

**KARACİĞER YAĞLANMASINA KARŞI FİTOTERAPÖTİK
FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Ayşe Esra KARADAĞ

DOKTORA TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üye. Mehmet Evren OKUR

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Nisan, 2022

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2001S007 no.lu ve TUBİTAK tarafından kabul edilen 220S351 no.lu projeler kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe Esra KARADAĞ'ın “Karaciğer Yağlanması Karşı Fitoterapötik Formülasyonların Geliştirilmesi” başlıklı tezi 05/04/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı- Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ	
Üye	: Prof. Dr. Rana ARSLAN	
Üye	: Prof. Dr. Gökalp İŞCAN	
Üye	: Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Üye	: Doç. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

KARACİĞER YAĞLANMASINA KARŞI FİTOTERAPÖTİK FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Uzm. Ecz. Ayşe Esra KARADAĞ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nisan, 2022

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üye. Mehmet Evren OKUR

Tez çalışması kapsamında, farmakope kalitesinde drog preparatlarının karaciğer üzerindeki etkilerinin uygun deneylerle, kanıta dayalı fitofarmasötik ürünlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle etnobotanik ve deneysel literatür verilerinden yola çıkılarak seçilen *Salvia fruticosa* Mill. yaprakları, *Taraxacum officinale* L. topraküstü kısımları, *Malva sylvestris* L. çiçekleri, *Tanacetum parthenium* L. topraküstü kısımları, *Plantago ovata* Forssk. tohumları ve *Allium sativum* L. soğan ekstreleri Avrupa Farmakopesi'ne göre hazırlanmış, Yüksek-Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) yöntemleri ile standardize edilmiştir. Standardize ekstreler *in vitro* hücre kültüründe yağlı karaciğer modelinde değerlendirilmiş ve en yüksek etkinlik gösteren *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri *in vivo* çalışmalar için seçilmiş, bu ekstrelerden hareketle mikroemülsiyon tipi özgün formülasyonlar hazırlanmıştır. Titrasyon metodu ile geliştirilen formülasyonlara 4 farklı dozda (75, 150, 300 ve 450 mg/kg) *M. sylvestris* %70 etanol ekstresi; 3 farklı dozda (100, 200 ve 400 mg/kg) *S. fruticosa* etanol ekstresi yüklenmiştir. İlgili formülasyonlar sıçanlara gavaj yoluyla verilerek haftalık kilo takibi yapılmıştır. Hayvanlardan alınan serum ve karaciğer örnekleri biyokimyasal analizlerle değerlendirilmiş, ayrıca alınan karaciğer dokuları histopatolojik olarak balon hücre oluşumu, lobüler enflamasyon ve makro-mikrosteatoz oluşumu açısından incelenmiştir. Biyokimyasal ve histopatolojik analizler doğrultusunda her iki ekstre de doza bağlı etki göstermiştir. *In vivo* akut toksisite deneylerinde 5 g doza kadar güvenli kullanım tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Gastro intestinal sistem, Karaciğer, Mikroemülsiyon, Farmakope, Bitkisel drog

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF PHYTOTHERAPEUTIC FORMULATIONS AGAINST HEPATOSTEATOSIS

Pharm. Ayşe Esra KARADAĞ

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, April, 2022

Supervisor: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Co-Supervisor: Dr. Mehmet Evren OKUR

The aim of this thesis project was to develop evidence-based phytopharmaceutical products and prove their effects using pharmacopeia quality herbal drug preparations on the liver and associated diseases. Based on ethnobotanical and experimental literature data *Salvia fruticosa* Mill. leaves, *Taraxacum officinale* L. aerial parts, *Malva sylvestris* L. flowers, *Tanacetum parthenium* L. aerial parts, *Plantago ovata* Forssk. seeds, and *Allium sativum* L. bulb extracts were prepared according to the European Pharmacopoeia and were standardized by High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) as well as by High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC), respectively. Standardized extracts were evaluated in the fatty liver model by *in vitro* cell culture, where *M. sylvestris* and *S. fruticosa* extracts were selected for further *in vivo* studies. Microemulsion type novel formulations were prepared by titration method. *M. sylvestris* 70% ethanol extract (75, 150, 300, and 450 mg/kg) and *S. fruticosa* ethanol extract (100, 200 and 400 mg/kg) were loaded to the formulations. The extract formulations were applied to rats by gavage, and weekly weight monitoring was performed. The serum and liver samples were evaluated by biochemical analysis, and the liver tissues were examined histopathologically for balloon cell formation, lobular inflammation, and macro-microsteatosis, respectively. In accordance with biochemical and histopathological evaluations, both extracts showed a dose-dependent effect. No toxicity was observed at doses up to 5 g in *in vivo* acute toxicity experiments.

Keywords: Gastro-intestinal system, Liver, Microemulsion, Pharmacopoeia, Herbal drug

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım ve tüm lisansüstü hayatım boyunca göstermiş olduğu desteklerinden dolayı; bilgi ve tecrübeleri ile bana her zaman yol gösteren, değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Hayvan çalışmalarımın planlanmasında ve değerlendirilmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen ikinci tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üye. Mehmet Evren OKUR'a,

Herhangi bir sorunla karşılaştığım zamanlarda bilgi ve tecrübesi ile yanımda olan Sayın Doç. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR'a,

Pozitif enerjisi ile beni her zaman motive eden ve histoloji çalışmalarında tez çalışmalarına destek olan Sayın Doç. Dr. Şule AYLA'ya,

Deneylerime teorik ve pratik çözüm önerileri ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Sayın Doç. Dr. Etil GÜZELMERİÇ'e,

Hücre kültürü deneyleri için her türlü imkân ile tezime destek olan Sayın Prof. Dr. Hande SİPAHİ ve asistanı Yağmur ÖZHAN'a,

Her anlamda destekçim, sevgili dostum Sevde Nur BİLTEKİN KALELİ'ye,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü İdaresi ve personeline, ayrıca maddi desteklerinden dolayı Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na (Proje No:2001S007),

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam boyunca da sonsuz desteğini esirgemeyen, sabır ve anlayış gösteren, pandemi ve tam kapanma koşullarında benimle laboratuvara gelen eşim Muhammet KARADAĞ'a, bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bu tez çalışmasını oğlum Ahmet Faruk'a ithaf ediyorum...

Uzm. Ecz. Ayşe Esra KARADAĞ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarda bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Uzm. Ecz. Ayşe Esra KARADAĞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	3
2.1. Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Patofizyolojisi ve Farmakoterapideki Yeri.....	3
2.2. Anadolu Halk İlaçları.....	4
2.3. Karaciğer Yağlanması Karşı Etnobotanik, Deneysel ve Klinik Çalışmalarda Yer Alan Bitki Drogları.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kimyasal sarf maddeler.....	23
3.1.2. Kullanılan diğer sarf malzemeleri	24
3.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Bitkisel materyal.....	25
3.2.2. Ekstraksiyon	25
3.2.3. Standardizasyon	26
3.2.3.1. YPİTK analizleri.....	26
3.2.3.2. YBSK analizleri.....	28
3.2.4. Formülasyon geliştirme.....	30

3.2.4.1. Yağ fazı olarak tarçın yağı içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanması	31
3.2.4.2. Yağ fazı olarak soya yağı içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanması	31
3.2.4.3. Karakterizasyon çalışmaları.....	32
3.2.4.4. Stabilite.....	33
3.2.5. In vitro karaciğer yağlanma modeli	33
3.2.5.1. In vitro sitotoksosite.....	33
3.2.5.2. Yağlanma modeli.....	34
3.2.5.2.1. Lipit peroksidasyon tayini- Malondialdehit	35
3.2.5.2.2. Protein tayini (Lowry metodu).....	35
3.2.5.2.3. Glutasyon (GSH) tayini.....	36
3.2.5.2.4. Nil red boyama ile yağ damlacıkları tespiti.....	36
3.2.5.2.5. Alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferaz aktivitelerinin belirlenmesi.....	36
3.2.5.3. İstatiksel analiz.....	37
3.2.6. In vivo karaciğer yağlanması modeli	37
3.2.6.1. Deney hayvanları.....	37
3.2.6.2. Akut oral toksisite.....	37
3.2.6.3. Non-alkolik yağlı karaciğer modeli.....	38
3.2.6.4. Serum örneklerinin biyokimyasal parametrelerinin ölçülmesi.....	39
3.2.6.5. Karaciğer örneklerinin biyokimyasal parametrelerinin ölçülmesi.....	41
3.2.6.6. Histopatoloji.....	42
3.2.6.7. İstatistik analiz.....	42
4. BULGULAR	43
4.1. Ekstraksiyon	43
4.2. Standardizasyon.....	43
4.2.1. <i>Allium sativum</i> L. soğan ekstresinin allisin üzerinden standardizasyonu.....	44
4.2.2. <i>Malva sylvestris</i> L. çiçek ekstresinin malvin üzerinden standardizasyonu	46

4.2.3. <i>Plantago ovata</i> Forssk. tohum ekstresinin β -sitosterol üzerin-	
den standardizasyonu	48
4.2.4. <i>Salvia fruticosa</i> Mill. yaprak ekstresinin salvigenin ve rosma-	
rinik asit üzerinden standardizasyonu	50
4.2.5. <i>Tanacetum parthenium</i> L. toprak üstü ekstresinin partenolit	
üzerinden standardizasyonu	52
4.2.6. <i>Taraxacum officinale</i> L. toprak üstü ekstresinin rutin ve kloro-	
jenik asit üzerinden standardizasyonu	55
4.3. Formülasyon Geliştirme	57
4.3.1. Karakterizasyon çalışmaları	65
4.3.2. Stabilite	66
4.4. <i>In vitro</i> Karaciğer Yağlanma Modeli	70
4.4.1. Sitotoksisite	71
4.4.2. Lipit peroksidasyon tayini (MDA)	72
4.4.3. Glutasyon (GSH) tayini	73
4.4.4. Nil Red boyama ile yağ hücrelerinin tespiti	75
4.4.5. Alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz	
aktivitelerinin belirlenmesi	75
4.5. <i>In vivo</i> Karaciğer Yağlanması	79
4.5.1. Akut oral toksisite	79
4.5.2. Non-alkolik yağlı karaciğer modeli	79
4.5.3. Serum ve karaciğer örneklerinden biyokimyasal parametreleri-	
nin değerlendirilmesi	81
4.5.3.1. Karaciğer ve serum örneklerinin glutasyon peroksidaz	
ölçümleri	82
4.5.3.2. Karaciğer ve serum örneklerinin süper oksit dismütaz	
ölçümleri	83
4.5.3.3. Karaciğer ve serum örneklerinin malondialdehit	
ölçümleri	85
4.5.3.4. Karaciğer ve serum örneklerinin trigliserit ölçümleri	87
4.5.3.5. Serum örneklerinin alkalen fosfataz ölçümleri	89
4.5.3.6. Serum örneklerinin aspartat aminotransferaz	
ölçümleri	90

4.5.3.7. Serum örneklerinin glikoz ölçümleri.....	91
4.5.3.8. Serum örneklerinin alanin aminotransferaz ölçümleri...	92
4.5.3.9. Serum örneklerinin yüksek yoğunluklu lipoprotein ölçümleri.....	93
4.5.3.10. Serum örneklerinin düşük yoğunluklu lipoprotein ölçümleri.....	94
4.5.3.11. Serum örneklerinin total kolesterol ölçümleri.....	95
4.5.3.12. Serum örneklerinin insülin ölçümleri.....	96
4.5.4. Histopatoloji	97
4.5.4.1. Hepatositlerde balonlaşma.....	98
4.5.4.2. Lobüler enflamasyon.....	99
4.5.4.3. Makrosteatoz ve mikrosteatoz.....	100
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	102
5.1. Bitkisel Drog Materyali, Ekstraksiyon ve Standardizasyon.....	103
5.2. <i>In vitro</i> ön tarama deneyleri.....	107
5.2.1. <i>A. sativum</i> ekstresinin <i>in vitro</i> sonuçları.....	108
5.2.2. <i>M. sylvestris</i> ve <i>S. fruticosa</i> ekstrelerinin <i>in vitro</i> sonuçları.....	109
5.3. Formülasyon.....	110
5.4. <i>In vivo</i> çalışmalar.....	112
KAYNAKÇA	120
ÖZGEÇMİŞ	139

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. Ekstre verimleri (a/a).....	43
Tablo 4.2. Yağ fazı olarak tarçın yağı, YEM fazı olarak Tween 80, YYEM fazı olarak propilen glikol ve distile su içeren optimum M1 formülasyonu için denenen miktarlar ve alan değerleri.....	57
Tablo 4.3. Yağ fazı olarak soya yağı, YEM fazı olarak Span 80: Cremophor EL (5:1), YYEM fazı olarak propilen glikol:etanol (1:1) ve distile su içeren optimum M2 formülasyonu için denenen miktarlar ve alan değerleri.....	62
Tablo 4.4. Formülasyonların karakterizasyon bulguları ve standart sapma değerleri	65
Tablo 4.5. Optimum mikroemulsiyonların pH stabilite sonuçları ve standart sapma değerleri.....	67
Tablo 4.6. Optimum mikroemulsiyonların elektrik iletkenliği (μ s) stabilite sonuçları ve standart sapma değerleri	67
Tablo 4.7. Optimum mikroemulsiyonların kırılma indisi stabilite sonuçları ve standart sapma değerleri.....	68
Tablo 4.8. Optimum mikroemulsiyonların viskozite stabilite sonuçları ve standart sapma değerleri.....	69
Tablo 4.9. Optimum boş mikroemulsiyonların damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları.....	70
Tablo 4.10. Karşılaştırmalı <i>in vitro</i> deney sonuçları.....	78
Tablo 4.11. Hayvan gruplarının ağırlık ortalamaları.....	79
Tablo 4.12. Ekstre yüklü formülasyonların <i>in vivo</i> koşullarda karaciğer parametrelerine etkileri.....	114
Tablo 4.13. Ekstre yüklü formülasyonların <i>in vivo</i> koşullarda serum parametrelerine etkileri.....	117
Tablo 4.14. Ekstre <i>in vitro-in vivo</i> sonuç karşılaştırması.....	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1. <i>A. sativum</i> metanol ekstresi YPİTK kromatogramı.....	44
Şekil 4.2. Allisin YBSK kromatogramı	45
Şekil 4.3. <i>A. sativum</i> metanol ekstresinin YBSK kromatogramı.....	45
Şekil 4.4. <i>M. sylvestris</i> sulu etanol ekstresi YPİTK kromatogramı.....	46
Şekil 4.5. Malvin YBSK kromatogramı	47
Şekil 4.6. <i>M. sylvestris</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	47
Şekil 4.7. <i>P. ovata</i> metanol ekstresinin YPİTK kromatogramı	48
Şekil 4.8. β -sitosterol YBSK kromatogramı	49
Şekil 4.9. <i>P. ovata</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	49
Şekil 4.10. <i>S. fruticosa</i> etanol ekstresinin YPİTK kromatogramı	50
Şekil 4.11. Salvigenin YBSK kromatogramı	51
Şekil 4.12. Rosmarinik asit YBSK kromatogramı	51
Şekil 4.13. <i>S. fruticosa</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	52
Şekil 4.14. <i>T. parthenium</i> metanol ekstresinin YPİTK kromatogramı	53
Şekil 4.15. Partenolit YBSK kromatogramı	54
Şekil 4.16. <i>T. parthenium</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	54
Şekil 4.17. <i>T. officinale</i> metanol ekstresinin YPİTK kromatogramı	55
Şekil 4.18. Klorojenik asit YBSK kromatogramı	56
Şekil 4.19. <i>T. officinale</i> ekstresinin YBSK kromatogramı	56
Şekil 4.20. Tarçın yağı, Tween 80: propilen glikol (1:1) ve distile sudan oluşan mikroemülsiyonun üçlü faz diyagramı.....	60
Şekil 4.21. Tarçın yağı, Tween 80, propilen glikol ve distile su içeren formülasyonların üçgen faz diyagramındaki alan değerleri.....	61
Şekil 4.22. Optimum M1 mikroemülsiyon formülasyonunun (tarçın yağı) görünüşü.....	61
Şekil 4.23. Soya yağı, Span 80:Cre EL/PG:etanol ve distile su içeren formülasyonun üçgen faz diyagramı.....	64
Şekil 4.24. Soya yağı, Span 80:Cre EL/PG:etanol ve distile su içeren formülasyonların üçgen faz diyagramındaki alan değerleri.....	64

Şekil 4.25.	Optimum M2 mikroemülsiyon formülasyonunun (soya yağı) görünüşü.....	65
Şekil 4.26.	Ekstrelerin artan konsantrasyonlarda HepG2 hücresindeki % canlılık düzeyleri.....	71
Şekil 4.27.	<i>S. fruticosa</i> ve <i>P. ovata</i> ekstreleri ve resveratrolün MDA sonuçları.....	72
Şekil 4.28.	<i>M. sylvestris</i> , <i>A. sativum</i> , <i>T. parthenium</i> ve <i>T. officinale</i> ekstrelerinin MDA sonuçları	73
Şekil 4.29.	<i>S. fruticosa</i> ve <i>P. ovata</i> ekstreleri ve resveratrolün GSH sonuçları..	74
Şekil 4.30.	<i>M. sylvestris</i> , <i>A. sativum</i> , <i>T. parthenium</i> ve <i>T. officinale</i> ekstrelerinin GSH sonuçları	74
Şekil 4.31.	Normal hücre ortamında ve oleik asit ve palmitik asitle yağlandırılan hücre ortamlarındaki ekstre gruplarında Nil red boyama sonucu yağ damlacıkları ve steatozislerin görünümü.....	75
Şekil 4.32.	<i>S. fruticosa</i> ve <i>P. ovata</i> ekstreleri ve resveratrolün AST düzeyleri...	76
Şekil 4.33.	<i>M. sylvestris</i> , <i>A. sativum</i> , <i>T. parthenium</i> ve <i>T. officinale</i> ekstrelerinin AST düzeyleri.....	76
Şekil 4.34.	<i>S. fruticosa</i> ve <i>P. ovata</i> ekstreleri ve resveratrolün ALT düzeyleri..	77
Şekil 4.35.	<i>M. sylvestris</i> , <i>A. sativum</i> , <i>T. parthenium</i> ve <i>T. officinale</i> ekstrelerinin ALT düzeyleri	77
Şekil 4.36.	Deney gruplarının karaciğer indeksi ortalamaları.....	81
Şekil 4.37.	<i>M. sylvestris</i> sulu etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen glutatyon peroksidaz seviyeleri.....	82
Şekil 4.38.	<i>S. fruticosa</i> etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen glutatyon peroksidaz seviyeleri	83
Şekil 4.39.	<i>M. sylvestris</i> sulu etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen süper oksit dismutaz seviyeleri	84
Şekil 4.40.	<i>S. fruticosa</i> etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen süper oksit dismutaz seviyeleri.....	85

Şekil 4.41.	<i>M. sylvestris</i> sulu etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen malondialdehit seviyeleri.....	86
Şekil 4.42.	<i>S. fruticosa</i> etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen malondialdehit seviyeleri.....	87
Şekil 4.43.	<i>M. sylvestris</i> sulu etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen trigliserit seviyeleri.....	88
Şekil 4.44.	<i>S. fruticosa</i> etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen trigliserit seviyeleri	89
Şekil 4.45.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen alkalen fosfataz seviyeleri	90
Şekil 4.46.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen aspartat aminotransferaz seviyeleri ...	91
Şekil 4.47.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen glikoz seviyeleri	92
Şekil 4.48.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen alanin aminotransferaz seviyeleri	93
Şekil 4.49.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen HDL seviyeleri.....	94
Şekil 4.50.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen LDL seviyeleri	95
Şekil 4.51.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen total kolesterol seviyeleri	96
Şekil 4.52.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen insülin seviyeleri.....	97
Şekil 4.53.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların karaciğer dokularında balon hücresi yoğunluğu.	98
Şekil 4.54.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların karaciğer dokularında lobüler enflamasyon skorları.	99
Şekil 4.55.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların karaciğer dokularında makrosteatoz seviyeleri.	100
Şekil 4.56.	<i>M. sylvestris</i> (A) ve <i>S. fruticosa</i> (B) ekstresi verilen grupların karaciğer dokularında mikrosteatoz seviyeleri.	101

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

AAC-1	: Asetil-CoA karboksilaz-1
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AMPK	: AMP ile aktive olan protein kinaz
AST	: Aminotransferaz
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan tip kültür koleksiyonu)
BSA	: Bovine serum albümin
CK-18	: Sitokeratin-18
CO₂	: Karbon dioksit
cP	: Centipoise
CPT1	: Karnitin palmitoiltransferaz 1
CYP4A	: Sitokrom P450 (Cytochrome P450)
DAD	: Diyot dizi dedektörü (Diode Array Detector)
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DTNB	: 5-5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
ED₅₀	: Ortanca etkin doz (Median Effective Dose)
EWAT	: Epididimal beyaz yağ dokusu
FBS	: Fetal Bovin Serum
FFA	: Serbest Yağ Asidi
g	: Gram
GGT	: Gama glutamil transferaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
h	: Hacim
H&E	: Hematoksilen ve Eozin
HOMA	: Homeostatik model değerlendirmesi (Homeostatic Model Assessment)
IC₅₀	: Enzimin %50'sini inhibe eden konsantrasyon (Inhibitory concentration of 50%)

IL-6	: İnterlökin-6
IUPAC	: Uluslararası Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
kg	: Kilo gram
L	: Litre
L.	: Linnaeus
LOX	: Lipooksijenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
m	: Metre
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
Na₂SO₄	: Sodyum sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
NASH	: Non-alkolik steatohepatit
NAYKH	: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
OGTT	: Oral glikoz tolerans testi
pg	: Pikogram
pH	: Power of Hydrogen
PPAR- γ	: Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör γ
PPAR-α	: Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör α
rpm	: Dakikadaki rotasyon (rotation per minute)
SOD	: Süperoksit dismutaz
SREBP1	: Sterol reseptörü element bağlayıcı protein 1c
TBA	: Tiyobarbütirik asit
TC	: Toplam kolesterol
TG	: Trigliserit
TMP	: Tetrametoksipropan

TNF	: Tümör nekroz faktör
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
vb.	: ve benzeri
YBSK	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
YEM	: Yüzey Etkin Madde
Y-YEM	: Yardımcı Yüzey Etkin Madde
YPİTK	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
± SS	: Standart sapma
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μs	: Mikrosaniye

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sindirim organlarından karaciğer, genel metabolizmanın ve sağlığın önemli bir sistemik merkezidir. Tez projesinin hedeflerinden olan karaciğer hastalıkları ve bitkisel ilaçlarla tedavisi birçok problem içermektedir. Modern hareketsiz hayat alışkanlıklarına bağlı olarak başta gelişmekte olan ülkeler olmak üzere dünya genelinde insanın çevresel kimyasallar ve toksinlerle teması; ilaçlar, aflatoksin içeren gıda tüketimi, alkol kullanımı, tarım/veteriner ilaçları kalıntıları ve yanlış beslenmeden dolayı, karaciğer hastalıkları günümüzde önemli halk sağlığı sorunları içerisinde sıralanmaktadır.

Metabolik hastalıklardan birisi olarak da kabul gören karaciğer yağlanması başlı başına bir hastalık olarak ele alınması, 1980 yılında Ludwig tarafından histopatolojik bulguları alkole bağlı karaciğer hastalığına benzediği halde alkol kullanmayan kişilerde görülen bir hastalık tablosunun “*Non alkolik steatohepatit (Non-Alcoholic Steatohepatitis) (NASH)*” olarak tanımlanmasından sonra şekillenmeye başlamıştır. Sonraki yıllarda, alkol kullanımına bağlı olmayan karaciğer yağlanmalarının büyük kısmının hepatit bulgularını içermeyen yağlanmalar olması nedeniyle isimlendirmede ortaya çıkan karışıklıkların aşılması için yeni bir tanımlama olan “*Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı*” kavramı ön plana çıkarılarak NASH’ler bu kavramın altında değerlendirilmeye başlanmıştır (Jennison vd., 2019). Karaciğer yağlanması tüm dünyada son 5 yılda prevalansı hızla artan bir sağlık sorunudur. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ise yukarıda sıralanan karaciğer yağlanmasının temel nedenlerinden alkol tüketimi hariç tüm diğer nedenlerden dolayı görülebilmektedir (Younossi, 2019). Bu tez çalışması planlanırken gerek artan non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı prevalansı, gerek bu konu üzerinde Pubmed, Scopus vb. kaynaklarda taranan bilimsel yayınların son 5 yıldaki artışı göz önünde bulundurularak güncel ve önemi artan bir konu olan non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı hedef alınmış, bu hastalığa yönelik Avrupa Farmakopesi’ne göre standardize bitkisel droglar kullanılarak yenilikçi fitoterapötik formülasyonların geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Bilindiği üzere günümüzde birçok alanda bitkisel kaynaklı ürünler ve ilaçlar kullanılmaktadır. Türkiye’de bitki çeşitliliği açısından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir ve geleneksel tedavide bu zengin kaynaktan sıklıkla yararlanılmaktadır. Anadolu tedavileri ve halk ilaçları arasında karaciğer hastalıklarında kullanılan çok sayıda bitki

preparatına yapılan saha çalışmalarında görülmektedir (Gürbüz vd., 2019; Sarper vd., 2009; Sezik vd., 2001; Yeşilada, 2002).

Tez çalışmasında kullanılacak bitkisel drog seçimi, karaciğer yağlanmasına karşı hem Türkiye hem dünya etnobotanik verileri araştırılmış ve temel alınmıştır. Deneysel çalışmaların standardizasyonu için belirlenen droglar Avrupa Farmakopesi kalitesinde temin edilmiştir. Bu tez çalışmasında literatüre dayalı bir ön tarama yapılarak Avrupa Farmakope'sinde bulunan 79 bitkisel drogtan 6'sının etnobotanik ve deneysel çalışmalarda karaciğer rahatsızlıklarında kullanımının olduğu belirlenmiştir. *Salvia fruticosa* Mill. yaprakları, *Taraxacum officinale* L. topraküstü, *Malva sylvestris* L. çiçekleri, *Tanacetum parthenium* L. topraküstü, *Plantago ovata* Forssk. tohumları ve *Allium sativum* L. soğanı Farmakope'ye standardında temin edilmiş, Farmakope'deki yöntemler izlenerek ekstreleri hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstrelerin Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile fitokimyasal analizleri yapılarak belirlenen sekonder metabolitler üzerinden standardizasyonunun sağlanması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında geleneksel kullanımlarından yola çıkılarak belirlenen bitkisel droglardan elde edilen ekstrelerin kanıta dayalı olarak bir fitoterapötik formülasyon sistemi içerisinde ileri çalışmalarla etkinlik ve toksisite açısından araştırılması amaçlanmış ve sonuçların *in vitro-in vivo* yöntemlerle ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1.Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Patofizyolojisi ve Farmakoterapideki Yeri

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı son yıllarda en sık görülen karaciğer hastalıklarından birisidir. İnsülin direnci ile de ilişkili olan bu hastalık, sıklıkla metabolik sendrom belirtileryile ortaya çıkar. Hastalığın patogenezinde yüksek karaciğer enzim seviyeleri görülmekte ve hastalığın seyrine karaciğer yetmezliği ve hepatosellüler karsinom gibi bulgular da eşlik edebilmektedir. Güncel tedavi protokollerinde öncelikle vücut kitle endeksi kontrolü ve fiziksel egzersizle sınırlıdır. Ancak kompleks bir etiyolojideki hastalığın kanıta dayalı bir farmakoterapi yöntemi halihazırda bulunmamaktadır (Rinella, 2015).

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) tanısı; aşırı alkolli içecek tüketimi öyküsünün olmadığı karaciğerdeki yağlanmayı tanımlamaktadır. NAYKH'nın histopatolojik spektrumu, genellikle iyi huylu, yumuşak steatozdan, ilerleyici fibroz ve siroz ile karmaşık olabilen hepatosellüler enflamasyon ve hasarla birlikte ileri steatoza kadar uzanmaktadır (Rinella, 2015).

Karaciğer, lipit metabolizmasında, serum serbest yağ asitlerini dışarıdan alarak, lipitleri ve lipoproteinleri üreterek, depolayarak ve dolaşıma vererek vücutta merkezi bir rol oynamaktadır. Ancak NAYKH'ye yol açan patofizyoloji henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Özellikle trigliserit birikiminden sonra ilerleyici hepatosellüler hasara yol açan faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır. Hepatik lipitlerin girişi veya sentezi ile bunların birikimi arasındaki dengeyi kontrol eden lokal ve sistemik faktörlerin (özellikle insülin direncinin) değişmesi bu nedenlerden birisi gibi görünmektedir. Steatoza uğramış karaciğerin daha sonra hepatosellüler inflamasyon ve fibrozise yol açan sekonder durumlara karşı savunmasız olduğu düşünülmektedir. Adipoz dokudan türetilen hormonlar (adipositokinler), oksidatif stres ve bağırsaktan türetilen bakteriyel endotoksin dahil olmak üzere, çeşitli sekonder nedenlerin var olduğu varsayılmaktadır (Day & James, 1998).

NAYKH için ABD Gıda ve İlaç Dairesi veya Avrupa İlaç Ajansı tarafından onaylanmış herhangi bir ilaç bulunmamaktadır (Leoni vd., 2018). Bu hastalıkta tedavinin birincil amacı, NAYKH'nın ilerlemesini yavaşlatmak ve karaciğer ile ilgili hastalık ve nekrozu önlemektir. Tedavide hem kilo kaybı hem de egzersiz insülin direncini

düşürdüğü için tavsiye edilmektedir. Daha önce yapılan randomize, plasebo kontrollü çalışmaların hiçbirisinde, denenen takviyelerin (antioksidanlar [E ve C vitaminleri]) veya hepatoprotektif ajanların (ursodeoksikolik asit veya metformin) plaseboya kıyasla daha iyi histolojik iyileşme sonucu vermediği tespit edilmiştir (Neuschwander-Tetri vd., 2003; Promrat vd., 2004). Tiazolidindionlar, peroksizom proliferatörünün aktive ettiği reseptör gamayı (PPAR γ) aktive ederek insülin duyarlılığını iyileştirmektedir. Bu ilacın önemli bir yan etkisi kilo artışı olmasına rağmen, NAYKH hastalarını içeren pilot çalışmalarda umut vaat ettiği ortaya konulmuştur. Ancak, ilk PPAR γ agonisti troglitazon, hepatotoksik etkileri nedeniyle geri çekilmiştir (Menon vd., 2001).

NAYKH'nın obezite ve diyabet insidansının artmasıyla prevalansının artması muhtemeldir. NAYKH'lı hastaların çok az bir kısmı ise, özellikle diyabeti olanlar, siroz ve hepatoselüler karsinom gibi karaciğer ile ilgili farklı komplikasyonların riski altındadır. Günümüzde bu hastalığın tedavisi, kilo kaybı, egzersiz ve metabolik risk faktörlerinin kontrolü ile sınırlıdır (Adams vd, 2005). Bu tez çalışmasında ise halk arasında kullanımlardan yola çıkılarak çok fazla tedavi alternatifi bulunmayan NAYKH hastalığına karşı sıçanlarda denenmek üzere fitoterapötik formülasyonların tasarlanması amaçlanmıştır.

2.2. Anadolu Halk İlaçları

Türkiye zengin bir floraaya sahip olması nedeniyle geleneksel halk ilaçları için eşsiz bir zenginliğe sahiptir. Özellikle karaciğer hastalıklarında kullanılan bitki drogları ve bu drogların çeşitli preparasyonları literatürde mevcuttur. Bunlara bazı örnekler şu şekilde sıralanabilir: *Potentilla reptans* L. toprak üstü kısımları karaciğerde dolaşım sorunlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır (Başer vd., 1986). *Thymbra spicata* L. yaprakları hiperkolesterolemiye karşı kullanılmaktadır (Avcı vd., 2006). *Urtica dioica* L. yaprakları ve *Ecbalium elaterium* A. Rich meyveleri de Orta Anadolu'da karaciğer rahatsızlıklarına karşı sıkça kullanılan diğer bitki droglarıdır (Sezik vd., 2001). Ege Bölgesi'nde yapılan bir diğer etnobotanik çalışmada ise *Ceratonia siliqua* L. meyveleri, *Salvia fruticosa* Mill. yaprakları, *Poliurus spina-christi* Mill. tohumları, *Rubus sanctus* L. yaprakları ile *Opuntia ficus-indica* Mill. meyvelerinin karaciğer rahatsızlıklarında kullanıldıkları kayıtlıdır (Gürdal & Kültür, 2013). Keban bölgesinde yapılmış başka bir halk ilaçları çalışmasında ise *Raphanus raphanistrum* L. kökleri, *Fumaria asepal* Boiss. toprak üstü

kısımları, *Teucrium polium* L. yaprakları ve yine *U. dioica* toprak üstü kısımlarının karaciğer hastalıklarına karşı kullanıldığı kayıtlıdır (Kılıç & Bağcı, 2013). Bingöl ilini kapsayan bir etnobotanik çalışmada ise *Asparagus acutifolius* L. toprak üstü kısımlarının karaciğer hastalıkları için kullanıldığı kayıtlıdır (Polat vd., 2013). Afyon ve çevresinde yapılmış bir diğer çalışmada ise *Berberis crataegina* DC. meyveleri ve *Chelidonium majus* L. toprak üstü kısımlarının karaciğer rahatsızlıklarında kullanıldığı bildirilmiştir (Arı vd., 2015). Mersin Bozyazı’da yapılan bir çalışmada ise *Pinus brutia* Ten. yaprakları, *Portulaca oleracea* L. toprak üstü kısımları ve *Vicia faba* L. meyvelerinin karaciğere faydalı olduğu yer almaktadır (Sargın vd., 2015). *Apium graveolens* L. yaprakları ve *Cichorium intybus* L. çiçekli toprak üstü kısımları ise Kahramanmaraş yöresine ait bir etnobotanik çalışmada karaciğer hastalıklarında kullanılan bitkiler arasında yer almaktadır (Uzun ve Koca, 2020). *Carduus nutans* L. ise Anadolu’da tohumları karaciğer hastalıklarına karşı kullanılan bir diğer bitkidir (Bulut vd., 2017).

Anadolu’da yapılmış etnobotanik çalışmalar incelendiğinde farklı karaciğer rahatsızlıklarına karşı kullanımı kayıtlı olan pek çok bitki drogu karşımıza çıkmaktadır. Diğer ülkelerde yapılan etnobotanik çalışmalar incelendiğinde ise bu sayı daha da artmaktadır. Aşağıda yer alan başlıkta ise deneysel ve klinik çalışmaların yanı sıra dünyada yer alan etnobotanik çalışmaların sonuçları da yer almaktadır.

