(<i>E,E</i>)- α -Farnesen	1.5
1773	δ -Kadinen	4.4
1776	γ -Kadinen	1.2
1799	Kadina-1,4-dien	0.2
1807	α -Kadinen	0.4
1945	1,5-Epoksi-salvial-4(14)-en	0.5
2008	Karyofillen oksit	0.1
2057	Ledol	e
2071	Humulen epoksit-II	e
2080	Kubenol	0.7
2084	Oktanoik asit	e
2088	1- <i>epi</i> -Kubenol	0.8
2098	Globulol	0.1
2104	Viridifurolol	0.1
2131	Hekzahidrofarneşil aseton	0.2
2173	6- <i>epi</i> -Kubenol	e
2187	T-kadinol	2.0
2209	T-muurolol	1.6
2219	α -Muurolol	0.6
2255	α -Kadinol	4.2
2300	Trikosan	0.3
2384	Hekzadekanol	0.3
2500	Pentakosan	0.8
2503	Dodekanoik asit	0.5
2622	Fitol	0.5
2655	Benzil benzoat	0.1
2670	Tetradekanoik asit	0.3
2900	Nonakosan	0.6
2931	Hekzadekanoik asit	1.6
Toplam		93.5
Tanımlanan Bileşik sayısı		57

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi n-alkan serisine göre hesaplanmıştır; % FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser miktar (< % 0,1).



Şekil 10. *Hypericum hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* Uçucu Yağının GK Kromatogramı

Çizelge 8. *Hypericum hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

RRI	Bileşik	(%)
965	3-Metil nonan	0.3
1000	Dekan	e
1032	α -Pinen	57.8
1035	α -Tuyen	1.4
1076	Kamfen	e
1100	Undekan	2.8
1118	β -Pinen	4.8
1174	Mirsen	2.6
1176	α -Fellandren	e
1188	α -Terpinen	0.2
1203	Limonen	0.4
1218	β -Fellandren	e
1246	(Z)- β -Osimen	0.5
1255	γ -Terpinen	0.4
1266	(E)- β -Osimen	7.9
1280	p-Simen	0.2
1290	Terpinolen	0.2
1482	Longipinen	1.0
1497	α -Kopaen	0.7
1612	β -Karyofillen	1.6
1628	Aromadendren	0.2
1661	Alloaromadendren	0.1
1668	(Z)- β -Farnesen	0.5
1704	γ -Murolen	1.2
1726	Germakren D	5.2

Çizelge 8. (Devam) *Hypericum hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi

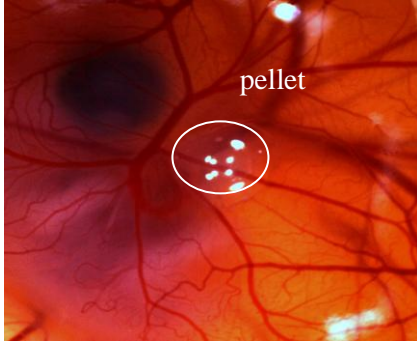
RRI	Bileşik	(%)
1755	Bisiklogermakren	0.9
1758	(<i>E,E</i>)- α -Farnesen	0.2
1773	δ -Kadinen	1.2
1776	γ -Kadinen	0.6
1807	α -Kadinen	e
1893	Dodesil asetat	0.1
1973	Dodekanol	e
2080	Kubenol	0.5
2098	Globulol	0.3
2100	Heneikosan	0.2
2104	Viridifurolol	0.1
2187	T-kadinol	0.3
2209	T-muurolol	0.3
2255	α -Kadinol	0.7
2300	Trikosan	e
2500	Pentakosan	e
2503	Dodekanoik asit	e
2622	Fitol	e
2655	Benzil benzoat	e
2700	Heptakosan	0.3
2900	Nonakosan	0.6
Toplam		96.3
Tanımlanan Bileşik sayısı		46

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; % FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser miktar (< % 0,1).

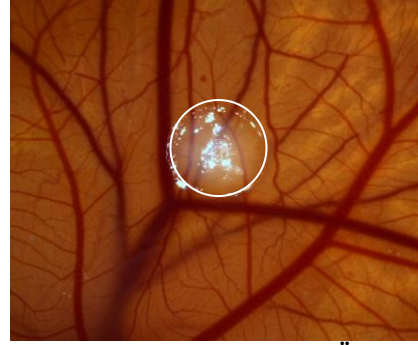
CAM Aktivite Sonuçları

Çizelge 4'teki skor sistemine göre yapılan değerlendirme sonucu verilen formüle göre hesaplanmış ve skorlar Çizelge 9'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre en fazla etki *H. perforatum* uçucu yağının $50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$ konsantrasyonunda zayıf-orta antianjiyojenik etki olarak görülmüştür. $50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$ konsantrasyonda *H. hircinum*, *H. hyssopifolium* ve *H. confertum* uçucu yağları hiçbir etki göstermemiştir. Test edilen uçucu yağlar denenen konsantrasyonlarda hiçbir toksik ya da iritan etki göstermemiştir. Uçucu yağların ve standart kontrol maddelerin CAM üzerindeki etkileri stereomikroskop ile görüntülenmiştir (Şekil 11-30).

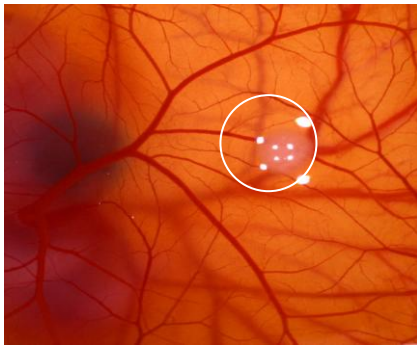
Uçucu Yağların ve Standart Kontrol Maddelerin CAM Üzerindeki Etkilerinin Stereomikroskop Görüntüleri



Şekil 11. Agar'da Normal Embriyo Gelişimi (% 2.5)



Şekil 12. Kortizon'un CAM Üzerinde Orta-Kuvvetli Antianjiyojenik Etkisi ($50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$)



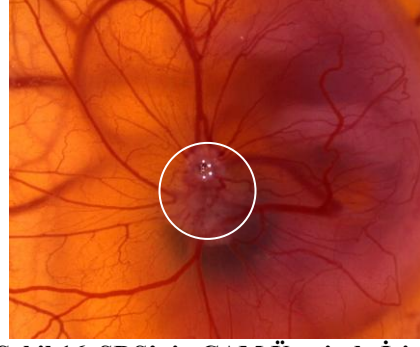
Şekil 13. Prednizon'un CAM Üzerinde Orta-kuvvetli Antianjiyojenik Etkisi ($50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$)



