









SALVIA VERTICILLATA L., ACHILLEA BIEBERSTEINII AFAN., TRAGOPOGON AUREUS BOISS. VE CEPHALARIA PROCERA FISCH. & AVÉ-LALL.'NIN HEMOSTATİK PERFORMANSLARININ İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

IN VITRO ASSESSMENT OF HEMOSTATIC PERFORMANCES OF SALVIA VERTICILLATA L, ACHILLEA BIEBERSTEINII AFAN., TRAGOPOGON AUREUS BOISS., AND CEPHALARIA PROCERA FISCH. & AVÉ-LALL.

Songul KARAKAYA^{1*} , Ozlem OZDEMİR² , Umit INCEKARA³ , Hasan TURKEZ⁴ ,
Oksana SYTAR⁵ , Ozkan AKSAKAL³ 

¹Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 25240, Erzurum, Türkiye

²Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 25100, Erzurum, Türkiye

³Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240, Erzurum, Türkiye

⁴Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 25240, Erzurum, Türkiye

⁵Kiev Ulusal Taras Shevchenko Üniversitesi, Biyoloji Enstitüsü, Bitki Biyolojisi Bölümü, Volodymyrska, 64, Kiev, Ukrayna

ÖZ

Amaç: Hemostaz, kanamayı önlemek veya durdurmak için doğal bir işlev ve doğal bir süreçtir. Günümüzde kanama kontrolü için yeni, ekonomik ve yüksek performanslı ürünler geliştirmek için büyük çaba sarf edilmektedir. Bu çalışmada, halk hekimliğinde farklı amaçlarla kullanılan *Salvia verticillata*, *Achillea biebersteinii*, *Tragopogon aureus* ve *Cephalaria procera* gibi dört farklı bitki türünün *in vitro* hemostatik etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Songül Karakaya
e-posta / e-mail: songul.karakaya@atauni.edu.tr, Tel. / Phone: +904422315250

Gönderilme / Submitted : 16.03.2023

Kabul / Accepted : 03.08.2023

Yayınlanma / Published : 20.09.2023

Gereç ve Yöntem: Farklı polaritelerde ekstreler hazırlandı ve hemostatik etkinlikleri optik agregometri kullanılarak belirlendi.

Sonuç ve Tartışma: Mevcut sonuçlar, diğer bitki özleri ile karşılaştırıldığında *S. verticillata* ekstrelerinin adenozin-difosfat (ADP) (%80.77), kollajen (%80.78) ve araziidonik asit (AA) (%73.71) varlığında trombosit agregasyonu üzerinde en yüksek etkinliği gösterdiğini açıkça ortaya koymuştur. Yine epinefrin (EPI) varlığında en etkili trombosit agregasyonu (%47.27) *C. procera* uygulamasından sonra belirlendi. Ayrıca, öncelikle etil asetat ekstrelerinin APD, kollajen, AA ve EPI olgusunda en yüksek trombosit agregasyonu yüzdelere göstermiştir. Sonuç olarak, bulgularımız, özellikle *S. verticillata* ve *C. procera*'nın etkili hemostatik ajanların yeni ve doğal kaynakları olabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *Achillea biebersteinii*, *Cephalaria procera*, hemostaz, *Salvia verticillata*, *Tragopogon aureus*

ABSTRACT

Objective: Hemostasis is an inherent function and natural process to prevent or stop bleeding. Nowadays great efforts are being made to develop novel, economical and high-performance products to control bleeding. In this study, we aimed to assess the in vitro hemostatic effects of four several plant species used in folk medicine for different purposes including *Salvia verticillata*, *Achillea biebersteinii*, *Tragopogon aureus*, and *Cephalaria procera*.

Material and Method: The extracts with different solvent nature were prepared and their hemostatic efficacy were determined using optical aggregometry.

Result and Discussion: The present results clearly revealed that the extracts of *S. verticillata* showed the highest efficacy on platelet aggregation in presence of adenosine-diphosphate (ADP) (80.77%), collagen (80.78%), and arachidonic acid (AA) (73.71%) when compared to other plant extracts. Again, the most effective platelet aggregation (47.27%) was determined after the application *C. procera* within the presence of epinephrine (EPI). Moreover, we first executed that ethyl acetate extracts led to the highest percentages of platelet aggregation in the fact of APD, collagen, AA and EPI. In a conclusion, our findings suggested that the tested medicinal plants in particular *S. verticillata* and *C. procera* could be novel and natural sources of effective hemostatic agents.

Keywords: *Achillea biebersteinii*, *Cephalaria procera*, hemostasis, *Salvia verticillata*, *Tragopogon aureus*

GİRİŞ

Kanama, travma tedavisi ve cerrahi müdahalelerde hastaların ve yaralı kişilerin güvenliğini tehdit eder. Kanama, tüm travma kazalarının %80'ini oluşturan travmadan sonra 48 saat içindeki ölümün başlıca nedenidir. Hemostaz, kan akışının durdurulması anlamına gelen bir Yunanca kelime kökenlidir. Birkaç sistemin hassas bir dengeye dayandığı karmaşık bir düzenlenmiş sistemden oluşur. Hemostatik süreçte yer alan en önemli sistemler arasında vasküler sistem, trombositler, pıhtılaşma sistemi ve fibrinolitik sistem bulunur [1].