2.3.Karaciğer Yağlanması Karşı Etnobotanik, Deneysel ve Klinik Çalışmalarda Yer Alan Bitki Drogları

Bitkisel preparatlar çok eski zamanlardan bu yana pek çok hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmaktadır. Bu bağlamda karaciğer rahatsızlıklarının tedavisinde ve önlenmesinde de bitkilerden sıklıkla yararlanılmaktadır. Bu bölümde karaciğer hastalıklarının dünya çapında geleneksel tedavide kullanılan bitki formülasyonlarına ait bilgiler ve literatürde karaciğer hasarı ve karaciğer yağlanması karşı etkili bulunan ekstre ve doğal bileşiklere ilişkin bilgilere yer verilmiştir. Bu bilgiler, söz konusu 37 adet bitkinin Latince isimlerinin alfabetik dizilişine göre sıralanmış olup geleneksel tedavide kullanılan kısımları ve halk arasında ne şekilde kullanıldıkları açıklanmıştır. Deneysel ve klinik çalışma sonuçlarına ait veriler ise bitkinin belirli droglarından hazırlanan ekstrenin

ya da doğal bileşiğin hangi yöntemle araştırıldığı ve sonuçların kısa özetleri şeklinde aktarılmıştır.

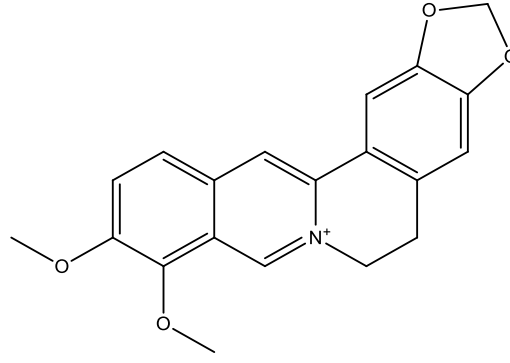
***Agrimonia eupatoria* L. (Rosaceae):** Koyun otu olarak bilinen bu bitki ülkemizde geniş yayılım göstermektedir (http-1). Bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksionun İran'da halk arasında karaciğer hastalıklarına karşı kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda, hücre kültüründe oleik asit ile indüklenen HepG2 hücrelerinde karaciğer yağlanmasına karşı farklı çözücü ekstreleri (metanol, etanol, diklorometan, etil asetat vb.) araştırılmıştır (Mohamadi vd., 2015; Sohn vd., 2015). Bahsi geçen daha önceki çalışmada, *A. eupatoria* etil asetat ekstresinin trigliserit birikimini baskıladığı ve peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör γ (PPAR- γ) gibi bir lipid markör genin ekspresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör α 'nın (PPAR- α) mRNA ekspresyon seviyesinin konsantrasyona bağlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Sohn vd., 2015).

***Allium* L. spp. (Liliaceae):** *A. tripedale* L. soğanlarının çiğ olarak tüketilmesi suretiyle, antihiperlipidemik etkisi nedeniyle halk arasında kullanıldığı bildirilmiştir (Delfan vd., 2016). *A. sativum* L. soğanlarından elde edilen sulu ekstreler, farelerde non-alkolik karaciğer yağlanmasına karşı araştırılmıştır (Jiang vd., 2021). İlgili çalışmada *A. sativum* ekstresi, yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelere verilmiş ve bu ekstreyi alan farelerden alınan karaciğer dokularının mikrografları, daha az lipid damlacıkları göstermiştir. Ayrıca aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerini düşürdüğü ve yüksek süper oksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri gözlemlendiği gösterilmiştir (Jiang vd., 2021). Ayrıca *A. sativum* soğanlarının tozunu içeren kapsüller ile yapılan bir klinik çalışmada karaciğer yağlanmasına karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Kapsül içerisinde doğrudan sarımsak tozu verilen tedavi grubunda vücut ağırlığında azalma gözlemlendiği beyan edilmiştir (Soleimani vd., 2016). Başka bir çalışmada ise *A. saralicum* R.M. Fritsch sulu etanol ekstreleri sıçanlarla yüksek yağlı diyetle bağlı non-alkolik karaciğer yağlanması üzerinde araştırılmıştır. Ekstre uygulaması, 20, 40, 80 ve 160 mg/kg konsantrasyonlarında *A. saralicum*'un sulu etanol ekstresi ile gerçekleştirilmiştir. *A. saralicum*'un denenen tüm konsantrasyonlarının (özellikle 160 mg/kg), Alanin fosfataz (ALP), AST, ALT, Gama glutamil transferaz (GGT), kolesterol, LDL, trigliserit, toplam ve konjuge bilirubin, glikoz ve GR düzeylerini azalttığı bildirilmiştir. İlgili çalışmada *A. saralicum* ekstresi,

ekstre verilmeyen grupla karşılaştırıldığında hepatik steatoz derecesini azaltmış olduğu belirtilmiştir (Moradi vd., 2019).

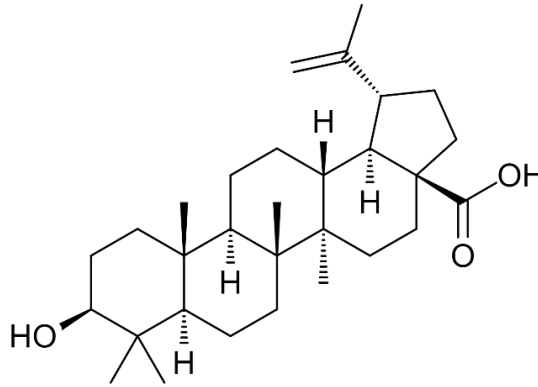
***Alisma plantago-aquatica* subsp. *orientale* (Sam.) Sam. (Alismataceae):** Bu tür ülkemizde yetişmemekle beraber cinsin diğer türleri Türkiye’de yayılış göstermektedir (http-1). Daha önceki çalışmalarda *A. plantago-aquatica* subsp. *orientale* metanol ekstresi deneysel non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) üzerinde çalışılmıştır. Sıçanlarda ekstre (150, 300 ve 600 mg/kg) uygulamasının serum ve karaciğer lipidlerini azalttığı; yüksek düzeyde açlık serum glikozu düşürdüğü ve insülin direncini düzelttiği belirtilmiştir. *A. plantago-aquatica* subsp. *orientale* uygulamasının ayrıca lipid peroksidasyonunu azaltarak ve antioksidan enzimleri aktive ederek oksidatif stresin önlenmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir. Ekstre verilen sıçanlarda karaciğer hasarı, aminotransferaz anormallikleri ve hepatomegali belirteçlerinin iyileştiği ve yağlı karaciğer, karışık enflamasyon ve kollajen birikimi gibi morfolojik değişikliklerinin azaldığı gösterilmiştir (Hong vd., 2010).

***Berberis vulgaris* L. (Berberidaceae):** Türkiye’de özellikle Kuzey Anadolu’da yetişmekte ve bu bölgede Zibike olarak bilinmektedir (http-1). Bitkinin köklerinden elde edilen sulu etanollü ekstrelerin hayvanlarda antihiperlipitemik etkilerinin gözlemlendiği bildirilmiştir (Taheri vd., 2012). Ayrıca *Berberis* türlerinin karakteristik bir sekonder metaboliti olan berberin molekülünün (1) klinik çalışmalarda karaciğer yağlanmasına karşı etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca önceki çalışmalarda hayvan deneylerinde, non-alkolik karaciğer yağlanması modelinde hepatik mRNA ve lncRNA ekspresyon profilleri açısından araştırılmıştır. Berberinin yağlı karaciğerde 881 mRNA ve 538 lncRNA dahil olmak üzere geniş bir gen grubunun hepatik gen ekspresyon profillerini modüle etmede etkili olduğu gösterilmiştir. Berberin tarafından düzenlenen genler arasında karaciğer metabolizması ve NAYKH ile ilgili fonksiyonlarla etkileşen çok sayıda gen tanımlanmıştır. Spesifik olarak, korunmuş bir lncRNA, MRAK052686’nın antioksidan faktör Nrf2 ile güçlü bir şekilde korele olduğu bulunmuş ve her iki genin de yağlı karaciğer tarafından aşağı regüle edildiği ortaya konulmuştur (Yan vd., 2015; Yuan vd., 2015).



1

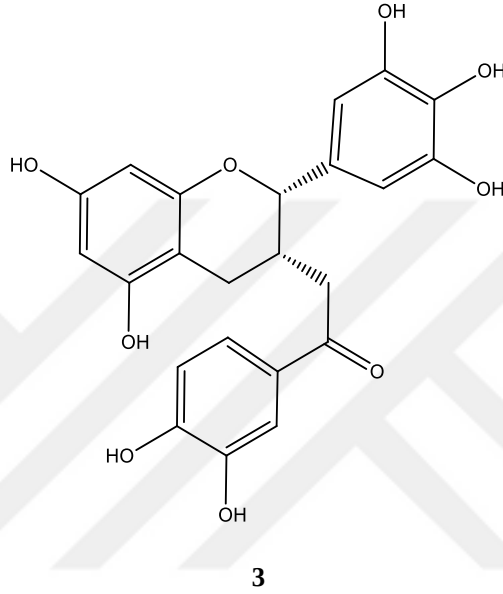
Betula L. spp. (Betulaceae): Bu cins genel olarak ülkemizde Huş Ağacı olarak bilinmekte ve Türkiye’de 5 farklı türü doğal olarak yetişmektedir ([http-1](http://1)). *Betula* türlerinin karakteristik bir sekonder metaboliti olan betulinik asitin (**2**), karaciğer yağlanması karşı etkili olduğu rapor edilmiştir. Sterol reseptörü element bağlayıcı protein 1c (SREBP1) aktivitesini, AMPK-mTOR-SREBP sinyal yolları aracılığıyla inhibe ederek yağlı karaciğere karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Quan vd., 2013).



2

Camellia sinensis L. (Kuntze) (Theaceae): Deneysel çalışmalar yeşil çayın etanollü ekstresinin non-alkolik karaciğer yağlanmasını iyileştirdiğini göstermiştir. Bir klinik çalışmada, kurutulmuş yeşil çay yaprağı tozu içeren kapsüllerin verilmesini takiben 12 hafta sonra ALT ve AST düzeylerinde düşüşler gözlemlenmiştir (Pezeshki vd., 2016). Çayda en çok bulunan kateşin olan epigallocateşin gallatın (**3**) hayvan deneylerinde

karaciğer yağlanması karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Yüksek yağlı diyet + Epigallokateşin gallat grubunda, yüksek yağlı diyet grubuna göre adipozite ve enflamasyon azaldığı, yağlı diyet grubuna göre ALT, trigliserit, insülin ve glikoz düzeylerinde azalma olduğu rapor edilmiştir. CYP 2E1 ve α -düz kas aktin ekspresyonunun da (3) grubunda daha az saptandığı gösterilmiştir (Kuzu vd., 2008).



***Capparis spinosa* L. (Capparaceae):** Ülkemizde kapari olarak bilinen meyveleri farklı şekillerde gıda olarak tüketilmektedir. Bitkinin yaş meyveleri, daha önce yapılmış klinik çalışmalarda karaciğer yağlanması olan hastalarda incelenmiş ve karaciğer yağlanmasını önlediği bulunmuştur. 12 hafta sonra, *C. spinosa* meyveleri verilen hastalarda ağırlık ve bel çevresinde azalma gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna göre kapari grubunda ALT, LDL ve trigliseritin azaldığı belirlenmiştir (Khavasi vd., 2018).

***Chrysanthemum morifolium* Ramat. (Asteraceae):** Bu cinse ait bitkiler ülkemizde doğal olarak yetişmemekte ancak “krizantem” adıyla bilinmektedir. *C. morifolium* toprak üstü kısımlarının etanol ekstresi verilen sıçanlarda serum total kolesterol düzeyleri ve karaciğer ağırlığının azaldığı, ancak serum triaçilgliserol düzeylerinde azalma gözlemlenmediği belirtilmiştir. Ancak ekstre sonrası hepatik lipid birikiminin, sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1c ve yağ asidi sentaz

ekspresyonunun azaldığı ve hepatik PPAR α , lipoprotein lipaz ve kolesterol 7 α hidroksilaz ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Cui vd., 2014).

***Cichorium intybus* L. (Asteraceae):** Yabani hindiba olarak bilinen bu tür ülkemizde geniş yayılım göstermektedir (http-1). Bitkinin köklerinden elde edilen infüzyonun etnobotanik olarak hiperlipidemiye karşı kullanıldığı bildirilmiş ve daha önce yapılan deneysel çalışmalarda, non-alkolik yağlı karaciğer üzerindeki etkisi *in vivo* olarak gösterilmiştir (Bahmani vd., 2015; Delfan vd., 2016; Faraji vd., 2020; Mohammadifar vd., 2019). *C. intybus* tohumlarının sulu-etanolü ekstresinin HepG2 hücrelerinde hepatik steatoz üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. HepG2 hücrelerine oleik asit ile farklı konsantrasyonlardaki ekstreler uygulanmıştır. Hücresel lipit birikimi, gliserol salgılanması ve hepatik trigliserit (TG) içeriği ölçülmüştür. SREBP-1c ve PPAR- α 'nın ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Ekstre grubunda, steatoz indüksiyonunu takiben hücrelere ve dokulara önemli histolojik hasarın (steatoz-iltihap-fibroz), SREBP-1c ve PPAR- α genlerinin aşağı regülasyonun, verilen hindiba ekstresi ile önlendiği bildirilmiştir. PPAR- α üzerinde daha yüksek bir uyarıcı etkiye sahip olan yabani hindiba, bir PPAR- α agonisti olarak raporlanmıştır (Ziamajidi vd., 2019).

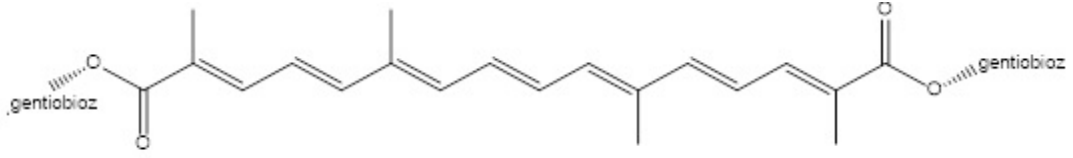
***Cinnamomum* L. spp. (Lauraceae):** Tarçının gıda ve baharat olarak kullanımı bulunmakta ancak *Cinnamomum* türleri ülkemizde yetişmemektedir. *C. verum* J. Presl. gövde kabuklarının tozunu içeren kapsüllerle yapılan çift kör, plasebo kontrollü bir klinik çalışmada, NAYKH'li elli kişilik hasta grubu, 12 hafta boyunca günde iki kapsül tarçın (her kapsül 750 mg tarçın içerir) veya 2 plasebo kapsül ile randomize edilmiştir. Tarçın grubunda Homeostatic Model Assessment (HOMA) indeksi, açlık kan şekeri, total kolesterol, trigliserit, ALT, AST, GGT düzeylerinin azaldığı beyan edilmiştir. Yapılan bu çalışmada, günde 1500 mg tarçın kullanımının NAYKH bozukluklarına etki edebileceği belirtilmiştir (Askari vd., 2014).

***Citrus medica* L. ve *Citrus x aurantifolia* (Christm.) Swingle (Rutaceae):** *C. aurantifolia* tarımı Türkiye'de yapılmakta ve misket limonu olarak bilinmekte, *C. medica* ise pomelo olarak bilinmektedir. Nijerya'da halk arasında her iki *Citrus* türünün meyve tüketiminin, özellikle kilo kontrolü amacıyla kullanıldığı belirtilmektedir (Ajayi vd., 2018). Ayrıca *C. aurantifolia* kabuğunun sulu etanolü ekstrelerinin farelerde karaciğer yağlanmasına karşı etkileri araştırılmıştır. Bahsi geçen bu çalışmada elde edilen sonuçlarda, azalmış serum lipit indeksi ve karaciğer histopatolojisini önleme ile

gösterildiği gibi, ekstre uygulamasının yüksek yağlı beslenmenin neden olduğu NAYKH'yi azalttığı gösterilmiştir. Serbest yağ asidi (FFA), PPAR- γ , SREBP-1c ve yağ asidi sentez enzimi dahil olmak üzere lipid sentezine dahil olan genlerin ekspresyonunun baskılandığı belirtilmiştir. Ayrıca, ekstre verilmeyen farelerle karşılaştırıldığında proenflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bahsi geçen bu çalışmaya ait sonuçlar, *C. aurantifolia* kabuk ekstresinin, plazma trigliserit ve kolesterol seviyelerini ve lipid sentezini azaltarak yüksek yağlı beslenmenin neden olduğu NAYKH'yi önlediğini göstermiştir (Han vd., 2019).

***Crataegus aronia* (L.) Bosc ex DC. ve *C. pinnatifida* Bunge (Rosaceae):** *Crataegus* türleri Türkiye’de yaygın olarak yetişmekte ve alıç olarak bilinmektedir (http-1). *C. aronia* meyvelerinin sulu maserasyonunun karaciğer yağlanmasına karşı koruyucu etkisi olduğu hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. *C. aronia* ekstresinin, karaciğer indeksini azalttığı, HDL kolesterolü artırdığı ve kandaki LDL kolesterolü azalttığı ifade edilmiştir. Alıç ekstresinin ayrıca karaciğer hasarını gösteren oksidatif stres biyobelirteçlerini ve karaciğer enzimlerini iyileştirdiği belirtilmiştir (Al-Humayed, 2017). *C. pinnatifida*'nın yapraklarından elde edilmiş ticari bir total flavonoit ekstresinin adiponektin/AMPK yolu ile karaciğer yağlanmasına karşı etkili olduğu hayvan deneylerinde rapor edilmiştir (Li vd., 2015).

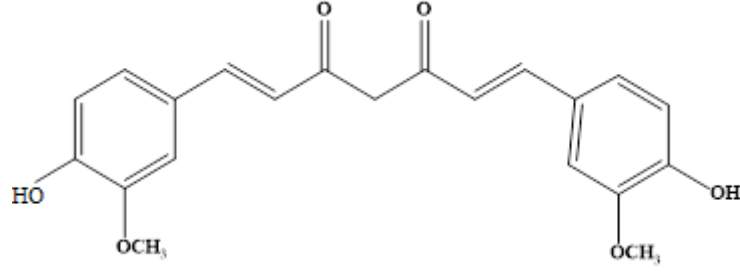
***Crocus sativus* L. (Iridaceae):** Safran olarak bilinen bu bitkinin çiçeklerinin stigmaları baharat olarak kullanılmaktadır. Türkiye’de endemikler de dahil olmak üzere 50 üzerinde *Crocus* türü yayılış göstermektedir (http-1). Daha önceki çalışmalarda yüksek yağlı diyetle indüklenen obez sıçanların non-alkolik karaciğer yağlanmasında *C. sativus* etanol ekstresi ve krosinin (4) koruyucu etkisi araştırılmıştır. Safran ekstresi ve krosin verilen gruplarda AST, ALT, alkalik fosfataz ve albümin gibi hepatik belirteç enzimlerinin düzeylerinde azalma gözlemlendiği belirtilmiştir (Mashmoul vd., 2016). Ayrıca klinik bir çalışmada, krosin verilen grubun karaciğer enzimlerinde iyileşme olurken, suyla hazırlanan safran ekstresi verilen grubunun karaciğer enzim sonuçlarının çok değişmediği ortaya konulmuştur (Parsi vd., 2020).



4

***Cornus mas* L. (Cornaceae):** Halk arasında meyvesi tüketilen bu tür, kızılçık olarak bilinmekte ve Türkiye’de doğal olarak yetişmektedir. Daha önceki çalışmalarda NAYKH'da *C. mas* meyvelerinin sulu etanol ekstresinin karaciğer fonksiyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elli kişilik hasta grubu, 12 hafta boyunca 20 μ L ekstre veya plasebo almıştır. Girişim öncesi ve sonrası serum ALT, AST, sitokeratin 18 (CK 18) düzeyleri, steatoz ve fibrozis skorları analiz edilmiştir. 12 hafta sonra, *C. mas* meyve ekstresinin, serum ALT, AST, CK-18 seviyelerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Sangsefidi vd., 2021).

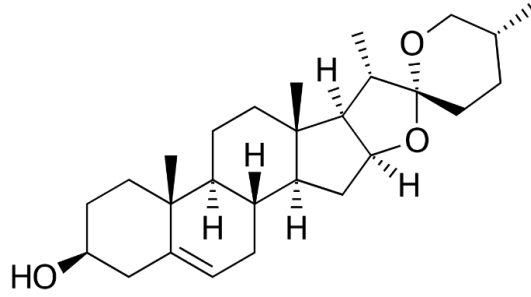
***Curcuma longa* L. (Zingiberaceae):** Zerdeçal, baharat olarak dünya çapında bilinen bir bitkidir ve ülkemize ithal edilmektedir. Zerdeçalın karakteristik metabolitlerinden olan kurkumin (5) de biyolojik aktivite çalışmalarına konu olan bilinen bir sekonder metabolittir. Non-alkolik karaciğer yağlanmasına karşı kurkumin ile klinik denemeler yapılmıştır (Cicero vd., 2018). Kurkuminin, NF-kappaB aktivasyonunu inhibe ederek farelerde karaciğer yağlanmasına karşı etkili olduğu bulunmuştur. Kurkuminin, yağlı karaciğerden kaynaklanan iltihabı azalttığı, ancak steatoz veya hepatik lipit peroksit seviyesi üzerinde etkisinin görülmediği bildirilmiştir. Kurkuminin, NF-KB'nin aktivasyonunu önlediği ve ICAM-1, COX-2 ve MCP-1'in aşağı indüksiyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ancak AP-1, MAPK yollarının aktivasyonunu azaltmada başarısız olduğu ortaya konulmuştur (Leclercq vd., 2004).



5

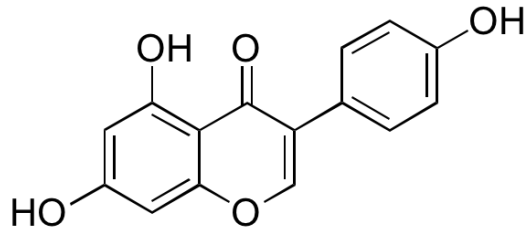
***Cynara scolymus* L. (Asteraceae):** Bu bitki enginar olarak bilinen bir sebzedir. Hem geleneksel tıpta basit preparasyonları hem de karaciğer rahatsızlıklarına karşı farmasötik formlarda farklı enginar müstahzarları kullanılmaktadır (Sharma vd., 2021). Enginarın karaciğer yağlanmasına karşı etkili olduğunu destekleyen klinik çalışmalar mevcuttur. Sonuçlar, beslenme rutininde enginar sebzesi yer alan hastalarda AST ve ALT enzimlerinin düşüş gösterdiğini ortaya koymuştur (Rajabi vd., 2020).

***Dioscorea bulbifera* L.:** Bu cins Türkiye’de doğal olarak yetişmemektedir. Daha önceki çalışmalarda *D. bulbifera* köklerinin etanol ve sulu ekstraktlarının farelerin karaciğer fonksiyonu ve dokusunda hasara neden olduğu gösterilmiştir. *D. bulbifera* toksisitesinin derecesi, ekstre konsantrasyonu ve uygulama süresi ile ilişkili bulunmuştur (Kundu vd., 2020). *D. nipponica*’nın köklerinden elde edilen bir saponin olan trillin ise karaciğer yağlanmasına karşı araştırılmış ve antihiperlipidemik etkisinin bulunduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2012). Bitkiden elde edilen bir diğer saponin bileşeni olan diosgeninin ise bir başka çalışmada, karaciğer yağlanmasında oldukça etkili olduğu bildirilmiştir. Dioscin’in yüksek yağlı diyetle indüklenen farelerde NAYKH’yi önlediği gösterilmiştir. Dioscin’in farelerde enerji ve oksijen tüketimini artırırken karaciğer lipid birikimi semptomlarını azalttığı bildirilmiştir. Diosgenin’in (6), yüksek kolesterolli diyetlerde sıçanlarda hepatik ve plazma toplam kolesterol (TC) seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Bununla birlikte, plazmadaki yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol seviyelerini arttırdığı ortaya konulmuştur (Liu vd., 2015).



6

***Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae):** Soya ve ürünleri ülkemize yurt dışından gelmektedir. Yapılan çalışmalarda soya fasulyesi içeriğindeki bir izoflavon bileşiği olan genisteinin (7) hepatik PPAR- γ 'yı artırarak karaciğer yağlanmasında etkili olduğu bulunmuştur. Bahsedilen bu çalışmaya ait bulgular, NAYKH grubunda hepatik malondialdehit (MDA) ve TNF- α düzeylerinin arttığı, ancak 16 μ mg/kg genisteinin bu seviyeleri azalttığı yönündedir. NASH grubunda hepatik PPAR- γ 'nin aşağı regülasyonu gözlenmiş, ancak genisteinin, her iki NASH + Gen grubunda da PPAR- γ ekspresyonunu yukarı regüle ettiği bildirilmiştir. Sonuçların, genisteinin, hepatik PPAR- γ 'nin yukarı regülasyonu, oksidatif stresin azalması ve enflamatuvar sitokinin inhibisyonu yoluyla NASH'ın karaciğer histopatolojisini azalttığını gösterdiği rapor edilmiştir (Susutlerpanya vd., 2015).



7

***Lactuca sativa* L. (Asteraceae):** Marul olarak bilinen, Türkiye’de tarımı yapılan, yaprakları sebze olarak tüketilen bu bitkinin yapraklarının çiğ olarak yenilmesi suretiyle halk arasında yağ yakıcı etkisinden dolayı zayıflama amaçlı kullanıldığı bildirilmiştir (Delfan vd., 2016). Kırmızı yapraklı olan türünün yüksek yağlı diyetlerde obeziteyi

önlediği daha önceki çalışmalarda deneysel olarak bulunmuştur. Marul yaprakları ile beslenen farelerin, kontrol diyeti ile karşılaştırıldığında %46 daha düşük aterosklerotik indekse sahip olduğu görülmüştür. Antioksidan parametrelerin, marul tüketilmesi ile arttığı bildirilmiştir. Antioksidan savunma sisteminin ayrıca glutatyon S-transferaz, GSH-Px, glutatyon redüktaz, SOD ve paraoksanaz gibi antioksidan enzimler tarafından kan veya karaciğer dokularında güçlendirildiği ortaya konulmuştur. Daha önce yapılan bu çalışma sonuçlarına göre, yüksek kolesterollü yüksek yağlı bir diyetin %8 oranında kırmızı yapraklı marul ile desteklenmesinin, plazma kolesterol ve lipit düzeylerini iyileştirdiği, lipit peroksidasyonunu önlediği ve antioksidan savunma sistemini artırdığı artırdığını gösterilmiştir (Lee vd., 2019).

Malva L. spp. (Malvaceae): Ülkemizde ebegümeci olarak bilinen bu bitkinin Türkiye’de 8 farklı türü doğal olarak yetişmekte, pek çok türü tüm dünyada yaygın olarak bilinmekte ve çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (http-1). Bu türlerden biri olan *M. neglecta* toprak üstü kısımlarından hazırlanan çayların, halk arasında kilo kontrolü amacıyla kullanıldığı bildirilmiştir (Deflan vd., 2016).

Melissa officinalis L. (Lamiaceae): Yaprakları limonu andıran kokusuyla bilinen bu bitki ülkemizde yayılış göstermektedir (http-1). Melisa toprak üstü kısımlarının kuru drog tozlarını içeren kapsülleri, daha önce yapılan karaciğer yağlanması çalışmalarında çörek otu ile denenmiş ve klinik çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır. Serum AST, ALT, vücut kitle indeksi ve yağlı karaciğer derecesinde düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir. Geleneksel İran Tıbbına dayalı *M. officinalis* infüzyon preparasyonlarının, vücut ağırlığını ve karaciğer enzimlerini düzenlediği ve karaciğer yağlanmasına iyi geldiği literatürde kayıtlıdır (Hosseini vd., 2018).

Morus alba L. (Moraceae): Ülkemizde besin olarak kullanımı olan beyaz dut yani *M. alba*’nın çiğ meyve olarak tüketildiğinde halk arasında karaciğeri koruyucu özelliğinin bulunduğu literatürde yer almaktadır (Heredia-Díaz vd., 2018). Bu durumu destekleyen deneysel çalışmalar da mevcuttur. Özellikle non-alkolik karaciğer yağlanmasına karşı hem yapraklarında hem de meyveleri ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda dut yaprağının etanollü ekstresinin obezite kaynaklı oksidatif stres, lipogenez ve karaciğer fibrozu üzerindeki etkisini araştırmak için, yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlara dut yaprağı ekstresi verilmiştir. Ekstre grubundaki yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde α -düz kas aktin gibi LXRa aracılı lipogenez ve hepatik

fibroz belirteçlerini iyileştirdiği ve hem oksijenaz-1 hem de GSH-Px dahil olmak üzere antioksidan enzimlerin aktivitelerini normalleştirdiği kaydedilmiştir. Çalışılan dut ekstrelerinin hepatik lipit metabolizmasını, fibrozisi ve antioksidan savunma sistemini düzenleyerek obeziteye bağlı karaciğer yağlanması üzerinde faydalı etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur (Ann vd., 2015; Xu vd., 2017; Yang vd., 2010).

***Myristica fragrans* Houtt. (Myristicaceae):** Küçük hindistan cevizi veya muskat olarak bilinen bu bitki Türkiye’de yetişmemekte ancak baharat olarak yurt dışından tedarik edilmektedir. Daha önceki çalışmalarda alınan *in vivo* sonuçlarda, *M. fragrans* tohumlarının etanollü ekstresinin lipit sentezi ile ilgili genlerin yağ asidi sentaz ve SREBP-1c ekspresyonunu azaltabileceğini ve hücrelerin lipit içeriğini düşürebileceği gösterilmiştir. Ayrıca hücrelerde serbest yağ asitlerinin aracılık ettiği enflamasyonla ilişkili sitokinler interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü a'nın (TNF- α) ekspresyonunu da inhibe ettiği bildirilmiştir. Çalışılan fare modelinde, obez farelerin vücut ağırlığını azalttığı ve gıda alımını etkilemeden NAYKH'yi iyileştirdiği rapor edilmiştir (Zhao vd., 2020).

***Nigella sativa* L. (Apiaceae):** Türkiye’de çörek otu olarak bilinen bitkinin tohumları hem gıda hem de tedavi amaçlı yaygın olarak kullanılmaktadır. Yağlı karaciğere karşı etkileri daha önce yapılmış bir klinik çalışmada araştırılmıştır. *N. sativa* tohumlarını içeren kapsüller verilen grupta hem vücut ağırlığında hem de karaciğer enzimlerinde iyileşme olduğu kaydedilmiştir (Hosseini vd., 2018).

***Olea europea* L. (Oleaceae):** Türkiye’de tarımı yapılan zeytin meyveleri, ülkemizle beraber tüm dünya ülkelerinde kolesterol düşürücü etkisi nedeniyle diyetlerde ve etnobotanik çalışmalarda yer aldığı kayıtlıdır (Deflan vd., 2018; Gürbüz vd., 2019). Bitkinin hem yaprakları hem de meyveleri ile yapılan çok sayıda non-alkolik karaciğer yağlanması çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birisinde sulu etanollü zeytin meyve ekstresi verilen farelerde vücut ağırlığının azaldığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise zeytinyağı grupları, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, zeytinyağının trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein düzeylerini azaltırken, yüksek yoğunluklu lipoprotein düzeylerini artırdığı görülmüştür. Bu nedenle zeytinyağının, NAYKH için potansiyel bir terapötik alternatifi temsil edebileceği belirtilmiştir (Dhibi vd., 2011; Wani vd., 2015). Zeytinyağı ile yapılan bir başka çalışmada ise zeytinyağı ile beslenen hastalarda karaciğer yağlanma oranları ölçülmüştür. Zeytinyağı grubu, kontrol yağı grubu

ile karşılaştırıldığında ağırlık ve vücut kitle indeksinde azalmaya neden olduğu kaydedilmiştir. Zeytinyağı verilmesi öncesi ve sonrası analizler, zeytinyağı grubunda yüksek yoğunluklu lipoprotein seviyesinde artış olduğunu ortaya koymuştur (NigamPriyanka vd., 2014).

***Panax ginseng* C.A. Mey. (Araliaceae):** Ginseng bir uzakdoğu bitkisidir. Ginseng kökleri ve sarımsak tozu ile hazırlanan bir kombinasyonun non-alkolik karaciğer yağlanması karşı başarılı olduğu daha önce yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Ginsengin bütün olarak etkisinin yanı sıra biyoaktif bileşeni olan ginsenosit de karaciğer yağlanması karşı araştırılmış ve AMP ile aktive olan protein kinazın aktivasyonu yoluyla karaciğer yağlanmasında etkili olduğu bulunmuştur. İntraperitoneal uygulamadan sonra, ginsenosidin (10 mg/kg) etkisi, düşük karaciğer ağırlığı, hepatik trigliserit düzeyi ve Hematoksin & Eozin boyama ile karaciğer bölümlerinin histolojik değerlendirmesi ile gösterildiği gibi, yüksek yağlı bir diyetle indüklenen obez sıçanlarda hepatik yağ birikimini de azalttığı belirtilmiştir. Yağ asidi oksidasyon hızının ve yağ asidi β -oksidasyonunda anahtar bir enzim olan karnitin palmitoiltransferaz 1'in (CPT-1) aktivitesinin tedavi edilen hepatositlerde yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca ginsenosidin, hepatik AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) ve fosforile edilmiş asetil-CoA karboksilazın yüksek aktivasyonu ile bağlantılı olan hücre AMP/ATP oranını arttırdığı ortaya konulmuştur. AMPK'nin aktivasyonu ile uyumlu olarak, yağ asidi oksidatif enzimlerini ve proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu uyardığı ve PCR analizlerinde lipogenezde işlev gören enzimleri veya proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu bastırdığı bildirilmiştir. Ginsenositlerin hepatik yağ birikimini azaltmak için güçlü bir ajan olabileceği ve yağlı karaciğer bozukluğu için terapötik olarak faydalı olacağı sonucuna varılmıştır (Shen vd., 2013).

***Pluchea indica* (L.) Less. (Asteraceae):** Ülkemizde yetişmeyen bu bitkinin, Ayurveda geleneksel kullanımlarında toprak üstü kısımlarından elde edilen infüzyonunun karaciğer sağlığını korumak için kullanıldığı bildirilmiştir (Heredia-Díaz vd., 2018). Sıçanlarda obezite ile ilgili çalışmalar yapılmış ve bu bitkinin toprak üstü kısımlarının sulu ekstreleri ile iyi sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir. *P. indica* çayının hipergliseminin düzelmesine etkisi; TC, LDL kolesterol (LDL-C), HDL kolesterol (HDL-C) ve trigliserit (TG) düzeylerini düzenlemesi şeklinde ortaya konulmuştur. 400 ve 600 μ mg/kg oral sulu ekstrenin, ekstre verilmeyen grupla karşılaştırıldığında konsantrasyona

bağımlı bir şekilde hiperglisemiye iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, histolojik analiz, *P. indica* sulu ekstresi ile tedavi edilen grupların perigonadal yağ adipositlerinin ortalama alanı ve miktarının daha düşük olduğunu göstermiştir (Sirichaiwetchakoon vd., 2020).

***Punica granatum* L. (Lythraceae):** Nar, ülkemizde doğal olarak yetişen bir tarım ürünüdür. Nar meyve kabuğundan elde edilen farklı (su, sulu alkol ve etanol) ekstraktların karaciğer yağlanmasına karşı etkileri sıçanlarda araştırılmış ve başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Yüksek doz sulu ekstre ve klofibrat gruplarının, diğer gruplara göre HDL ve antioksidan aktivitede istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirtilmiştir (Amiri vd., 2018).