Şekil 14. (+)-Talidomit'in CAM Üzerinde Orta-kuvvetli Antianjiyojenik Etkisi ($50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$)



Şekil 15. (\pm)-Talidomit'in CAM Üzerinde Orta-kuvvetli Antianjiyojenik Etkisi ($50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$)



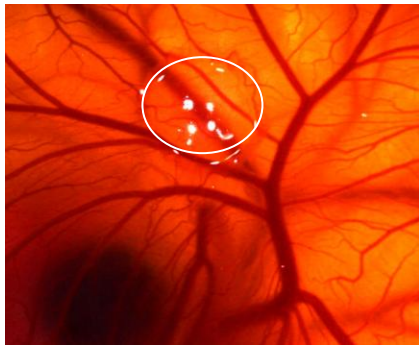
Şekil 16. SDS'nin CAM Üzerinde İritan Etkisi ($50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$)



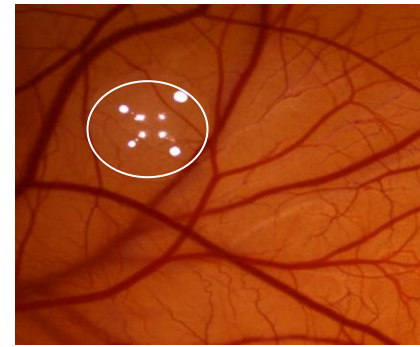
Şekil 17. (-)-Talidomit'in CAM Üzerinde Zayıf Antianjiyojenik Etkisi ($50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$)



Şekil 18. Suramin'in CAM Üzerinde Zayıf Antianjiyojenik Etkisi ($50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$)



Şekil 19. *H. perforatum* Uçucu Yağının $50 \mu\text{g.pellet}^{-1}$ Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi



Şekil 20. *H. perforatum* Uçucu Yağının $10 \mu\text{g.pellet}^{-1}$ Konsantrasyonda CAM Üzerinde Etkisi



Şekil 21. *H. perforatum* Uçucu Yağının
5 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi



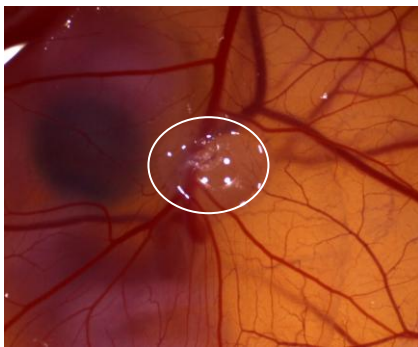
Şekil 22. *H. hircinum* Uçucu Yağının
50 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi



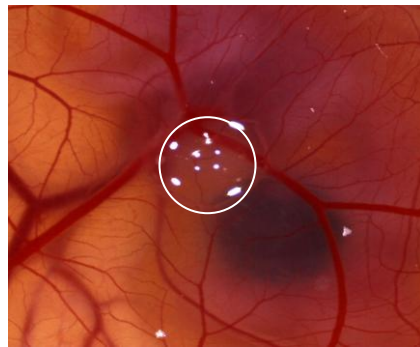
Şekil 23. *H. hircinum* Uçucu Yağının
10 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi



Şekil 24. *H. hircinum* Uçucu Yağının
5 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi



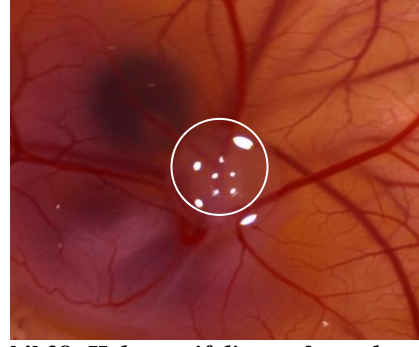
Şekil 25. *H. confertum* Uçucu Yağının
50 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi



Şekil 26. *H. confertum* Uçucu Yağının
10 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi



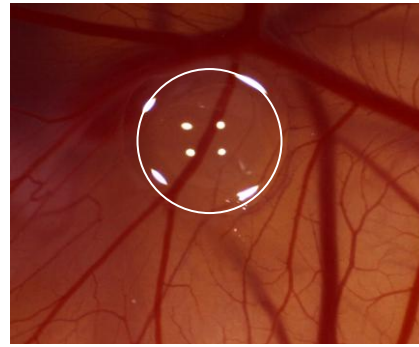
Şekil 27. *H. confertum* Uçucu Yağının
5 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi



Şekil 28. *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum*
var. *microcalycinum* Uçucu Yağının
50 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi



Şekil 29. *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum*
var. *microcalycinum* Uçucu Yağının
10 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi



Şekil 30. *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum*
var. *microcalycinum* Uçucu Yağının
5 µg.pellet⁻¹ Konsantrasyonda
CAM Üzerinde Etkisi

Çizelge 9. CAM Aktivite Sonuçları

Test Maddeleri	Skor	İritasyon (%)	Embriyotoksisite (%)	Konsantrasyon ($\mu\text{g.pellet}^{-1}$)
<i>H. perforatum</i> uçucu yağı	0.6 ± 0.3 0.3 ± 0 0.2 ± 0.1	-	-	50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$ 10 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$ 5 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$
<i>H. hircinum</i> uçucu yağı	0.4 ± 0 0 0.2 ± 0.1	-	-	50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$ 10 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$ 5 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$
<i>H. confertum</i> uçucu yağı	0.1 ± 0.1 0.1 ± 0.1 0.1 ± 0.1	-	-	50 $\mu\text{g/pellet}$ 10 $\mu\text{g/pellet}$ 5 $\mu\text{g/pellet}$
<i>H. hyssopifolium</i> subsp. <i>elongatum</i> var. <i>microcalycinum</i> uçucu yağı	0.2 ± 0.2 0 0	-	-	50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$ 10 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$ 5 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$
Agar	0.2 ± 0.2	-	-	Kör (% 2.5, a/h)
Prednizon	0.9 ± 0.7	- -	-	Pozitif kontrol (50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$)
Kortizon	1.2 ± 0.2	-	-	Pozitif kontrol (50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$)
Suramin	0.5 ± 0.2	-	-	Pozitif kontrol (50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$)
(-)-Talidomit	0.5 ± 0.2	-	-	Pozitif kontrol (50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$)
(+)-Talidomit	0.9 ± 0.2	-	-	Pozitif kontrol (50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$)
(±)-Talidomit	0.9 ± 0.2	-	-	Pozitif kontrol (50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	0.1 ± 0.1	87 ± 5	-	Negatif kontrol (50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$)

NOT: Her bir maddenin test edilen her konsantrasyonu için her hafta 15'er olmak üzere toplam 45 yumurta kullanılmıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında *Hypericum* türlerinin çiçeklerinden su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağların GK/KS analizleri sonucunda *Hypericum perforatum*, *Hypericum hircinum* ve *Hypericum hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* yağlarının ana bileşiği α -pinen olarak (% 33.3, % 88.3, %57.8); *Hypericum confertum* yağının ana bileşiği germakren D (% 30.2) olarak tespit edilmiştir (**Çizelge 5-8**). *H. confertum*, *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri ilk kez bu çalışmada bildirilmektedir.