Kanama, yaralanmalar veya diğer bazı sebeplerle damardan dışarı çıkan kandır. Bu durum, tüm insanlar ve hayvanlar için hayati bir öneme sahiptir ve ciddi risklere, hatta ölüme yol açabilir. Bu nedenle, kanamayı önlemek veya durdurmak için gerçek teknikler ve yeni ilaçlar/bileşikler kullanılarak kapsamlı çabalar gösterilmektedir. Bu alandaki ilk uygulamalar, eski Mısır ve Yunan halkının kullandığı kazıma tekniğidir. Bu teknik uzun bir süredir kullanılmakta olup, 16. yüzyılda ligasyon tekniğiyle değişime uğramıştır. 20. yüzyılın başlarında bypass tekniği uygulanmaya ve yaygınlaşmaya başlamıştır. Birinci ve İkinci Dünya Savaşı gibi dünyanın farklı bölgelerindeki savaşlar ve çatışmalar, bu alandaki ihtiyacın ve tecrübenin artmasına neden olmuştur. Vasküler yaralanmaları iyileştirmenin temel amacı kanamayı durdurmak ve normal dolaşımı sürdürmektir [2]. İnsan trombositleri, normal hemostaz, patolojik kanama ve trombozda farklı işlevlerle bu süreçte önemli bir rol oynar. Temel hemostaz, damar duvarları ve trombositler arasındaki etkileşime dayanır. Bir damar duvarının hasar gördüğü bölgede, trombositler hızlı bir fonksiyonel yanıtta adezyon, aktivasyon ve agregasyon yoluyla trombosit aktivasyonuna katılırlar [3]. Trombositlerin çeşitli işlevleri, kapsamlı bir araştırma yelpazesiyile güvenilir bir şekilde tanımlanabilir [4,5]. Erken kanama kontrolü hayati önem taşır, çünkü kan yaşamın

değerli özüdür ve kontrolsüz kanama hayati tehlike oluşturabilir. Vücudun doğal hemostatik sistemi hafif ila orta düzeydeki kanamaları yönetme kabiliyetine sahiptir [6].

1960'lerde, trombosit açısından zengin plazmada (PRP) devrim niteliğindeki trombosit agregasyon deneyi olan ışık geçirgenliği agregometrisi, trombosit fonksiyonunu teşhis etmek için anahtar tekniktir [7]. Bu yaklaşım, adenozin-difosfat (ADP), araziidonik asit (AA), kollajen ve epinefrin (EPI) gibi harici agregasyon ajanlarına veya agonistlerine yanıt olarak trombositlerin *in vitro* olarak birbirlerini aglomere etme yeteneklerinin belirlenmesini sağlar. Günümüzde kan pıhtılaşmasını değiştiren yeni ajanlar geliştirmek için büyük çaba sarf edilmektedir. Pıhtılaşmayı değiştiren ilaçların endikasyonları, trombosit inhibitörleri ile yakından ilişkilidir. Çoğu trombosit inhibitörü, trombositler üzerindeki reseptörleri bloke ederek yapışmayı önlemeyi amaçlar. Kanama (diş fırçalama gibi basit kanama durumlarından, yaralanma sonrası aşırı kanamaya kadar) en yaygın yan etkidir [8]. Bu soruna yönelik birçok ürün piyasada bulunmaktadır. Bununla birlikte, hala keşfedilmemiş ürünler mevcuttur ve daha iyi performans ve daha ekonomik özellikler sunan yeni adaylar elde etmek için artan sayıda araştırma yapılmaktadır. Ankaferd Blood Stopper (ABS) adı verilen bir ilaç, çiçek aşısı sonrasında Türk uzmanların en büyük icadı olarak kabul edilen bu alandaki en yeni üründür. Bu ilacın hiçbir yan etkisi olmadığı ve kanamayı diğerlerine göre çok daha kısa sürede durdurduğu bilinmektedir. Gerçekten de ABS, diş kanama ve diş operasyonu kanamalarının tedavisinde etkinliği kanıtlanmış bitkisel ekstre karışımıdır. Geleneksel olarak yıllar boyunca topikal bir hemostatik ajan olarak kullanılmıştır. İçeriğinde *Glycyrrhiza glabra* L., *Thymus vulgaris* L., *Urtica dioica* L., *Alpinia officinarum* Hance ve *Vitis vinifera* L olmak üzere beş farklı bitki bulunduğu bildirilmiştir [9,10]. Bu ilaç tamamen bitkisel karışımla hazırlanmıştır ve halk tıbbına dayanmaktadır [11]. Lamiaceae familyasının en yaygın üyelerinden biri *Salvia* L. cinsidir ve yaklaşık 700 türü vardır. *Salvia* türünden elde edilen terpenoid bileşikler, fenolik türevler ve uçucu yağlar gibi çeşitli kimyasal gruplardan faydalı ikincil metabolitler elde edilmiştir ve bu içerikler, birçok ülkenin farmakopelerinde belirgin bir şekilde yer almaktadır [12]. *S. verticillata* L., leylak adaçayı olarak da bilinen bir Avrasya türüdür ve geleneksel olarak halk tıbbında ve bahçe düzenlenmesinde kullanılır. *S. verticillata*'nın iyi antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri olduğu bildirilmiştir [13]. *Achillea*, Truva Savaşı'nda askerlerin yaralarını iyileştirmek için kullanılan ayva yağından dolayı Aşil'in adını almıştır. *A. biebersteinii* Hub.-Mor. (Asteraceae) ise odunsu olmayan, aromatik ve otsu bir bitkidir. *A. biebersteinii*; antiplatelet, antikanser, antioksidan, antiülser, yara iyileştirme, antigit, hipoglisemik, antibakteriyel, antiinflamatuvar, anti epimastigot, nöroprotektif gibi çok çeşitli biyolojik ve farmakolojik etkilere sahiptir. Ayrıca antikolinesteraz özelliği de bulunmaktadır. Bu tür aynı zamanda endometriozis tedavisinde de etkili olmuştur [14]. Bitki, peynirin korunması için peynir yapım sürecinde kullanılmıştır. *S. verticillata* toprak üstü kısımlarından hazırlanan çay balgam söktürücü olarak, ağız dezenfeksiyonunda ve yaraların iyileşmesinde kullanılmaktadır [15].