***Rhododendron oldhamii* Maxim. (Ericaceae):** Bazı türleri Türkiye’de yayılış göstermekte ve “orman gülü, ağulu ot” gibi isimlerle bilinmektedir ([http-1](http://1)). Daha önceki çalışmalarda farelerde karaciğer yağlanmasına karşı etkisi, bitkinin yapraklarından elde edilen etanol, sulu etanol, diklorometan, etil asetat gibi farklı ekstraktlarla araştırılmıştır. Önceki bu çalışmada, *R. oldhamii* yaprak ekstresinin, yüksek yağlı diyet ile indüklenen NAYKH ile farelerde ve HepG2 hücrelerinde serbest yağ asidi kaynaklı yağ birikimini inhibe etme ve yağlı karaciğer sendromunu iyileştirme üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *R. oldhamii* yaprağından elde edilen fraksiyonlar arasında EtOAc fraksiyonunun, güçlü bir yağ birikimini önleyici aktivite sergilediği belirtilmiştir. Ek olarak, *R. oldhamii* yaprağının EtOAc fraksiyonunun yağlı karaciğer belirtilerini büyük ölçüde iyileştirdiği ve yüksek yağlı beslenme ile indüklenen NAYKH farelerinde toplam kolesterolü (TC) ve trigliseriti (TG) azalttığı ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, *R. oldhamii* yaprağından elde edilen ekstraktların, NAYKH’ye karşı etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2017).

***Rhus chinensis* Mill. (Anacardiaceae):** Çin sumak meyvelerinden elde edilen sulu etanol ekstraktlarının NAYKH’ye karşı önleyici etkisi ve altında yatan mekanizmalar daha önce yapılan çalışmalarda aydınlatılmıştır. Önceki çalışmalara ait sonuçlarda, TG, TC, MDA, ALT, AST ve endojen antioksidan enzimler dahil olmak üzere bazı kritik biyokimyasal endeksleri iyileştirdiği gösterilmiştir. Bahsedilen bu çalışmadaki immüno Floresan ve TUNNEL testinin sonuçları, ekstrenin hücre çekirdeğindeki NF-kB seviyesini azalttığını ve hepatosit apoptozunu baskıladığını göstermiştir. Ayrıca, immünohistokimya ve western blot analizlerinin sonuçları doğrultusunda, lipid metabolizması, enflamasyon ve hepatositlerin apoptozunda yer alan birkaç anahtar

proteini düzenleyerek, yani p-AMPK ekspresyon seviyelerini artırarak NAYKH'yi iyileştirebileceği belirtilmiştir (Wu vd., 2020).

***Rosa damascena* L. (Rosaceae):** *R. damascena* ülkemizde özellikle Isparta ve çevresinde yetiştirilen bir bitkimizdir. Önceki çalışmalarda non-alkolik karaciğer yağlanması karşı hayvan modeli üzerinde *R. damascena* petallerinin sulu etanol ekstresinin etkisi araştırılmıştır. *R. damascena* çiçeklerinden elde edilen ekstrelerin vücut ağırlığını, karaciğer yağ birikimini, TG, TC, LDL-C konsantrasyonlarını ve karaciğer enzimlerinin yükselmesini azalttığı bildirilmiştir. Karaciğer dokusunun histopatolojik incelemesinin, *R. damascena*'nın terapötik etkisini doğruladığı gösterilmiştir. Ekstre uygulanan hayvanlarda toplam antioksidan aktivitenin, toplam tiyol içeriğinin, MPO enzim aktivitesinin yanı sıra lipit peroksidasyonunun iyileştirilmesi de dikkate alınmıştır. Alınan tüm sonuçlar doğrultusunda *R. damascena* ekstresinin NAYKH'da terapötik bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Davoodi vd., 2017).

***Senna obtusifolia* (L.) H.S.Irwin & Barneby (Fabaceae):** Bu cinse ait türler ülkemizde doğal olarak yetişmemektedir. Tohumlarından elde edilen infüzyonun geleneksel olarak karaciğer yağlanması karşı kullanıldığı kayıtlıdır (Heredia-Díaz vd., 2018). Ayrıca tohumların etanol ekstralarının karaciğer yağlanması ve hiperlipidemiye karşı etkili olduğu deneysel olarak bulunmuştur. Sıçanlarda *Cassia* ekstresi verilen grupta, NAYKH gelişen sıçanlarda ortaya çıkan yüksek biyobelirteçleri azalttığı belirtilmiştir. *Cassia* ekstre uygulamasının ayrıca LDL-R mRNA ekspresyonunun azalmasını önlediği ve histopatolojik değişiklikleri iyileştirdiği daha önceki çalışmalarda rapor edilen bilgiler arasındadır (Mei vd., 2015; Meng vd., 2019).

***Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Asteraceae):** Devedikeni, karaciğere etkili çeşitli müstahzarları olan bir bitkidir. Ülkemizde Ege ve Akdeniz'in bir bölümünde yetişmektedir (http-1). Hepatotoksisite, karaciğer yetmezliği ve karaciğer yağlanması için kullanımı kayıtlıdır. Ayrıca karaciğer yağlanması karşı etkilerinin deneysel ve klinik çalışmalarda ortaya konulduğu bildirilmektedir (Abenavoli vd., 2011; Mohammadifar vd., 2019).

***Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F.H. Wigg (Asteraceae):** Bitkinin 50'den fazla türü ülkemizde yetişmesine rağmen *T. officinale* bu türler arasında değildir (http-1). Bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen sulu özütlerin halk arasında karaciğer

rahatsızlıklarında kullanıldığı kayıtlıdır (Heredia-Díaz vd., 2019). Daha önceki çalışmalarda karaciğer hasarına ve karaciğer yağlanmasına karşı etkileri ve etki mekanizmaları hayvan deneylerinde araştırılmıştır (Davaatseren vd., 2013). *Taraxacum*'un hepatoprotektif etkisi C57BL/6 fareleri ile çalışılmıştır. Sulu etanollü ekstre verilen gruba ait sonuçlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hepatik lipit birikimini azalttığı bildirilmiştir. Ekstre gruplarının vücut ve karaciğer ağırlıkları, yüksek yağlı diyet grubununkinden daha düşük bulunduğu ve ekstre uygulamasının, TG, TC, insülin, serum açlık glikoz seviyesini ve insülin direncini bastırdığı belirtilmiştir. Bu sonuçlarla, *Taraxacum*'un obezite ile ilişkili non-alkolik karaciğer yağlanmasının önlenmesi ve tedavisi için etkili olduğunu ortaya koyduğu rapor edilmiştir (Mahboubi vd., 2020; Wirngo vd., 2016).

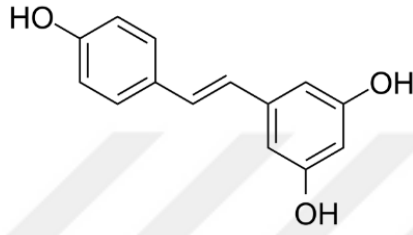
***Triticum aestivum* L. (Poaceae):** Buğday tohumlarının yeşil ve yaş halde sıkılmasıyla elde edilen suyunun Singapur'da halk arasında kilo verme ve karaciğer yağlanmasına karşı kullanımı kaydedilmiştir (Siew vd., 2014). Ayrıca daha önceki deneysel çalışmalarda, obezite ve yağlı karaciğere etkilerinin yanı sıra lipit düşürücü etkileri gösterilmiştir. Yüksek yağlı diyet ile indüklenen obez farelerde *T. aestivum* tohumlarının %50'lik sulu etanol ekstresinin etkileri araştırılmıştır. 6 hafta boyunca ekstre uygulamasının (10, 50 ve 200 mg/kg), yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde vücut ağırlıklarını, serum TC'sini ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol seviyelerini azalttığı belirtilmiştir. Ekstre grubunda epididimal beyaz yağ dokusunun (EWAT) ve karaciğerde lipit birikiminin azaldığı, TC ve lipit seviyelerinin düştüğü bildirilmiştir. Ekstre uygulaması ile serum leptin ve adiponektin konsantrasyonları azaldığı ve EWAT'de PPAR- γ ve yağ asidi sentaz ekspresyonunda düşüşler görüldüğü rapor edilmiştir. Ayrıca, ekstre uygulamasının, yüksek yağlı diyet ile indüklenen obez farelerin karaciğerindeki PPARa protein seviyelerini arttırdığı ortaya konulmuştur (Choi vd., 2009; Im vd., 2015; Oh vd., 2019).

***Urtica dioica* L. (Urticaceae):** Isırgan otu ülkemizde doğal yayılış gösteren yabani bir bitkidir. Isırgan otunun karaciğer yağlanmasına karşı toprak üstü kısımlarından hazırlanan preparatları halk arasında kullanılmaktadır. Daha önceki deneysel çalışmalarda ise kan lipit profili hiperkolesterolemik sıçanlarda araştırılmıştır. 4 hafta süreyle *U. dioica* ekstresi (100-300 mg/kg) uygulanmış ve hayvanların kan lipit düzeylerinde azalma gözlemlendiği belirtilmiştir (Delfan vd., 2016; Nassiri-Asr vd., 2009).

***Vaccinium vitis-idea* L. (Ericaceae):** Türkiye’de Rize ve çevresinde yetişen ve kekreyemiş adı ile bilinen kırmızı renkli bir meyvedir (http-1). Meyvelerinin daha önceki deneysel sonuçlara göre kandaki lipit seviyesini düşürmede başarılı olduğu bildirilmiştir. *V. vitis-idea* meyvelerinin etanollü ekstresi 12 hafta yüksek yağlı diyet kaynaklı karaciğer hasarında, hepatik lipit birikimi ve enflamatuvar sitokin ekspresyon düzeylerinin tespit edilebilmesi için verilmiştir. Sonuçta verilen ekstrenin karaciğerde SREBP-1c ve asetil-CoA karboksilaz-1 (AAC-1) ekspresyonunu ve ayrıca aktif AMPK’yi inhibe ettiği ortaya konulmuştur. Ayrıca hepatik oksidatif stresi ve enflamatuvar agregasyonu azalttığı bildirilmiştir. Bu durum yapılan bu çalışmada, karaciğerde nükleer faktör eritroit 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) ve glutatyon seviyesinin restorasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlarla, *V. vitis-idea* uygulamasının kısmen hepatik lipit birikimini, oksidatif stresi ve enflamatuvar yanıtı azaltarak karaciğer hasarına karşı koruma sağlayabileceği ortaya konulmuştur (Hewage vd., 2021).

***Vitis vinifera* L. (Vitaceae):** Ülkemizde tarımı yapılan ve meyve olarak tüketilen üzüm çekirdekleri biyoaktif sekonder metaboliti rezveratrol (**9**) ile bilinmektedir. Ayrıca meyvelerinin yenilerek tüketilmesi geleneksel tıpta antihiperlipidemik etkilerinden dolayı kayıtlıdır (Deflan vd., 2016). Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda non-alkolik karaciğer yağlanması için sıçanlarda üzüm kabuğu sulu etanol ekstresi denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Çalışmada, yüksek yağlı bir diyetle beslenen farelerde polifenolden zengin üzüm kabuğu ekstresinin yağlanma ve hepatik steatoz üzerindeki etkisini ve adipoz ve hepatik lipit metabolizmasına dayalı temel mekanizmalarını araştırılmıştır. Üzüm kabuğu ekstresi uygulanan grup, yüksek yağlı diyet grubu ile karşılaştırıldığında ekstre grubunun vücut ağırlığını, yağ ağırlığını, plazma serbest yağ asidi seviyesini ve hepatik lipit birikimini azalttığı belirtilmiştir. Yüksek yağlı diyet grubuna göre üzüm kabuğu ekstresinin grubunda plazma leptin düzeyi daha düşük, plazma adiponektin düzeyinin daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Üzüm kabuğu ekstresi uygulamasının, β -oksidasyon aktivasyonunun eşlik ettiği hem yağ hem de karaciğer dokularında lipojenik enzimlerin aktivitelerini bastırdığı rapor edilmiştir. Ek olarak üzüm kabuğu ekstresinin, karaciğerde lipogenez ve β -oksidasyon ile ilgili genlerin ekspresyonunda yüksek yağlı beslenmenin neden olduğu değişiklikleri tersine çevirdiği vurgulanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda, üzüm kabuğu ekstresinin mRNA ekspresyonunu, yağ dokusu ve karaciğerde lipogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu

düzenleyen enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek diyetle ilgili yağlanma ve karaciğer yağlanmasına karşı koruma sağladığı belirtilmiştir (Park vd., 2013). Bir başka deneysel çalışmada ortaya konulan bulgulara göre ise, üzüm çekirdeğinde bulunan rezveratrolün hem klinik çalışmalarda ve hem hayvan deneylerinde antihiperlipitemik, antiobezite ve yağlı karaciğer önleyici aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Cicero vd., 2018).



9

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal sarf maddeler

- Allisin (HPLC %90, Sigma)
- Anisaldehit (Sigma)
- Asetonitril (HPLC Grade, Merck)
- β -sitosterol (HPLC %90, Sigma)
- Butanol (Merck)
- Cremophor EL (Sigma)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma)
- Dimetil sülfoksit (Riedel de Haen)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo)
- EDTA (Sigma)
- Etanol (%99,9, Merck)
- Etil asetat (Carlo Erba)
- Fetal Bovine Serum (Thermo)
- Folin-Fenol çözeltisi (Sigma)
- Formik asit (Carlo Erba)
- Glasiyel asetik Asit (Carlo Erba)
- Glikoz (Fluka)
- Glutasyon (Sigma)
- HepG2 hücre hattı (ATCC HB-8065TM)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- İzopropanol (Merck)
- Klorojenik asit (HPLC %95, Sigma)
- Malvin (HPLC %90, Sigma)
- Metanol (HPLC Grade, Merck)
- *n*-Hekzan (Merck)
- Nil Kırmızı1S1 (Sigma)
- Palmitik Asit (Sigma)
- Paraformaldehit (Sigma)
- Partenolit (HPLC %96, Sigma)
- Penicillin (Sigma)
- Propilen glikol (Merck)
- Polietilen Glikol 400 (Merck)
- Rosmarinik asit (HPLC %95, Sigma)
- Rutin (HPLC %90, Sigma)
- Salvigenin (HPLC %95, Fluka)
- Sikloheksan (Carlo Erba)
- Sodyum bikarbonat (Sigma)
- Sodyum hidroksit (Sigma)
- Sodyum tartarat (Riedel de Haen)
- Soybean Oil (Sigma)
- Span 80 (Merck)
- Streptomisin (Sigma)
- Toluen (Merck)
- Trizma Base-Tris HCl (Sigma)
- Tween 80 (Merck)
- Oleik Asit (Sigma)
- Oleum Cinnamomi (Sigma)

3.1.2. Kullanılan diğer sarf malzemeleri

- 0,22 μm por $\mathcal{C}$ apına sahip membran filtre
- 0,45 μm por $\mathcal{C}$ apına sahip membran filtre
- 48 kuyucuklu mikroplate (NEST)
- 96 kuyucuklu mikroplate (NEST)
- Cam kapaklı Petri (150 mm)
- Cam pastör pipetleri
- Drummond kılcal borular
- Hazır cam ve alüminyum İTK plakları (İTK-Silikajel 60 GF₂₅₄, por 15 μm Merck)
- Silikajel kaplı cam YPİTK plakları
- Şeffaf YBSK vialleri
- Tek kullanımlık plastik kapaklı Petri (90 mm x 25, ISOLAB)
- Tek kullanımlık pipet uçları (1000, 200 ve 10 μL)
- Whatman kâğıdı No:1
- Vakumlu filtrasyon sistemi (Sartorius)

3.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar

- Buzdolabı (Bosch, Almanya)
- Distile Su Cihazı (Milipor, Milli-Q Synthesis A10, Fransa)
- Doku Homojenizatörü (Heidolph Silent Crusher, Almanya)
- Elektrik iletkenliği cihazı (Milwaukee MW 801, Amerika)
- Malvern zeta sizer (Nano ZS, Amerika)
- Mikroplate spektrofotometre (BioTek, Powerwave XS, Amerika)
- Nikon Eclipse Ni araştırma mikroskobu (Japonya)
- Otoklav (Hirayama, HV-50, Japonya)
- Otomatik multikanal pipetör (Brand, Amerika)
- pH metre (WTW Inolab, Almanya)
- Refraktometre (Krüss, Almanya)
- Robotik Pipetleme Sistemi (BioTek-Precision Power, Amerika)
- Rotavapor (Heidolph, Almanya)

- Santrifüj (Sigma, Amerika)
- Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrofotometresi (SK-KS) (Agilent 1100, Amerika)
- Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrofotometresi (SK-KS) (Shimadzu 2010C Japonya)
- Steril Kabin (Heal force HF SAFE 900, Çin)
- Ultra derin dondurucu (-85 °C) (New Brunswick Scientific, Amerika)
- Ultrasonik banyo (Bandalin-Sonorex, Amerika)
- UV spektrofotometre (Thermo Multiscan Spectrum, Finlandiya)
- Viskozimetre (Heidolph, Almanya)
- Vorteks karıştırıcı (İka Genius 3, Almanya)
- Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (CAMAG, İsviçre)

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkisel materyal

Salvia fruticosa Mill. yaprakları, *Taraxacum officinale* L. toprak üstü kısımları, *Malva sylvestris* L. çiçekleri, *Tanacetum parthenium* L. toprak üstü kısımları, *Plantago ovata* Forssk. tohumları, *Allium sativum* L. soğanları kuru droglar olmak koşuluyla, sertifikalı olarak Almanya'dan Farmakope kalitesinde Anoxymet International GmbH ve Caelo gibi ticari kaynaklardan temin edilmiştir. Yaprak, çiçek ve toprak üstü drogları kaba toz, soğan drogu ise toz halde satın alınmıştır. *A. sativum* soğanı haricindeki bitki drogları 200-300 mesh aralığında öğütülmüştür.

3.2.2. Ekstraksiyon

Bitki drogları başlık 3.2.1.'de ifade edildiği şekilde öğütüldükten sonra her biri Avrupa Farmakopesi'nde uygun görülen çözücüler ile ekstre edilmiştir.

Toz haldeki *A. sativum* soğanlarından 100 g tartılmış ve metanol ile 1 saat çalkalamalı olarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 saatin sonunda Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek ekstre rotary evaporatör yardımı ile yoğunlaştırılmıştır. Filtre kağıtları işlem öncesi metanol ile ıslatılmıştır. İşlem toplamda 3 kez tekrarlanmıştır.

M. sylvestris çiçeklerinden (öğütülmüş) 100 g tartılmış ve %70'lik etanol ile 1 saat çalkalamalı olarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 saatin sonunda Whatman No:1

filtre kağıdından süzülerek ekstre rotavapor yardımı ile yoğunlaştırılmıştır. Filtre kağıtları işlem öncesi %70'lik etanol ile ıslatılmıştır. İşlem toplamda 3 kez tekrarlanmıştır.

P. ovata tohumlarından (öğütülmüş) 100 g tartılmış ve metanol ile 1 saat çalkalamalı olarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 saatin sonunda Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek ekstre rotavapor yardımı ile yoğunlaştırılmıştır. Filtre kağıtları işlem öncesi metanol ile ıslatılmıştır. İşlem toplamda 3 kez tekrarlanmıştır.

S. fruticosa yapraklarından (öğütülmüş) 100 g tartılmış ve etanol ile 1 saat çalkalamalı olarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 saatin sonunda Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek ekstre rotavapor yardımı ile yoğunlaştırılmıştır. Filtre kağıtları işlem öncesi etanol ile ıslatılmıştır. İşlem toplamda 3 kez tekrarlanmıştır.

T. officinale toprak üstü kısımları (öğütülmüş) 100 g tartılmış ve metanol ile 1 saat çalkalamalı olarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 saatin sonunda Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek ekstre rotavapor yardımı ile yoğunlaştırılmıştır. Filtre kağıtları işlem öncesi metanol ile ıslatılmıştır. İşlem toplamda 3 kez tekrarlanmıştır.

T. parthenium toprak üstü kısımlarından (öğütülmüş) 100 g tartılmış ve metanol ile 1 saat çalkalamalı olarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 saatin sonunda Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek ekstre rotavapor yardımı ile yoğunlaştırılmıştır. Filtre kağıtları işlem öncesi metanol ile ıslatılmıştır. İşlem toplamda 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.3. Standardizasyon

Tez çalışmaları kapsamında temin edilen 6 drogdan başlık 3.2.2.'de ifade edildiği şekillerde hazırlanan ekstrelerin standardizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle ekstrelerin, detayları alt başlıklar 3.2.3.1. ve 3.2.3.2.'de belirtilen farklı sekonder metabolitlerle YPİTK analizleri yapılmış, sonrasında ise varlığı tespit edilen sekonder metabolit/lerin madde miktar tayini YBSK yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemlere ait analiz koşulları Latince drog adlarının alfabetik sırasına göre verilmiştir.

3.2.3.1. YPİTK analizleri

Aksi belirtilmedikçe maddeler YPİTK plaklarına Linomat 5 aplikatör sistemi kullanılarak uygulanmıştır. Tüm YPİTK analizleri CAMAG YPİTK sistemi kullanılarak

çalışılmıştır. YPİTK analizlerine ait detaylar her bir ekstre için aşağıda yer alan paragraflarda ayrı ayrı açıklanmıştır

A. sativum soğan ekstresinin YPİTK analizi HPTLC Association'da belirtilen yöntemle göre yapılmıştır (http-2). Silikajel kaplı cam YPİTK plakları sabit faz olarak kullanılırken mobil faz olarak asetonitril:su:formik asit (30:8:2, *h/h/h*) kullanılmıştır. YPİTK plağına metanol içinde çözölen 50 mg/mL *A. sativum* ekstresi 5 µL hacminde plakanın alt kenarından 8 mm mesafede 7 mm'lik bantlar halinde uygulanmıştır. Allisinin 0,2 mg/mL konsantrasyondaki şahit çözöltisi kullanılmıştır. 105°C'de 3 dakika ısıtma işleminin ardından plakta ekstre içerisinde var olan sekonder metabolitlere ait spotlar gün ışığı altında tespit edilmiştir.

M. sylvestris çiçek ekstresinin YPİTK analizi Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen yöntemle göre yapılmıştır (PhEur9, Sağlık Bakanlığı, 2016). Silikajel kaplı cam YPİTK plakları sabit faz olarak kullanılırken mobil faz olarak glasiyel asetik asit:su:butanol (15:30:60, *h/h/h*) kullanılmıştır. YPİTK plağına metanol içinde çözölen 50 mg/mL *M. sylvestris* ekstresi 2 µL hacminde plakanın alt kenarından 8 mm mesafede 7 mm'lik bantlar halinde uygulanmıştır. Referans olarak malvinin 0,2 mg/mL konsantrasyondaki çözöltisi kullanılmıştır. Gün ışığında incelenen plakta ekstrede var olan sekonder metabolitlere ait spotlar tespit edilmiştir.

P. ovata tohum ekstresinin YPİTK analizi literatürde belirtilen yöntemle göre yapılmıştır (Sriraman vd., 2015). Silikajel kaplı cam YPİTK plakları sabit faz olarak kullanılırken mobil faz olarak etil asetat:hekzan:formik asit (3:7:0,5, *h/h/h*) kullanılmıştır. YPİTK plağına metanol içinde çözölen 50 mg/mL *P. ovata* ekstresi 5 µL hacminde plakanın alt kenarından 8 mm mesafede 7 mm'lik bantlar halinde uygulanmıştır. Referans olarak β-sitosterolün 0,2 mg/mL konsantrasyondaki çözöltisi kullanılmıştır. Plakta *P. ovata* ekstresi içinde var olan sekonder metabolitlere ait spotlar anisaldehit uygulamasından sonra 3 dakika 105°C'de ısıtma işleminin ardından gün ışığı altında tespit edilmiştir

S. fruticosa yapraklarına ait ekstrelerin YPİTK analizi Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen yöntemle göre yapılmıştır (PhEur9, Sağlık Bakanlığı, 2016). Silikajel kaplı cam YPİTK plakları sabit faz olarak kullanılırken mobil faz olarak toluen:etil asetat:formik asit (50:40:10, *h/h/h*) kullanılmıştır. YPİTK plağına metanol içinde çözölen 50 mg/mL *S. fruticosa* ekstresi 5 µL hacminde plakanın alt kenarından 8 mm mesafede 7 mm'lik bantlar halinde uygulanmıştır. Referans olarak rosmarinik asitin 0,2 mg/mL konsantrasyondaki

çözeltisi kullanılmıştır. Plakta *S. fruticosa* ekstresi içinde var olan sekonder metabolitlere ait spotlar 366 nm dalga boyunda tespit edilmiştir.

T. parthenium toprak üstü kısımlarına ait ekstrelerin YPİTK analizi HPTLC Association'da belirtilen yöntemle göre yapılmıştır (http-2). Silikajel kaplı cam YPİTK plakları sabit faz olarak kullanılırken mobil faz olarak sikloheksan:etil asetat (50:50, *h/h*) kullanılmıştır. YPİTK plağına metanol içinde çözölen 50 mg/mL *T. parthenium* ekstresi 5 µL hacminde plakanın alt kenarından 8 mm mesafede 7 mm'lik bantlar halinde uygulanmıştır. Referans olarak partenolitin 0,2 mg/mL konsantrasyondaki çözöltisi kullanılmıştır. Anisaldehit belirteci uygulanarak türevlendirme işleminin ardından *T. parthenium* ekstresi içinde var olan sekonder metabolitlere ait spotlar gün ışığı altında tespit edilmiştir.

T. officinale toprak üstü kısımlarına ait ekstrelerin YPİTK analizi Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen yöntemle göre yapılmıştır (PhEur9, Sağlık Bakanlığı, 2016). Silikajel kaplı cam YPİTK plakları sabit faz olarak kullanılırken mobil faz olarak susuz formik asit:su:etil asetat (10:10:80, *h/h/h*) kullanılmıştır. YPİTK plağına metanol içinde çözölen 50 mg/mL *T. officinale* ekstresi 2 µL ve 5 µL hacimlerde plakanın alt kenarından 8 mm mesafede 7 mm'lik bantlar halinde uygulanmıştır. Referans olarak rutin ve klorojenik asitin 0,2 mg/mL konsantrasyondaki çözöltileri kullanılmıştır. Makragol 400 uygulamasının ardından *T. officinale* ekstresi içinde var olan sekonder metabolitlere ait spotlar 366 nm dalga boyunda tespit edilmiştir.

3.2.3.2. YBSK analizleri

A. sativum ekstresinin YBSK analizi için 10 mg ekstre 1 mL metanolde çözöndürölüp, 0,22 µm por çapına sahip membran filtrelerden süzülmüştür. Ekstre içerisindeki allisin miktarını analiz etmek için modifiye edilmiş bir YBSK yöntemi kullanılmıştır. YBSK analizleri, Agilent 1100 LC Sistemi üzerinde çalışılmıştır. Sabit faz olarak C18 kolonu (4.6 x 250 mm, 5 µm) üzerinde çalışılmış ve kolon sıcaklığı 25°C'de tutulmuştur. Sistem izokratik modda (50: 50, *h/h*; metanol:su) 0,5 mL/dakika akış hızında çalıştırılmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µL olarak uygulanmıştır. Allisin, alıkonma süreleri aynı koşullar altında analiz edilen standardınki ile eşleştirilerek tanımlanmıştır. Pikler 210 nm'de analiz edilmiş olup kalibrasyon eğrisi 3 farklı allisin konsantrasyonu (0,1-0,5 mg/mL) ile çalışılarak çizilmiştir (Bose vd., 2014).

M. sylvestris ekstresi 10 mg/mL konsantrasyonda çalışılmış olup ekstre metanolde çözüldükten sonra 0,22 mikron membran filtreden süzülerek analiz edilmiştir. *M. sylvestris* ekstresinin YBSK analizleri Agilent 1100 YBSK sistemine bağlı DAD dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak C18 kolon (250 x 4.6 mm, 10 μ m) kullanılırken mobil faz olarak A: su:formik asit:asetik asit (100: 0,7: 0,9, *h/h/h*), B: asetonitril ile 0-30 dakika arasında %10 B'den %90 B konsantrasyonuna lineer gradient akış olarak çalışılmıştır. Akışta 30-35. dakikalarda, %90 B'den %10 B'ye (başlangıç şartlarına) geri dönmüştür. Akış hızı 0,5 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Malvin, alıkonma süreleri aynı koşullar altında analiz edilen standardı ile eşleştirilerek tanımlanmıştır. Pikler 530 nm'de analiz edilmiş olup kalibrasyon eğrisi 3 farklı malvin konsantrasyonu (0,1-0,5 mg/mL) ile çalışılarak çizilmiştir (Farina vd., 1995). Enjeksiyon hacmi 20 μ L, kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır.

P. ovata ekstresi 20 mg/mL konsantrasyonda çalışılmış olup ekstre metanolde çözüldükten sonra 0,22 mikron membran filtreden süzülerek analiz edilmiştir. *P. ovata* ekstresinin YBSK analizleri Shimadzu 2010C YBSK sistemine bağlı UV dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak C18 kolon (250 x 4.6mm, 5 μ m) kullanılmıştır. Mobil faz olarak metanol:asetonitril (90:10, *h/h*) ile izokratik akış çalışılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanmıştır. β -Sitosterol, alıkonma süreleri aynı koşullar altında analiz edilen standardı ile eşleştirilerek tanımlanmıştır. Pikler 208 nm'de analiz edilmiş olup kalibrasyon eğrisi 5 farklı β -sitosterol konsantrasyonu (0,5-0,1 mg/mL) ile çalışılarak çizilmiştir (Sriraman vd., 2015). Enjeksiyon hacmi 10 μ L, kolon sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmıştır.

S. fruticosa ekstresi 50 mg/mL konsantrasyonda çalışılmış olup ekstre metanolde çözüldükten sonra 0,22 mikron membran filtreden süzülerek analiz edilmiştir. *S. fruticosa* ekstresinin YBSK analizleri Agilent 1100 YBSK sistemine bağlı DAD dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak C18 kolon (150 x 4.6mm, 10 μ m) kullanılmıştır. Mobil faz olarak su (10 mM formik asit): asetonitril (90:10, *h/h*) ile lineer gradient akış 40 dakika içerisinde su (10 mM formik asit): asetonitril (10:90, *h/h*) olacak şekilde çalışılmıştır. 40 + 10 dakika süre ile sistemin tekrar başlangıç şartlarına dönmesi için de gradient akış geçirilmiştir. Akış hızı 0,45 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Salvigenin ve rosmarinik asit, alıkonma süreleri aynı koşullar altında analiz edilen standardı ile eşleştirilerek tanımlanmıştır. Pikler 330 nm'de analiz edilmiş olup kalibrasyon eğrisi 5

farklı salvigenin ve rosmarinik asit konsantrasyonu (2-0,1 mg/mL) ile çalışılarak çizilmiştir (Kamatou vd., 2010). Enjeksiyon hacmi 10 µL, kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır.

T. parthenium ekstresi 10 mg/mL konsantrasyonda çalışılmış olup ekstre metanolde çözüldükten sonra 0,22 mikron membran filtreden süzülerek analiz edilmiştir. *T. parthenium* ekstresinin YBSK analizleri Agilent 1100 YBSK sistemine bağlı DAD dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak C18 kolon (250 x 4.6mm, 10µm) kullanılırken mobil faz olarak su:asetonitril (55:45, h/h) ile çalışılmıştır. Akış izokratik akış olup hızı 2 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Partenolit, alıkonma süreleri aynı koşullar altında analiz edilen standardı ile eşleştirilerek tanımlanmıştır. Pikler 210 nm’de analiz edilmiş olup kalibrasyon eğrisi 5 farklı partenolit konsantrasyonu (2-0,1 mg/mL) ile çalışılarak çizilmiştir (Awang vd., 1991). Enjeksiyon hacmi 20 µL, kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır.

T. officinale ekstresi 10 mg/mL konsantrasyonda çalışılmış olup ekstre metanolde çözüldükten sonra 0,22 mikron membran filtreden süzülerek analiz edilmiştir. *T. officinale* ekstresinin YBSK analizleri Agilent 1100 YBSK sistemine bağlı DAD dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak C18 kolon (150 x 3mm, 4µm) kullanılırken mobil faz olarak A: asetik asit:su (2:98, h/h), B: asetonitril:su:asetik asit (44,5:44,5:1 h/h/h) gradient akışla kullanılmıştır. Gradient akış şeması 0–20 dk %10-18 B, 20-30 dk %18-24 B, 30-33 dk %24-30 B, 33-35 dk %30-10 B olacak şekilde ayarlanmıştır. Akış hızı 0,4 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Klorojenik asit, alıkonma süreleri aynı koşullar altında analiz edilen standardı ile eşleştirilerek tanımlanmıştır. Pikler 280 nm’de analiz edilmiş olup kalibrasyon eğrisi 3 farklı klorojenik asit konsantrasyonu (1-0,1 mg/mL) ile çalışılarak çizilmiştir (Schütz vd., 2005). Enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmıştır.

3.2.4. Formülasyon Geliştirme

Mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanmasında ilk olarak üçgen faz diyagramlarından yararlanarak en kararlı mikroemülsiyon bölgesini veren yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde (YEM/Y-YEM) oranları belirlenmiştir.

Mikroemülsiyon formülasyonları hazırlanırken titrasyon yöntemi kullanılmıştır (Schulman vd., 1959; Üstündağ Okur vd., 2019).

3.2.4.1. Yağ fazı olarak tarçın yağı içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanması

Yağ fazı olarak formülasyon geliştirme çalışmaları için uygun olarak Sigma'dan satın alınan safrol içeren *Cinnamomum* bark oil, yüzey etkin madde Tween 80, yardımcı yüzey etkin madde olarak propilen glikol kullanılmıştır. Formülasyonlar geliştirilirken YEM/YYEM (a/a) oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 oranlarında karıştırılmıştır. YEM/Y-YEM oranları belirlendikten sonra yağ, YEM (Tween 80) ve YYEM (Propilen glikol) 150 devir/dk dönme hızıyla karıştırılırken, formülasyonlar şeffaflığın bozulduğu noktaya kadar distile su ile titre edilmiş ve şeffaflığın kaybolduğu su sarfiyat hacimleri tespit edilmiştir (Üstündağ Okur vd., 2014). Sistemin şeffaflığının kaybolduğu noktadaki harcanan su miktarı hesaplanarak bu noktadaki yağ, su ve YEM/Y-YEM (a/a) oranları hesaplanmıştır. Tüm formülasyon çalışmaları 25±°C oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Formülasyon çalışması sırasında elde edilen veriler kullanılarak, bilgisayar programı yardımıyla her bir YEM/YYEM oranı için üçgen faz diyagramları çizilmiştir ve en yüksek mikroemülsiyon alanını veren bölgenin ağırlık merkezi kullanılarak optimum mikroemülsiyon formülasyonları hesaplanarak geliştirilmiştir. Bu alanın ağırlık merkezi kullanılarak optimum formülasyon hazırlanmıştır. Tarçın yağı içeren mikroemülsiyona (M1) farklı konsantrasyonlarda Avrupa Farmakopesi'ne göre standardize *S. fruticosa* ekstresi yüklenmiş ve *in vivo* çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.4.2. Yağ fazı olarak soya yağı içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanması

Yağ fazı olarak soya yağı, yüzey etkin madde Span 80 ve Cremophor EL, yardımcı yüzey etkin madde olarak propilen glikol ve etanol kullanılmıştır. Formülasyonlar geliştirilirken YEM/YYEM (a/a) oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 oranlarında karıştırılmıştır. YEM/Y-YEM oranları belirlendikten sonra yağ, YEM (span 80:cremophor EL) ve YYEM (propilen glikol:etanol) 150 devir/dk dönme hızıyla

karıştırılırken, formülasyonlar şeffaflığın bozulduğu noktaya kadar distile su ile titre edilmiş ve şeffaflığın kaybolduğu su sarfiyat hacimleri tespit edilmiştir (Üstündağ Okur vd., 2014). Sistemin şeffaflığının bozulduğu noktadaki harcanan distile su miktarı hesaplanarak bu noktadaki yağ, su ve YEM/Y-YEM oranları hesaplanmıştır. Tüm formülasyon çalışmaları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Formülasyon çalışması sırasında elde edilen veriler kullanılarak, bilgisayar programı yardımıyla her bir YEM/YYEM oranı için üçgen faz diyagramları çizilmiştir ve en yüksek mikroemülsiyon alanını veren bölgenin ağırlık merkezi kullanılarak optimum mikroemülsiyon formülasyonları hesaplanarak geliştirilmiştir. Bu alanın ağırlık merkezi kullanılarak optimum formülasyon hazırlanmıştır. Soya yağı içeren optimum mikroemülsiyona (M2) farklı konsantrasyonlarda Avrupa Farmakopesi'ne göre standardize *M. sylvestris* ekstresi yüklenmiş ve *in vivo* çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.4.3. Karakterizasyon çalışmaları

Optimum formülasyonlar başlangıç anında görünüş, elektrik iletkenliği, pH, kırılma indisi, viskozite, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel parametreleri açısından daha önce yayınlanan yöntemlerle incelenmiştir (Schulman vd., 1959; Üstündağ Okur vd., 2014).

Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının oda sıcaklığında ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) fiziksel görünüşleri incelenip değerlendirilmiştir. Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının tipinin tayin edilmesi amacıyla elektrik iletkenliği cihazı kullanılmıştır. Ölçüm üç defa tekrarlanmıştır. Optimum mikroemülsiyon formülasyonları 13.000 rpm'de, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 30 dk santrifüj edilmiştir. Ölçümler 3 defa tekrarlanmıştır. Mikroemülsiyon formülasyonlarının pH'sı oda sıcaklığında pH metre kullanılarak ölçülmüştür. İdeal mikroemülsiyon formülasyonlarının kırılma indisi ölçümü refraktometre ile yapılmıştır. İdeal mikroemülsiyon formülasyonlarının viskozitesi $25 \pm 2^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında viskozimetre kullanılarak ölçülmüştür. Bu değerler damlacık büyüklüğü ölçümünde de kullanılmıştır. İdeal mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklükleri, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

3.2.4.4. *Stabilite*

Optimum mikroemülsiyon formülasyonları hazırlanarak $4 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ %60 ± 5 bağıl nem ve $40 \pm 2^\circ\text{C}$ %65 ± 5 bağıl nemde stabilite kabininde 6 ay boyunca değerlendirilmiştir. Formülasyonlar 3. ve 6. aylarda görünüş, viskozite, pH, zeta potansiyel, damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi açısından incelenmiştir (Schulman vd., 1959).

3.2.5. *In vitro* karaciğer yağlanma modeli

HepG2 (insan karaciğer kanser) hücre hattı önce *in vitro* toksite sonrasında da karaciğer yağlanma modelindeki tüm deneylerde kullanılmıştır. Bu kapsamda ekstrelerle *in vitro* sitotoksiste, lipit peroksidasyon tayini, protein tayini, glutatyon analizi, Nil red boyama yöntemi ile yağ damlacıklarının tespiti ve hücre kültüründe ALT-AST düzeylerinin ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olan resveratrol ise tüm hücre deneylerinde 10 ve 20 μM konsantrasyonda çalışılmıştır (Daraie vd., 2012; Izdebska vd., 2010; Lowry 1951; She vd., 2016).

3.2.5.1. *In vitro* sitotoksiste

HepG2 hücreleri, %10 (h/h) Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 penisilin (10.000 ünite/mL) ve streptomisin (10.000 $\mu\text{g/mL}$) takviye edilmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium/High glucose (DMEM) içerisinde, 37°C 'de ve %5 CO_2 varlığında hücre kültürü inkübatöründe üretilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen ekstrelerin HepG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksitesini MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] kolorimetrik yöntemiyle belirlenmiştir. Hücreler, 48 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamına ekilmiş, yapışmaları için 24 saat 37°C 'de ve %5 CO_2 varlığında etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ekstreler DMSO'da çözülerek hazırlanmıştır. Hücre besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak maddelerin çalışma konsantrasyonları (0,125, 0,25, 0,5 ve 1 mg/mL) hazırlanmış ve hücreler üzerine uygulanmıştır. Daha sonra plakalar etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, hazırlanan MTT çalışma solüsyonundan (0,5 mg/mL), plakaların her bir kuyucuğa 100 μL ilave edilmiş ve plakalar 2 saat 37°C 'lik etüvde

inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonunda her kuyucuğa çözücü olarak 100 µL isopropanol konulmuş ve 570 nm dalga boyunda plakaların spektrofotometrik (BioTek, USA) olarak absorbans değerleri okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi, aşağıdaki **Denklem 3.1** kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{Canlılık} = (\text{Absorbans}_{\text{deney grubu}}) / (\text{Absorbans}_{\text{kontrol}}) \times \%100 \quad (\text{Denklem 3.1})$$

3.2.5.2. Yağlanma modeli

Konsantrasyon-steatotitis ve konsantrasyon-canlılık arasındaki değerleri belirlemek üzere palmitik asit ve oleik asit ile ön çalışmalar yapılmıştır. Yağ asidi ile etkileşim konsantrasyonları 100, 150 ve 200 µM olacak şekilde hesaplanmıştır. Oleik ve palmitik asidin stok çözeltileri DMSO içinde 20 mmol/L'lik konsantrasyonda hazırlanmış ve daha sonra hücre kültürü medyumunu ile seyreltilerek uygulanmıştır. Çalışmada denenecek 6 ekstre için 0,25 mg/mL sitotoksik olmayan en yüksek konsantrasyon aralığında çalışılmıştır.

Hücre kültürü yağlanma modeli çalışmasındaki deneysel gruplar aşağıda verilmiştir.

- HepG2 + Medium kontrol grubu (**G1K**)
- HepG2 hücreleri + %1 izopropanol (**G2Kç**)
- HepG2 hücreleri + oleik asit (OA) 100, 150 ve 200 µM (**G3Ko**)
- HepG2 hücreleri + palmitik asit (PA) 100, 150 ve 200 µM (**G4Kp**)
- HepG2 hücreleri + oleik asit:palmitik asit (2:1, a:a) (**G5Ko_{2p}**)
- HepG2 hücreleri + oleik asit:palmitik asit (1:2, a:a) (**G6Kop₂**)
- HepG2 hücreleri + Ekstre (0,25 mg/mL) (**G7E**)
- HepG2 hücreleri + oleik asit (100 µM) + Ekstre (**G8Eo**)
- HepG2 hücreleri + palmitik asit (100 µM) + Ekstre (**G9Ep**)
- HepG2 hücreleri + oleik asit:palmitik asit (2:1, a:a) + Ekstre (**G10Eo_{2p}**)
- HepG2 hücreleri + oleik asit:palmitik asit (1:2, a:a) + Ekstre (**G11Eop₂**)

3.2.5.2 başlığının alt başlığında yer alan tüm çalışmalar yukarıda sıralanan gruplar üzerinden HepG2 hücreleri ile çalışılmıştır.

3.2.5.2.1. Lipit peroksidasyon tayini- Malondialdehit (MDA)

HepG2 hücre hattı T-25 flasklara hücre sayısı 2×10^6 hücre/flask olacak şekilde ekilmiştir. Hücre ortamı ekstre ile muamele edildikten sonra MDA düzeylerinin analizi öncesi hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile kaldırılan hücreler 1.000 g'de 10 dakika santrifüj sonucu çöktürülmüştür. Çöken hücre pelleti, 1 mL PBS içerisinde, doku homojenizatörü ile 120 saniye boyunca 15.000 rpm'den 60.000 rpm'e kadar kademeli olarak hız arttırılarak homojenize edilip, Homojenat, -20°C'de bir gece boyunca bekletilip ve ertesi gün homojenatlar 37°C'de bekletildikten sonra tekrar homojenizatörden geçirilmiştir. Tamamen lizis edilen hücreler 4°C'de 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant MDA tayini için kullanılmıştır. 100 μ L süpernatant/standart + 200 μ L TBA ile karıştırılıp, 30 dakika 90°C'lik sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Kör madde (blank) olarak dH₂O (distile su) kullanılmıştır. Test numuneleri 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra oluşan pembe renk 532 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür (Daraie vd., 2012).

3.2.5.2.2. Protein tayini (Lowry metodu)

Lipit peroksidasyon tayini için kullanılan süpernatantlara ait protein düzeyi tayini; Lowry ve diğerlerinin (1951) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Lowry vd., 1951). Standart olarak bovine serum albümin (BSA) kullanılmıştır. 0,5 N NaOH çözeltisi hazırlanmıştır. Na₂CO₃ çözeltisi (%10) için, Na₂CO₃ tartılıp hazırlanan NaOH çözeltisi ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. CuSO₄.5H₂O çözeltisi (%1) için, CuSO₄.5H₂O tartılıp, dH₂O ile tamamlanmıştır. Na-K tartarat (%2) çözeltisini hazırlamak için, Na-K tartarat tartılıp, dH₂O ile 500 μ L'ye tamamlanmıştır. Bakır Reaktif, 1820 μ L Na₂CO₃ çözeltisi, 90 μ L CuSO₄.5H₂O çözeltisi ve 90 μ L Na-K tartarat çözeltisi karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır. Folin-Fenol çözeltisi dH₂O ile karıştırılarak hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plaka 50 μ L Numune / Standart / Blank (dH₂O) + 50 μ L Bakır Reaktif kuyular içerisine eklenmiş; 25°C'de 10 dakika çalkalanmıştır. Kuyucuklara 150 μ L Folin-Fenol çözeltisi

eklenip, 50°C’de 10 dakika çalkalanmıştır ve inkübasyon sonunda absorbans 660 nm’de ölçülmüştür.

3.2.5.2.3. Glutasyon (GSH) tayini

Deney için, lipid peroksidasyon tayininde kullanılmak üzere hazırlanan süpernatantlar kullanılmıştır (Sedlak & Lindsey, 1968). Trizma Base-Tris HCl ve EDTA tartılıp, su ile 50 mL’e tamamlanmış, NaOH ile pH = 8,2’ye ayarlanarak tampon çözelti hazırlanmıştır. Blank olarak tampon çözeltisi kullanılmıştır. 1,6 mg DTNB [5,5’-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] (4,04 μ mol) 400 μ L metanol ile çözülmüştür. Çözelti ışıktan korunmuş ve taze olarak hazırlanmıştır. Standart olarak GSH kullanılmıştır. 100 μ L süpernatant/standart + 50 μ L tampon çözeltisi + 10 μ L DTNB 96 oyuklu plakaya uygulanıp, plaka 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Oluşan sarı renk UV spektrofotometrede 412 nm’de, 3 tekrarlı olarak okutulmuştur.

3.2.5.2.4. Nil red boyama ile yağ damlacıkları tespiti

Nil Red stok solüsyonu aseton kullanılarak hazırlanmış ve 4°C’de saklanmıştır. Yağ hücrelerin tespiti için kullanılacak olan çözelti ise (5 mg/mL) PBS içerisinde seyreltilerek hazırlanmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından HepG2 hücreleri 3 defa PBS ile yıkanmıştır. Hücreler 15 dakika paraformaldehit ile fikse edilmiş ve ardından Nil Red boyası ilave edilerek karanlıkta 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücreler yine 3 defa PBS ile yıkanmıştır. Steatozis durumu floresan mikroskobu ile tespit edilmiştir (Izdebska vd., 2010).

3.2.5.2.5. Alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktivitelerinin belirlenmesi

ALT ve AST hücrelerin sitoplazmasında bulunan hepatik enzimlerdir. Karaciğer hücre hasarında ALT AST düzeylerindeki artış karaciğeri hasarının göstergesi olarak kullanılmıştır (She vd., 2016). Hücre kültürü çalışmasında AST ve ALT düzeyleri ELISA kitleri (Human AST ELISA Kit/ab263881 ve Human ALT ELISA Kit/ab234578) ile üretici firmanın talimatına göre ölçülmüştür. Ölçümler için 20 μ L hücre süpernatantı kullanılmıştır.

3.2.5.3. İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki karşılaştırmalar Tukey tarafından yapılan post-hoc testlerinin ardından GraphPad Prism 6 (Sürüm 6.01; GraphPad yazılımı, Inc., San Diego, CA) tek yönlü ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.2.6. In vivo karaciğer yağlanması modeli

Bu başlıkta yer alan çalışmalar başlık 3.2.5.'te yer alan deneylerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri ile gerçekleştirilmiştir. Ekstreler hazırlanışı başlık 3.2.4.'te yer alan optimum formülasyonlara yüklenmiş ve hayvanlara gavaj yolu ile verilmesi için hazır hale getirilmiştir.

Bu başlık altında deney hayvanlarında önce yağlı karaciğer modeli oluşturulması için hayvanların özel yemle 8 hafta boyu beslenme şartları açıklanmış ve ardından hayvan grupları verilmiştir. Daha sonra serum ve karaciğer örneklerinin biyokimyasal analizleri ve dokuların histopatolojik değerlendirmesine ait yöntemler detaylandırılmıştır.

3.2.6.1. Deney hayvanları

Bu çalışmada İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM)'nden temin edilen 200-230 g ağırlığında 6-8 haftalık Wistar albino dişi sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsüne ayarlanmış $22 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklığındaki ve %50-60 nem oranındaki iyi havalandırılan odalarda barındırılmıştır. Sıçanlar sekizli gruplar halinde günlük altları temizlenen ayrı kafeslere konulmuş ve *ad libitum* olarak standart veya yağlı yem pelletleri (çalışılan gruba göre) ve çeşme suyu verilmiştir. Hayvan deneyleri için İstanbul Medipol Üniversitesi (Karar No:38828770-772.02-E.56432, 16.10.2020) tarafından Etik Kurul Onayı alınmıştır.

3.2.6.2. Akut oral toksisite

OECD Akut Oral Toksisite (OECD 423, 2002) yöntemine bağlı olarak toksisite çalışması yapılmıştır. *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri değişen dozlarda (5-2000 mg/kg) Wistar albino sıçanlara ($n=3$) oral gavaj yoluyla her bir hayvana tek doz olacak

şekilde uygulanmıştır. Hayvanlar tek doz uygulama sonrası ilk gün 6., 12., 18. ve 24. saatlerde, sonrasında ise 14 gün boyunca günlük olarak toksisite ve mortalite açısından takip edilmiştir. Toksik belirtiler; deri ve kürk, dolaşım ve solunum, gözler ve mukoz membranlar ayrıca sinir sistemi izlenip değerlendirilmiştir.

3.2.6.3. Non-alkolik yağlı karaciğer modeli

Sıçanlarda non-alkolik yağlı karaciğer modeli Wu ve diğerleri (2020) tarafından belirtilen yüksek yağlı beslenme ile oluşturulmuştur. Yüksek yağlı diyet metiyonin ve kolin içeriği açısından fakirleştirilmiş, %25 oranında yağ içeren (enerjinin yaklaşık %45'i yağdan sağlanacak şekilde) beslenmeye uygun şekilde hazırlanmıştır (Wu vd., 2020).

Daha sonra 96 adet dişi Wistar albino sıçan rastgele olarak 12 gruba ayrılmıştır. İlk 7 hafta hiçbir hayvana herhangi bir ilaç / ekstre uygulanmadan; sadece birinci gruba normal diyet diğer tüm gruplara ise yüksek yağlı diyet verilmiştir. Deney başlangıcından itibaren haftada bir tüm sıçanların ağırlıkları ölçülerek kaydedilmiştir. Devam eden 8 hafta boyunca beslenmeler aynı şekilde devam ederken her bir gruba aşağıda gösterildiği gibi ekstre içeren formülasyon uygulaması yapılmıştır.

1. Normal Beslenme Grubu ($n=8$); Normal diyet, Serum fizyolojik (1 mL-gavaj)
2. Kontrol Yağlı Beslenme Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, Serum fizyolojik (1 mL-gavaj)
3. Taşıyıcı M1 Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, Ekstre içermeyen mikroemülsiyon (M1) (1 mL-gavaj)
4. Taşıyıcı M2 Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, Ekstre içermeyen mikroemülsiyon (M2) (1 mL-gavaj)
5. Ekstre 1 Doz 1 Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, 75 mg/kg *M. sylvestris* standardize ekstre içeren mikroemülsiyon (1 mL-gavaj)
6. Ekstre 1 Doz 2 Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, 150 mg/kg *M. sylvestris* standardize ekstre içeren mikroemülsiyon (1 mL-gavaj)
7. Ekstre 1 Doz 3 Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, 300 mg/kg *M. sylvestris* standardize ekstre içeren mikroemülsiyon (1 mL-gavaj)

8. Ekstre 1 Doz 4 Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, 450 mg/kg *M. sylvestris* standardize ekstre içeren mikroemülsiyon (1 mL-gavaj)

9. Ekstre 2 Doz 1 Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, 100 mg/kg *S. fruticosa* standardize ekstre içeren mikroemülsiyon (1 mL-gavaj)

10. Ekstre 2 Doz 2 Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, 200 mg/kg *S. fruticosa* standardize ekstre içeren mikroemülsiyon (1 mL-gavaj)

11. Ekstre 2 Doz 3 Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, 400 mg/kg *S. fruticosa* standardize ekstre içeren mikroemülsiyon (1 mL-gavaj)

12. Pozitif Kontrol Grubu ($n=8$); Yüksek yağlı diyet, 7,2 mg/kg Simvastatin (1 mL-gavaj)

15. hafta sonunda sıçanlar 12 saat aç bırakılmalarını takiben tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Daha sonra ise jugular venden kan örnekleri alınmıştır. Santrifüjde $3.000 \times g$ 'de ($4^{\circ}C$) 10 dakika boyunca tutulacak kanlardan elde edilen serum kısmı analiz edilinceye kadar $-80^{\circ}C$ 'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra sıçanlar anestezi altında dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Her bir sıçandan çıkarılan karaciğerlerin ağırlıkları tartılarak kaydedilmiş, aşağıdaki denkleme (**Denklem 3.2**) göre karaciğer indeksi hesaplanmıştır (Wu vd, 2018; Peng vd, 2014).

$$\text{Karaciğer indeksi} = \text{Karaciğer ağırlığı (mg)} / \text{Vücut ağırlığı (g)} \quad (\text{Denklem 3.2})$$

3.2.6.4. Serum örneklerinin biyokimyasal parametrelerinin ölçülmesi

Otomatik biyokimyasal analiz cihazlarında serum örneklerinden; Serum lipitlerini değerlendirmek için total kolesterol (TC), trigliserit (TG), düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-C), yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL-C) seviyeleri ticari kitler yardımı ile (Reel Assay, Türkiye) değerlendirilmiştir. Karaciğer fonksiyonunu değerlendirmek ALT, AST, alkalın fosfat (ALP) seviyeleri Reel Assay (Türkiye) ticari kitleri ile ölçülmüştür. Antioksidan seviyelerini değerlendirmek için SOD, GSH-Px, malondialdehit (MDA) seviyeleri değerlendirilmiştir. İnsülin direncini değerlendirmek için serum glikoz ve insülin (kit, Elabscience, Teksas, Amerika) seviyeleri ölçülmüştür. İnsülin için ELISA metodu kullanılmış olup çoklu mikroluka okuyucuda (BioTek-

Synergy H1, Amerika) sonuçlar analiz edilmiştir. Diğer analizler ise kolorimetrik okuma ile çalışılmış olup Mindray BS400 (Çin) cihazı ile yürütülmüştür.

İnsülin seviyeleri, sandviç prensibine göre çalışan ELISA kiti ile test edilmiştir. Bu teknikte, serum örnekleri anti-insülin antikoruna ile önceden kaplanmış 96 oyuklu plaka kuyucuklarına eklenmiştir. Daha sonra Sığan INS ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş antikor, her bir kuyucuğa art arda eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Ardından serbest bileşenler yıkanmıştır. Substrat ilavesinden sonra oluşan sarı rengin absorbansı ELISA okuyucusunda 450 nm'de ölçülmüştür (Anwer vd., 2021).

AST ve ALT serum konsantrasyonu, bir otoanalizör yardımı ile UV absorbans okuma yöntemiyle belirlenmiştir. Serum ALP düzeyleri ise Annino ve Giese'nin yöntemi ile belirlenmiştir (1976). *P*-nitrofenilfosfat, alkalın fosfataz ile inkübe edilerek *p*-nitrofenol'e hidrolize edilmiştir (alkali çözeltide renk, renksizden sarıya değişir). Sodyum ilavesi hidroksit enzim reaksiyonunu durdurmuştur ve *p*-nitrofenolün rengini ortaya çıkarmıştır. Enzim aktivitesi için, 1 mL alkalın fosfat tamponlu substrata 0,1 mL numune eklenmiştir. Çözelti karıştırılmış ve 37°C'de tam olarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 10 mL 0,02 M NaOH ilave edilmiştir. 0,1 mL su içeren bir örnek de kör deney olarak benzer şekilde muamele edilmiştir. Absorbans 410 nm'de okunmuştur.

Total kolesterol, Folch ve diğerlerinin (1957) yöntemiyle analiz edilmiştir. Renk yoğunluğu kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak belirlenmiştir. Fosfolipidin flurosil ile uzaklaştırılmasından sonra trigliseritlerin analizi için ise Van Handel (1961) yöntemi kullanılmıştır. Örneklerde var olan trigliseritler, oluşan reaksiyonlar sonrasında spektrofotometrik olarak ölçülebilen renkli kompleksler oluşturmuştur. HDL-C ölçümleri Hiller'in 1987'deki enzimatik kolorimetrik yöntemine göre, LDL-C ölçümleri ise Frieweald ve diğerlerinin (1972) yöntemine göre yapılmıştır. Her serum numunesi (10 µL), bir test tüpünde 1000 µL reaktife pipetlenmiştir. 10 µL standart 1000 µL reaktif ile karıştırılarak standart bir çözelti hazırlanmıştır 1000 µL reaktife 10 µL distile su eklenerek kör hazırlanmıştır. Bu serum, standart ve boş numuneler daha sonra karıştırılmış ve 25°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Kör reaktifin absorbansı, her numuneninkinden ve standardinkinden çıkarılmıştır. Plazma, serum veya karaciğer numunelerindeki kolesterol/trigliserit konsantrasyonları, kitlerle üreticinin tavsiyesine göre hem numunenin hem de standardın düzeltilmiş absorbansından hesaplanmıştır. HDL-C ölçümünde, üreticinin kit kılavuzuna göre maddeler karıştırılmış

ve oda sıcaklığında 10 dakika beklemeyle bırakılmıştır. Tüpler daha sonra 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Berrak süpernatant, yukarıda tarif edildiği gibi kolesterol tayini için 2 saat içinde toplanmıştır.

Serum glukoz seviyeleri, Barham ve Trinder (1972) tarafından açıklanan yöntemle, ticari kitler kullanılarak, enzimatik kolorimetrik yöntem (Glucose GOD-PAP) ile ölçülmüştür. Bu yöntemin prensibi, glikoz oksidaz tarafından enzimatik oksidasyondan sonra glikozun belirlenmesine dayanmaktadır.

Malondialdehit (MDA) seviyesi, 90-100°C'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona dayanan bir yöntemle belirlenmiştir. TBA reaksiyonunda, MDA veya MDA benzeri maddeler ve TBA, 532 nm'de maksimum absorpsiyon ile pembe renkli kromoforik grup vererek reaksiyona girerler. Reaksiyon, pH 2-3'te 90°C'de 15 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Numune, proteinin çöktürülmesi için soğuk %10 (a/h) trikloroasetik asit ile karıştırılmıştır. Çökelti santrifüjleme ile topak haline getirilmiş ve %0,67'lik (a/h) TBA ile 10 dakika kaynar su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Soğutulduktan sonra absorbans 532 nm'de okunmuştur (Kei, 1978).

3.2.6.5. Karaciğer örneklerinin biyokimyasal parametrelerinin ölçülmesi

Hepatik lipitler, kloroform:metanol (2:1, h/h) yardımıyla Yan ve diğerleri (2015) tarafından belirtildiği gibi ekstre edilmiştir. Karaciğerde trigliserit (TG) düzeyleri ticari kitler (Reel Assay, Türkiye) yardımıyla ölçülmüştür (Yan vd., 2015).

Karaciğerde antioksidan aktivite ölçümü için; karaciğer örnekleri (200 mg) 2 mL fosfat tamponu (0,2 M NaH₂PO₄) pH 7,5'te homojenize edilmiştir. 4°C'de 10.000 rpm 40 dakika santrifüj sonrası, supernatant toplanmış ve ticari kitler yardımıyla (ElabScience, Teksas, Amerika); SOD, GSH-Px, malondiadehit (MDA) ve trigliserit seviyeleri ölçülmüştür.

Süperoksit dismutaz ölçümü için uygulanan yöntem, kırmızı bir formazan boyası oluşturmak üzere 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür ile reaksiyona giren süperoksit radikalleri üretmek için ksantin ve ksantin oksidaz kullanımına dayanmaktadır (Settle, 1986). SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülmüştür.

GSH-Px ölçüm yöntemi, Paglia ve Valentine (1967) yöntemine dayanmaktadır. GSH-Px, glutatyonun kümen hidroperoksit tarafından oksidasyonunu katalize etmiştir. Glutatyon varlığında (GSSG), NADPH'nin NADP'ye oksidasyonu ile hemen indirgenmiş forma dönüştürülmüştür. 340 nm'de absorbanstaki azalma ölçülmüştür.

3.2.6.6. Histopatoloji

Diseksiyonunu takiben her bir sıçan karaciğerinin aynı lobu %10 formol çözeltisi içinde fikse edilmiştir. %10'luk formol solüsyonu içerisinde 24-48 saat süresince bekletilen dokulara rutin parafin takibi yapılmıştır. Parafin bloklardan hazırlanan mikrotomla alınan (ThermoMicrom HM 340E)) 5 μ m'lik kesitlere Hematoksilen-Eozin (HE) boyası uygulanarak ve Nikon Eclipse Ni araştırma mikroskobu ile 200x büyütme ile görüntülenme yapılmıştır (Brown ve Kleiner, 2016).

3.2.6.7. İstatistik analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 18.0 yazılım programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm veriler ortalama değer $\pm$ S.H. olarak belirtilmiştir. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Ekstraksiyon

Avrupa Farmakopesi'ne göre hazırlanan 6 ekstrenin kuru drog üzerinden % (a/a) ekstre verimleri hesaplanmıştır. *M. sylvestris* çiçeklerinden %70 etanol ile elde edilen ekstrenin verimi %12 olarak bulunmuştur. *A. sativum* soğanlarından metanol ile elde edilen ekstrenin verimi %5,5 olarak hesaplanmıştır. *S. fruticosa* yapraklarından etanol ile elde edilen ekstrenin verimi %6,5 olarak tespit edilmiştir. *P. ovata* tohumlarından metanol ile elde edilen ekstrenin verimi %1 olarak hesaplanmıştır. *T. parthenium* toprak üstü kısımlarından metanol ile elde edilen ekstrenin verimi %9 olarak bulunmuştur. *T. officinale* toprak üstü kısımlarından metanol ile elde edilen ekstrenin verimi %8 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Ekstre verimleri (a/a)

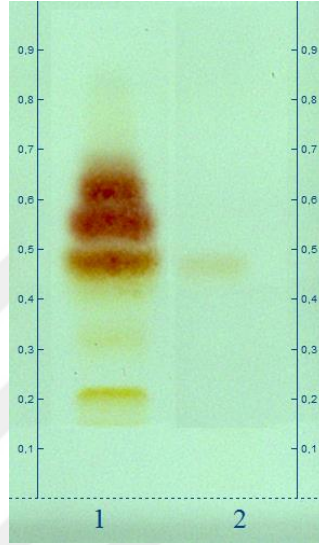
Ekstre	Verim
<i>A. sativum</i> soğan metanol ekstresi	%5,5
<i>M. sylvestris</i> çiçek %70'lik etanol ekstresi	%12
<i>S. fruticosa</i> yaprak etanol ekstresi	%6,5
<i>P. ovata</i> tohum metanol ekstresi	%1
<i>T. officinale</i> toprak üstü metanol ekstresi	%9
<i>T. parthenium</i> toprak üstü metanol ekstresi	%8

4.2. Standardizasyon

Bu bölümde tez kapsamında Farmakope'de belirtildiği şekilde hazırlanan ekstrelerin fitokimyasal açıdan Farmakope'ye ve literatüre olan uygunluğu incelenmiştir. Bu bağlamda 6 ekstrenin önce YPİTK yöntemi ile parmakizi analizleri yapılmış, daha sonra YPİTK yöntemi ile tespit edilen biyoaktif metabolitlerin madde miktar tayinleri YBSK yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Böylece Farmakope yöntemleri ile geliştirilmiş ve Farmakope'ye uygun, fitokimyasal açıdan standardize ekstreler elde edildiği ortaya konulmuştur.

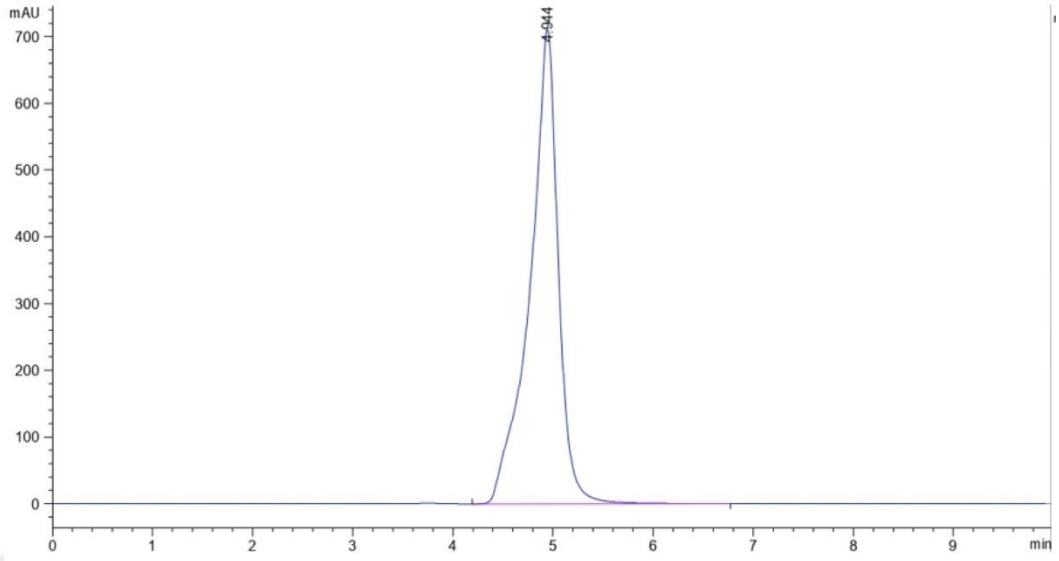
4.2.1. *Allium sativum* L. soğan ekstresinin allisin üzerinden standardizasyonu

A. sativum soğan ekstresi önce YPİTK sonrasında ise YBSK ile allisin varlığı ve miktarı açısından incelenmiştir. *A. sativum* metanol ekstresindeki (50 mg/mL) allisin (0,2 mg/mL) 9 belirgin spot arasından $R_F \approx 0,45$ 'te gün ışığı altında sarı-kahverengi bir spot olarak belirlenmiştir, YPİTK kromatogramı Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

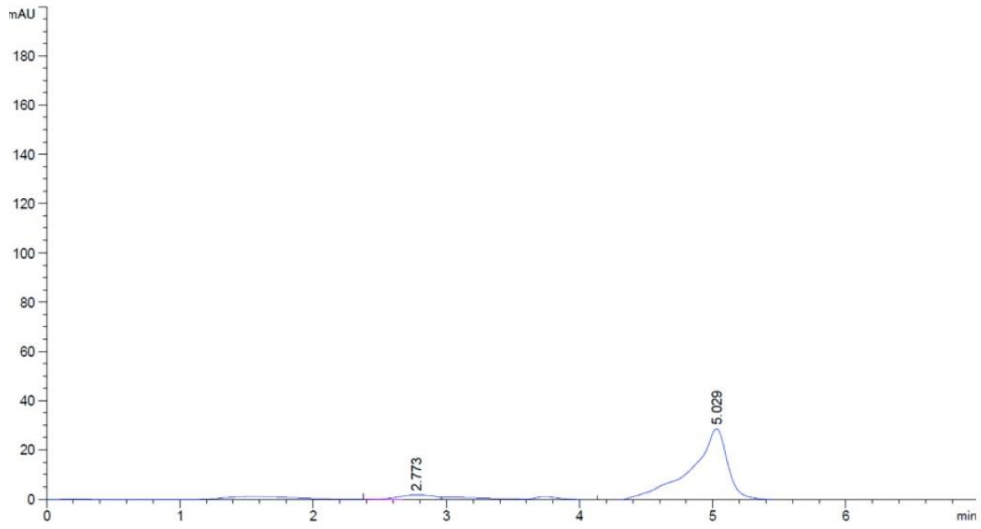


Şekil 4.1. *A. sativum* metanol ekstresi YPİTK kromatogramı (1. *A. sativum* ekstresi, 2. Allisin)

YPİTK çalışması ile varlığı tespit edilen, *A. sativum* ekstresinin içerdiği allisinin madde miktarı (a/a) başlık 3.2.3.'de detaylı olarak ifade edildiği şekilde YBSK yöntemi ile hesaplanmıştır. Standart olarak kullanılan allisinin ve *A. sativum* ekstresinin YBSK kromatogramı Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *Allisin YBSK kromatogramı (t_R: 4.944)*



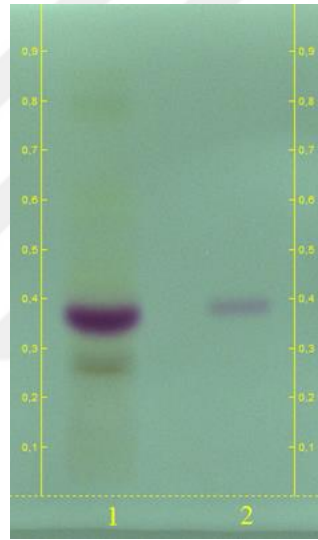
Şekil 4.3. *A. sativum metanol ekstresinin YBSK kromatogramı (Allisin t_R: 5.02)*

İç standart yöntemi kullanılarak yeniden YBSK analizi yapılmış ve pikin allisine ait olduğu teyit edilmiştir. Allisin standartlarından çizilen kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak, ekstre içerisinde var olan allisin miktarı kantitatif olarak (a/a) %1,49 bulunmuştur. Avrupa Farmakopesi'ne (PhEur9.0, Sağlık Bakanlığı, 2016) göre “*A. sativum* ekstresinin içermesi gereken allisin miktarı asgari %0,45 olmalıdır”, buna

göre alınan sonuçlar doğrultusunda hazırlanan ekstrenin Avrupa Farmakopesi'ne göre standardize bir ekstre olduğu teyit edilmiştir.