CAM aktivite çalışmasında pozitif standart maddesi olarak prednizon, (-)-talidomit, (+)-talidomit, (\pm)-talidomit, kortizon, suramin, negatif standart kontrol maddesi olarak SDS ve kör olarak agar kullanılmıştır. Kontrol maddeleri 50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$, uçucu yağlar ise 5 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$, 10 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$ ve 50 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$ olmak üzere üç farklı konsantrasyonda test edilmiştir. Her bir madde için 15 yumurta kullanılarak deney en az üç hafta süreyle tekrarlanmıştır.

Sonuçlar Çizelge 4'teki skor sistemi kullanılarak değerlendirilmiş ve bu skorlar skor formülünde yerine konularak hesaplanmıştır. Skorlar deneyin yapıldığı her hafta sonunda her bir standart kontrol maddesi ve uçucu yağ için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Elde edilen farklı haftalara ait skorlar her bir madde için kendi içinde paralellik göstermediyse deney tekrarlanmıştır.

Çizelge 4'e göre döllenmiş yumurtanın CAM'ı üzerine uygulanan pelletin alt yüzeyinde ve etrafındaki kapiler gelişiminde hiçbir değişim yok ise skor < 0.5 olarak ifade edilmiş ve bu durum normal embriyo gelişimi olarak değerlendirilmiştir. CAM üzerine uygulanan pelletin alt yüzeyinde ve etrafında pelletten çok daha geniş olmamak üzere kapiler yoğunluk azalmış ancak kapiler damarsız alan yok ise skor 0.5-0.75 olarak ifade edilmiş ve bu durum zayıf antianjiyojenik etki olarak, kapilersiz alan az veya kapiler yoğunluk belirli bir alanda azalmış ve etki pellet alanının iki katından fazla değilse skor $> 0.75-1$ olarak ifade edilmiş ve bu durum kuvvetli antianjiyojenik etki olarak, pelletin etrafında en az iki kat mesafe olacak şekilde kapilersiz alan mevcut ise skor > 1 olarak ifade edilmiş ve bu durum çok kuvvetli antianjiyojenik etki olarak değerlendirilmiştir. Eğer pellet CAM yüzeyinde kanamaya yada tahrişe yol açmışsa bu durum iritasyon olarak değerlendirilmiştir. Deney sonucunda her hafta her bir madde için ölü ve iritasyonun bulunduğu yumurtaların toplamı deney süresince maddelerin test edildiği toplam yumurta sayısına oranlanarak maddelerin embriyotoksik ve iritan etkisi % olarak ifade edilmiştir. Her bir yumurta bu sisteme göre değerlendirilmiş ve elde edilen skorlar CAM değerlendirme formundaki ilgili alanlara (< 0.5 , 0.5-0.75, $> 0.75-1$ ve > 1 , iritasyon, ölü, toplam yumurta sayısı) yazılmıştır. Her bir hafta sonunda elde edilen skor değerleri formülde < 0.5 ; 0, 0.5-0.75 ve $> 0.75-1$; 1, > 1 ; 2 olacak şekilde yerine konularak hesaplanmış ve üç haftanın sonunda elde edilen skorların ortalaması her bir madde için sonuç skor olarak ifade edilmiştir.

En az üç hafta tekrarlanan deneylerin sonunda elde edilen ortalama değerlendirme sonuçlarına göre kör olarak kullanılan agarın 50 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonda sonuç skoru 0.2 ± 0.2 olarak hesaplanmış ve skor sistemine göre < 0.5 olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla kapillerlerin ve embriyonun gelişimi üzerine bu konsantrasyonda hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür. Pozitif standart kontrol maddeleri kortizon, (±)-talidomit, (+)-talidomit ve prednizonun 50 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonda sonuç skorları sırasıyla 1.2 ± 0.2, 0.9 ± 0.2, 0.9 ± 0.2, 0.9 ± 0.7 olarak hesaplanmış ve bu değerler skor sistemine göre 0.5-1 aralığında olduğundan bu durum orta-kuvvetli antianjiyojenik etki olarak ifade edilmiştir. Suramin ve (-)-talidomitin bu konsantrasyonda hesaplanan sonuç skoru 0.5 ± 0.2'nin skor sistemine göre 0.5-0.75 aralığında olduğundan etki zayıf antianjiyojenik olarak ifade edilmiştir. Negatif kontrol maddesi SDS'nin bu konsantrasyonda CAM üzerinde 0.1 ± 0.1 skorla % 87 ± 5 oranında iritasyona neden olduğu gözlenmiştir. Standart kontrol maddelerinin hiçbirisi µg.pellet⁻¹ konsantrasyonda hiçbir iritasyon ve toksik etki göstermemiştir. *H. perforatum*, *H. hircinum*, *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* uçucu yağlarının 5-50 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonlarının CAM aktivite çalışması sonucunda ise ana bileşiği α-pinen olan *H. perforatum*, *H. hircinum* ve *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* yağları 50 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonda sonuç skorları sırasıyla 0.6 ± 0.3, 0.4 ± 0, 0.2 ± 0.2 olarak hesaplanmış ve *H. perforatum* uçucu yağı için etki; zayıf-orta antianjiyojenik etki, *H. hyssopifolium* subsp. *elongatum* var. *microcalycinum* ve *H. hircinum* uçucu yağları için etkisiz olarak ifade edilmiştir. Bu uçucu yağların 10 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonda sonuç skorları sırasıyla 0.3, 0, 0 olarak hesaplanmış ve antianjiyojenik etkinin olmadığı belirlenmiştir. Yine 5 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonda sonuç skorları sırasıyla 0.2 ± 0.1, 0.2 ± 0.1 ve 0 olarak hesaplanmış sonuçta ise antianjiyojenik etkinin olmadığı belirlenmiştir. Ana bileşiği germakren D olan *H. confertum* uçucu yağı denenen tüm konsantrasyonlarda (5-50 µg.pellet⁻¹) hiçbir antianjiyojenik etki göstermemiştir. Antianjiyojenik etki *H. perforatum* uçucu yağının 50 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonunda gözlenmiştir. Uçucu yağlar 5-50 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonda hiçbir toksik ya da iritan etki göstermemiştir. CAM aktivite sonuçları **Çizelge 9**'da verilmiştir. Bu uçucu yağların CAM aktivitelerinin belirlenmesi ilk kez bu çalışmada bildirilmektedir.