A. biebersteinii Hub.-Mor. 2012'den beri *A. arabica* Kotschy'nin sinonimi olarak kabul edilmektedir [16]. *Tragopogon aureus* Boiss. (Asteraceae) adlı bitki, Avrasya'dan Atlantik ve Pasifik Okyanuslarına kadar yayılan, endemik ve çok yıllık bir türdür. Olgun *T. aureus* genellikle 10-30 cm boyunda olup, gövdeleri dalsız ve yaprakları mızrak şeklindedir. Bu tür, 1700-2300 m yükseklikteki kayalık yamaçlar, bozkırlar ve tarla kenarlarında yetişir ve Türkiye'de "sarı yemlik, sping, spink, yemlik" gibi isimlerle tanınır. Bu bitkiden elde edilen lateks, halk hekimliğinde hemostatik (kanama durdurucu) olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bitkinin yaprakları taze olarak sebze olarak da tüketilebilir [17-20]. *Cephalaria procera* Fisch & Lall. (Caprifoliaceae) adlı bitki, kuzey Ermenistan, İran ve Türkiye'de yetişir. Bu bitki çok yıllıktır ve gövdeleri 2 metreye kadar uzayabilir. Çiçekler genellikle krem veya soluk sarı renktedir. *C. procera*, 1120-2450 metre yükseklikteki çayırlar, bozkır alanları ve kayalık yamaçlarda yaygın olarak bulunur. Halk arasında "cipreş, gevrek, ganteper" gibi isimlerle bilinir ve bu bitkinin taze toprak üstü kısımları ezilerek geleneksel olarak yara iyileşmesinde hemostatik (kanama durdurucu) olarak kullanılır [18,19,21,22].

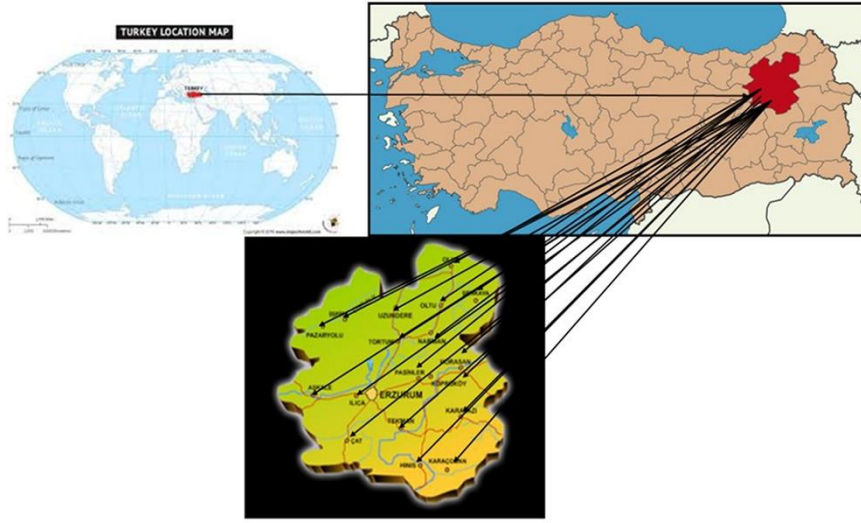
Bu çalışmada, *S. verticillata*, *A. biebersteinii*, *T. aureus* ve *C. procera* *in vitro* deneylerle hemostatik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bu bitkiler, Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün "Erzurum İlinde Biyoçeşitliliğe Dayalı Geleneksel Bilgilerin Belirlenmesi" projesi kapsamında halk tarafından kan durdurucu amaçla yaygın olarak kullanılan bitkiler tespit edilmiştir. Bu amaçla, bitkilerin trombositlerin maksimum agregasyonunu ölçmek için

optik agregometri yöntemiyle incelenmesi, bu projede ilk kez önerilen bir yaklaşımdır. Bu şekilde, bitkilerin hemostatik özellikleri araştırılmış ve değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bitki Materyalleri

Salvia verticillata, *Achillea biebersteinii*, *Tragopogon aureus* ve *Cephalaria procera*, “Erzurum İlinde Biyoçeşitliliğe Dayalı Geleneksel Bilgilerin Belirlenmesi” adlı mevcut projenin kapsamında toplanmıştır. Araştırma bölgesinin coğrafi konumu Şekil 1’de sunulmuştur. Bitkiler, Prof. Dr. Özkan Aksakal tarafından teşhis edilmiştir. Bitki örnekleri, Atatürk Üniversitesi Biyoçeşitlilik Uygulama ve Araştırma Merkezi Herbariumu’na kaydedilmiştir. Toplanan bitki örneklerinin lokaliteleri ve herbarium numaraları Tablo 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Araştırma bölgesinin coğrafi konumu

Tablo 1. Toplanan bitki örneklerinin lokaliteleri ve herbarium örnekleri

Türler	Lokaliteler	Herbarium kodu
<i>Salvia verticillata</i> L.	B8 Erzurum: Narman, Göllü köyü, 03.06.2018, 1900 m	AUEF 1264
<i>Achillea biebersteinii</i> Hub.-Mor.	B8 Erzurum: Atatürk Üniversitesi kampüsü, Eczacılık Fakültesi bahçesi, 05.06.2018, 1890 m	AUEF 1359
<i>Tragopogon aureus</i> Boiss.	B8 Erzurum: Erzurum Kent ormanı, 07.06.2018, 1910 m	AUEF 1360
<i>Cephalaria procera</i> Fisch. & Avé-Lall.	B8 Erzurum: Erzurum Kent ormanı, 07.06.2018, 1910 m	AUEF 1361

Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama

S. verticillata, *A. biebersteinii* ve *C. procera*'nın toprak üstü kısımları (50 g) ile *T. aureus*'un kökleri (50 g) öğütüldü ve oda sıcaklığında üç gün boyunca metanolle hareketli maserasyona tabi tutuldu (3 x 200 ml). Ekstreler kurutuldu ve metanol: su (1: 9) karışımında disperse edildikten sonra sırasıyla *n*-hekzan (3 x 150 ml), diklorometan (3 x 150 ml), etil asetat (3 x 150 ml) ve *n*-butanol (3 x 150 ml) ile fraksiyonlandı. Her bir fraksiyon kurutuldu, tartıldı. Çalışmada tüm ekstre ve alt-ekstreler test edilmiştir. *S. verticillata*, *A. biebersteinii*, *T. aureus* ve *C. procera*'dan elde edilen ekstrelerin ve alt-ekstrelerin miktarları Tablo 2'de sunulmuştur. Ayrıca, bitkilerin halk arasındaki kullanımı dikkate alındığında, bitkiler taze iken toprak üstü kısımları havanda dövülerek elde edildi. Sadece *T. aureus* kökünün lateksi kesim yoluyla elde edildi.