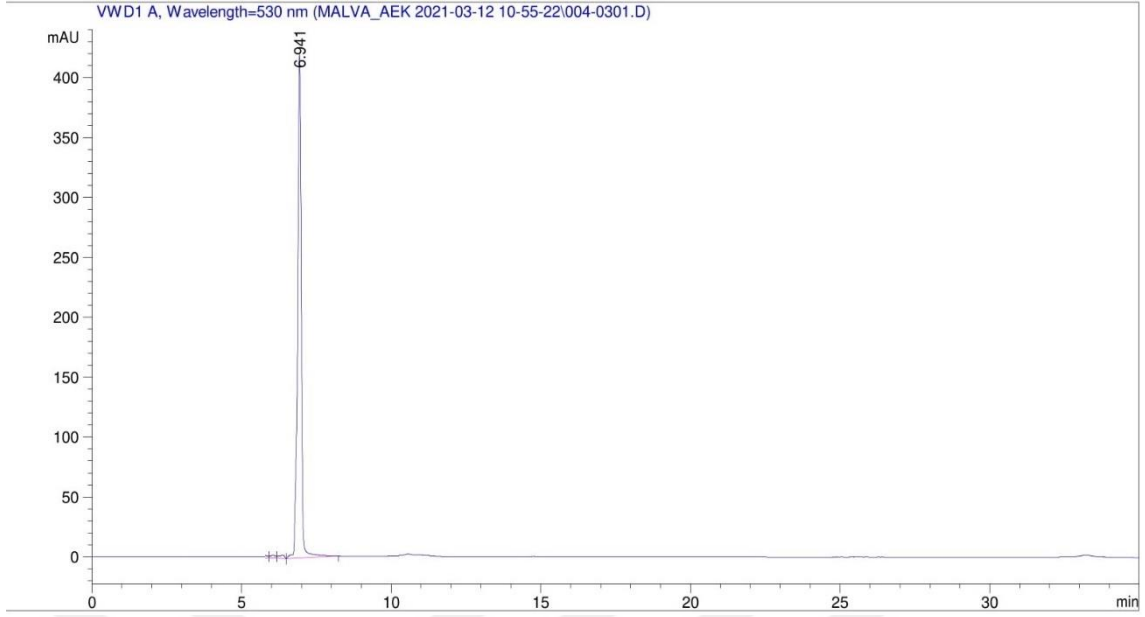
4.2.2. *Malva sylvestris* L. çiçek ekstresinin malvin üzerinden standardizasyonu

M. sylvestris çiçek ekstresi önce YPİTK sonrasında ise YBSK ile malvin varlığı ve miktarı açısından incelenmiştir. *M. sylvestris* sulu etanol ekstresindeki (25 mg/mL) malvin (0,2 mg/mL) 2 belirgin spot arasından $R_F \approx 0,40$ 'ta gün ışığı altında mor-menekşe bir spot olarak belirlenmiştir, YPİTK kromatogramı Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

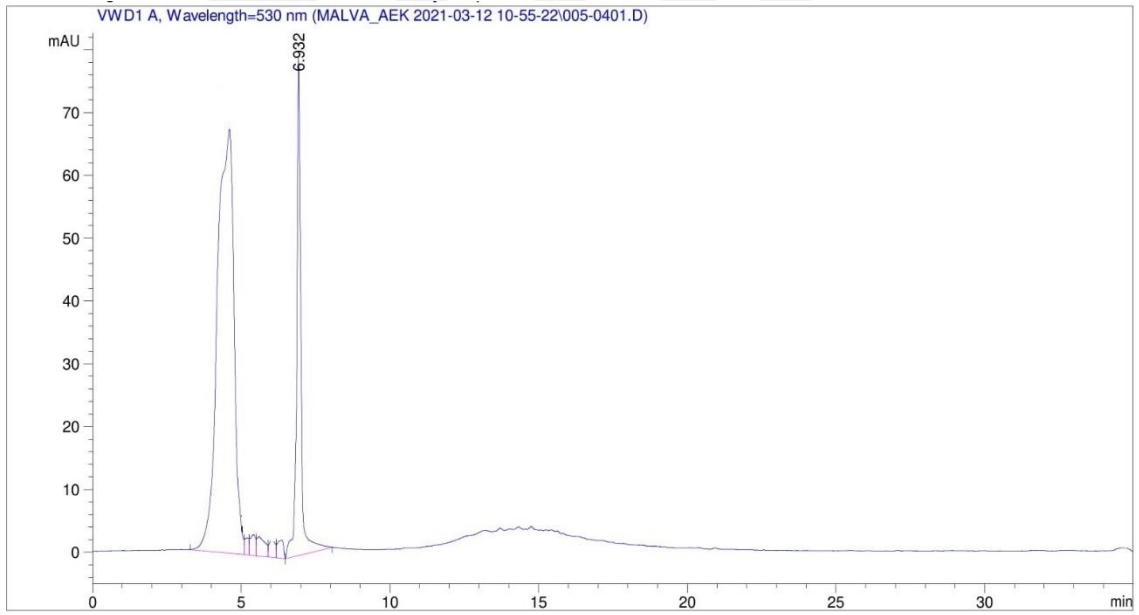


Şekil 4.4. *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi YPİTK kromatogramı (1. *M. sylvestris* ekstresi, 2. Malvin)

YPİTK çalışması ile varlığı tespit edilen, *M. sylvestris* ekstresinin içerdiği malvinin madde miktarı (a/a) başlık 3.2.3.'de detaylı olarak yer aldığı şekilde YBSK yöntemi ile hesaplanmıştır. Standart olarak kullanılan malvine ve *M. sylvestris* ekstresine ait YBSK kromatogramı Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Malvin YBSK kromatogramı (t_R : 6.941)



Şekil 4.6. *M. sylvestris* ekstresinin YBSK kromatogramı (Malvin t_R : 6.932)

İç standart yöntemi kullanılarak yeniden YBSK analizi yapılmış ve t_R : 6.932'deki pikin malvine ait olduğu teyit edilmiştir. Malvin standartlarından çizilen kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak, ekstre içerisinde var olan malvin miktarı kantitatif olarak (a/a) %0,19 bulunmuştur. Avrupa Farmakopesi'ne (PhEur9.0, Sağlık Bakanlığı, 2016) göre

“*M. sylvestris* çiçek ekstresinde İTK’da malvin sekonder metaboliti gün ışığı altında tespit edilebilir olmalıdır”, buna göre alınan sonuçlar doğrultusunda hazırlanan ekstrenin Avrupa Farmakopesi’ne göre standardize bir ekstre olduğu teyit edilmiştir.

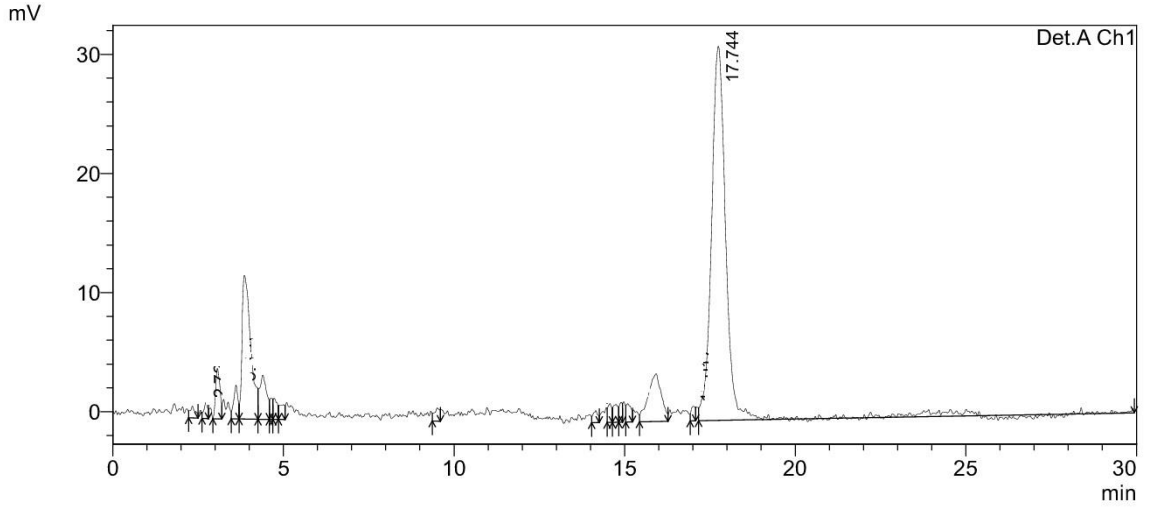
4.2.3. *Plantago ovata* Forssk. tohum ekstresinin β -sitosterol üzerinden standardizasyonu

YPİTK analizinde *P. ovata* tohum metanol ekstresi içerisindeki β -sitosterol varlığı türevlendirme işleminin ardından gün ışığı altında gösterilmiştir ve YPİTK kromatogramı Şekil 4.7.’de gösterilmiştir. Sonuç olarak *P. ovata* ekstresi içerisinde β -sitosterol $R_F \approx 0,60$ ’ta tespit edilmiştir.

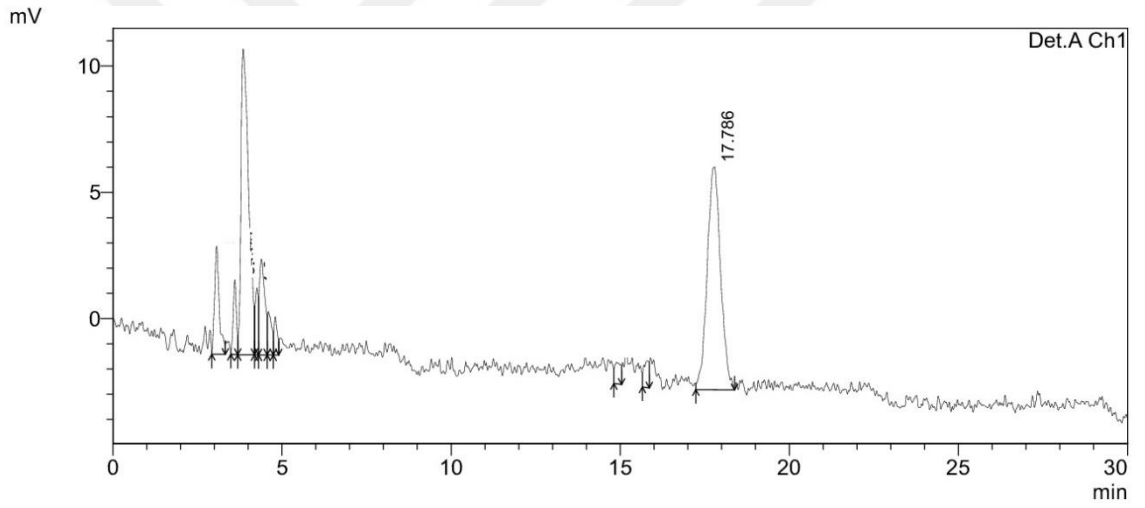


Şekil 4.7. *P. ovata* metanol ekstresinin YPİTK kromatogramı (1. *P. ovata* ekstresi, 2. β -sitosterol)

YPİTK çalışması ile varlığı tespit edilen, *P. ovata* ekstresinin içerdiği β -sitosterol madde miktarı (a/a) başlık 3.2.3.’de detaylı olarak ifade edildiği şekilde YBSK yöntemi ile hesaplanmıştır. Standart olarak kullanılan β -sitosterol ve *P. ovata* ekstresine ait YBSK kromatogramı Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.’da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. β -sitosterol YBSK kromatogramı (t_R : 17.744)

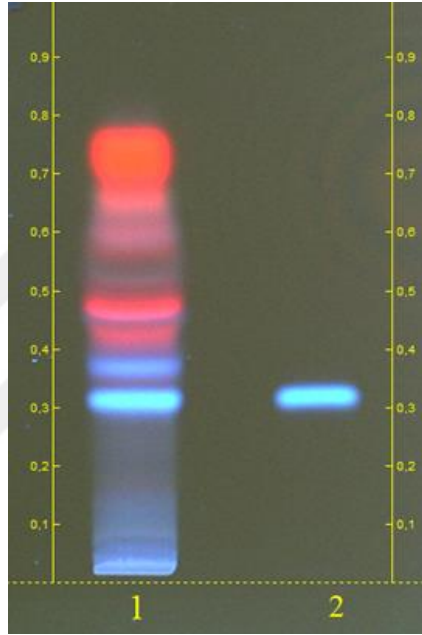


Şekil 4.9. *P. ovata* ekstresinin YBSK kromatogramı (β -sitosterol t_R 17.786)

İç standart yöntemi kullanılarak yeniden YBSK analizi yapılmış ve t_R :17.786'daki pikin β -sitosterol ait olduğu teyit edilmiştir. Standartlardan çizilen kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak, ekstre içerisinde var olan β -sitosterol miktarı kantitatif olarak (a/a) %0,33 olarak hesaplanmıştır. Literatüre göre *P. ovata* tohum ekstresi β -sitosterol içermektedir ve alınan sonuçlar doğrultusunda kullanılan ekstrenin literatüre göre standardize bir ekstre olduğu teyit edilmiştir (Nakamura vd., 2005).

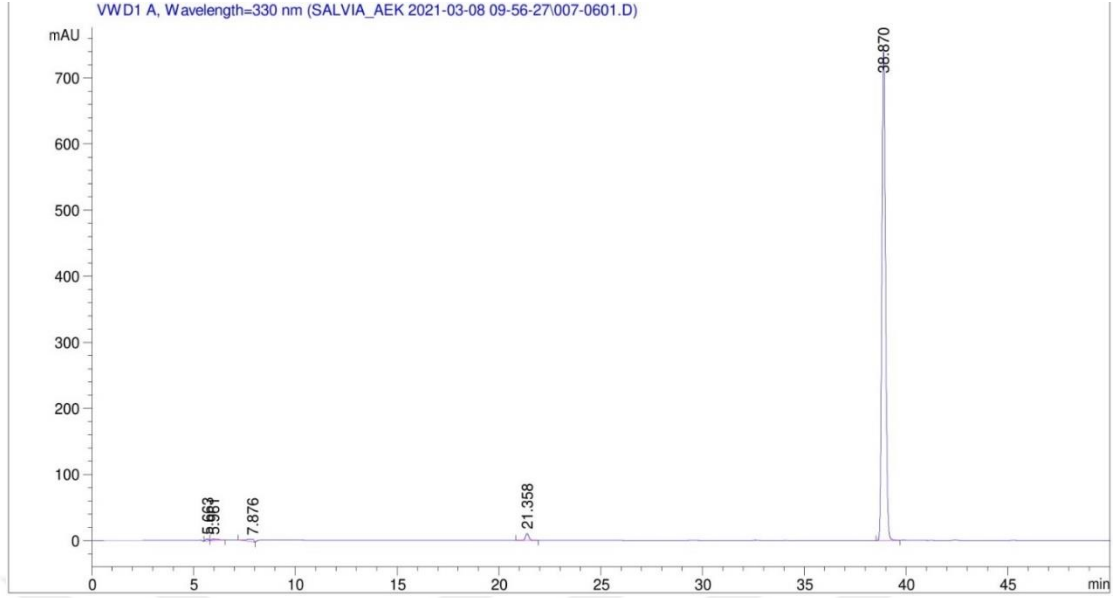
4.2.4. *Salvia fruticosa* Mill. yaprak ekstresinin salvigenin ve rosmarinik asit üzerinden standardizasyonu

YPİTK analizinde *S. fruticosa* yaprak etanol ekstresinde 366 nm dalga boyundaki ışık altında 10 farklı spot tespit edilmiştir ve rosmarinik asit varlığı mavi bir spot olarak ortaya konulmuştur ve YPİTK kromatogramı Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. Sonuç olarak *S. fruticosa* ekstresi içerisinde rosmarinik asit $R_F \approx 0,35$ 'te tespit edilmiştir.

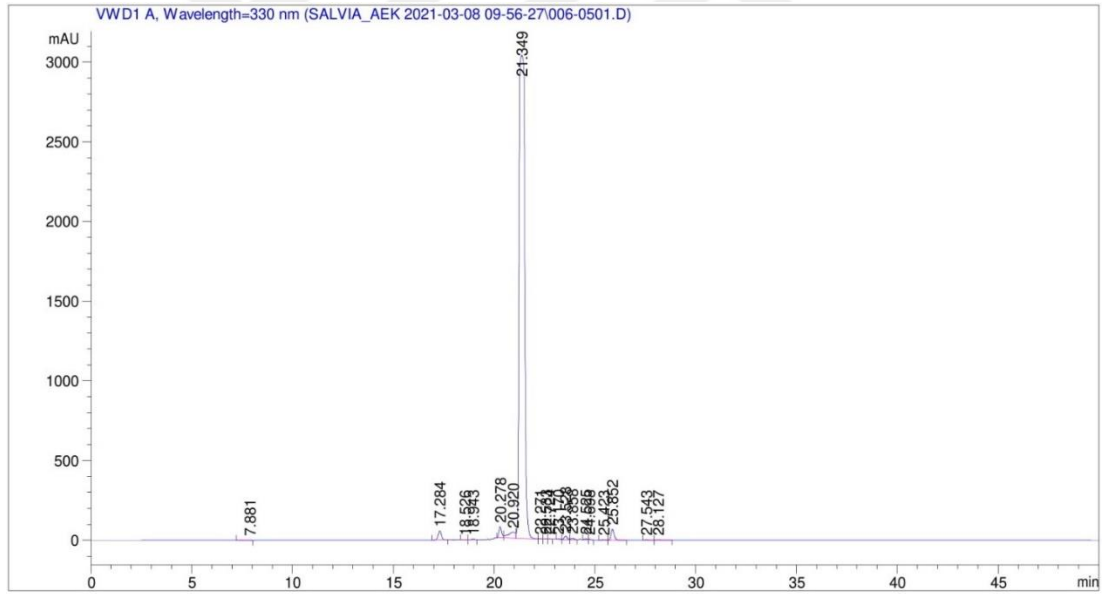


Şekil 4.10. *S. fruticosa* etanol ekstresinin YPİTK kromatogramı (1. *S. fruticosa* ekstresi, 2. Rosmarinik asit)

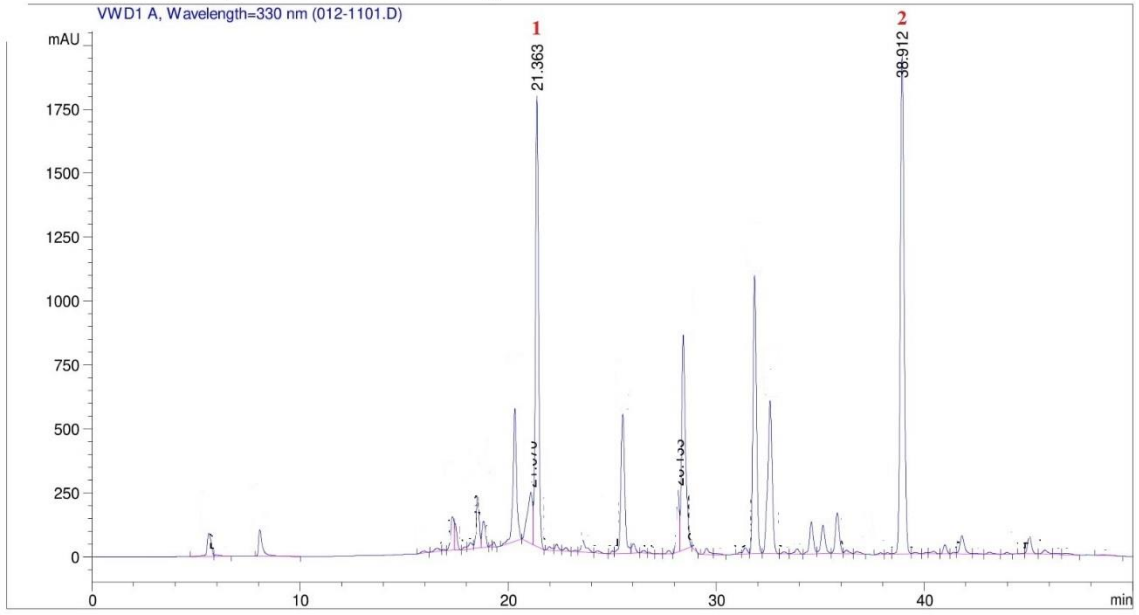
YPİTK çalışması ile varlığı tespit edilen, *S. fruticosa* ekstresinin içerdiği rosmarinik asit ve salvigeninin madde miktarı (a/a) başlık 3.2.3.'de detaylı olarak yer aldığı şekilde YBSK yöntemi ile hesaplanmıştır. Standart olarak kullanılan rosmarinik asit, salvigenin ve *S. fruticosa* yaprak ekstresine ait YBSK kromatogramı Şekil 4.11., Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Salvigenin YBSK kromatogramı (t_R 38.870)



Şekil 4.12. Rosmarinik asit YBSK kromatogramı (t_R 21.349)

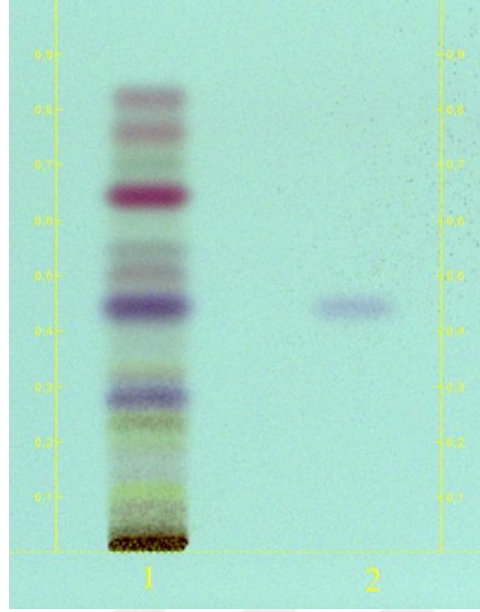


Şekil 4.13. *S. fruticosa* ekstresinin YBSK kromatogramı (1.Rosmarinik asit t_R 21.363; 2. Salvigenin t_R 39.912)

İç standart yöntemi kullanılarak yeniden YBSK analizi yapılmış ve t_R :21.36'daki pikin rosmarinik asite, t_R :39.91'deki pikin salvigenine ait olduğu teyit edilmiştir. Standartlardan çizilen kalibrasyon grafiklerinden yola çıkılarak, ekstre içerisinde var olan rosmarinik asit miktarı kantitatif olarak (a/a) %1,36; salvigenin miktarı %3,68 olarak hesaplanmıştır. HPTLC Association'a göre *S. fruticosa* ekstresi rosmarinik asit ve salvigenin içermelidir ve alınan sonuçlar doğrultusunda kullanılan ekstrenin HPTLC Association'a göre standardize bir ekstre olduğu teyit edilmiştir (http-2).

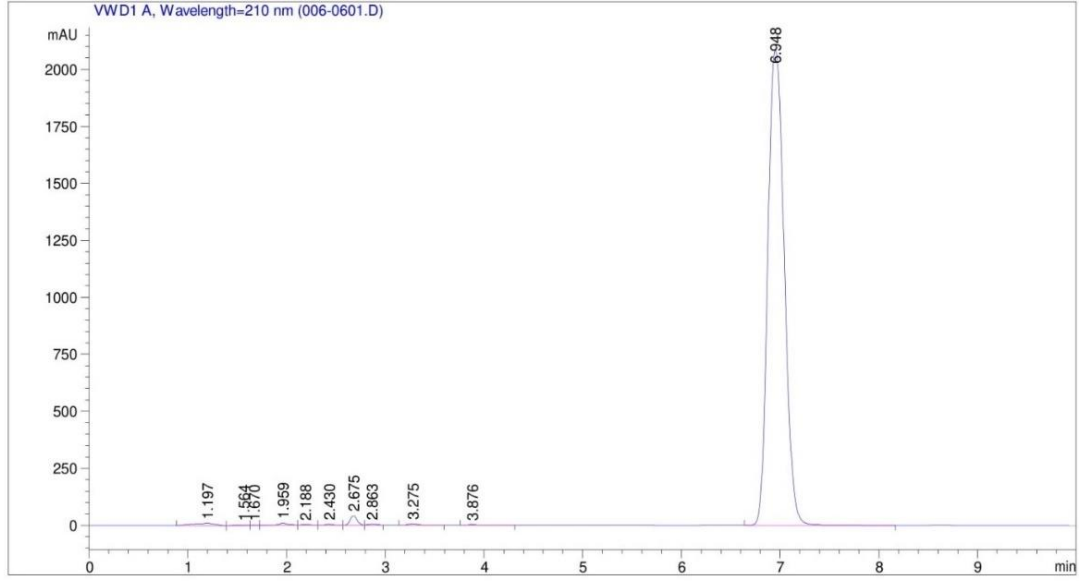
4.2.5. *Tanacetum parthenium* L. toprak üstü ekstresinin partenolit üzerinden standardizasyonu

YPİTK analizinde *T. parthenium* toprak üstü metanol ekstresi içerisindeki partenolit varlığı türevlendirme işleminin ardından gün ışığı altında ortaya konulmuştur ve YPİTK kromatogramı Şekil 4.14.'te gösterilmiştir. Sonuç olarak *T. parthenium* ekstresi içerisindeki partenolit 12 spot arasından $R_F \approx 0,45$ 'te tespit edilmiştir.

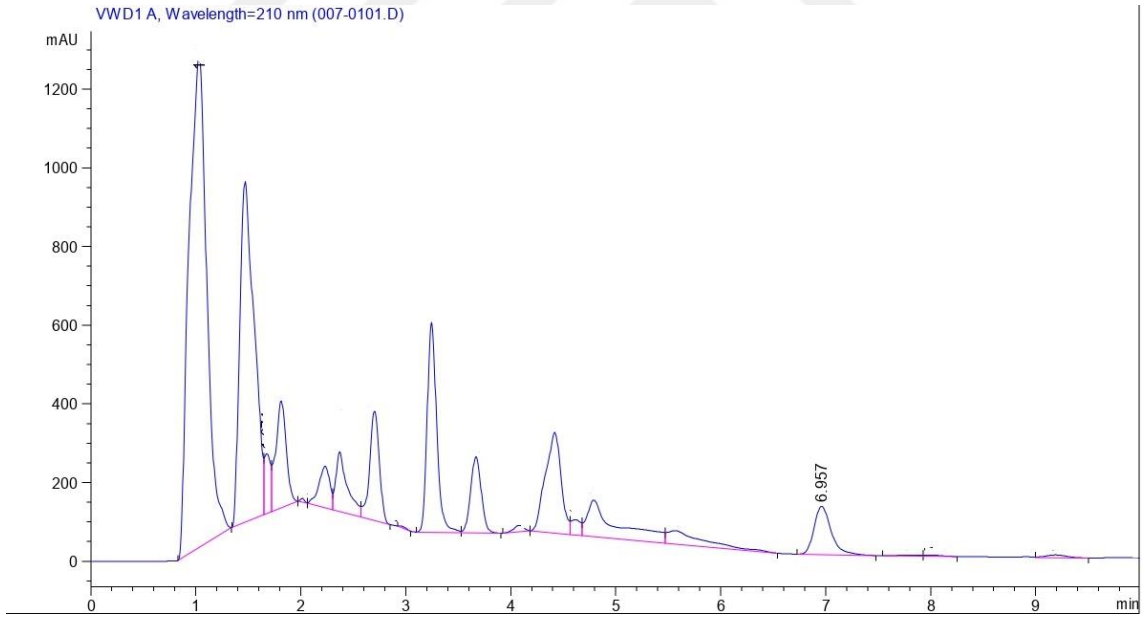


Şekil 4.14. *T. parthenium* metanol ekstresinin YPİTK kromatogramı (1. *T. parthenium* ekstresi, 2. Partenolit)

YPİTK çalışması ile varlığı tespit edilen, *T. parthenium* ekstresinin içerdiği partenolit madde miktarı (a/a) başlık 3.2.3.'de detaylı olarak ifade edildiği şekilde YBSK yöntemi ile hesaplanmıştır. Standart olarak kullanılan partenolit ve *T. parthenium* ekstresine ait YBSK kromatogramı Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Partenolit YBSK kromatogramı (t_R . 6.948)



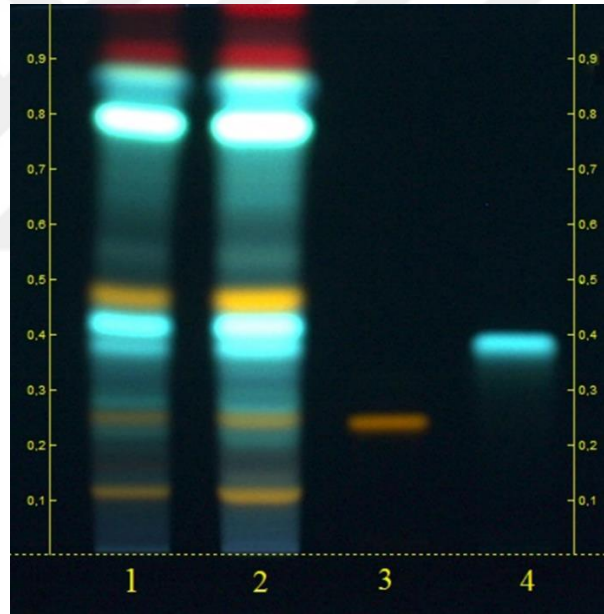
Şekil 4.16. *T. parthenium* ekstresinin YBSK kromatogramı (Partenolit t_R 6.957)

İç standart yöntemi kullanılarak yeniden YBSK analizi yapılmış ve t_R :6.957'deki pikin partenolite ait olduğu teyit edilmiştir. Standartlardan çizilen kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak, ekstre içerisinde var olan partenolit miktarı kantitatif olarak (a/a) %0,5 olarak hesaplanmıştır. Avrupa Farmakopesi'ne göre *T. parthenium* ekstresi partenolit

içermelidir ve alınan sonuçlar doğrultusunda kullanılan ekstrenin farmakopeye göre standardize bir ekstre olduğu tespit edilmiştir (PhEur9.0, Sağlık Bakanlığı, 2016).

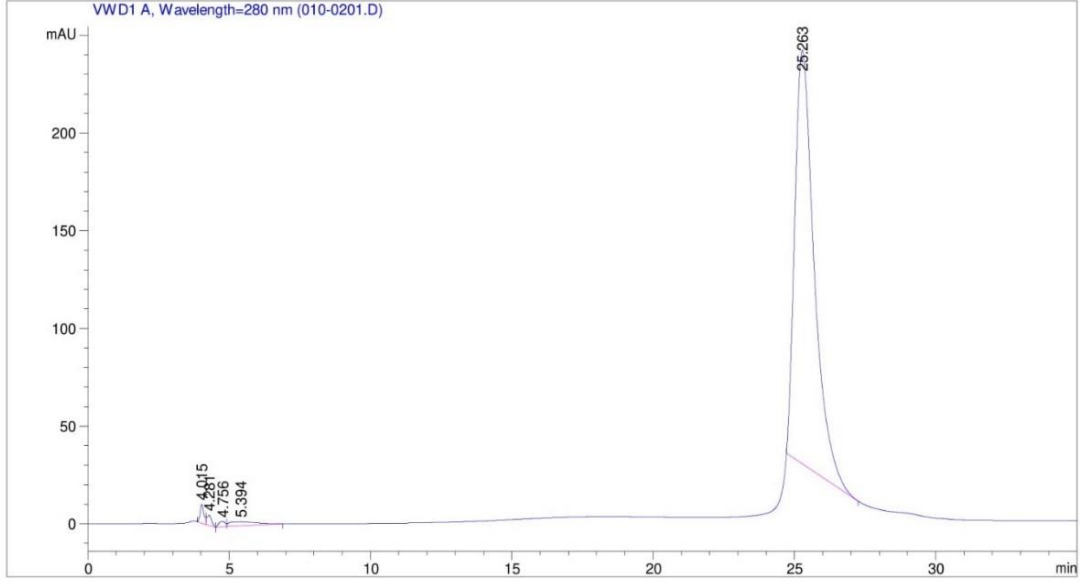
4.2.6. *Taraxacum officinale* L. toprak üstü ekstresinin rutin ve klorojenik asit üzerinden standardizasyonu

YPİTK analizinde *T. officinale* toprak üstü metanol ekstresi içerisindeki rutin ve klorojenik asit varlığı türevlendirme işleminin ardından 366 nm’de ortaya konulmuştur ve YPİTK kromatogramı Şekil 4.17.’de gösterilmiştir. Sonuç olarak *T. officinale* ekstresi içerisinde tespit edilen 10 spot arasında rutin $R_F \approx 0,22$ ’de, klorojenik asit $R_F \approx 0,40$ ’ta tespit edilmiştir.

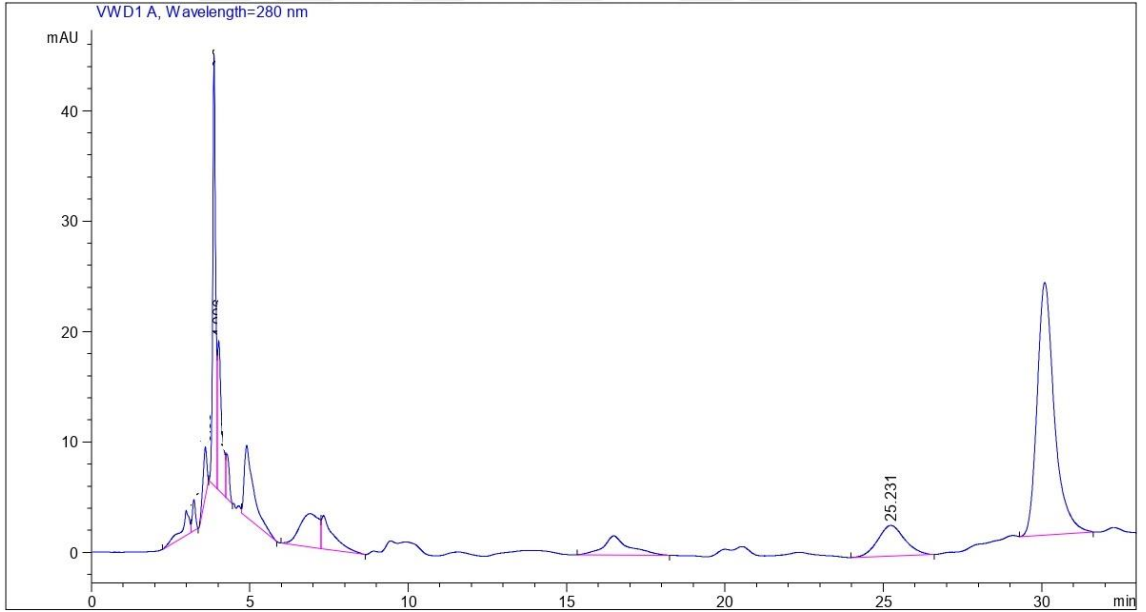


Şekil 4.17. *T. officinale* metanol ekstresinin YPİTK kromatogramı (1. *T. officinale* ekstresi 2 µL, 2. *T. officinale* ekstresi 5 µL, 3. Rutin, 4. Klorojenik asit)

YPİTK çalışması ile varlığı tespit edilen, *T. officinale* ekstresinin içerdiği klorojenik asit madde miktarı (a/a) başlık 3.2.3.’de detaylı olarak ifade edildiği şekilde YBSK yöntemi ile hesaplanmıştır. Standart olarak kullanılan klorojenik asit ve *T. officinale* ekstresine ait YBSK kromatogramı Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.’da gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Klorojenik asit YBSK kromatogramı (t_R : 25.263)



Şekil 4.19. *T. officinale* ekstresinin YBSK kromatogramı (Klorojenik asit t_R 25.231)

İç standart yöntemi kullanılarak yeniden YBSK analizi yapılmış ve t_R :25.231'deki pikin klorojenik asite ait olduğu teyit edilmiştir. Standartlardan çizilen kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak, ekstre içerisinde var olan klorojenik asit miktarı kantitatif olarak (a/a) %0,3 olarak hesaplanmıştır. Avrupa Farmakopesi'ne göre *T. officinale* ekstresi klorojenik asit içermelidir ve alınan sonuçlar doğrultusunda kullanılan ekstrenin

Avrupa Farmakopesi'ne göre standardize bir ekstre olduğu teyit edilmiştir (PhEur9.0, Sağlık Bakanlığı, 2016).