Bu çalışmaların devamında etkili olan uçucu yağların daha yüksek konsantrasyonlarda da etki profilleri belirlenmesi ve etkiden sorumlu aktif bileşenlerinin aydınlatılması ve bu bileşenler ile yapılacak benzer aktivite çalışmalarının sonucunda yeni ilaç keşfine katkıda bulunulabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Akhbari, M., Batooli, H., composition of *Hypericum perforatum* L. volatile oil from kashan Oil composition of *Hypericum perforatum* L., Am.-Eurasian J. Sustain. Agric., 3(1), 107-110 (2009).

Anonymous, Final report on the safety assessment of *Hypericum perforatum* extract and *Hypericum perforatum* oil, Int. J. Toxicol., 20 (2), 31-39 (2001).

Ataergin, A. S., Özet, A., Arpacı, F., The place of angiogenesis inhibitors in cancer therapy, T. Klin. J. Med. Sci., 19, 100-105 (1999).

Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., Akhtar, N., Angiogenesis assays: A critical overview, Clin. Chem., 49, 32-40 (2003).

Azizi, M., Change in content and chemical composition of *Hypericum perforatum* L. oil at three harvest time, Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 13(2), 79-85 (2007).

Azzarello, J., Ihnat, M. A., Kropp, B. P., Warnke, L. A., Lin, H. K., Assessment of angiogenic properties of biomaterials using the chicken embryo chorioallantoic membrane assay, Biomed. Mater., 2, 55-61 (2007).

Bai, X., Cerimele, F., Fukai, M. U., Waqas, M., Campbell, P. M., Govindarajan, B., Der, C. J., Battle, T., Frank, D. A., Ye, K., Murad, E., Dubiel, W., Soff, G., Arbiser, J. L., Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis *in vitro* and tumor growth *in vivo*, J. Biol. Chem., 278 (37), 35501-35507 (2003).

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Biological effects of essential oils – A review, Food Chem. Toxicol., 46, 446–475, (2008).

Baser, K. H. C., Buchbauer, G., Handbook Of Essential Oils: Science, Technology, And Applications, K. H. C., Baser, CRC Press, 2009.

Başer, K. H. C., Demirci, F., Chemistry of Essential Oils, In: Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability, R. G. Berger (Ed.), Springer, Almanya, 43-75 (2007).

Baser, K. H. C., Ozek, T., Nuriddinov, H. R., Demirci B., Essential Oils of Two *Hypericum* Species From Uzbekistan, Chem. Nat. Compd., 38 (1), 54-57 (2002).

Baytop, T., A Dictionary of Vernacular Names of Wild Plants of Turkey, Publication of Turk Dil Kurumu (Turkish Language Soc.), Ankara, 152, 1994.

Baytop, T., Therapy with Medicinal Plants in Turkey 2'nd Edition, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1999.

Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 250-251, 1984.

Belotti, D., Vergani, V., Drudis, T., Borsotti, P., Pitelli, M. R., Viale, G., Giavazzi, R., Taraboletti, G., The Microtubule-affecting Drug Paclitaxel Has Antiangiogenic Activity, Clin. Cancer Res., 2, 1843-1849 (1996).

Bertoli, A., Pistelli, L., Morelli, I., Spinelli, G., Menichini, F., Constituents of *Hypericum hircinum* oils., J. Essent. Oil Res. , 12, 617-620 (2000).

Birt, D. F., Widrechner, M. P., Hammer, K. D. P., Hillwig, M. L., Wei, J., Kraus, G. A., Murphy, P. A., McCoy, J. A., Wurtele, E. S., Neighbors, J. D., Wiemer, D. F., Maury, W. J., Price, J. P., *Hypericum* in infection: Identification of anti-viral and anti-inflammatory constituents, Pharm. Biol., 47 (8), 774-782 (2009).

Bombardelli, E., Morazzoni, P., *Hypericum perforatum*, Fitoterapia, 66, 43-68 (1995).

Brower, V., Tumor angiogenesis- new drugs on the block, Nat. Biotechnol., 17 (1999).

Bürgermeister, J., Paper, D. H., Vogl, H., Linhardt, R. J., Franz, G., LaPSvS1, a (1→3)-β-galactan sulfate and its effect on angiogenesis *in vivo* and *in vitro*, Carbohydrate Research, 337, 1459-1466 (2002).

Carmeliet, P., Angiogenesis in life, disease and medicine, Nature, 438, 932-936 (2005).

Carmeliet, P., Jain, R. K., Angiogenesis in cancer and other diseases, Nature, 407, 249-257 (2000).

Chatzopoulou, P. S., Koutsos, T., Katsiotis, S. T., Chemical Composition of the Essential Oils from Cultivated and Wild Grown St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*), J. Essent. Oil Res., 18, 643-646 (2006).

Choi, J. M., Lee, E. O., Lee, H. Y., Kim, K. H., Ahn, K. S., Shim, B. S., Kim, N. I., Song, M. C., Baek, N. I., Kim, S. H., Identification of Campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its Antiangiogenic Activities, Phytother. Res., 21, 954-959 (2007).

Cimpean, A. M., Ribatti, D., Raica, M., The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis, Angiogenesis, 11, 311-319 (2008).

Couladis, M., Badisa, R. B., Baziou, P., Chaudhuri, S. K., Pilarinou, E., Verykokidou, E., Harvala, C., Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Hypericum* sp. on Brine Shrimps and Human Cancer Cell Lines, Phytother. Res., 16, 719-722 (2002).

Çakır, A., Duru, M. E., Harmandar, M., Ciriminna, R., Passannanti, S., Piozzi, F., Comparison of the Volatile Oils of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum perforatum* L. from Turkey, *Flavour Frag. J.*, 12, 285-287 (1997).

Çakır, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S., Hirata, T., Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*, *Flavour Fragr. J.*, 19, 62-68 (2004).