Tablo 2. *Salvia verticillata*, *Achillea biebersteinii*, *Tragopogon aureus* ve *Cephalaria procera*'dan elde edilen ekstre ve alt ekstrelerin miktarları

Estre ve alt ekstreler	<i>Salvia verticillata</i>	<i>Achillea biebersteinii</i>	<i>Tragopogon aureus</i>	<i>Cephalaria procera</i>
MeOH (g)	10.09	10.25	11.24	9.87
Hekzan (g)	1.20	1.22	1.51	1.26
CH ₂ Cl ₂ (g)	2.89	2.92	3.02	2.04
EtOAc (g)	0.76	0.69	1.03	0.93
BuOH (g)	2.77	2.91	3.01	2.28
Sulu kısım (g)	2.23	2.04	2.41	2.22

Kimyasallar

ADP, Kollajen, AA ve EPI için trombosit agregasyonu, Hart Biologicals (Hartlepool, İngiltere) tarafından satın alınmıştır.

Kan Toplama ve PRP'nin Hazırlanması

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (B.30.2.ATA.0.01.00/). Kan, 20-25 yaş aralığında (22.5 ± 1.3) üç sağlıklı ve sigara kullanmayan kadın gönüllüden 0.10^5 M tamponlu sodyum sitrat içeren polipropilen tüpe toplanmıştır. Vericilerden hiçbiri, kan toplamadan en az 10 gün önce trombosit fonksiyonunu etkileyen herhangi bir ilaç almamıştır. PRP, tam kanın 150 g'de 15 dakika boyunca RT'de santrifüj edilmesiyle toplanmıştır. Daha sonra, trombosit yoksun plazma (PPP) 2000 g'de 20 dakika boyunca RT'de santrifüj edilerek toplanmıştır. Trombosit sayısı PPP ile 2×10^8 hücre/ml'ye ayarlanmıştır.

PRP'nin Ekstrelerle İnkübasyonu

PRP, ekstrelerle (1/5 ve 1/10) 37 °C'de 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Herhangi bir bileşik içermeyen PRP kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Optik Agregometri ile Maksimum Agregasyon Ölçümü

PRP'deki trombosit agregasyonu, dört kanallı agregometre (APACT 4004; LABiTec, Ahrensburg, Almanya) kullanılarak ölçülmüştür. PRP'nin ekstraktlarla inkübasyonundan sonra, trombosit agregasyonu ADP (5µM), Kollajen (10µg/ml), AA (5mM) ve EPI (10µM) ile uyarılmış ve agregasyon yüzdesi 10 dakika boyunca izlenmiştir. Test, kan toplandıktan hemen sonra yapıp 2 saat içinde tamamlanmıştır. Trombosit agregasyon deneyleri üç kez tekrarlanmıştır.

Toplam Fenolik İçerik

250 µl Folin-Ciocalteu, 50 µl materyal ve %500 Na₂CO₃ su çözeltisinin göstergesi karıştırılmış ve 5 ml suya tamamlanmıştır. Absorbans 765 nm'de ölçülmüştür. 30 dakika RT inkübasyonu sonrasında referans eğrisi galik asit ile yapılmıştır. Toplam polifenoller galik asit eşdeğerleri (GAE) olarak sunulmuştur ve mg GAE/g materyal (dw) ± standart sapma (SD) olarak belirtilmiştir [23-25].

Kantitatif DPPH

Materyallerin 0.1 ml'si, 2.9 ml DPPH çözeltisine serbest radikal kaynağı olarak konuldu. Karışımlar, karıştırıldı, 30 °C'deki bir su banyosunda 30 dakika inkübe edildi ve her materyalin absorpsiyonu 517 nm'de ölçüldü. Referans olarak klorojenik asit, rutin ve propil gallat kullanıldı. Veriler, DPPH'nin radikal süpürme aktivitesinin yüzdesi (%) olarak gösterildi ve $[(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$ formülüyle hesaplandı, burada A₀ materyallerin varlığında absorpsiyonu ifade etmektedir [26].

İstatistiksel Analiz

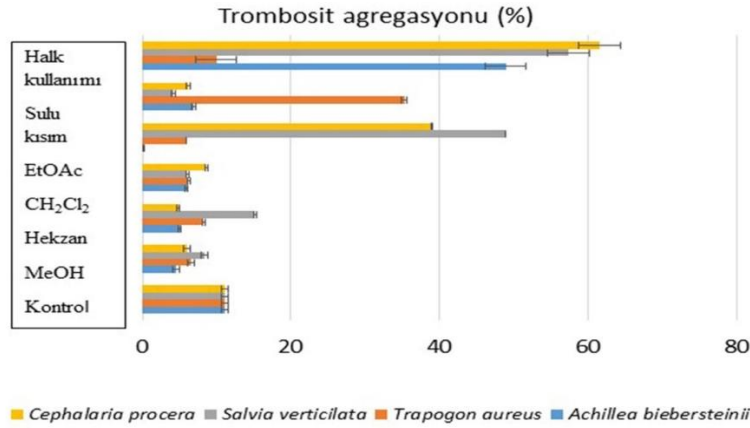
Bulguların istatistiksel analizinde SPSS 20.0 paket programı (SPSS Inc., Chicago, USA) kullanıldı. Varyans analizi, kontrol ve farklı örneklerin işlem görmüş grupları arasında trombosit

agregasyonunun farklı olup olmadığını belirlemek için kullanıldı. Oneway Anova ve Fisher Least Significant Difference (LSD) testleri varyans analizi için kullanıldı. 0.05'ten küçük bir p değeri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

SONUÇ VE TARTIŞMA

S. verticillata, *A. biebersteinii*, *T. aureus* ve *C. procera* bitkilerinin toprak üstü kısımlarının metanolik ekstraktları ve hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH, sulu kısım alt ekstraktlarının ADP, kolajen, AA ve EPI varlığında kanama durdurma performansları test edilmiştir. Ayrıca, *S. verticillata*, *A. biebersteinii* ve *C. procera* toprak üstü kısımlarının usareleri ile *T. aureus* kök lateksi de test edilmiştir. Numunelerin ADP, kolajen, AA ve EPI varlığında kanama durdurma performansı sonuçları Şekil 2-5'te sunulmuştur.