4.3. Formülasyon Geliştirme

Tez çalışması kapsamında elde edilen ve başlık 3.2.3.'de ifade edildiği şekilde standardizasyonu sağlanan ekstrelerin, uygulama kolaylığını sağlamak, emilimi ve biyoyararlanımını arttırmak ve bir fitoterapötik prototip ortaya koymak amacıyla bir formülasyon sistemi içerisinde tasarlanması planlanmıştır. Formülasyonlar geliştirilirken öncelikle ön formülasyon çalışmaları ile optimum ve stabil formülasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. Belirlenen Yağ/YEM/YYEM ve su oranları kullanılarak hazırlanan boş formülasyonlar ve bu boş formülasyonların başlangıç anında karakterizasyon parametreleri değerlendirilmiştir. Ardından 3 ve 6 aylık sürelerde aynı parametreler üzerinden farklı sıcaklık koşullarında stabiliteleri incelenmiştir. Sonuçta, standardize bitki ekstreleri için taşıyıcı sistem olarak özgün mikroemülsiyon formülasyonları geliştirilmiştir.

Mikroemülsiyonların hazırlanmasında, 3.2.4.'te ifade edildiği gibi yağ fazı olarak tarçın yağı, YEM olarak Tween 80 ve YYEM fazı olarak propilen glikol kullanılarak hazırlanan optimum M1 formülasyonunu elde etmek için denenen madde miktarları ve elde edilen alan değerleri Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Yağ fazı olarak tarçın yağı, YEM fazı olarak Tween 80, YYEM fazı olarak propilen glikol ve distile su içeren optimum M1 formülasyonu için denenen miktarlar ve alan değerleri

Formülasyon kodu	YEM: YYEM oranı	Yağ Tarçın yağı	YEM/YYEM Tween 80 / propilen glikol	Su Distile su	Alan Değerleri
F-1	1:1	0,5	9,5	20	624,06
		1	9	20	
		2	8	6,4	
		3	7	1,28	

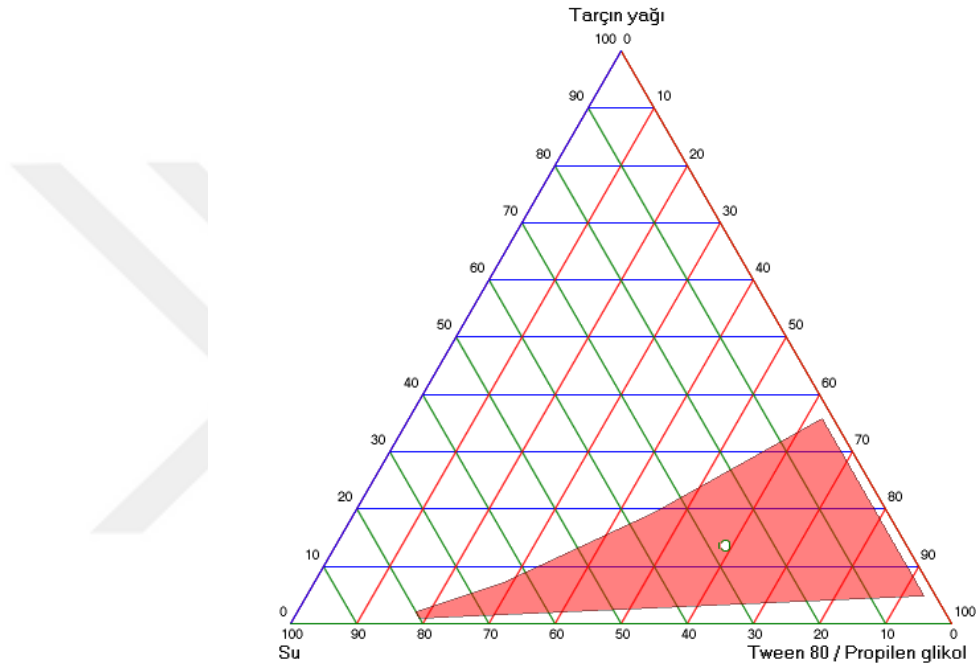
Tablo 4.2. (Devam) Yağ fazı olarak tarçın yağı, YEM fazı olarak Tween 80, YYEM fazı olarak propilen glikol ve distile su içeren optimum M1 formülasyonu için denenen miktarlar ve alan değerleri

Formülasyon kodu	YEM: YYEM oranı	Yağ Tarçın yağı	YEM/YYEM Tween 80 / propilen glikol	Su Distile su	Alan Değerleri
F-1	1:1	4	6	0,92	624,06
F-2	1:2	0,5	9,5	0	229,25
		1	9	0	
		2	8	1,72	
		3	7	1	
		4	6	0,8	
F-3	1:3	0,5	9,5	0	77,67
		1	9	0	
		2	8	0	
		3	7	0,56	
		4	6	0,84	
F-4	1:4	0,5	9,5	0	59,56
		1	9	0	
		2	8	0	
		3	7	0,36	
		4	6	0,76	
F-5	1:5	0,5	9,5	0	158,6
		1	9	0	
		2	8	0	
		3	7	1,8	
		4	6	0,78	

Tablo 4.2. (Devam) Yağ fazı olarak tarçın yağı, YEM fazı olarak Tween 80, YYEM fazı olarak propilen glikol ve distile su içeren optimum M1 formülasyonu için denenen miktarlar ve alan değerleri

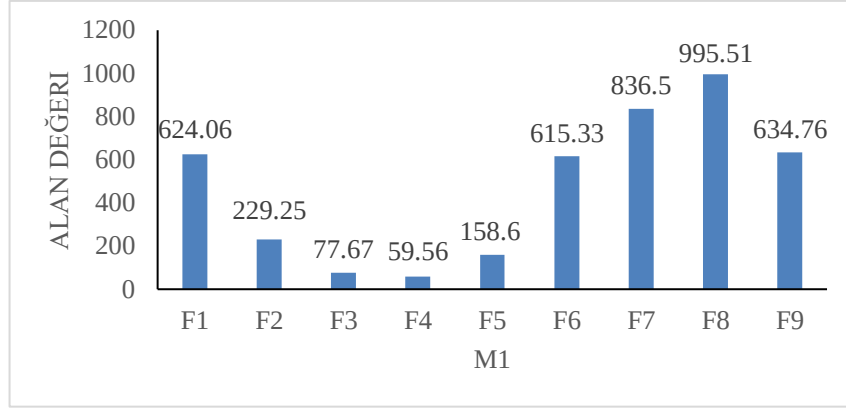
Formülasyon kodu	YEM: YYEM oranı	Yağ Tarçın yağı	YEM/YYEM Tween 80 / propilen glikol	Su Distile su	Alan Değerleri
F-6	2:1	0,5	9,5	20	615,33
		1	9	20	
		2	8	5,8	
		3	7	1,8	
		4	6	1,04	
					.
F-7	3:1	0,5	9,5	20	836,5
		1	9	20	
		2	8	18,8	
		3	7	5,4	
		4	6	1,12	
F-8	4:1	0,5	9,5	20	995,51
		1	9	20	
		2	8	18	
		3	7	5,48	
		4	6	1,2	
F-9	5:1	0,5	9,5	20	634,76
		1	9	20	
	4:1	2	8	18,8	
		3	7	6,6	
		4	6	2,48	

Alan değerleri incelendiğinde en yüksek alan değerine sahip olan F8 formülasyonunun üçgen faz diyagramı Şekil 4.20.'de gösterilmiştir. Bu faz diyagramına göre YEM / YYEM oranı en yüksek alana sahip optimum formülasyon oranı 1:1 olarak belirlenmiştir. Bu üçgen faz diyagramındaki orta nokta ise optimum formülasyon (M1) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.20. Tarçın yağı, Tween 80: propilen glikol (1:1) ve distile sudan oluşan mikroemülsiyonun üçlü faz diyagramı

Yağ fazı olarak tarçın yağı, YEM fazı olarak Tween 80, YYEM fazı olarak propilen glikol ve distile su içeren formülasyonların üçgen faz diyagramındaki alan değerleri Şekil 4.21.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Tarçın yağı, Tween 80, propilen glikol ve distile su içeren formülasyonların üçgen faz diyagramındaki alan değerleri

Hazırlanan optimum mikroemülsiyon formülasyonu (M1) oda sıcaklığında saydamlık ve faz ayrımı açısından değerlendirilmiş olup, koyu sarı renkte saydam-berrak formülasyonun görünüşü Şekil 4.22.’deki gibidir. Mevcut formülasyon bilğimiz dahilinde ilk defa tasarlanıp hazırlanmıştır.



Şekil 4.22. Optimum M1 mikroemülsiyon formülasyonunun (tarçın yağı) görünüşü

Yağ fazı olarak soya yağı, YEM olarak span 80:cremophor EL (5:1), YYEM olarak propilen glikol:etanol (1:1) ve distile su içeren optimum M2 formülasyonunu elde etmek için denenen madde miktarları ve elde edilen alan değerleri Tablo 4.3.’te gösterilmiştir.

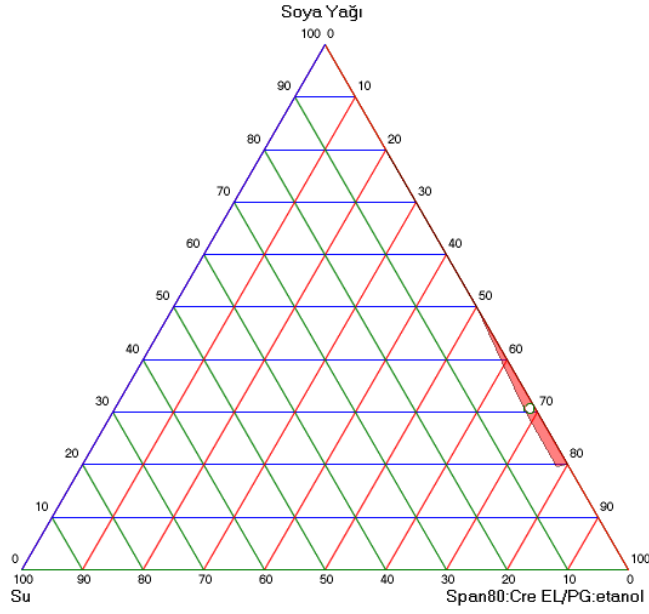
Tablo 4.3. Yağ fazı olarak soya yağı, YEM fazı olarak Span 80:Cremophor EL (5:1), YYEM olarak propilen glikol:etanol (1:1) ve distile su içeren optimum M2 formülasyonu için denenen miktarlar ve alan değerleri

Formülasyon kodu	YEM: YYEM oranı	Yağ Soya yağı	YEM/YYEM Span 80: Cremophor EL (5:1) / propilen glikol: etanol (1:1)	Su Distile su	Alan Değerleri
F-1	1:1	2	8	0	0
		3	7	0	
		4	6	0	
		5	5	0	
		6	4	0	
		7	3	0	
		8	2	0	
F-2	1:2	2	8	0	0
		3	7	0	
		4	6	0	
		5	5	0	
		6	4	0	
		7	3	0	
		8	2	0	
F-3	1:3	2	8	0,04	23,31
		3	7	0	
		4	6	0	
		5	5	0	
		6	4	0	
		7	3	0	
		8	2	0	

Tablo 4.3. (Devam) Yağ fazı olarak soya yağı, YEM fazı olarak Span 80:Cremophor EL (5:1), YYEM olarak propilen glikol:etanol (1:1) ve distile su içeren optimum M2 formülasyonu için denenilen madde miktarları ve alan değerleri

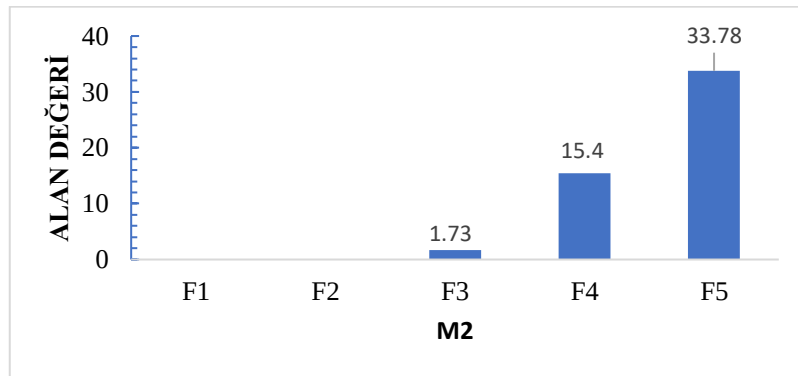
Formülasyon kodu	YEM: YYEM oranı	Yağ Soya yağı	YEM/YYEM Span 80: Cremophor EL (5:1) / propilen glikol: etanol (1:1)	Su Distile su	Alan Değerleri
F-4	1:4	2	8	0,12	27,65
		3	7	0,12	
		4	6	0	
		5	5	0	
		6	4	0	
		7	3	0	
		8	2	0	
F-5	1:5	2	8	0,2	30,64
		3	7	0,2	
		4	6	0,1	
		5	5	0	
		6	4	0	
		7	3	0	
		8	2	0	

Alan değerleri incelendiğinde en yüksek alan değerine sahip olan F5 formülasyonunun üçgen faz diyagramı Şekil 4.23.'te gösterilmiştir. Bu faz diyagramına göre YEM/YYEM oranı en yüksek alana sahip optimum formülasyon oranı 1:5 olarak belirlenmiştir. Bu üçgen faz diyagramındaki orta nokta ise optimum formülasyon (M2) olarak belirlenmiştir.



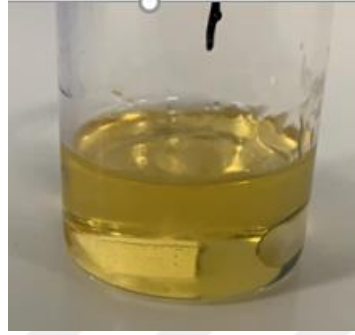
Şekil 4.23. Soya yağı, Span 80:Cre EL/PG:etanol ve distile su içeren içeren formülasyonun üçgen faz diyagramı (Cre EL: Cremophor EL, PG: propilen glikol)

Yağ fazı olarak soya yağı, YEM fazı olarak span 80:cremophor EL, YYEM fazı olarak propilen glikol:etanol ve distile su içeren formülasyonların üçgen faz diyagramındaki alan değerleri Şekil 4.24.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Soya yağı, Span 80:Cre EL/PG:etanol ve distile su içeren içeren formülasyonların üçgen faz diyagramındaki alan değerleri (Cre EL: Cremophor EL, PG: propilen glikol)

Hazırlanan soya yağı içeren optimum mikroemülsiyon formülasyonları (M2) oda sıcaklığında saydamlık ve faz ayrımı açısından değerlendirilmiş olup, hafif sarımsı renkli, saydam-berrak formülasyon görünüşü Şekil 4.25.'teki gibidir. Mevcut formülasyon tez çıktısı olarak bilginiz dahilinde ilk defa tasarlanıp hazırlanmıştır.



Şekil 4.25. Optimum M2 mikroemülsiyon formülasyonunun (soya yağı) görünüşü

4.3.1. Karakterizasyon çalışmaları

Formülasyonların oda sıcaklığında başlangıç anında ölçülen karakterizasyon çalışma bulguları (görünüş, viskozite, pH, zeta potansiyel, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi) Tablo 4.4.'te yer almaktadır. Kullanılacak olan optimum formülasyonun oral olarak kullanıma uygunluğunu belirlemek için veriler değerlendirilmiştir.

Tablo 4.4. Formülasyonların karakterizasyon bulguları ve standart sapma değerleri ($\pm$ SS)

	M1	M2	<i>S. fruticosa</i> yükü M1	<i>M. sylvestris</i> yükü M2
pH	6,26 $\pm$ 0,03	6,35 $\pm$ 0,11	6,99 $\pm$ 0,05	7,11 $\pm$ 0,09
Viskozite (cP)	613 $\pm$ 1,11	269	666 $\pm$ 1,1	285 $\pm$ 0,9
Kırılma indisi	1,44498 $\pm$ 0,0012	1,4673 $\pm$ 0,005	1,4444 $\pm$ 0,002	1,4514 $\pm$ 0,003
Damlacık büyüklüğü (nm)	0,4014 $\pm$ 0,02871	3,935 $\pm$ 0,2803	1,365 $\pm$ 0,03456	132,1 $\pm$ 4,544
PDI	0,590 $\pm$ 0,030	0,194 $\pm$ 0,062	0,453 $\pm$ 0,013	0,378 $\pm$ 0,019
Zeta potansiyel (mV)	-0,00884 $\pm$ 0,0000	0,0184 $\pm$ 0,0445	-0,000224 $\pm$ 0,0000278	-0,0190 $\pm$ 0,01211
Elektrik iletkenliği (μ s)	9 $\pm$ 0	0	15 $\pm$ 0	0

Tablo 4.4.'te formülasyonların karakterizasyon çalışmalarının sonuçları (viskozite, pH, zeta potansiyeli, damlacık boyutu, polidispersite indeksi) boş ve ekstre yüklü mikroemülsiyonlar için ayrı ayrı verilmiştir. Damlacık boyutu, M1 formülasyonu için 0,401 nm ile 1,365 nm arasında değişmektedir. M1 formülasyonunun PDI değerleri ise Tablo 4.2.'de gösterildiği üzere 0,590 ile 0,453 arasında tespit edilmiştir. M2 formülasyonu için ise PDI değeri 0,194 ile 0,378 arasındadır. M2 formülasyonunun damlacık boyutları 3,935 nm ile 132,1 nm arasındadır. M1 boş ve yüklü formülasyonların pH değerleri 6.99-6.26 arasında bulunmuştur. M2 için ise pH değer aralığı 6,35-7,11 olarak kaydedilmiştir. M1 boş mikroemülsiyonun viskozitesi 613 cP olarak belirlenmiştir. *S. fruticosa* etanol ekstresi yüklendiğinde ise viskozite değeri 666 cP olarak bulunmuştur. M2 boş mikroemülsiyonunun viskozitesi ise 269 cP, yüklü M2 formülasyonunun ise 285 cP olarak belirlenmiştir. M1 formülasyonlarının elektrik iletkenliği 9 ile 15 μ S/cm arasında bulunmuştur. M2 için ise elektrik iletkenlik değeri 0 olarak tespit edilmiştir. M1 mikroemülsiyonların zeta potansiyel değerleri (-0.00884) - (-0.000224) mV olarak belirlenirken M2 mikroemülsiyonlarının zeta potansiyelleri 0,0184-(-0,019) olarak tespit edilmiştir. Kırılma indisi ölçümü yapılmış ve M1 için 1.44498 ile 1.4444 arasında, M2 için 1,4673-1,4514 arasında olduğu bulunmuştur. Tasarlanıp geliştirilen özgün formülasyonunun fizikokimyasal karakterizasyonu da mevcut tez çalışması kapsamında ilk kez gerçekleştirilmiştir.

4.3.2. Stabilité

Formülasyonların 3. ve 6. aylarında tespit edilen görünüş, viskozite, pH, zeta potansiyel, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ölçüm sonuçları Tablo 4.4-4.8.'de gösterilmiştir.

Formülasyonların fiziksel görünümünün 6 ay boyunca incelenmesi sonucunda hiçbir formülasyonda fiziksel görünümde değişiklik, bulanıklık, faz ayrışması veya çökelti gibi bir bozulma olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca formülasyonların t=0. dakikada ve 6 ay süresince yapılan kontrollerde 13.000 rpm hızda, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ve 30 dakika süre ile santrifüj edilmiş olup, tüm formülasyonlarda bu süre sonunda faz ayrışması gerçekleşmemiştir.

Optimum formülasyonların 3 ve 6 aylık dönemlerde 4, 25 ve 40°C sıcaklıklarda pH ölçüm sonuçları Tablo 4.5.'te yer almaktadır.

Tablo 4.5. Optimum mikroemulsiyonların pH stabilite sonuçları ve standart sapma değerleri ($\pm SS$)

Ay	Sıcaklık °C	Formülasyon	pH $\pm SS$
3	4 $\pm$ 2	M1	6,74 $\pm$ 0,01
	25 $\pm$ 2		6,44 $\pm$ 0,01
	40 $\pm$ 2		6,24 $\pm$ 0,01
	4 $\pm$ 2	M2	6,12 $\pm$ 0,13
	25 $\pm$ 2		6,44 $\pm$ 0,02
	40 $\pm$ 2		6,51 $\pm$ 0,09
6	4 $\pm$ 2	M1	6,92 $\pm$ 0,06
	25 $\pm$ 2		6,79 $\pm$ 0,04
	40 $\pm$ 2		6,61 $\pm$ 0,05
	4 $\pm$ 2	M2	6,01 $\pm$ 0,14
	25 $\pm$ 2		6,14 $\pm$ 0,03
	40 $\pm$ 2		6,29 $\pm$ 0,04

Optimum formülasyonların 3 ve 6 aylık dönemlerde 4, 25 ve 40°C sıcaklıklarda elektrik iletkenliği ölçüm sonuçları Tablo 4.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Optimum mikroemulsiyonların elektrik iletkenliği (μs) stabilite sonuçları ve standart sapma değerleri ($\pm SS$)

Ay	Sıcaklık °C	Formülasyon	Elektrik iletkenliği (μs) $\pm SS$
3	4 $\pm$ 2	M1	10 $\pm$ 0
	25 $\pm$ 2		10 $\pm$ 0
	40 $\pm$ 2		10 $\pm$ 0
	4 $\pm$ 2	M2	0
	25 $\pm$ 2		0
	40 $\pm$ 2		0

Tablo 4.6. (Devam) Optimum mikroemulsiyonların elektrik iletkenliği (μs) stabilite sonuçları ve standart sapma değerleri ($\pm \text{SS}$)

Ay	Sıcaklık °C	Formülasyon	Elektrik iletkenliği (μs) $\pm \text{SS}$
6	4 $\pm$ 2	M1	10 $\pm$ 0
	25 $\pm$ 2		10 $\pm$ 0
	40 $\pm$ 2		10 $\pm$ 0
	4 $\pm$ 2	M2	0
	25 $\pm$ 2		0
	40 $\pm$ 2		0

Optimum formülasyonların 3 ve 6 aylık dönemlerde 4, 25 ve 40 °C sıcaklıklarda kırılma indisi ölçüm sonuçları Tablo 4.7.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Optimum mikroemulsiyonların kırılma indisi stabilite sonuçları ve standart sapma değerleri ($\pm \text{SS}$)

Ay	Sıcaklık °C	Formülasyon	Kırılma İndisi $\pm \text{SS}$
3	4 $\pm$ 2	M1	1,4412 $\pm$ 0,003
	25 $\pm$ 2		1,4424 $\pm$ 0,001
	40 $\pm$ 2		1,4462 $\pm$ 0,005
	4 $\pm$ 2	M2	1,4461 $\pm$ 0,005
	25 $\pm$ 2		1,44708 $\pm$ 0,0092
	40 $\pm$ 2		1,4614 $\pm$ 0,001
6	4 $\pm$ 2	M1	1,4419 $\pm$ 0,002
	25 $\pm$ 2		1,4442 $\pm$ 0,004
	40 $\pm$ 2		1,4459 $\pm$ 0,002
	4 $\pm$ 2	M2	1,4458 $\pm$ 0,004
	25 $\pm$ 2		1,4463 $\pm$ 0,008
	40 $\pm$ 2		1,4599 $\pm$ 0,001

Optimum formülasyonların 3 ve 6 aylık dönemlerde 4, 25 ve 40°C sıcaklıklarda viskozite ölçüm sonuçları Tablo 4.8.'de gösterilmiştir. Bu değerler damlacık büyüklüğü ölçümünde de kullanılmıştır.

Tablo 4.8. Optimum mikroemülsiyonların viskozite (cP) stabilite sonuçları ve standart sapma değerleri ($\pm$ SS)

Ay	Sıcaklık °C	Formülasyon	Viskozite (cP) $\pm$ SS
3	4 $\pm$ 2	M1	443,3 $\pm$ 0,07
	25 $\pm$ 2		399,3 $\pm$ 0,07
	40 $\pm$ 2		396,6 $\pm$ 0,14
	4 $\pm$ 2	M2	250,75 $\pm$ 0,17
	25 $\pm$ 2		280 $\pm$ 3
	40 $\pm$ 2		224
6	4 $\pm$ 2	M1	387,6 $\pm$ 0,4
	25 $\pm$ 2		312,4 $\pm$ 1,2
	40 $\pm$ 2		287,8 $\pm$ 0,18
	4 $\pm$ 2	M2	221,7 $\pm$ 1,2
	25 $\pm$ 2		211,1 $\pm$ 2
	40 $\pm$ 2		201

Optimum mikroemülsiyon formülasyonlarının 3 ay sonunda 4, 25 ve 40°C sıcaklıklarda damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları Tablo 4.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Optimum boş mikroemülsiyonların damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları

			Karakterizasyon parametreleri		
Ay	Sıcaklık °C	Formülasyon	Damlacık büyüklüğü (nm) ± SS	Polidispersite indeksi ± SS	Zeta potansiyel (mV) ± SS
3	4 ± 2	M1	0,8192 ± 0,06300	0,455 ± 0,029	0,00150 ± 0,0000
	25 ± 2		1,294 ± 0,03758	0,286 ± 0,026	-0,000110 ± 0,0000252
	40 ± 2		0,5033 ± 0,03472	0,595 ± 0,040	-0,000188 ± 0,00000232
	4 ± 2	M2	0,8166 ± 0,04908	0,188 ± 0,064	0,0177 ± 0,0445
	25 ± 2		111,9 ± 7,328	0,616 ± 0,022	-0,0186 ± 0,01150
	40 ± 2		172,4 ± 84,22	0,486 ± 0,053	0,0216 ± 0,01910

İlk defa bu tez çalışmasında geliştirilen özgün mikroemülsiyon formülasyonları, karakterizasyon çalışmalarında ortaya koyulduğu üzere oral kullanıma uygun özelliklerde bulunmuştur. Ayrıca belirlenen optimum formülasyonların oda koşullarında 6 aya kadar stabil olduğu ortaya konulmuştur.

4.4. *In vitro* Karaciğer Yağlanma Modeli

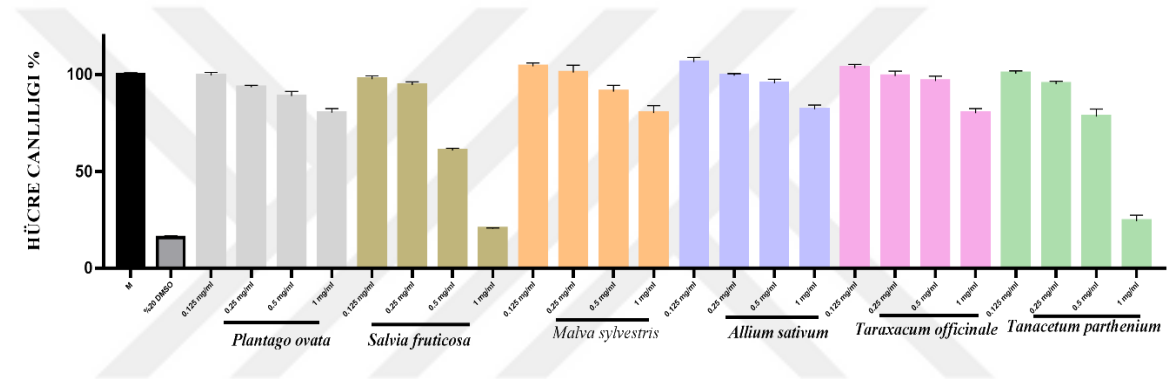
Tez kapsamında belirlenen ekstrelerin etkileri *in vitro* ortamda değerlendirilmiş ve bu çalışmalar neticesinde alınan sonuçlara göre yapılan deneylerde biyoaktif olduğu tespit edilen ekstralar *in vivo* çalışmalarda araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalar kapsamında öncelikle çalışılacak olan HepG2 hücre hattında sitotoksik değerler belirlenmiştir.

Sitotoksikite testleri sonucunda 6 ekstrenin ortak olarak çalışılabileceği maksimum toksik olmayan doz tespit edilerek diğer çalışmalar bu konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Sonrasında yağlanma modeli oluşturulmuş HepG2 hücre hattında lipid peroksidasyon ve glutatyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ardından Nil Red boyası ile ekstre muamelesinden önce ve sonra ortamdaki yağ hücreleri floresan mikroskobu ile

tespit edilmiştir. Hücre ortamındaki ALT AST enzim düzeyleri de ticari kitler ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *M. sylvestris* sulu etanol ve *S. fruticosa* etanol ekstreleri *in vitro* ortamda karaciğer yağlanmasına karşı altı ekstre içerisindeki en biyoaktif ekstreler olarak belirlenmiştir.

4.4.1. Sitotoksosite

Tez kapsamında çalışılan altı standart ekstrenin HepG2 hücre hattı üzerine *in vitro* sitotoksik etkileri Şekil 4.26.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.26. Ekstrelerin artan konsantrasyonlarda HepG2 hücresindeki % canlılık düzeyleri

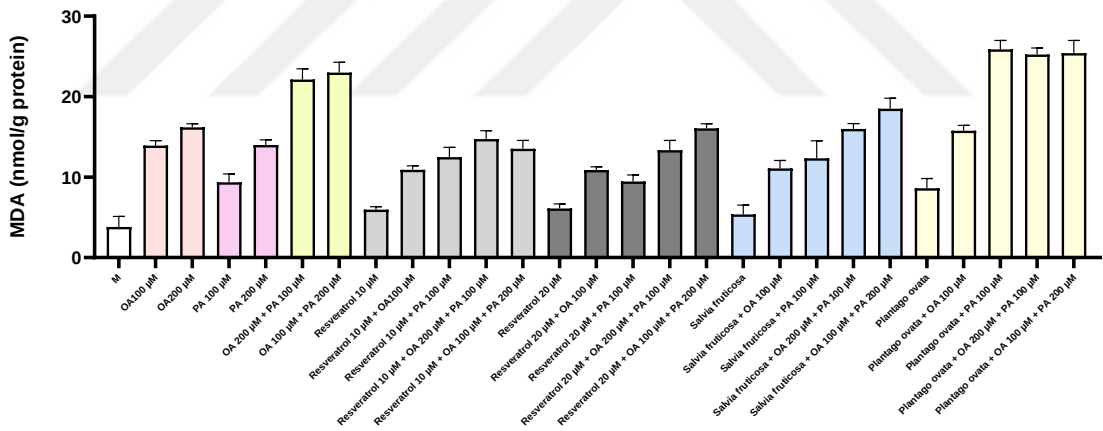
Alınan sonuçlar doğrultusunda *P. ovata*, *M. sylvestris*, *A. sativum* ve *T. officinale* ekstrelerinin 1 mg/mL konsantrasyona kadar HepG2 hücreleri üzerinde toksik olmadığı; *S. fruticosa* ekstresi için 0,25 mg/mL ve altındaki konsantrasyonların non-toksik olduğu, *T. parthenium* ekstresi için ise 0,5 mg/mL ve altında HepG2 hücreleri üzerinde toksisite gözlemlenmediği tespit edilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlarla hücre kültüründe karaciğer yağlanma deneylerine geçilmiştir.

Aşağıda yer alan lipid peroksidasyon tayini, glutatyon analizi, Nil Red boya ile yağ damlacıkları tespiti ve ALT-AST düzeylerinin ölçümü deneylerinde ortak çalışılabilecek en yüksek konsantrasyon olan 0,25 mg/mL'de çalışılmıştır.

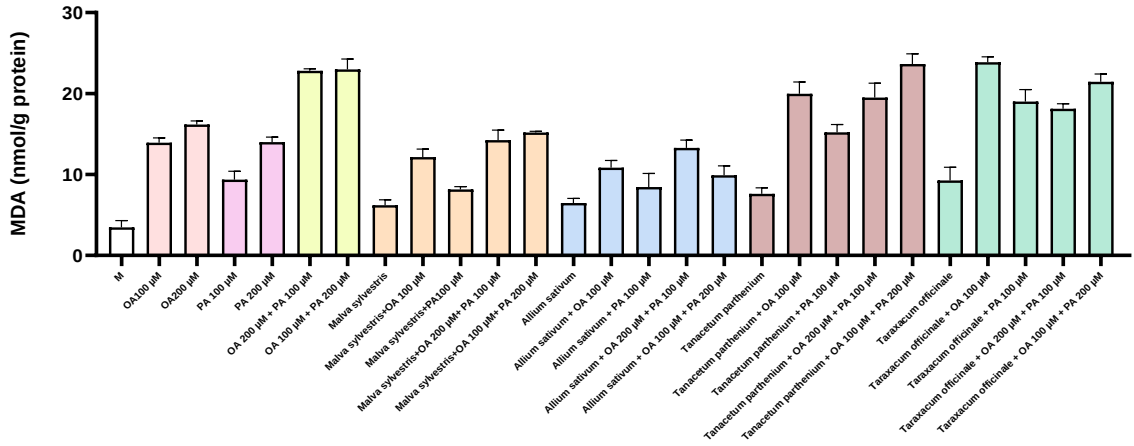
4.4.2. Lipit peroksidasyon tayini (MDA)

Lipit peroksidasyon göstergesi olan MDA tayini, tiyobarbitirik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen kromoforik bir bileşik vermesi esasına dayanmaktadır. Tetrametoksipropen (TMP) standart olarak kullanılmış ve sonuçlar nmol/g cinsinden verilmiştir (Daraie vd., 2012).

Ekstrelerin lipit peroksidasyon tayinlerine ait grafikler Şekil 4.27. ve Şekil 4.28.'de özetlenmiştir. İnsan karaciğer hepatoselüler karsinoma hücrelerinde (HepG2), MDA düzeylerinde Oleik asit, Palmitik asit ve kombinasyonları ile muamele edilmesiyle normal kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre oleik asit ve palmitik asitle indüklenen MDA düzeyini en fazla *A. sativum* metanol ve *M. sylvestris* sulu etanol ekstralarının düşürdüğü görülmektedir. *P. ovata* ve *T. parthenium* ekstralarından alınan sonuçlar ise serbest asitle indüklenen hücre ortamına göre değişiklik göstermemiştir.