D' Arcy, P. F., Howard, E. M., A new anti-inflammatory test, utilizing the chorioallantoic membrane of the chick embryo , *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 29, 378-387 (1967).

D'Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E., Folkman, J., Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 4082-4085 (1994).

Davis, P.H., *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, Edinburgh, 10, 1988.

Davis, P.H., *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, Edinburgh, 2, 1982.

Debefve, E., Pegaz, B., van den Bergh, H., Wagnières G., Lange N., Ballini, J.-P., Video monitoring of neovessel occlusion induced by photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne®), in the CAM model, *Angiogenesis*, 11(3), 235–243 (2008).

Demirci, B., Dadandı, M. Y., Paper, D. H., Franz, G., Başer, K. H. C, Chemical Composition of the Essential Oil of *Phlomis linearis* Boiss. & Bal., and Biological Effects on the CAM-Assay: A Safety Evaluation, *Z. Naturforsch.*, 58c, 826-829 (2003).

Demirci, B., Demirci, F., Dönmez, A. A., Franz, G., Paper, D. H., Başer, K. H. C., Effects of *Salvia* Essential Oils on the Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay, *Pharm. Biol.*, 43(8), 666–671 (2005).

Demirci, F., Paper, D. H., Franz, G., Başer, K. H. C., Investigation of the *Origanum onites* L. Essential Oil Using the Chorioallantoic Membrane (CAM)-Assay, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 251-254 (2004).

Demirci, F., Paper, D. H., Franz, G., Nerolidol'ün Koryon Allantoik Membran (CAM) Üzerine Etkileri, 15. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, 15. BİHAT, Ankara, 189-197 (2006).

Di Carlo, G., Nuzzo, I., Capasso, R., Sanges, M. R., Galdiero, E., Capasso, F., Carratelli, C. R., Modulation of apoptosis in mice treated with Echinacea and St. John's wort, *Pharmacol. Res.*, 48, 273-277 (2003).

Edris, A. E, Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: a review, *Phytother. Res.*, 21, 308-323 (2007).

Erken, S., Malyer, H., Demirci, F., Demirci, B., Baser, K. H. C., Chemical Investigations on Some *Hypericum* Species Growing in Turkey-I, *Chem. Nat. Compd.*, 37 (5), 434-438 (2001).

Ernst, E., *Hypericum-the Genus Hypericum*, Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles, 31 , Taylor & Francis, London, 2003.

ESO 2000, The Complete Database of Essential Oils, Boelens Aroma Chemical Information Service, The Netherlands, 1999.

European Pharmacopoeia, Council of Europe, 2004, 5th Ed. Strasbourg, 1, 217, 2005.

Fan, T. P., Yeh, J. C., Leung, K. W., Yue, P. Y. K., Wong, R. N. S., Angiogenesis: from plants to blood vessels, *Trends. Pharmacol. Sci.*, 27 (6), 297-309 (2006).

Ferrara, N., Kerbel, R. S., Angiogenesis as a therapeutic target, *Nature*, 438, 967-974 (2005).

Ferrara, N., Vascular endotelial growth factor: pathophysiology and clinical implications, In: *Angiogenesis: from basic science to clinical applications*, N. Ferrara (Ed.), CRC Press, USA, 2-36 (2007).

Folkman, J., Fundamental Concepts of the Angiogenic Process, *Curr. Mol. Med.*, 3, 643-651 (2003).

Folkman, J., What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 4-6 (1990).

Gudžić, B., Dordević, S., Palić, R., Stojanović, G., Essential oils of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum perforatum* L., *Flavour Fragr. J.*, 16, 201–203 (2001).

Güner, A. , Özhatay, N. , Ekim, T., Başer, K.H.C ,Flora of Turkey and East Aegean Islands. Vol.11, Edinburgh University Pres, Edinburgh (2000).

Hammer, K. D. P., Elucidation of anti-inflammatory constituents in *Hypericum perforatum* extracts and delineation of mechanisms of anti-inflammatory activity in RAW 264.7 mouse macrophages, *Doktora Tezi*, Iowa State University, Ames, Iowa (2008).

Hänsel, R., Sticher, O., *Pharmakognosie-Phytopharmazie*, Springer, Verlag, Berlin, 2003.

Jennings, W. G., Shibamoto, T., Quantitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary GC, Academic Press, New York, 1980.

Joulain, D., Koenig, W. A., The Atlas of Spectra Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, E.B.-Verlag, Hamburg, 1998.

Jung, M., Tak, J., Chung, W. Y., Park, K. K., Antiangiogenic activity of deoxoartemisinin derivatives on chorioallantoic membrane, Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 1227-1230 (2006).

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

Konukoğlu, D., Turhan, S. M., Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis, Cerrahpaşa J. Med., 36, 42-48 (2005).

Krenn, L., Paper, D. H., Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.), Phytomedicine, 16(12), 1083-1088 (2009).

Kumar, A., D' Souza, S. S., Tickoo, S., Salimath, B. P., Singh, H. B., Antiangiogenic and Proapoptotic Activities of Allyl Isothiocyanate Inhibit Ascites Tumor Growth *in Vivo*, Integr. Cancer Ther., 8(1), 75-87 (2009).

Leng, T., Miller, J. M., Bilbao, V., Palanker, D. V., Huie, P., Blumenkranz, M. S., The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation, Retina, 24, 427-434 (2004).

Liekens, S., Clercq De, E., Neyts, J., Angiogenesis: regulators and clinical applications, Biochem. Pharmacol., 61, 253-270 (2001).

Liu, D., Schwimer, J., Liu, Z., Woltering, E. A., Greenway, F. L., Antiangiogenic Effect of Curcumin in Pure Versus in Extract Forms, Pharm. Biol., 46 (10-11), 677-682 (2008).

Liu, J. J., Huang, T. S., Cheng, W. F., Lu, F. J., Baicalein and Baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation, Int. J. Cancer, 106, 559-565 (2003).

Losso, J. N., Targeting excessive angiogenesis with functional foods and nutraceuticals, Trends Food Sci. Tech., 14, 455-468 (2003).

Loutrari, H., Hatziapostolou, M., Skouridou, V., Papadimitriou, Roussos, C., Kolisis, F. N., Papapetropoulos, A., Perillyl Alcohol Is an Angiogenesis Inhibitor, J. Pharmacol. Exp. Ther., 311, 568-575 (2004).

Maggi, F., Ferretti, G., Essential Oil Comparison of *Hypericum perforatum*

L. subsp. *perforatum* and subsp. *veronense* (Schrank) Ces. from Central Italy, J. Essent. Oil Res., 20, 492-494 (2008).