A. biebersteinii numuneleri arasında ADP varlığında trombosit agregasyonu üzerine en etkili numunenin halk arasındaki kullanımının (yaprakların tazeyken ezilerek kanayan bölge üzerinde bekletilerek) olduğu görülmüştür (%45.62). *S. verticillata*, örnekler arasında, ADP varlığında en etkili örnek olarak bulundu (%80.77). *T. aureus* numuneleri arasında ADP varlığında trombosit agregasyonu üzerine en etkili numunenin halk arasındaki kullanımının (köklerden elde edilen latekslerin toplanıp sakız kıvamına getirilip kanayan bölge üzerinde bekletilerek) olduğu görülmüştür (%37.94). *C. procera* numuneleri arasında ADP varlığında trombosit agregasyonu üzerine en etkili numunenin halk arasındaki kullanımının (pedunkullar tazeyken ezilerek kanayan bölge üzerinde bekletilerek) olduğu görülmüştür (%61.61). Tüm numuneler arasında ADP varlığında trombosit agregasyonu üzerine en etkili numunenin *S. verticillata* bitkisi olduğu görülmüştür (Şekil 2).

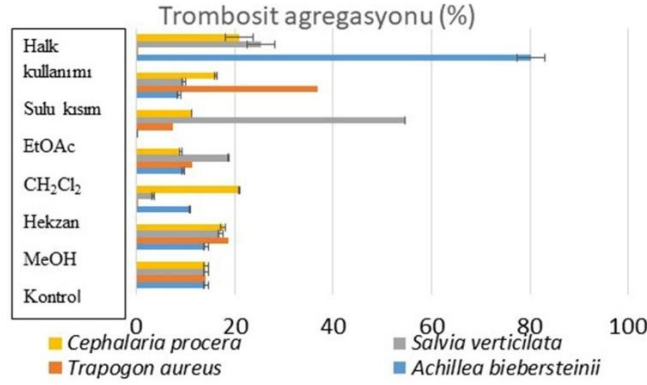


Şekil 2. Farklı çözücülerle elde edilen bitki ekstraktlarının ADP varlığında trombosit agregasyonuna etkisi. Değerler ortalama+SD olarak gösterilmiştir

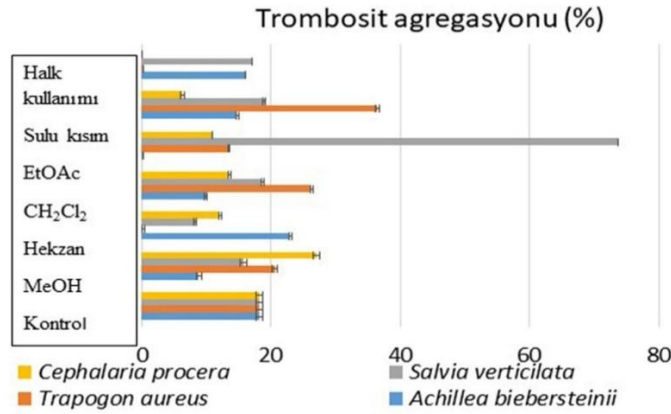
Sonuçlarımıza göre, *A. biebersteinii* numunelerinin halk arasında kullanımıyla (yaprakların tazeyken ezilerek kanayan bölge üzerinde bekletilmesi) kolajen varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe ettiği (%80.27) görüldü. Benzer şekilde, *S. verticillata* numuneleri de halk arasında kullanıldığında (yaprakların tazeyken ezilerek kanayan bölge üzerinde bekletilmesi) kolajen varlığında trombosit agregasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği belirlendi (%80.78). *T. aureus* numuneleri arasında sulu fraksiyonunun kolajen varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe ettiği (%36.74) tespit edildi. Benzer şekilde, *C. procera* numuneleri arasında da sulu fraksiyonunun kolajen varlığında trombosit agregasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği (%38.55) gözlemlendi. Tüm numuneler arasında kolajen varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden bitkinin *S. verticillata* olduğu belirlendi (Şekil 3).

Sonuçlarımıza göre, *A. biebersteinii* numunelerinin araşidonik asit varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden fraksiyonun hekzan fraksiyonu olduğu belirlendi (%22.92). Benzer şekilde, *S. verticillata* numunelerinde ise araşidonik asit varlığında trombosit agregasyonunu en

etkili şekilde inhibe eden fraksiyonun etilasetat fraksiyonu olduğu tespit edildi (%73.71). *T. aureus* numuneleri arasında ise araşidonik asit varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden fraksiyonun sulu fraksiyon olduğu görüldü (%36.39). *C. procera* numunelerinde ise araşidonik asit varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden numunenin metanol ekstresi olduğu belirlendi (%26.99). Tüm numuneler arasında araşidonik asit varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden bitkinin *S. verticillata* olduğu sonucuna ulaşıldı (Şekil 4).



Şekil 3. Farklı çözücülerle elde edilen bitki ekstraktlarının kollajen varlığında trombosit agregasyonuna etkisi. Değerler ortalama+SD olarak gösterilmiştir

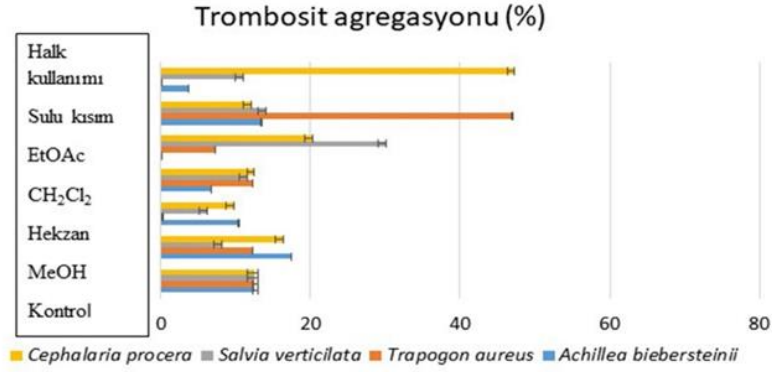


Şekil 4. Farklı çözücülerle elde edilen bitki ekstraktlarının araşidonik asit varlığında trombosit agregasyonuna etkisi. Değerler ortalama + SD olarak gösterilmiştir