Şekil 4.27. *S. fruticosa* ve *P. ovata* ekstraları ve resveratrolün MDA sonuçları (nmol / protein)



Şekil 4.28. *M. sylvestris*, *A. sativum*, *T. parthenium* ve *T. officinale* ekstrelerinin MDA sonuçları (nmol/protein)

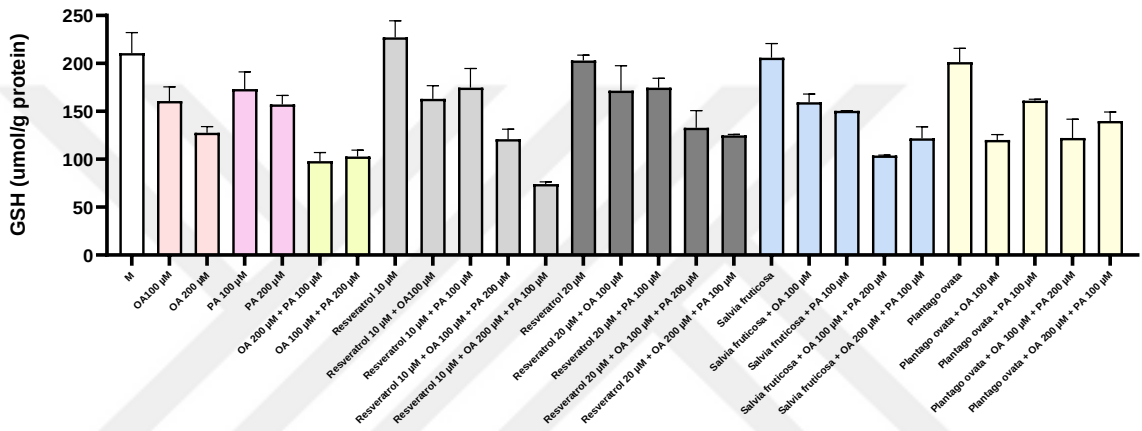
Lipit peroksidasyon düzeylerine ait sonuçlar pozitif kontrol olarak kullanılan resveratrolle karşılaştırılmıştır. Resveratrol hücre ortamındaki MDA düzeyini (nmol/g protein) %31,8 oranında azaltırken, *A. sativum* metanol ekstresi %48,2, *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi ise %36,4 oranında düşürmüştür. *S. fruticosa* etanol ekstresi ise pozitif kontrol olan resveratrole yakın bir değerde, %27,3 oranında bir azalmaya neden olmuştur. Lipit peroksidasyon deneylerinden elde edilen sonuçlara göre *A. sativum* ekstresi MDA düzeylerini en fazla oranda düşürürken, *T. parthenium* ekstresi ise MDA düzeylerinde artışa neden olmuştur.

4.4.3. Glutasyon (GSH) tayini

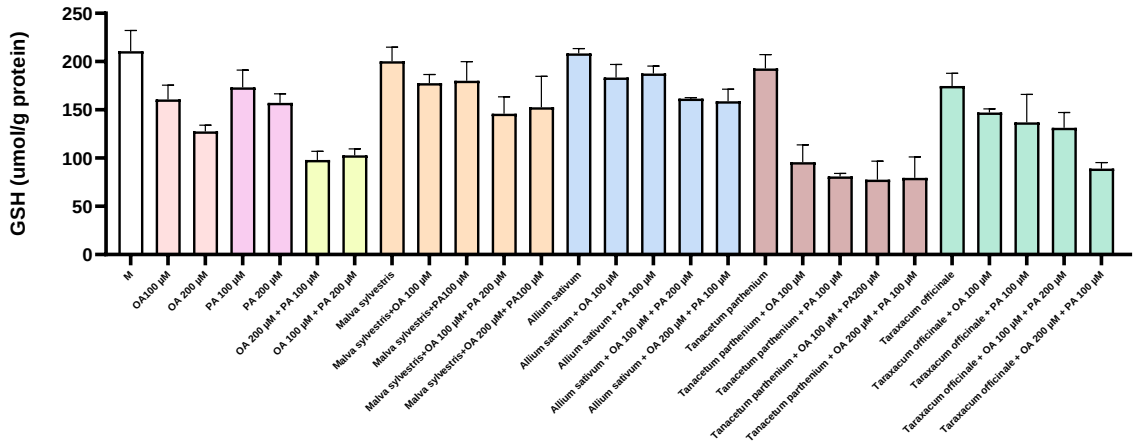
Glutasyon, dokularda ve hücrelerde oksidatif strese karşı hücresel savunmada kritik rol oynayan bir tiyoldür. DTNB (Ellman's reagent), tiyol grupları ile reaksiyona girer ve yapısındaki disülfid bağları parçalanır. Oluşan TNB^- , nötr ya da alkali ortamda TNB^{-2} 'ye dönüşür ve sarı kromoforik grup verir (Sedlak and Lindsey, 1968). Düşük molekül ağırlıklı bir tiyol olan glutasyon da bu prensibe dayanarak ölçülmüştür.

Ekstrelerin glutasyon tayinlerine ait sonuçlar Şekil 4.29. ve Şekil 4.30.'da verilmiştir. GSH düzeylerinin değerlendirilmesi sonucunda elde edilen veriler pozitif kontrol olarak kullanılan resveratrolle karşılaştırılmıştır. İnsan karaciğer hepatoselüler karsinoma hücrelerinde (HepG2), GSH düzeylerinde Oleik asit, Palmitik asit ve

kombinasyonları ile muamele edilmesiyle normal kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma gözlenmiştir. Resveratrol hücre ortamındaki GSH düzeyini ($\mu\text{mol/g}$ protein) %27,9 oranında arttırırken, *A. sativum* metanol ekstresi %59,1, *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi ise %49,7 oranında yükseltmiştir. *P. ovata* metanol ekstresi ise pozitif kontrol olan resveratrole yakın bir değerde, %29,1 oranında etkili olmuştur. Buna göre en çok MDA düzeylerini *A. sativum* ekstresi en fazla oranda arttırırken, *T. parthenium* ekstresi ise hücre kültüründe MDA düzeylerinin azalmasına neden olmuştur.



Şekil 4.29. *S. fruticosa* ve *P. ovata* ekstreleri ve resveratrolün GSH sonuçları ($\mu\text{mol} / \text{protein}$)



Şekil 4.30. *M. sylvestris*, *A. sativum*, *T. parthenium* ve *T. officinale* ekstrelerinin GSH sonuçları ($\mu\text{mol/protein}$)

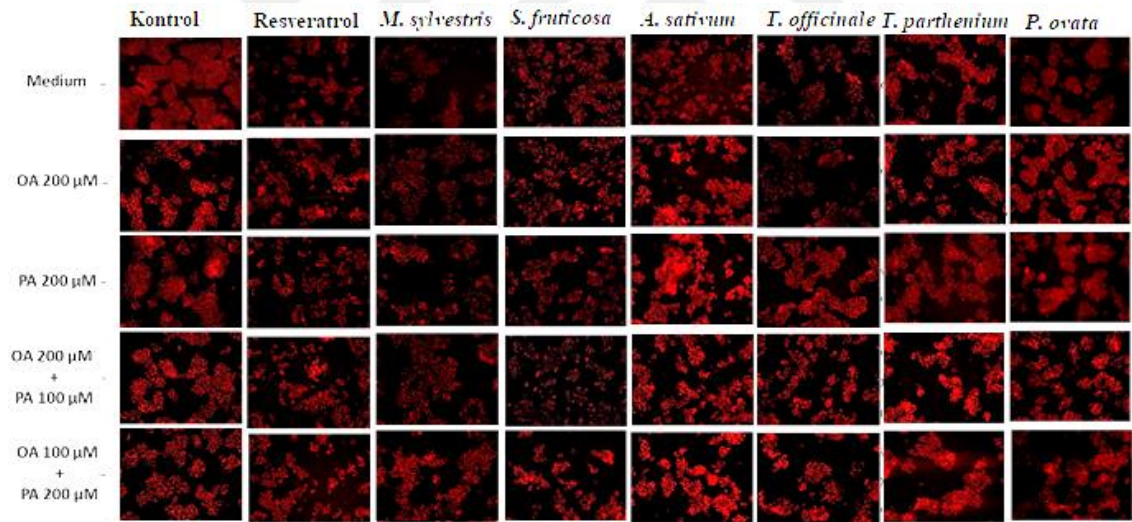
Bu sonuçlara göre oleik asit ve palmitik asit etkisiyle azalan glutatyon düzeyini en fazla *M. sylvestris* ve *A. sativum* ekstrelerinin yükselttiği görülmektedir. *T. officinale*

ekstresinden alınan sonuçlar bu deney için bir değişikliğe neden olmamışken, *T. parthenium* ekstresinin ise GSH seviyelerinde azalmaya neden olduğu görülmüştür.

4.4.4. Nil Red boyama ile yağ hücrelerinin tespiti

Nil Red, floresan özellik gösteren ve lipofilik bir boya olup yağ hücrelerinin boyanmasında kullanılır (Izdebska vd., 2010). Hücre kültürü ortamında steatoz durumu floresan mikroskobu ile tespit edilmiştir. Ortamdaki yağ damlacıklarının tespiti de Nil Red boyası ile tespit edilmiş olup sonuçlara ait floresan mikroskobu görüntüleri Şekil 4.31.'de yer almaktadır.

Floresan mikroskopi görüntülerinden yola çıkılarak *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ile muamele edilen hücre ortamlarında yağ damlacıkları daha az miktarda tespit edilmiştir.



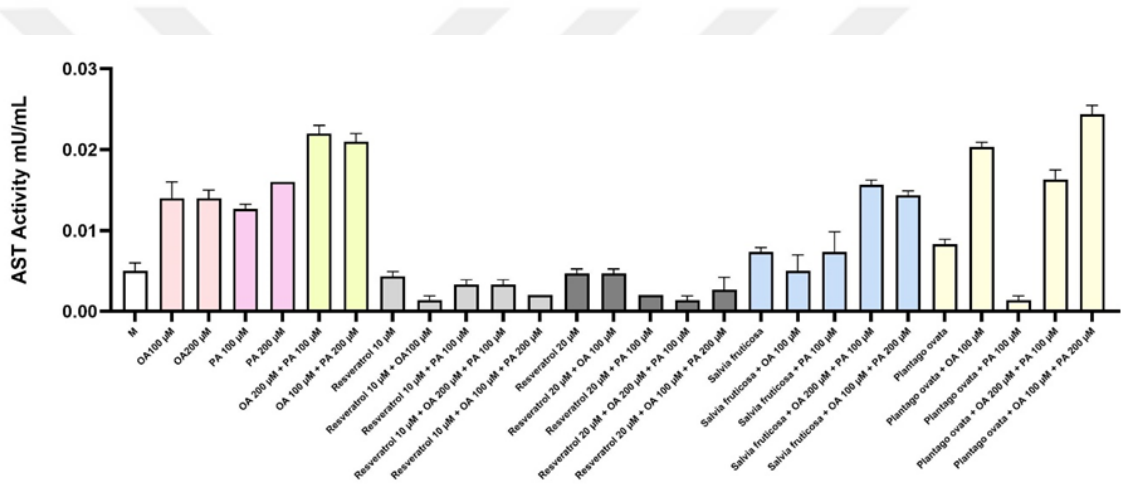
Şekil 4.31. Normal hücre ortamında ve oleik asit ve palmitik asitle yağlandırılan hücre ortamlarındaki ekstre gruplarında Nil red boyama sonucu yağ damlacıkları ve steatoz görünümü (OA: Oleik asit; PA: Palmitik asit)

4.4.5. Alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktivitelerinin belirlenmesi

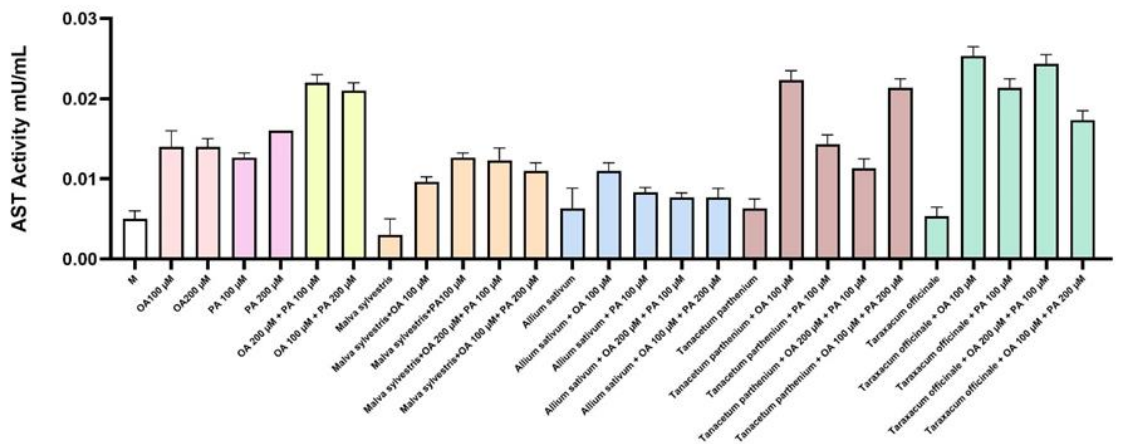
Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) testi bir antijen (mikroorganizmanın özel bir proteini) ve bir antikor (antijene karşı üretilen protein yapısındaki molekül) arasındaki reaksiyonu gösterir ve enzim aktivitesini kolorimetrik olarak ölçer. ALT ve AST

hücrelerin sitoplazmasında bulunan hepatik enzimlerdir. Karaciğer hücre hasarında ALT ve AST düzeylerindeki artış karaciğer hasarının göstergesi olarak kabul edilmektedir (She vd., 2016).

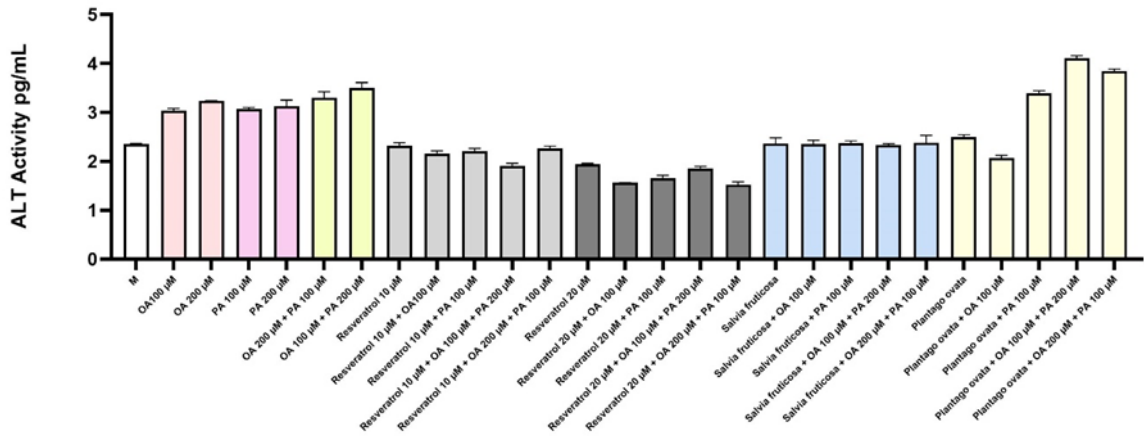
Hücre kültürü çalışmasında AST ve ALT düzeyleri ELISA kitleri ile üretici firmanın talimatına göre ölçülmüştür. Ölçümler için 20 μ L hücre süpernatantı kullanılmıştır (Human AST ELISA Kit /ab263881 ve Human ALT ELISA Kit/ab234578). 6 ekstrenin hücre kültürü süpernatantındaki ALT ve AST düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar AST için Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.'te, ALT için Şekil 4.34. ve Şekil 4.35.'te gösterilmiştir.



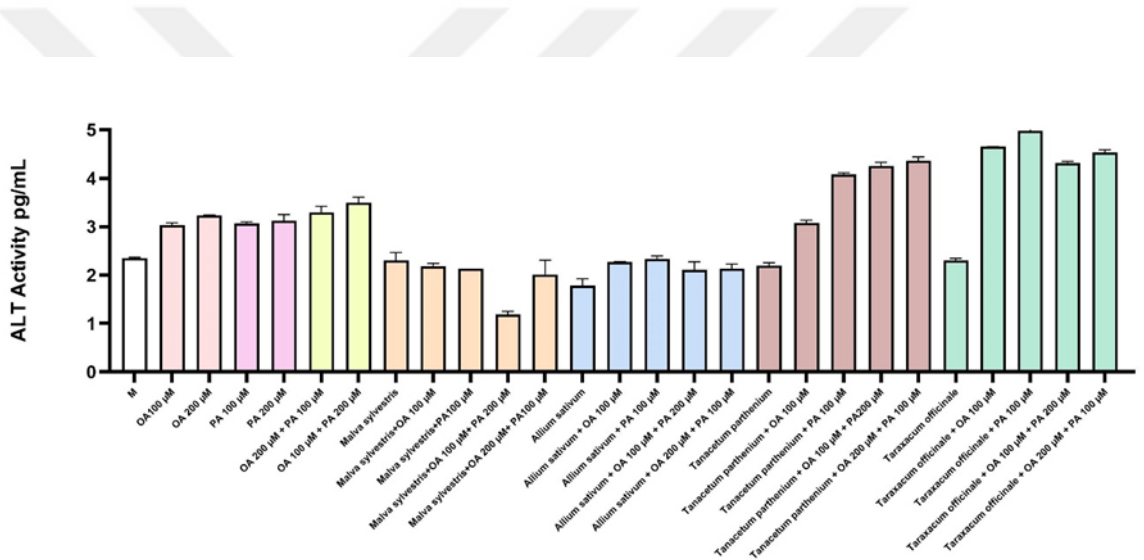
Şekil 4.32. *S. fruticosa* ve *P. ovata* ekstreleri ve resveratrolün AST düzeyleri (mU / mL)



Şekil 4.33. *M. sylvestris*, *A. sativum*, *T. parthenium* ve *T. officinale* ekstrelerinin AST düzeyleri (mU/mL)



Şekil 4.34. *S. fruticosa* ve *P. ovata* ekstreleri ve resveratrolün ALT düzeyleri (pg / mL)



Şekil 4.35. *M. sylvestris*, *A. sativum*, *T. parthenium* ve *T. officinale* ekstrelerinin ALT düzeyleri (pg/mL)

İnsan karaciğer hepatoselüler karsinoma hücrelerinde (HepG2), AST ve ALT enzim düzeylerinde oleik asit, palmitik asit ve kombinasyonları ile muamele edilmesiyle boş medyumla karşılaştırıldığında artış gözlenmiştir. Bu deneyde alınan sonuçlara göre AST seviyesini en fazla %65 ve %46,5 oranında sırasıyla *A. sativum* ve *M. sylvestris* ekstrelerinin düşürdüğü görülmektedir. ALT deneyi için ise sırasıyla %53,5 ve %38,5 olacak şekilde *S. fruticosa* ve *M. sylvestris* ekstrelerinden alınan sonuçlar daha etkili bulunmuştur. Her iki enzim için de *M. sylvestris* ekstresinin iyi sonuç verdiği görülmektedir. Her iki deney için de *T. officinale* ve *T. parthenium* ekstrelerine ait

sonuçların ALT ve AST seviyelerini beklenenin aksine yükselttiği tespit edilmiştir. Resveratrol ise ALT seviyelerini %30,9, AST seviyelerini ise %93 oranında düşürmüştür.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ekstrelerin *in vitro* ortamda karaciğer yağlanması karşı koruyucu etkilerinin 0,25 mg/mL konsantrasyonda çalışılabileceği belirlenmiştir. Lipit peroksidasyon deneylerinden elde edilen sonuçlara göre *A. sativum* ekstresi MDA düzeylerini en fazla oranda düşürürken, *T. parthenium* ekstresi ise MDA düzeylerinde artışa neden olmuştur. Oleik asit ve palmitik asit etkisiyle azalan glutatyon düzeyini en fazla *M. sylvestris* ve *A. sativum* ekstrelerinin yükselttiği bulunmuştur. *T. officinale* ekstresinden alınan sonuçlar bu deney için değişikliğe neden olmamışken, *T. parthenium* ekstresinin ise GSH seviyelerinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Nil Red boyama ile yağ damlacıklarının tespiti deneyinde floresan mikroskopi görüntülerinden yola çıkılarak *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri ile muamele edilen hücre ortamlarında yağ damlacıkları daha az miktarda tespit edilmiştir. ALT ve AST enzim düzeyleri için de *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstrelerinin iyi sonuç verdiği görülmektedir. Her iki deney için de *T. officinale* ve *T. parthenium* ekstrelerine ait sonuçların ALT ve AST seviyelerini yükselttiği tespit edilmiştir. *In vitro* deney sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 4.10.'da verilmiştir.

Tablo 4.10. Karşılaştırmalı *in vitro* deney sonuçları

	<i>A. sativum</i>	<i>M. sylvestris</i>	<i>S. fruticosa</i>	<i>P. ovata</i>	<i>T. officinale</i>	<i>T. parthenium</i>
Lipit peroksidasyon	%48,2	%36,4	%27,3	+%9,1	%11,4	%0,5
Glutatyon	%59,1	%49,7	%12,3	%29,1	%9,2	-%22
Nil Red Boyama	-	Çok iyi	İyi	-	İyi	-
ALT	%50,2	%38,5	+%37,5	%53,5	+%29,4	+%23,4
AST	%65	%46,5	%0,1	%27,9	%0,3	%20,9

Tüm bu deneylerde alınan sonuçlar doğrultusunda *in vitro* çalışmalar sonucunda denenen 6 ekstre içerisinde *in vivo* deneyler için *M. sylvestris* sulu etanol ve *S. fruticosa* etanol ekstreleri seçilmiş ve hazırlanan formülasyonlara ayrı ayrı yüklenerek yağlı diyetle beslenen sıçanlara gavaj yoluyla verilmiştir.

4.5. In vivo Karaciğer Yağlanması

4.5.1. Akut oral toksisite

M. sylvestris ve *S. fruticosa* ekstreleri değişen dozlarda (5-2000 mg/kg) sıçanlara (n=3) oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. Uygulama sonrası 6, 12, 18 ve 24. saatlerde ve devam 14 gün boyunca yapılan takipler sonrası *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri ile tükürük, gözyaşı, terleme, piloereksiyon, iseme veya dışkılamada hiçbir değişiklik gözlenmemiştir. Hayvanlar; uyuşukluk, saldırganlık, titreme, konvülsiyon, motor koordinasyon açısından gözlemlenmemiş ve hayvanların hiçbirinde anormallik belirtilerine rastlanmamıştır. Yürüyüş, doğrulma refleksi ve kornea refleksi normal olarak tespit edilmiştir. Hayvanların derisi, kürkü, gözleri ve vücut ağırlığı da normal olarak gözlemlenmiştir. Çalışma sırasında titreme, uyuşukluk, ishal ve koma gözlenmemiştir.

4.5.2. Non-alkolik yağlı karaciğer modeli

12 farklı gruba ayrılan 96 Wistar albino sıçana ait ağırlık takibi haftalık olarak yapılmıştır. Hayvanlara ait beslemeye başlangıç-gavaja başlangıç ve deneyin sonlandırılacağı gün kaydedilen ağırlık bilgilerini deney gruplarının ayrı ayrı ağırlık ortalaması şeklinde içeren çizelge Tablo 4.11.'de yer almaktadır.

Tablo 4.11. Hayvan gruplarının ağırlık ortalamaları (0., 7. ve 15. Haftalar) ($\pm$ SS)

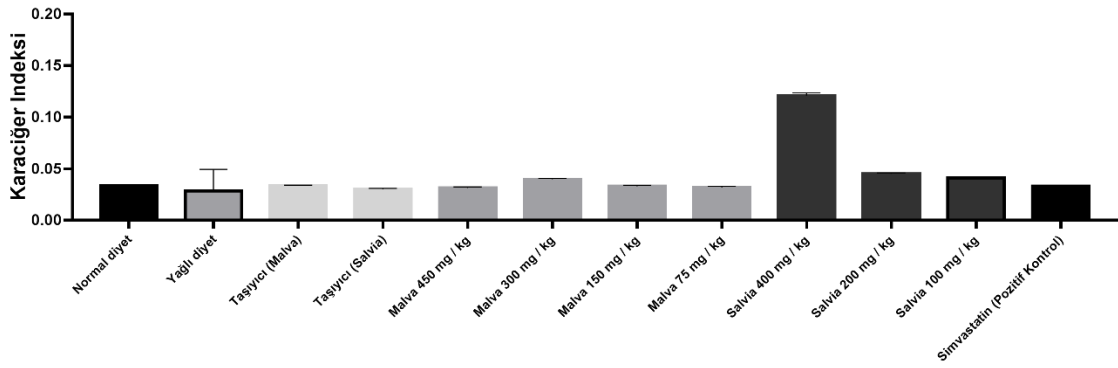
Grup	1. hafta	7. hafta	15. hafta	0-7. haftalar arasında kilo artış hızı (A)	7-15. haftalar arasında kilo artış hızı (B)
Normal Diyet Kontrol Grubu	227 $\pm$ 2,9	245,2 $\pm$ 1,2	257,6 $\pm$ 2,92	%7,9	%5,1
Yağlı Beslenme Kontrol Grubu	224,6 $\pm$ 3,1	269,1 $\pm$ 3,88	289,9 $\pm$ 1,3	%20,1	%7,5
Taşıyıcı M1 Grubu (<i>M. sylvestris</i>)	221,7 $\pm$ 2,3	253 $\pm$ 2,98	261 $\pm$ 3,78	%14,4	%3,1
Taşıyıcı M2 Grubu (<i>S. fruticosa</i>)	236,2 $\pm$ 3,1	280,5 $\pm$ 1,78	297 $\pm$ 2,88	%18,6	%6,1
<i>M. sylvestris</i> 75 mg/kg Grubu	228,7 $\pm$ 3,11	293,6 $\pm$ 2,95	393 $\pm$ 2,85	%22,2	%34,1

Tablo 4.11. (Devam) Hayvan gruplarının ağırlık ortalamaları (0., 7. ve 15. Haftalar) ($\pm$ SS)

Grup	1. hafta	7. hafta	15. hafta	0-7. haftalar arasında kilo artış hızı (A)	7-15. haftalar arasında kilo artış hızı (B)
<i>M. sylvestris</i> 150 mg/kg Grubu	207,3 $\pm$ 2,78	280,8 $\pm$ 3,45	305,33 $\pm$ 2,11	%26,1	%8,9
<i>M. sylvestris</i> 300 mg/kg Grubu	212,6 $\pm$ 3,42	248,1 $\pm$ 4,55	304,3 $\pm$ 4,1	%17	%22,5
<i>M. sylvestris</i> 450 mg/kg Grubu	284,8 $\pm$ 3,65	357,75 $\pm$ 3,55	386,7 $\pm$ 2,57	%25,7	%8,12
<i>S. fruticosa</i> 100 mg/kg Grubu	225,3 $\pm$ 2,43	297,37 $\pm$ 2,45	293,28 $\pm$ 2,18	%32	-%1,35
<i>S. fruticosa</i> 200 mg/kg Grubu	213,25 $\pm$ 1,75	286 $\pm$ 2	289 $\pm$ 2,15	%32,4	%1,01
<i>S. fruticosa</i> 400 mg/kg Grubu	239 $\pm$ 2,54	305,5 $\pm$ 2,87	304,75 $\pm$ 2,88	%27,6	-%0,25
Pozitif Kontrol (Simvastatin) Grubu	238,5 $\pm$ 3,13	307,3 $\pm$ 2,65	333,75 $\pm$ 2,1	%28,99	%8,4

Ağırlık tartımlarının ortalamasından alınan sonuçlara göre gavaja başlanan 7. haftadan sonra özellikle *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta vücut kütlesi artışında yavaşlama, hatta hayvanların yağlı beslenme diyetleri devam etmesine rağmen vücut kütle indekslerinde azalma görülmüştür.

Sıçanların anestezi altında dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edilmesinden sonra her bir sıçandan çıkarılan karaciğerlerin ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir. Buradan hareketle Formül 2'ye göre karaciğer indeksi hesaplanmıştır. Hayvanlara ait karaciğer indeksi sonuçları hayvan gruplarının ortalaması olarak Şekil 4.42.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.36. Deney gruplarının karaciğer indeksi ortalamaları

Şekil 4.36.'da yer alan verilere göre karaciğer indeksi sonuçlarından *S. fruticosa* ekstresinin sıçanların vücut kütlelerinde azalmaya neden olduğu ancak karaciğer kütlesinin azalmasına etki etmediği anlaşılmaktadır. *M. sylvestris* ekstresi verilen sıçanların karaciğer indeksi değerlerinden ise *M. sylvestris* ekstresi yüklü formülasyonun vücut kütlesinin artışını önlemediği ancak karaciğer kütlesindeki artışı yavaşlattığı sonucu çıkarılmaktadır.

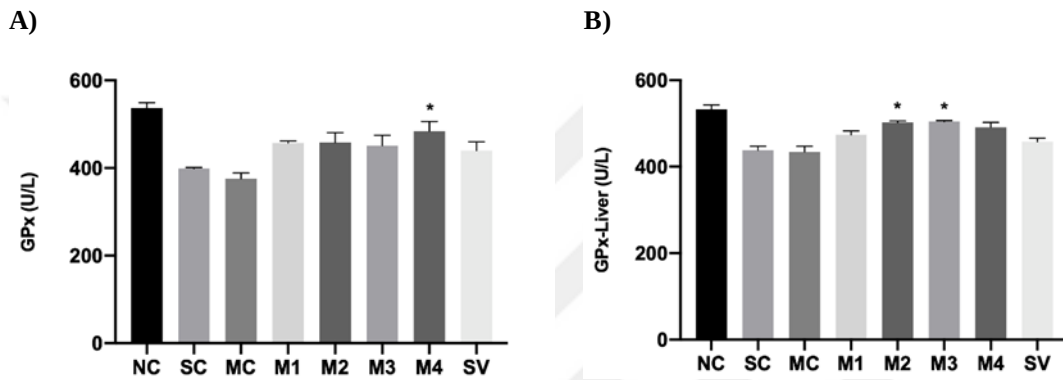
4.5.3. Serum ve karaciğer örneklerinden biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi

Serum lipitlerini değerlendirmek için total kolesterol (TC), trigliserit (TG), düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-C), yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL-C) seviyeleri ölçülmüştür. Karaciğer fonksiyonunu değerlendirmek için ALT, AST, alkaline fosfotaz (ALP) seviyeleri; Antioksidan seviyelerini değerlendirmek için SOD, GSH-Px, malondiadehit (MDA) seviyeleri değerlendirilmiştir. İnsülin direncini değerlendirmek için serum glikoz ve insülin seviyeleri ölçülmüştür. Karaciğer örneklerinde ise SOD, GSH-Px, malondiadehit (MDA) ve trigliserit seviyeleri ölçülmüştür. Deney gruplarında *M. sylvestris* ekstresi verilen gruplar için 4 farklı doz düşük dozdan yüksek doza doğru grafiklerde M1, M2, M3 ve M4 (sırasıyla 75, 150, 300 ve 450 mg/kg) olarak kodlanmıştır. *S. fruticosa* verilen sıçanlarda ise 3 farklı doz Sa1, Sa2 ve Sa3 (sırasıyla 100, 200 ve 400 mg/kg) olarak düşük dozdan yüksek doza doğru kodlanmıştır. Normal diyetle beslenen grup grafiklerde NC olarak kodlanırken, yağlı diyetle beslenen kontrol grubu ise SC olarak kodlanmıştır. Pozitif kontrol simvastatin

grubu ise SV olarak kodlanmıştır. Taşıyıcı grupları *M. sylvestris* verilen grubun taşıyıcısı için MC; *S. fruticosa* verilen grubun taşıyıcısı için ise SaC şeklinde belirtilmiştir.

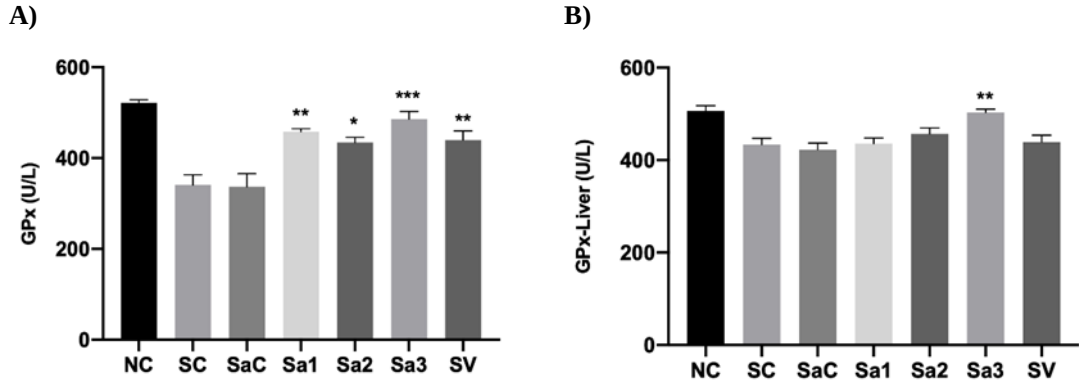
4.5.3.1. Karaciğer ve serum örneklerinin glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ölçümleri

Karaciğer ve serum örneklerinden ölçülen GSH-Px seviyeleri *M. sylvestris* ekstresi verilen grup için Şekil 4.37.'de, *S. fruticosa* ekstresi verilen grup için Şekil 4.38.'de yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 4.37. *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen glutatyon peroksidaz seviyeleri (U / L). * $p < 0.05$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: Boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.37.'de verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen (HFD) gruba (SC) göre *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi verilen gruplarda hem serum hem karaciğer örneklerinde GSH-Px seviyelerinde bir artış gözlemlenmiştir. Taşıyıcı (MC) verilen grupta serum glutatyon seviyesinde yağlı karaciğer grubuna göre %5,7 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında 450 mg/kg dozda *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta ise serum GSH-Px seviyeleri %25,3 ($p < 0.05$) oranında bir artış göstermiştir. Karaciğer GSH-Px seviyesi için ise taşıyıcı grup ile yağlı karaciğer grubu arasında bir fark gözlemlenmezken 300 mg/kg dozlarda *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta karaciğer GSH-Px seviyelerinde %15,6 ($p < 0.05$) oranında bir artış tespit edilmiştir.