Marks, M. G., Shi, J., Fry, M. O., Xiao, Z., Trzyna, M., Pokala, V., Ihnat, M. A., Li P. K., Effects of Putative Hydroxylated Thalidomide Metabolites on Blood Vessel Density in the Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay and on Tumor and Endothelial Cell Proliferation, Biol. Pharm. Bull., 25(5), 597-604 (2002).

Martarelli, D., Martarelli, B., Pediconi, D., Nabissi, M. I., Perfumi, M., Pompei, P., *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice, Cancer Lett., 210, 27-33 (2004).

Mc Donald, D. M., Angiogenesis and Vascular Remodeling In Inflammation and Cancer: Biology and Architecture of the Vasculature, In: Angiogenesis: An Integrative Approach from Science to Medicine, W. D. Figg, J. Folkman (Eds.), Springer, USA, 17-34 (2008).

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

Menegazzi, M., Di Paola, R., Mazzon, E., Muià, C., Genovese, T., Crisafulli, C., Suzuki, H., Cozzocrea, S., *Hypericum perforatum* attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice, Free Radical Biology & Medicine, 40, 740-753 (2006).

Mojzis, J., Varinska, L., Mojzisova, G., Kostova, I., Mirossay, L., Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones, Pharmacol. Res., 57, 259-265 (2008).

Nahrstedt, A., Butterweck, V., Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L., Pharmacopsychiatry, 2, 129-134 (1997).

Norrby, K., Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control, APMIS, 105, 417-437 (1997).

Oak, M. H., Bedoui, J. E., Kerth, V. B. S., Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea, J. Nutr. Biochem., 16, 1-8 (2005).

Obložinský, M., Bezáková, L., Holková, I., Vanko, M., Kartnig, T., Pšenák, M., Antilipoxygenase activity of compounds from *Hypericum perforatum*, Biologia, 61 (3), 331-332 (2006).

Oh, S., Jeong, I. H., Ahn, C. M., Shin, W. S., Lee, S., Synthesis and antiangiogenic activity of thioacetal artemisinin derivatives, Bioorgan. Med. Chem., 12, 3783-3790 (2004).

Özgürtaş, T., Anjiyogenezde bir *in-vivo* model: civciv koriyoallantoik membran, Gülhane Tıp Dergisi, 51, 67-69 (2009).

Öztürk, N., Korkmaz, S., Öztürk, Y., Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts, J. Ethnopharmacol., 111, 33-39 (2007).

Paper, D., Natural products as angiogenesis inhibitors, Planta Med., 64, 686-695 (1998).

Pavlović, M., Tzakou, O., Petrakis, P. V., Couladis, M., The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum tetrapterum* Fries and *Hypericum olympicum* L. growing in Greece, Flavour Fragr. J., 21, 84-87 (2006).

Pintore, G., Chessa, M., Boatto, G., Cerri, R., Usai, M., Tirillini, B., Essential Oil Composition of *Hypericum perforatum* L. var. *angustifolium* DC Growing Wild in Sardinia (Italy), J. Essent. Oil Res., 17, 533-535 (2005).

Radusiene, J., Judzentiene, A., Bernotiene, G., Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania, Biochem. Syst. Ecol., 33, 113-124 (2005).

Rančić, A., Soković, M., Vukojević, J., Simić, A., Marin, P., Duletić-Laušević, S., Djoković, D., Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Myrrhis odorata* (L.) Scop, *Hypericum perforatum* L and *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, J. Essent. Oil Res., 17, 341-345 (2005).

Raso Mattace, G., Pacilio, M., Di Carlo, G., Esposito, E., Pinto, L., Meli, R., *In-vivo* and *in-vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*, JPP. , 54, 1379-1383 (2002).

Ribatti, D., History of Research on Tumor Angiogenesis, Springer, İtalya, 1-17, 2009.

Ribatti, D., Judah Folkman, a Pioneer in the study of angiogenesis, Angiogenesis, 11, 3-10 (2008).

Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Presta, M., The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay, Nat. Protoc., 1, 85 - 91 (2006).

Ribatti, D., Vacca, A., Roncali, L., Dammacco, F., The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on anti-angiogenesis, Curr. Pharm. Biotechno., 1, 73-82 (2000).

Roscetti, G., Franzese, O., Comandini, A., Bonmassar, E., Cytotoxic Activity of *Hypericum perforatum* L. on K562 Erythroleukemic Cells: Differential Effects between Methanolic Extract and Hypericin, *Phytother. Res.*, 18, 66-72 (2004).

Sagar, S.M., Yance, D., Wong, R.K., Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 1, *Curr. Oncol.*, 13 (1), 14-26 (2006).

Sauer, H., Günther, J., Hescheler, J., Wartenberg, M., Thalidomide Inhibits Angiogenesis in Embryoid Bodies by the Generation of Hydroxyl Radicals, *Am. J. Pathol.*, 156 (1), 151-158 (2000).

Šavikin, K., Dobrić, S., Tadić, V., Zdunić, G., Antiinflammatory Activity of Ethanol Extracts of *Hypericum perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. richeri* Vill. and *H. androsaemum* L. in Rats, *Phytother. Res.* 21, 176–180 (2007).

Schwarz, D., Kisselev, P., Roots, I., St. John's Wort Extracts and Some of Their Constituents Potently Inhibit Ultimate Carcinogen Formation from Benzo[*a*]pyrene-7,8-Dihydrodiol by Human CYP1A1, *Cancer Res.*, 63, 8062-8068 (2003).

Schwob, I., Bessière, J. M., Masotti, V., Viano, J., Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle, *Biochem. Syst. Ecol.*, 32, 735-745 (2004).

Schwob, I., Bessière, J. M., Viano, J., Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France, *C. R. Biologies*, 325, 781-785 (2002).

Shiba, Y., Takahashi, M., Ikeda, U., Models for the Study of Angiogenesis, *Curr. Pharm. Design.*, 14, 371-377 (2008).

Skalkos, D., Stavropoulos, N. E., Tsimaris, I., Gioti, E., Stalikas, C. D., Nseyo, U. O., Ioachim, E., Agnantis, N. J., The Lipophilic Extract of *Hypericum perforatum* Exerts Significant Cytotoxic Activity Against T24 and NBT-II Urinary Bladder Tumor Cells, *Planta Med.*, 71, 1030-1035 (2005).

Smelcerovic, A., Spiteller, M., Ligon, A. P., Smelcerovic, Z., Raabe, N., Essential oil composition of *Hypericum* L. species from Southeastern Serbia and their chemotaxonomy, *Biochem Syst. Ecol.*, 35, 99-113 (2007).