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, *A. biebersteinii* numunelerinde epinefrin varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden numunenin metanol ekstresi olduğu saptandı (%13.45). Benzer şekilde, *S. verticillata* numunelerinde epinefrin varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden numunenin etilasetat fraksiyonu olduğu tespit edildi (%30.14). *T. aureus* numuneleri arasında epinefrin varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden numunenin sulu fraksiyon olduğu gözlemlendi (%47.02). *C. procera* numunelerinde ise epinefrin varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden numunenin halk arasında kullanılan yöntemle (pedunkulların tazeyken ezilip kanayan bölge üzerinde bekletilmesi) elde edilen numune olduğu görüldü (%47.27). Tüm numuneler arasında epinefrin varlığında trombosit agregasyonunu en etkili şekilde inhibe eden bitkinin *C. procera* olduğu sonucuna ulaşıldı (Şekil 5).

Tüm numuneler arasında ADP, kolajen ve araşidonik asit varlığında trombosit agregasyonu üzerine en etkili bitkinin *S. verticillata* olduğu görülmüştür. Epinefrin varlığında trombosit agregasyonu üzerine en etkili bitkinin ise *C. procera* olduğu görülmüştür. Her bir bitkinin halk arasında kullandığı

şekli ve çeşitli kısımlarından hazırlanan ekstratlar üzerine uygulanan “Platelet Agregasyon Testi” sonucunda, yüksek performans gösterenler tespit edilmiş, yeni bir ürün geliştirme potansiyelinin olup olmadığı araştırılmış ve bazı örneklerin çok yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, bazı yüksek performanslara dikkat çekilirken, *in vivo* çalışmaların da yapılması gerektiği kanısına varılmıştır. Ancak bu sonuçlar, bu konudaki uzun soluklu çalışmaların ilk basamağı olarak değerlendirilmelidir.



Şekil 5. Farklı çözücülerle elde edilen bitki ekstratlarının epinefrin varlığında trombosit agregasyonuna etkisi. Değerler ortalama + SD olarak gösterilmiştir

Oksidatif stres ROS tarafından artırıldığında dokularda hasara, DNA, protein ve lipid hasarına neden olduğu bilinmektedir [27]. En yüksek toplam fenolik içerik geleneksel kullanımda *S. verticillata*'da (1287.83 ± 1.77 mg GAE/g kuru ağırlık) gösterilmiştir (Tablo 3). Ayrıca, *S. verticillata*'nın geleneksel kullanımı ($8.65 \mu\text{g/ml}$), en yüksek radikal süpürme aktivitesini göstermiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Yüksek aktivite gösteren örneklerin toplam fenolik içerikleri ve DPPH radikal süpürme aktivitesi ($\mu\text{g/ml}$)

Test edilen örnekler	Toplam fenolik içerik (mg GAE/g) \pm SD*
<i>S. verticillata</i> 'nın geleneksel kullanımı	1287.83 ± 1.77
<i>S. verticillata</i> 'nın EtOAc alt-ekstraktı	988.25 ± 2.56
<i>C. procera</i> 'nın geleneksel kullanımı	1092.66 ± 1.92
Test edilen örnekler	IC ₅₀ değerleri ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD*
<i>S. verticillata</i> 'nın geleneksel kullanımı	8.65 ± 2.87
<i>S. verticillata</i> 'nın EtOAc alt-ekstraktı	13.77 ± 1.60
<i>C. procera</i> 'nın geleneksel kullanımı	10.77 ± 0.91
Klorojenik asit	2.66 ± 0.72
Propil galat	0.015 ± 0.82
Rutin	2.99 ± 0.90

*Standard deviation

Kanama, yaralanma, kan hastalıkları veya ilaç etkisi gibi nedenlerle oluşabilir. Kanamayı durdurmak sıkça talep edilen tıbbi bir müdahaledir. Desmopressin, aprotinin ve antifibrinolitik amino asitler (traneksamik asit ve aminokaproik asit gibi) gibi etkili birçok hemostatik ilaç mevcuttur. Bunlar doğuştan gelen kanamalar, hastalıklar, iç kanamalar veya kalp cerrahisi gibi durumlarda kullanılırlar, ancak bu ilaçlar lokal kullanım için tasarlanmamıştır. Fibrin doku yapıştırıcıları, protrombin, kollajen ve trombin gibi topikal hemostatik ajanlar pahalı ve kolayca erişilebilir değildir. Ayrıca, bazıları sınırlı aktivite sergilemiştir. Bu nedenle, kritik kanama durumları için değil, aynı zamanda yaygın yaralar veya mukozal kanamalar için acil olarak etkili topikal ajanlara ihtiyaç vardır. Bazı doğal bileşikler geleneksel olarak kanamayı durdurmak için etkili bir şekilde kullanılmıştır [28]. Cerrahi işlemlerin neden olduğu

kanama, yanıkları içeren plastik cerrahi uygulamaları dışında ölümün nadir bir nedenidir. Konvansiyonel tıbbi bitki özleri, dermal, harici travmatik ve postoperatif, ve dış kanamalarının yönetimi için kullanılan bir alternatif tedavi modalitesidir [29]. Fitokimyasal bulgular, incelenen tüm numunelerin polifenolik bileşenler içerdiğini göstermiştir. Aslında, *Arbutus unedo*, *Equisetum arvense*, *Petroselinum crispum*, *Cistus ladaniferus* ve *Urtica dioica*'da flavonoidler ve tanenlerin mevcut olduğu bildirilmiştir. Test edilen bitki türlerinin gözlemlenen hemostatik özellikleri, biyolojik olarak aktif bileşenlerine atfedilebilir. Ve önceki araştırmalar, flavonoidlerin trombosit agregasyonunu, sekresyonunu ve yapışmasını önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Aslında, kırmızı şarapta bulunan bir polifenolik bileşik (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben veya t-resveratrol), hiperkolesterolemik tavşanlarda trombosit agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [30]. Oksidatif stres, kan damarlarının hasarına neden olarak kanamaya yol açabilir. Serbest radikaller, endotel hücrelerinde hasara neden olarak damarların bütünlüğünü bozabilir ve kanamaya neden olabilir. Serbest radikaller, pıhtılaşma faktörlerini etkileyebilir ve kanın normal pıhtılaşmasını engelleyebilir. Bu durumda kanama eğilimi artabilir. Trombositler, kanamanın durdurulmasında önemli bir rol oynar ve oksidatif stres trombosit aktivasyonunu artırabilir veya inhibe edebilir. Bbu da kanama üzerinde etkili olabilir ve oksidatif stres kan damarlarında hasara yol açarak kanama riskini artırabilir.