Sosa, S., Pace, R., Bornancin, A., Morazzoni, P., Riva, A., Tubaro, A., Loggia, R. D., Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L., *JPP*, 59, 703-709 (2007).

Süntar Peşin, I., Akkol Küpeli, E., Yilmazer, D., Baykal, T., Kırmızıbekmez, H., Alper, M., Yeşilada, E., Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L., J. Ethnopharmacol., 127, 468-477 (2009).

Tedeschi, E., Menegazzi, M., Margotto, D., Suzuki, H., Förstermann, U., Kleinert, H., Anti-Inflammatory Actions of St. John's Wort: Inhibition of Human Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression by Down-Regulating Signal Transducer and Activator of Transcription-1 α (STAT-1 α) Activation, J. Pharmacol. Exp. Ther., 307 (1), 254-261 (2003).

Toker, Z., Kızıl, G., Özen, H. Ç., Kızıl, M., Ertekin, S., Compositions and antimicrobial activities of the essential oils of two *Hypericum* species from Turkey, Fitoterapia, 77, 57- 60 (2006).

Ucuzian, A. A., Greisler, H. P., In Vitro Models of Angiogenesis, World J. Surg., 31, 654-663 (2007).

Vailhé, B., Vittet, D., Feige, J., In Vitro Models of Vasculogenesis and Angiogenesis, Lab. Invest., 81(4), 439-452 (2001).

Wei, A., Shibamoto, T., Medicinal Activities of Essential Oils: Role in Disease Prevention, In: Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables, R. Watson, V. R. Preedy (Eds.), Elsevier Science & Technology, 59-70 (2009).

Yang, S. H., Lin, J. K., Huang, C. J., Chen, W. S., Li, S. Y., Chiu, J. H., Silibinin Inhibits Angiogenesis via Flt-1, but not KDR, Receptor Up-Regulation, J. Surg. Res., 128, 140-146 (2005).

Yew, W. W., Selvaduray, K. R., Nesaretnam, K., The Plumbing System in Our Body-Angiogenesis and Cancer, Palm Oil Developments, 47, 10-15 (2004).

Yue, P. Y. K., Wong, D. Y. L., Ha, W. Y., Fung, M. C., Mak, N. K., Yeung, H. W., Leung, H. W., Chan, K., Liu, L., Fan, T. P. D., Wong, R. N. S., Elucidation of the mechanisms underlying the angiogenic effects of ginsenoside Rg1 *in vivo* and *in vitro*, Angiogenesis, 8, 205-216 (2005).

Zdunić, G., Godevac, D., Milenković, M., Vučićević, D., Šavikin, K., Menković, N., Petrović, S., Evaluation of *Hypericum perforatum* Oil Extracts for an Antiinflammatory and Gastroprotective Activity in Rats, Phytother. Res., 23, 1559-1564 (2009).

EKLER**EK 1. Daha Önce Çalışılan *Hypericum* Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimleri**

Tür	Yetiştirme Yeri	Uçucu Yağın Elde Edildiği Kısım	Uçucu Yağın Ana Bileşenleri	Kaynak
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Fransa	Toprak üstü kısımları	Vejetasyon, tomurcuklanma ve meyve verme döneminde karyofillen oksit (%15.3, %17.0, %18.5); çiçeklenme döneminde β -karyofillen (%18.3)	Schwob ve ark., 2004
	Türkiye	Toprak üstü kısımları	α -Pinen (% 50), karvakrol (% 22) (mikrodistilasyon sonucu)	Erken ve ark., 2001
	İran	Yapraklar Çiçekler ve meyveler	α -Pinen (% 29.33) α -Amorfen (% 15.86), α -pinen (% 11.34)	Akhbari ve Batooli, 2009
	Fransa	Toprak üstü kısımları	Üç lokalite için germakren D (% 17.8, % 37.3, % 29.1), bir lokalite için β -karyofillen (% 26.1), iki lokalite için spatulenol (% 21.1, % 21.5)	Schwob ve ark., 2002
	Türkiye	Toprak üstü kısımları	α -Pinen (% 61.7)	Çakır ve ark., 1997
	Sırbistan	Çiçekler Yapraklar Gövde Toprak üstü kısımları	2004 yılı için 2-metil oktan (% 27.3) 2004 yılı için α -bergamoten (% 11.5) 2004 yılı için (E)-anetol (% 25) 2003 yılı için 2-metil oktan (% 20.5), 2001 yılı için spatulenol (% 8.7), 1998 yılı için β -karyofillen (% 14.2)	Smelcerovic ve ark., 2007

EK 1. (Devam) Daha Önce Çalışılan *Hypericum* Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimleri

Tür	Yetiştirme Yeri	Uçucu Yağın Elde Edildiği Kısım	Uçucu Yağın Ana Bileşenleri	Kaynak
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Sırbistan	Toprak üstü kısımları	β -Karyofillen (% 14.2)	Gudžić ve ark., 2001
	Özbekistan	Toprak üstü kısımları	β -Karyofillen (% 11.7)	Baser ve ark., 2002
	Yunanistan	Toprak üstü kısımları	α -Pinen (% 21), 2-metil oktan (% 12.6)	Pavlović ve ark., 2006
	Sırbistan	Çiçekler	Nonan (% 63.8)	Rančić ve ark., 2005
	Litvanya	Çiçekler Yapraklar	1. örnek için manool (% 27.6); 2.-11. örnek için karyofillen oksit (% 15.9, % 25.6, % 29.1, % 27.5, % 16, % 29.5, % 19.2, % 34, % 20.3, % 18.8) 1. örnek için manool (% 13.8); 2.-6. ve 9.-11. örnek için karyofillen oksit (% 15.6, % 20.2, % 25.9, % 14.1, % 18.3 ve % 21.2, % 20.4, % 24.2); 7. ve 8. örnek için n-tetradekanol (% 24.5 ve % 20.1)	Radusiene ve ark., 2005

EK 1. (Devam) Daha Önce Çalışılan *Hypericum* Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimleri

Tür	Yetiştirme Yeri	Uçucu Yağın Elde Edildiği Kısım	Uçucu Yağın Ana Bileşenleri	Kaynak
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Yunanistan	Toprak üstü kısımları (doğal)	Germakren D (% 22.8)	Chatzopoulou ve ark., 2006
		Toprak üstü kısımları (kültür)	Germakren D (% 16.9)	
	İran	Toprak üstü kısımları	Çiçeklenme öncesi dönemde longifolen (% 18.7) Çiçeklenme döneminde α -kadinen (% 27.17) Meyvelenme döneminde longifolen (% 22)	Azizi, 2007
<i>Hypericum perforatum</i> L. var. <i>angustifolium</i> DC	İtalya	Çiçekler	2-Metil oktan (% 21.1), germakren D (% 17.6), α -pinen (% 15.8)	Pintore ve ark., 2005
<i>Hypericum perforatum</i> L. subsp. <i>veronense</i> (Schrank) Ces.	İtalya	Çiçekler	α -Pinen (% 35.6), 2-metil oktan (% 16.9)	Maggi ve Ferretti, 2008
<i>Hypericum perforatum</i> L. subsp. <i>perforatum</i>			β -Karyofillen (%24.4), 2,6-dimetil heptan (%18.2)	

EK 1. (Devam) Daha Önce Çalışılan *Hypericum* Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimleri

Tür	Yetiştirme Yeri	Uçucu Yağın Elde Edildiği Kısım	Uçucu Yağın Ana Bileşenleri	Kaynak
<i>Hypericum hircinum</i> L.	İtalya	Meyveler	Nonan (% 35.5)	Bertoli ve ark., 2000
<i>Hypericum hyssopifolium</i> Chaix subsp. <i>elongatum</i> (Ledeb.) Woron var. <i>elongatum</i>	Türkiye	Toprak üstü kısımları	α -Pinen (% 57.3)	Çakır ve ark., 2004
<i>H. hyssopifolium</i> Chaix var. <i>microcalycinum</i> Boiss. et Heldr.	Türkiye	Toprak üstü kısımları	Karyofillen oksit (% 20.4)	Toker ve ark., 2006

EK 2. *Hypericum* Türlerinin Yara İyileştirici, Antikanser ve Antienflamatuvar Aktivite Çalışmaları

Tür	Çalışılan Kısım	Aktivite Türü	Sonuç	Kaynak
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Toprak üstü kısımlardan elde edilen % 50' lik alkol ekstresi	Yara iyileştirici etki	Orta seviyede etki	Öztürk ve ark., 2007
	Toprak üstü kısımlarının zeytin yağı ekstresi, toprak üstü kısımlarının etanol ekstresi, etanol ekstresinden hazırlanan etil asetat ekstresi	Yara iyileştirici etki	Kuvvetli etki	Süntar Peşin ve ark., 2009
	Toprak üstü kısımlarının etanol ekstresi, etanol ekstresinden hazırlanan etil asetat ekstresi, bu ekstreden elde edilen Sephadex fraksiyonları	Antienflamatuvar etki	Doza bağlı etki	
	ekstresi	Antienflamatuvar etki	Kuvvetli etki	Tedeschi ve ark., 2003
	Flavonoit türevi Hiperozit	Antienflamatuvar etki	Kuvvetli etki (IC ₅₀ 5.768 × 10 ⁻⁶ M)	Obložinsk ý ve ark., 2006
	Hiperisin, saponinler, flavonoidler, karotenoidler, alkaloidler, vitaminler ve mineraller içeren sulu alkollü ekstre	Antienflamatuvar etki	Kuvvetli etki (% 4, 200 µg'da; % 12, 600 µg'da)	Hammer, 2008

EK 2. (Devam) *Hypericum* Türlerinin Yara İyileştirici, Antikanser ve Antienflamatuvar Aktivite Çalışmaları

Tür	Çalışılan Kısım	Aktivite Türü	Sonuç	Kaynak
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Çiçeklerden hazırlanan % 0.27 hiperisin ve % 2.5 hiperforin içeren kuru ekstre	Antienflamatuvar etki	Kuvvetli etki (10 mg/kg dozda)	Hammer, 2008
	Yaprak, gövde ve çiçeklerden hazırlanan % 50'lik sulu etanolik ekstresi	Antienflamatuvar etki	Kuvvetli etki (100 veya 200 mg/kg dozda)	
	Lipofilik ekstresi, etil asetik asit fraksiyonu ve sulu alkollü ekstresi	Antienflamatuvar etki	Kuvvetli etki (IC ₅₀ of 220, 267, ve >1000 µg/cm ²)	
	Toprak üstü kısımlardan elde edilen etanol ekstresi	Antienflamatuvar etki	Doza bağlı etki	Šavikin ve ark., 2007
	Çiçekli kısımlardan elde edilen yağ ekstreleri	Antienflamatuvar etki	Kuvvetli etki	Zdunić ve ark., 2009
	Çiçekli kısımlardan elde edilen ticari ekstre	Antienflamatuvar etki	Doza bağlı etki	Raso Mattace ve ark., 2002
	Çiçekli kısımlardan elde edilen sulu alkollü, lipofilik ve etilasetik ekstreler	Antienflamatuvar etki	Doza bağlı etki	Sosa ve ark., 2007
	Metanollü ticari ekstre	Antienflamatuvar etki	Kuvvetli etki	Menegazzi ve ark., 2006
	Metanol ekstresi	Antikanser etki	Kuvvetli sitotoksik etki	Couladis ve ark., 2002

EK 2. (Devam) *Hypericum* Türlerinin Yara İyileştirici, Antikanser ve Antienflamatuvar Aktivite Çalışmaları

Tür	Çalışılan Kısım	Aktivite Türü	Sonuç	Kaynak
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Metanol ekstresi	Antikanser etki	Prostat kanseri hücrelerinin gelişiminin inhibisyonu	Martarelli ve ark., 2004
	Flavonoitçe zengin hekzan, etanol ve kloroform ekstrelerinden kolon kromatografisi sonucunda elde edilen amentoflavon, klorojenik asit, psödohiperisin ve kersetin içeren fraksiyon	Antienflamatuvar etki	Kuvvetli etki	Birt ve ark., 2009
	Çiçeklerden elde edilen metanol ekstresi	Antikanser etki	Kuvvetli sitotoksik ve apoptotik etki	Roscetti ve ark., 2004
	Çiçeklerden elde edilen % 0.27 antrakinin türevleri	Antikanser etki	Apoptotik etki	Di Carlo ve ark., 2003
	Toprak üstü kısımlardan petrol eteriyle hazırlanan lipofilik ekstre	Antikanser etki	T24 ve NBT-II mesane tümör hücrelerine karşı kuvvetli sitotoksik etki	Skalkos ve ark., 2005
	Ticari preparatları	Antikanser etki	Karsinojen aktivasyonunun kuvvetli inhibisyonu	Schwarz ve ark., 2003