Kanamayı durdurmak veya azaltmak için geleneksel tıbbi bitkiler uzun süredir kullanılmaktadır. Bu bitkiler, içerdikleri biyoaktif bileşikler sayesinde kanama kontrolüne yardımcı olabilir ve yara iyileşmesini destekleyebilir. İşte kanamada kullanılan geleneksel tıbbi bitkilerin önemini vurgulayan bazı noktalar:

Hemostatik etki: Kanamayı durdurmak veya azaltmak için kullanılan bitkiler, içerdikleri aktif bileşikler sayesinde kan pıhtılaşmasını artırabilir veya kan damarlarının daralmasını sağlayabilir. Bu şekilde, kanama kontrol edilir ve kan pıhtılaşması hızlanır.

Yara iyileşmesi: Kanama, yaralanmaların doğal bir sonucu olarak ortaya çıkar. Geleneksel tıbbi bitkiler, yara iyileşmesini hızlandırmaya yardımcı olabilir. Antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip bileşikler içerdikleri için yara bölgesinde iyileşme sürecini desteklerler.

Doğal ve yan etkisiz: Geleneksel tıbbi bitkiler genellikle doğal kaynaklardan elde edilir ve kimyasal bileşenler içermezler. Bu nedenle, sentetik ilaçlara kıyasla daha az yan etki riski taşırlar. Bununla birlikte, herhangi bir bitki veya bitkisel ürün kullanırken, kişinin özel sağlık durumu ve alerjik reaksiyonlar gibi faktörleri göz önünde bulundurması önemlidir.

Kolay erişilebilirlik: Geleneksel tıbbi bitkiler, birçok coğrafi bölgede yetişir ve kolayca erişilebilir olabilir. Bu, insanların kırsal bölgelerde veya sınırlı tıbbi kaynaklara sahip olan toplumlarda dahi kanamayı kontrol etmek için bitkileri kullanabilmesini sağlar.

Ancak, geleneksel tıbbi bitkilerin kullanımı konusunda dikkatli olunması önemlidir. Uzman olmayan kişilerin bitki kullanımı konusunda bilgili olmaması veya yanlış dozaj ve yöntemlerin uygulanması istenmeyen etkilere neden olabilir. Bu nedenle, bitkisel tedavilerden yararlanırken uzman bir sağlık uzmanından veya bitki uzmanından destek almak önemlidir.

Bu tür bitki türlerinin kanamayı durdurucu olarak kullanımının altında yatan mekanizmaları ve pıhtılaşmayı basitleştiren veya fibrinolizi inhibe eden ilişkili aktif bileşik veya bileşiklerin ortaya çıkarılması için daha fazla araştırmalar gereklidir. Öncelikle, bitkilerin klinik kullanımları için denenmesi gereklidir ve güvenlik profilleri belirlenmelidir, çünkü infüzyonlar ve topikal uygulamalar gibi başarılı kullanımlarına rağmen. Yüksek etkinliğe sahip yeni ve doğal hemostatik ajanların dış ve kardiyovasküler cerrahide, gastrointestinal kanamada ve antikoagülan veya trombolitik ilaç tedavisi sonrası kanamada kritik gereksinimlerin varlığından dolayı, çalışmamız etkili hemostatiklerin geliştirilmesi için yeni bakış açıları sağlayacaktır. Aslında, bu bulgular öncelikle *S. verticillata* gibi test edilen dört bitki türünün hem deri hem de mukoza hasarları için ucuz, doğal, güvenli ve kolay kullanılabilir bir topikal hemostatik ajan kaynağı olabileceğini önermektedir.

Sonuçlar, bu dört bitki türünün farklı ekstreleri ve bileşenlerinin kanama durdurma yeteneklerini ortaya koymaktadır. Hemostatik performansları, ADP, kolajen, AA ve EPI gibi kanama tetikleyicilerinin varlığında test edilmiştir. *S. verticillata*, diğer bitkiler arasında en etkili hemostatik performansına sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin hemostatik özelliklerini desteklemektedir ve bitkinin potansiyel olarak kanama kontrolünde kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak, bu çalışma sadece *in vitro* koşullarda yapılmış olup, klinik uygulamalar için daha fazla araştırma

gerekmektedir. İleri çalışmalar, bu bitkilerin etkin bileşenlerini ve mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak değerlendirmeli ve potansiyel yan etkileri veya etkileşimleri de göz önünde bulundurmalıdır.

Sonuç olarak, bu çalışma, *S. verticillata*, *A. biebersteinii*, *T. aureus* ve *C. procera* gibi bitkilerin hemostatik performanslarının *in vitro* olarak değerlendirildiğini göstermektedir. Bu bitkilerin kanama kontrolünde potansiyel kullanımını destekleyen bulgular elde edilmiştir. Ancak, klinik uygulamalar için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Araştırma Fonu (FBA-2018-6832) tarafından desteklenmiştir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: S.K., U.İ., H.T., O.A.; Tasarım: S.K., O.O., U.İ., H.T., O.S., O.A.; Denetim: S.K., U.İ., H.T., O.S.; Kaynaklar: S.K., O.O., U.İ., H.T., O.S., O.A.; Malzemeler: S.K., U.İ., H.T., O.A.; Veri Toplama ve/veya İşleme: S.K., O.O., U.İ., H.T., O.S., O.A.; Analiz ve/veya Yorumlama: S.K., O.O., U.İ., H.T., O.S., O.A.; Literatür Taraması: S.K., U.İ., H.T., O.S.; Makalenin Yazılması: S.K., U.İ., H.T., O.S.; Kritik İnceleme: S.K., O.O., U.İ., H.T., O.S., O.A.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik kurulu tarafından onaylanmıştır (B.30.2.ATA.0.01.00/).

KAYNAKLAR

1. Nayal, R., Abajy, M.Y., Takla, S. (2015). Investigating *in vitro* the hemostatic effect of some medicinal plants, Res. J of Aleppo univ, Medicine Science Series, No.100.
2. Yılmaz, Y.K. (2013). Vascular injuries: Introduction, history, the diagnosis and treatment methods. Türkiye Klinikleri Cardiovascular Surgery-Special Topics, 5(2), 18-25.
3. Periyah, M.H., Halim, A.S., Mat, S.A.Z. (2017). Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research, 11(4), 319-327.
4. Ghoshal, K., Bhattacharyya, M. (2014). Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. The Scientific World Journal. 2014, 781857. [CrossRef]
5. Paniccia, R., Priora, R., Liotta, A.A., Abbate, R. (2015). Platelet function tests: A comparative review. Vascular Health and Risk Management, 11, 133-148. [CrossRef]
6. Ebrahimia, F., Torbati, M., Mahmoudic, J., Valizadeh, H. (2020). Medicinal plants as potential hemostatic agents. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science, 23, 11-23. [CrossRef]
7. Born, G.V.R. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, 194, 927-929. [CrossRef]
8. Zhou, L., Schmaier, A.H. (2005). Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: Description of procedures with the aim to develop standards in the field. American Journal of Clinical Pathology, 123, 172-183. [CrossRef]
9. Yarali, N., Oruc, M., Bay, A., Dalgic, B., Bozkaya, I.O., Arıkoğlu, T., Kara, A., Bahattin, T. (2010). A new hemostatic agent-Ankaferd blood stopper: Management of gastrointestinal bleeding in an infant and other experiences in children. Pediatric Hematology and Oncology, 27, 592-596. [CrossRef]
10. Okten, S., Kurt, M., Onal, I.K., Haznedaroglu, I.C. (2011). Use of Ankaferd blood stopper for controlling actively bleeding fundal varices. Singapore Medical Journal, 52(1), e11-2.
11. Bilgili, H., Kosar, A., Kurt, M., Onal, I.K., Goker, H., Captug, O., Shorbagi, A., Turgut, M., Kekilli, M., Kar, K.O., Kirazli, S., Aksu, S., Haznedaroglu, I.C. (2009). Hemostatic efficacy of ankaferd blood stopper in a swine bleeding model. Medical Principles and Practice. 18, 165-169. [CrossRef]

12. Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H.A., Aydin, E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Frey & Bornm.) Bornm. Food Chemistry, 100(3), 985-989. [CrossRef]
13. Matkowski, A., Zielińska, S., Oszmiański, J., Lamer-Zarawsk, E. (2008). Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L. Bioresource Technology, 99(16), 7892-7896. [CrossRef]
14. Jaffal, S.M., Manal, A.A. (2019). Antinociceptive action of *Achillea biebersteinii* methanolic fower extract is mediated by interaction with cholinergic receptor in mouse pain models. Inflammopharmacology, 27, 961-968. [CrossRef]
15. Katanić, S.S., Srećković, N., Mišić, D., Gašić, U., Imbimbo, P., Monti, D.M., Mihailović, V. (2020). Bioactivity, biocompatibility and phytochemical assessment of lilac sage, *Salvia verticillata* L. (Lamiaceae)-A plant rich in rosmarinic acid. Industrial Crops and Products, 143, 111932. [CrossRef]
16. Plantlist Web site. (2019). Retrieved August 23, 2019, from <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-131516>. Erişim tarihi: 23.08.2019.
17. Coruh, I., Gormez, A.A., Ercisli, S., Bilen, S. (2007). Total phenolics, mineral elements, antioxidant and antibacterial activities of some edible wild plants in Turkey. Asian Journal of Chemistry, 19(7), 5755-5762.
18. Karakaya, S., Polat, A., Aksakal, Ö., Sümbüllü, Y.Z., İncekara, Ü. (2019). An ethnobotanical investigation on medicinal plants in South of Erzurum (Turkey). Ethnobotany Research & Applications, 18, 13.
19. Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T. (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanic Garden Publications, p.108, 211, 316, 580.
20. Ozgen, U., Kaya, Y., Coskun, M. (2004). Ethnobotanical studies in the villages of the district of Ilıca (province Erzurum), Turkey. Economic Botany, 58(4), 691-696.
21. Tozlu, G. (2010). Biological observations on *Agapanthia osmanlis* Reiche & Saulcy (Coleoptera: Cerambycidae) associated with *Cephalaria procera* Fisch & Lall. (Dipsacaceae) in Northeastern Turkey. Journal of Entomological Research Society, 12(1), 15.
22. Plantlist Web site. (2019). Retrieved August 23, 2019, from <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2709407>. Erişim tarihi: 23.08.2019.
23. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 6, 144-158.
24. Slinkard, K., Singleton, V.L. (1977). Total phenols analysis: Automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55.
25. Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim, A., Coşkun, M. (2004). Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27, 702-705. [CrossRef]
26. Brand, W.W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology, 28, 25-30. [CrossRef]
27. Ugur, A., Saraç, N., Çankal, D.A., Özle, M. (2016). The antioxidant and antimutagenic activities of Ankaferd blood stopper, a natural hemostatic agent used in dentistry. Turkish Journal of Medical Sciences, 46, 657-663. [CrossRef]
28. Páez, X., Hernández, L. (2003). Topical hemostatic effect of a common ornamental plant, the Geraniaceae *Pelargonium zonale*. The Journal of Clinical Pharmacology, 43, 291-295. [CrossRef]
29. Kose, R., Sogut, O., Erdemir, T., Koruk, I. (2012). Hemostatic efficacy of folkloric medicinal plant extract in a rat skin bleeding model. Dermatologic Surgery, 38, 760-766. [CrossRef]
30. Mekhfi, H., El Haouari, M., Legssyer, A., Bnouham, M., Aziz, M., Atmani, F., Adnane, R., Abderrahim, Z. (2004). Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 94, 317-322. [CrossRef]