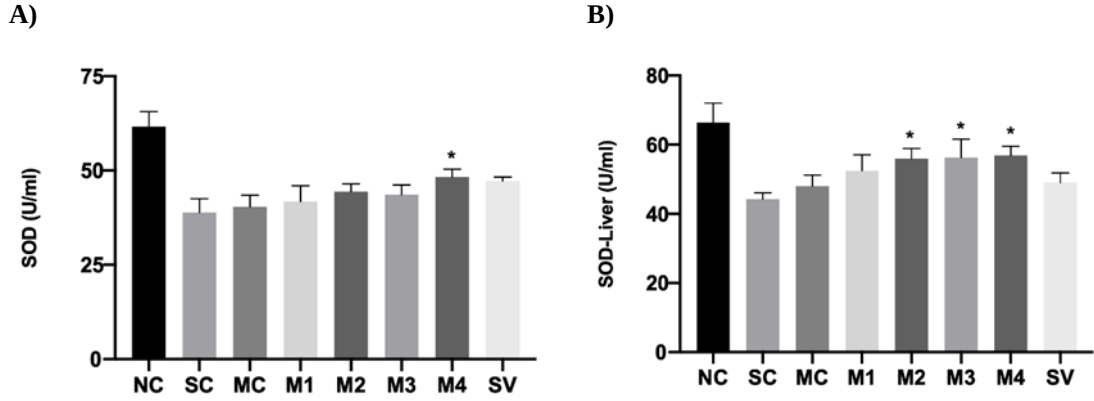


Şekil 4.38. *S. fruticosa* etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen glutatyon peroksidaz seviyeleri (U / L). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, SaC: Boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.38.'de verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre *S. fruticosa* etanol ekstresi verilen gruplarda hem serum hem karaciğer örneklerinde GSH-Px seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Taşıyıcı (SaC) verilen grupta serum glutatyon seviyesinde yağlı karaciğer grubuna göre %1,1 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında 400 mg/kg dozda *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta ise serum GSH-Px seviyeleri %41,5 ($p<0.001$) oranında bir artış göstermiştir. Karaciğer GSH-Px seviyesi için ise taşıyıcı grup ile yağlı karaciğer grubu arasında fark gözlemlenmezken 400 mg/kg dozlarda *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta karaciğer GSH-Px seviyelerinde %19,4 ($p<0.01$) oranında bir artış tespit edilmiştir.

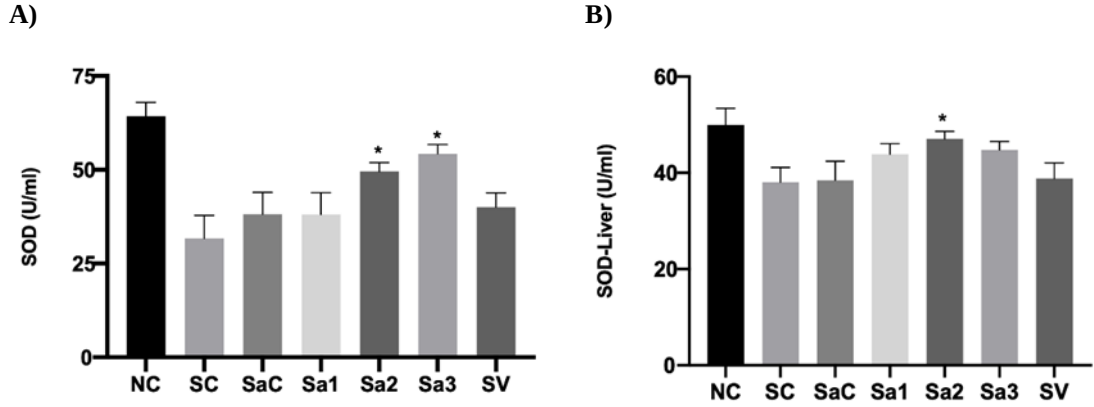
4.5.3.2. Karaciğer ve serum örneklerinin süper oksit dismütaz (SOD) ölçümleri

Karaciğer ve serum örneklerinden ölçülen SOD seviyeleri *M. sylvestris* ekstresi verilen grup için Şekil 4.39.'da, *S. fruticosa* ekstresi verilen grup için Şekil 4.40.'ta yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 4.39. *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen süper oksit dismütaz seviyeleri (U / mL) * $p<0.05$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: Boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.39.'da verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi verilen gruplarda hem serum hem karaciğer örneklerinde SOD seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında taşıyıcı grubunda (MC) serum SOD seviyelerinde %4,2, karaciğer SOD seviyelerinde ise %8,6 oranında bir artış görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında serum SOD seviyeleri için 450 mg/kg dozu %21,3 ($p<0.05$) oranında bir artış gösterirken, karaciğer SOD seviyesi %22,2 ($p<0.05$) oranında artmıştır.

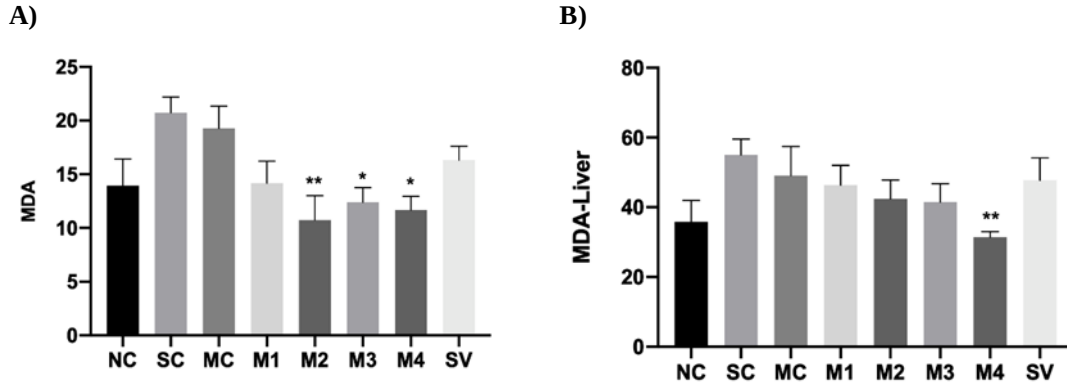


Şekil 4.40. *S. fruticosa* etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen süper oksit dismütaz seviyeleri (U / mL). * $p<0.05$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, SaC: Boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.40.'ta verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre *S. fruticosa* etanol ekstresi verilen gruplarda hem serum hem karaciğer örneklerinde SOD seviyelerinde bir artış gözlemlenmiştir. HDF grubu ile karşılaştırıldığında taşıyıcı grubunda (SaC) serum SOD seviyelerinde %20,6 oranında bir artış görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında serum SOD seviyeleri için 400 mg/kg dozu %41,4 ($p<0.05$) oranında bir artış gösterirken, karaciğer SOD seviyesi 200 mg/kg ekstre verilen grupta %23,6 ($p<0.05$) oranında artmıştır.

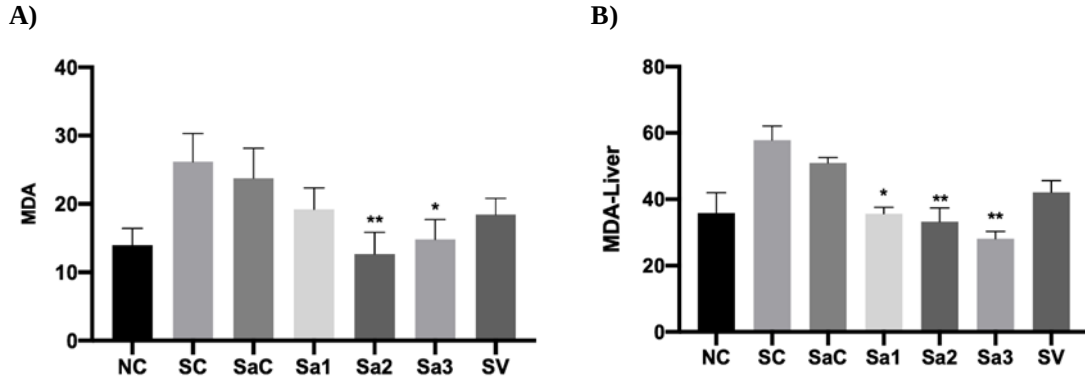
4.5.3.3. Karaciğer ve serum örneklerinin malondialdehit (MDA) ölçümleri

Karaciğer ve serum örneklerinden ölçülen malondialdehit seviyeleri *M. sylvestris* ekstresi verilen grup için Şekil 4.41.'de, *S. fruticosa* ekstresi verilen grup için Şekil 4.42.'de yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 4.41. *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen malondialdehit seviyeleri * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: Boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.41.'de verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi verilen tüm gruplarda hem serum hem karaciğer örneklerinde malondialdehit seviyelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında taşıyıcı grubunda (MC) serum MDA seviyelerinde %7,8, karaciğer MDA seviyelerinde ise %10,1 oranında bir azalma görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında serum MDA seviyeleri için 150 mg/kg dozu %48,1 ($p < 0.01$) oranında bir azalma gösterirken, 450 mg/kg dozunda karaciğer MDA seviyesinde %42,4 ($p < 0.01$) oranında azalma tespit edilmiştir.

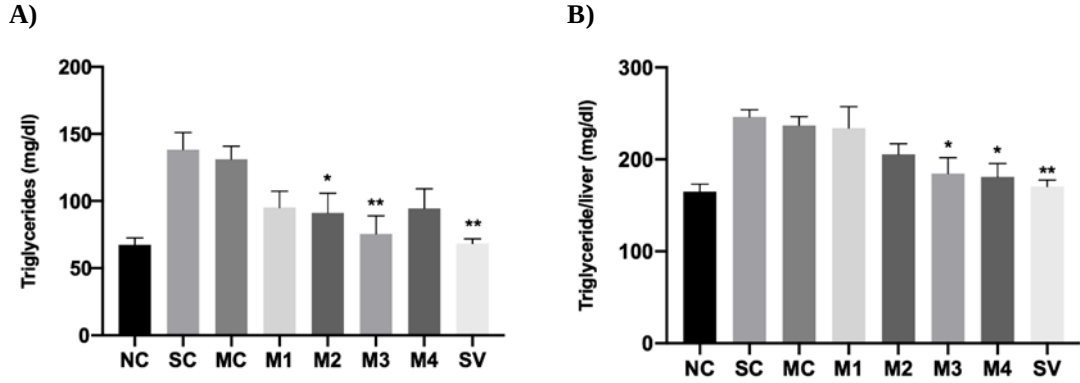


Şekil 4.42. *S. fruticosa* etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen malondialdehit seviyeleri. * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, SaC: Boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.42.'de verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre *S. fruticosa* etanol ekstresi verilen tüm gruplarda hem serum hem karaciğer örneklerinde malondialdehit seviyelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında taşıyıcı grubunda (SaC) serum MDA seviyelerinde %9,2, karaciğer MDA seviyelerinde ise %11,9 oranında bir azalma görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında serum MDA seviyeleri için 200 mg/kg dozu %48,6 ($p < 0.01$) oranında bir azalma gösterirken, 400 mg/kg dozunda karaciğer MDA seviyesinde %43,7 ($p < 0.01$) oranında azalma tespit edilmiştir.

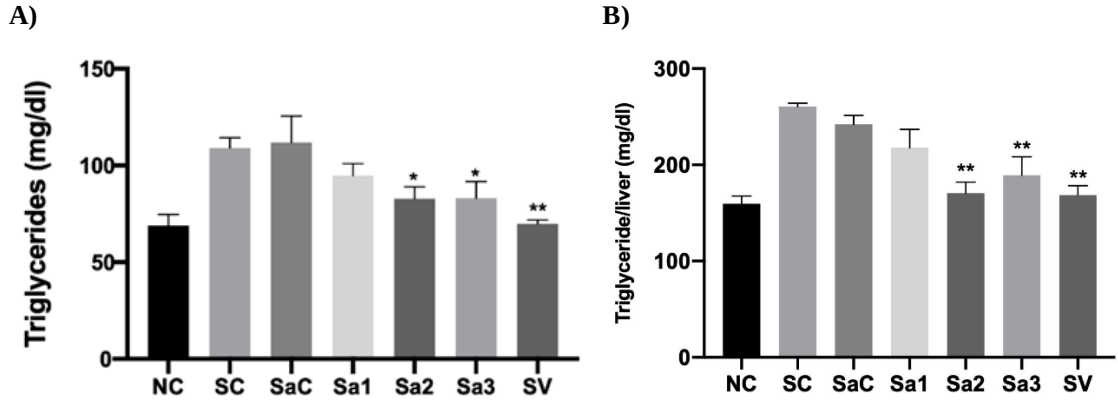
4.5.3.4. Karaciğer ve serum örneklerinin trigliserit (TG) ölçümleri

Karaciğer ve serum örneklerinden ölçülen trigliserit seviyeleri *M. sylvestris* ekstresi verilen grup için Şekil 4.43.'te, *S. fruticosa* ekstresi verilen grup için Şekil 4.44.'te yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 4.43. *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen trigliserit seviyeleri (mg / dl). * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: Boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.43.'te verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre *M. sylvestris* sulu etanol ekstresi verilen tüm gruplarda hem serum hem karaciğer örneklerinde trigliserit seviyelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında taşıyıcı grubunda (MC) serum trigliserit seviyelerinde %5,3, karaciğer trigliserit seviyelerinde ise %3,2 oranında bir azalma görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında serum trigliserit seviyeleri için 300 mg/kg ekstre verilen grupta %45,3 ($p < 0.01$) oranında bir azalma gözlenirken, 450 mg/kg ekstre verilen grupta karaciğer trigliserit seviyesinde %25,1 ($p < 0.01$) oranında azalma tespit edilmiştir. Simvastatin grubunda ise serum ve karaciğer trigliserit seviyeleri için sırasıyla %50,2 ve %30,4 oranında bir düşüş görülmüştür.

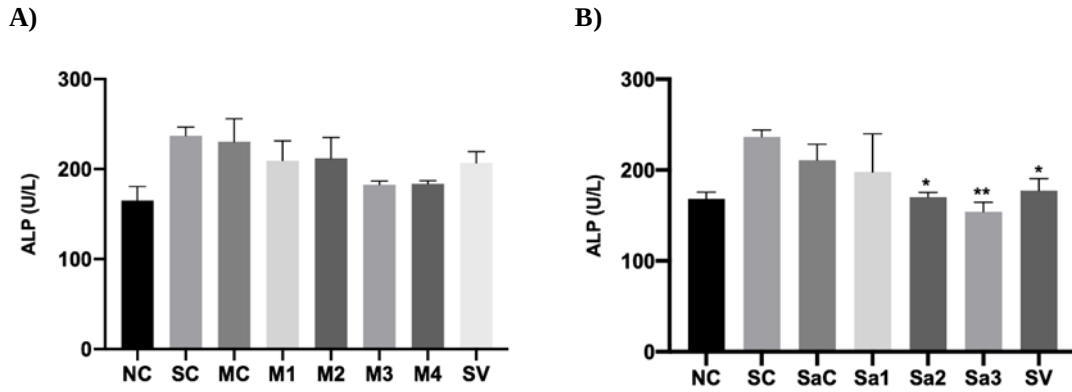


Şekil 4.44. *S. fruticosa* etanol ekstresi verilen grupların serum (A) ve karaciğer (B) örneklerinden ölçülen trigliserit seviyeleri (mg / dl) * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, SaC: Boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.44.'te verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre *S. fruticosa* etanol ekstresi verilen tüm gruplarda hem serum hem karaciğer örneklerindeki trigliserit seviyelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında taşıyıcı grubunda (SaC) serum trigliserit seviyelerinde %2,6 artış, karaciğer trigliserit seviyelerinde ise %7,2 oranında bir düşüş görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında serum ve karaciğer trigliserit seviyeleri için 200 mg/kg ekstre verilen grupta sırasıyla %26,3 ($p < 0.05$) ve %34,4 ($p < 0.01$) oranında düşüş tespit edilmiştir. Simvastatin grubunda ise serum ve karaciğer trigliserit seviyeleri için sırasıyla %45,2 ve %45,4 oranında bir düşüş görülmüştür.

4.5.3.5. Serum örneklerinin alkalen fosfataz (ALP) ölçümleri

Serum örneklerinden ölçülen alkalen fosfataz seviyeleri *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri verilen gruplar için Şekil 4.45.'te yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.

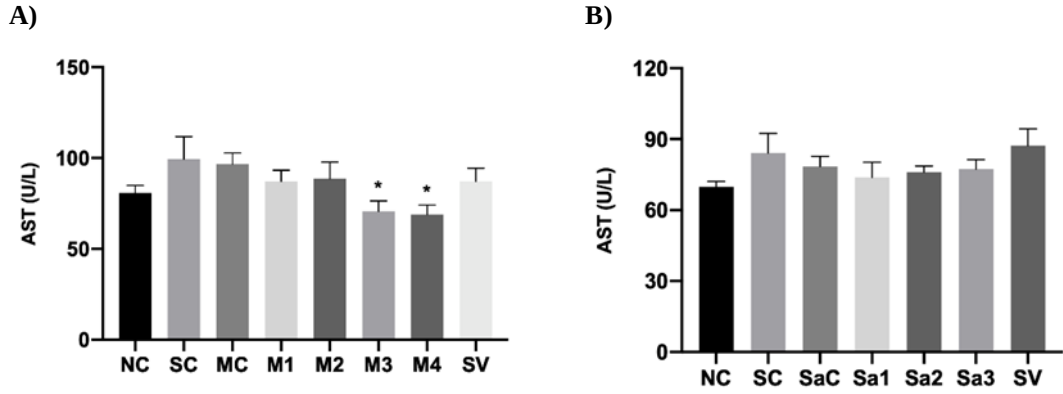


Şekil 4.45. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen alkalin fosfataz seviyeleri (U / L). * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.45.'te verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre ekstre verilen tüm gruplarda serum örneklerinde ALP seviyelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) ALP seviyelerinde %2,5, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) ALP seviyelerinde ise %10,8 oranında bir azalma görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında ALP seviyeleri için 300 ve 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen gruplarda yaklaşık %21 oranında bir azalma gözlenirken, 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta serum ALP seviyesinde %30,9 ($p < 0.01$) oranında azalma tespit edilmiştir. Simvastatin grubunda ise serum ALP seviyelerinde %10,1 oranında düşüş gözlemlenmiştir.

4.5.3.6. Serum örneklerinin aspartat aminotransferaz (AST) ölçümleri

Serum örneklerinden ölçülen AST seviyeleri *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri verilen gruplar için Şekil 4.46.'da yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.

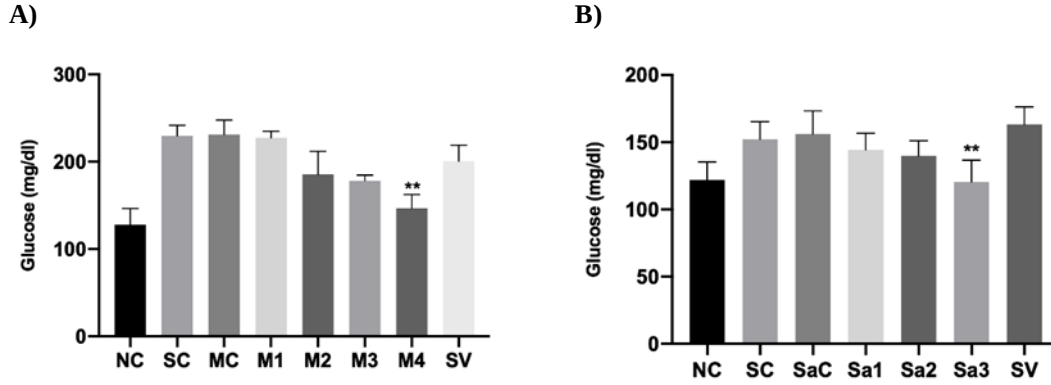


Şekil 4.46. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen aspartat aminotransferaz seviyeleri (U / L). * $p < 0.05$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.46.'da verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre ekstre verilen tüm gruplarda serum örneklerinde AST seviyelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) AST seviyelerinde %1,9, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) AST seviyelerinde ise %6,7 oranında bir azalma görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında AST seviyeleri için 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta %31 ($p < 0.05$) oranında bir azalma gözlenirken, 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta serum AST seviyesinde %5,6 oranında azalma tespit edilmiştir.

4.5.3.7. Serum örneklerinin glikoz ölçümleri

Serum örneklerinden ölçülen glikoz seviyeleri *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri verilen gruplar için Şekil 4.47.'de yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.

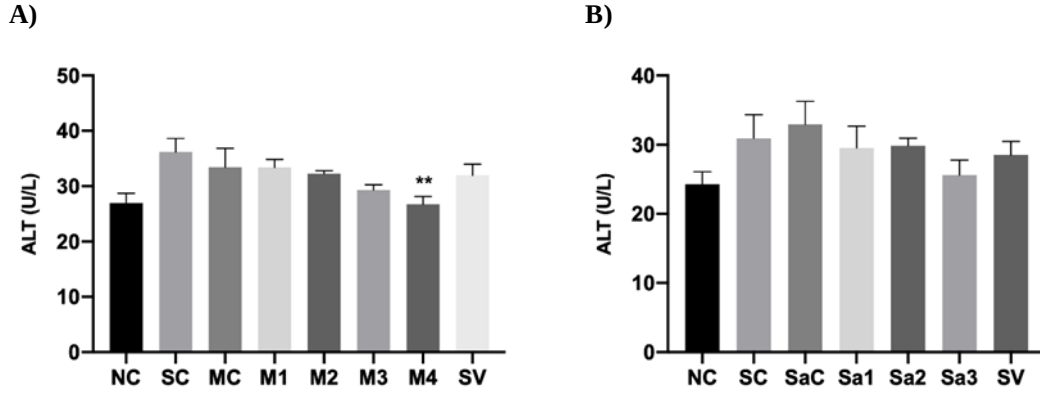


Şekil 4.47. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen glikoz seviyeleri (mg / dl). ** $p < 0.01$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.47.'de verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre ekstre verilen tüm gruplarda serum örneklerinde glikoz seviyelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) glikoz seviyelerinde bir değişiklik gözlemlenmezken, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) glikoz seviyelerinde ise %2,6 oranında bir artış görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında glikoz seviyeleri için 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta %37,8 ($p < 0.01$) oranında bir azalma gözlenirken, 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta serum glikoz seviyesinde %21,8 ($p < 0.01$) oranında azalma tespit edilmiştir.

4.5.3.8. Serum örneklerinin alanin aminotransferaz (ALT) ölçümleri

Serum örneklerinden ölçülen ALT seviyeleri *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri verilen gruplar için Şekil 4.48.'de yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.

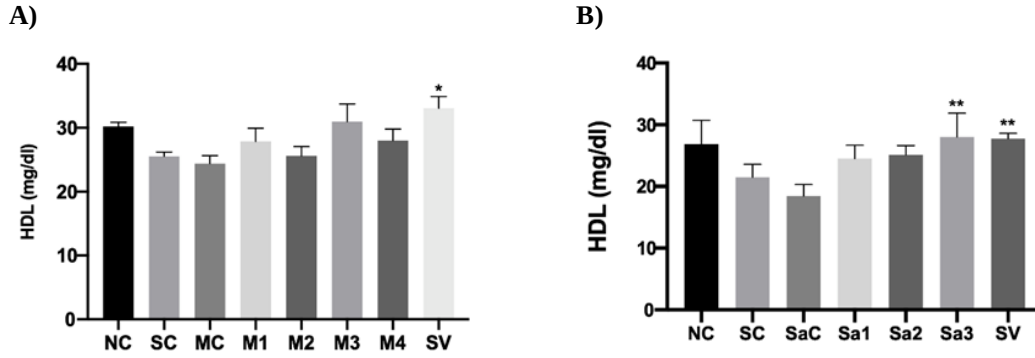


Şekil 4.48. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen alanin aminotransferaz seviyeleri (U/ L). ** $p < 0.01$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.48.'de verilen sonuçlar doğrultusunda yağlı beslenen gruba (SC) göre ekstre verilen tüm gruplarda serum örneklerinde ALT seviyelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) ALT seviyelerinde %7,1 oranında bir düşüş olurken, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) ALT seviyelerinde ise %6,4 oranında bir artış görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında ALT seviyeleri için 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta %24,4 ($p < 0.01$) oranında bir azalma gözlenirken, 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta serum ALT seviyesinde %19,4 oranında azalma tespit edilmiştir.

4.5.3.9. Serum örneklerinin yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ölçümleri

Serum örneklerinden ölçülen HDL seviyeleri *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri verilen gruplar için Şekil 4.49.'da yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.

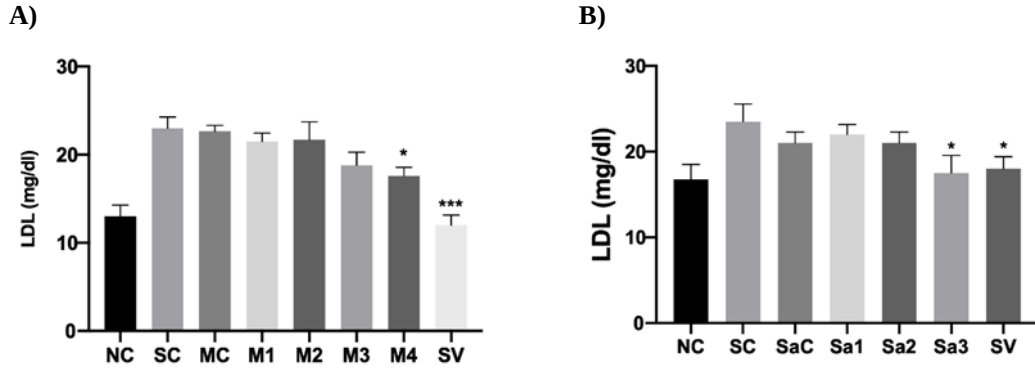


Şekil 4.49. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen HDL seviyeleri (mg / dl). * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.49.'da verilen sonuçlar doğrultusunda HFD grubuna göre ekstre verilen tüm gruplarda serum örneklerinde HDL seviyelerinde bir artış gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) HDL seviyelerinde %4,2 oranında bir düşüş olurken, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) HDL seviyelerinde ise %14,1 oranında bir düşüş görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında HDL seviyeleri için 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta %25,3 oranında bir artış gözlenirken, 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta serum HDL seviyesinde %40,7 ($p < 0.01$) oranında artış tespit edilmiştir. Pozitif kontrol simvastatin grubunda ise HFD grubuna göre serum HDL seviyelerinde %30,4 ($p < 0.05$) oranında bir artış gözlemlenmiştir.

4.5.3.10. Serum örneklerinin düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ölçümleri

Serum örneklerinden ölçülen LDL seviyeleri *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri verilen gruplar için Şekil 4.50.'de yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.

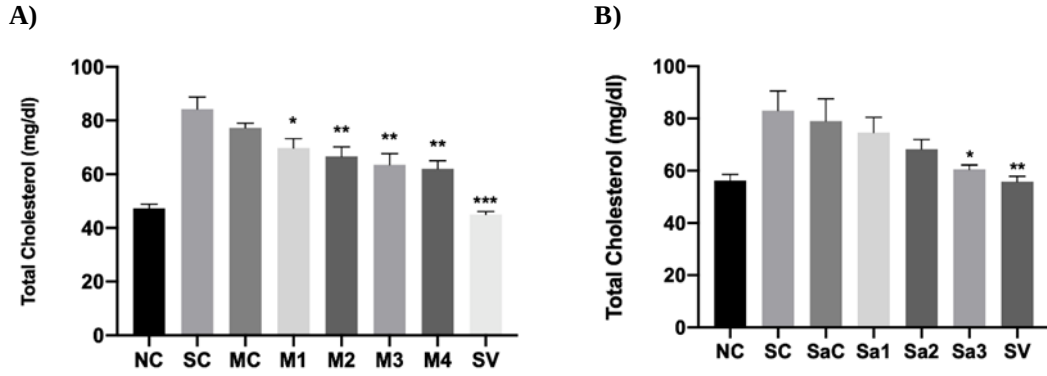


Şekil 4.50. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen LDL seviyeleri (mg / dl). * $p < 0.05$ ve *** $p < 0.001$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.50.'de verilen sonuçlar doğrultusunda HFD grubuna göre ekstre verilen tüm gruplarda serum örneklerinde LDL seviyelerinde bir düşüş gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) LDL seviyelerinde bir fark gözlemlenmezken, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) LDL seviyelerinde ise %10,8 oranında bir düşüş görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında LDL seviyeleri için 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta %24,1 ($p < 0.05$) oranında bir azalma gözlenirken, 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta serum LDL seviyesinde %22,9 ($p < 0.05$) oranında düşüş tespit edilmiştir. Pozitif kontrol simvastatin grubunda ise HFD grubuna göre serum LDL seviyelerinde %47,4 ($p < 0.001$) oranında bir düşüş gözlemlenmiştir.

4.5.3.11. Serum örneklerinin total kolesterol ölçümleri

Serum örneklerinden ölçülen total kolesterol seviyeleri *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri verilen gruplar için Şekil 4.51.'de yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.

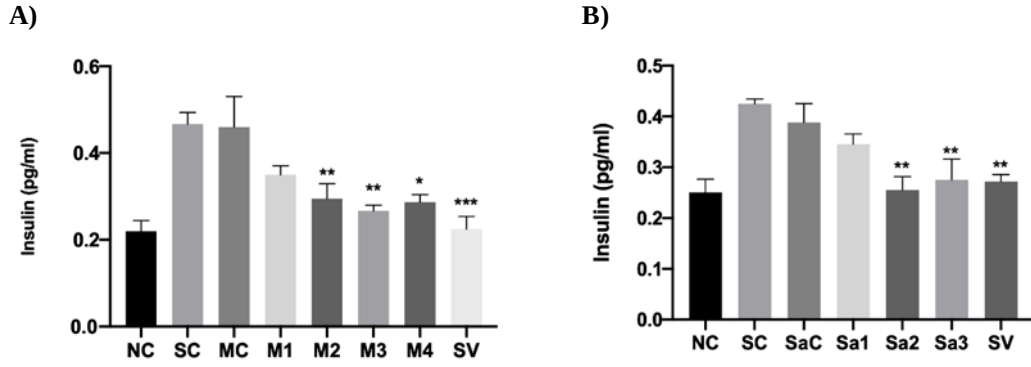


Şekil 4.51. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen total kolesterol seviyeleri (mg / dl). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.51.'de verilen sonuçlar doğrultusunda HFD grubuna göre ekstre verilen tüm gruplarda serum örneklerinde total kolesterol seviyelerinde bir düşüş gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) total kolesterol seviyelerinde %7,7 oranında bir azalma görülmüşken, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) total kolesterol seviyelerinde ise %4,9 oranında bir düşüş görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında total kolesterol seviyeleri için 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta %15,3 ($p<0.01$) oranında bir azalma gözlenirken, 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta serum total kolesterol seviyesinde %27,1 ($p<0.05$) oranında düşüş tespit edilmiştir. Pozitif kontrol simvastatin grubunda ise HFD grubuna göre serum total kolesterol seviyelerinde %46,3 ($p<0.01$) oranında bir düşüş gözlemlenmiştir.

4.5.3.12. Serum örneklerinin insülin ölçümleri

Serum örneklerinden ölçülen insülin seviyeleri *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri verilen gruplar için Şekil 4.52.'de yer alan grafiklerde detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 4.52. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların serum örneklerinden ölçülen insülin seviyeleri (pg / mL). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ (SC grubuna göre).

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

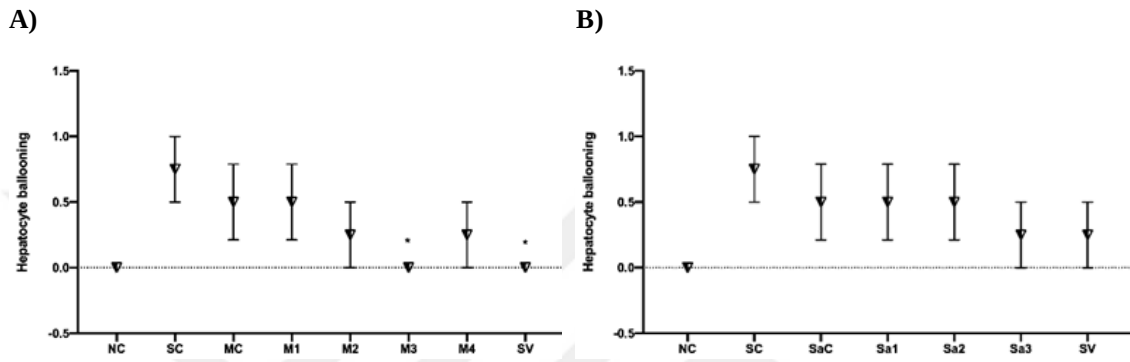
Şekil 4.52.'de verilen sonuçlar doğrultusunda HFD grubuna göre ekstre verilen tüm gruplarda serum örneklerinde insülin seviyelerinde bir düşüş gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) insülin seviyelerinde bir değişiklik gözlemlenmezken, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) insülin seviyelerinde ise %8,7 oranında bir düşüş görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında insülin seviyeleri için 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta %43,1 ($p < 0.01$) oranında bir azalma gözlenirken, 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta serum insülin seviyesinde %38,2 ($p < 0.01$) oranında bir düşüş tespit edilmiştir.

4.5.4. Histopatoloji

%10 formol çözeltisi içinde fikse edilen karaciğer loblarından hazırlanan parafin bloklarda 5 μ m'lik kesitlerde Hematoksilen-Eozin (HE) boyası uygulanarak ve Nikon Eclipse Ni araştırma mikroskobu ile yapılan görüntülere ait sonuçlar skorlanarak değerlendirilmiştir.

4.5.4.1. Hepatositlerde balonlaşma

Nonalkolik steatohepatit durumlarında karaciğerde yağlanma ile alkolik karaciğer hastalığında olduğu gibi hepatositlerde balonlaşma gibi bulgular gözlemlenmektedir. Karaciğer dokularında tespit edilen balon hücrelerinin yoğunluk durumlarına ilişkin yapılan skorlama sonuçları *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri için ayrı ayrı Şekil 4.53.'te yer alan grafiklerde verilmiştir.

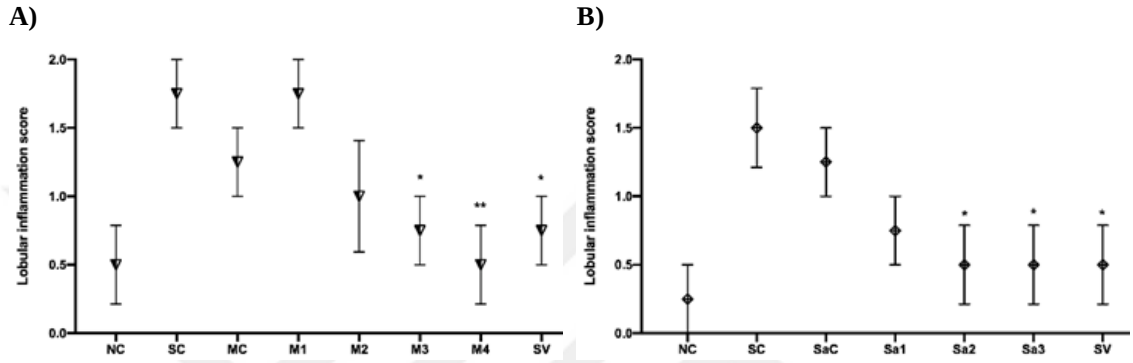


Şekil 4.53. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların karaciğer dokularında balon hücresi yoğunluğu. * $p < 0.05$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.53.'te verilen sonuçlar doğrultusunda HFD grubuna göre ekstre verilen tüm gruplarda karaciğer dokularında balon hücre yoğunluğunda azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) balon hücre yoğunluk seviyelerinde %18,9 oranında bir azalma olurken, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) karaciğer dokularındaki balon hücresi yoğunluğunda ise %32,4 oranında bir düşüş görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında balon hücre yoğunluğu için 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta balon hücresi görülmezken ($p < 0.05$), 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta karaciğer dokusunda gözlenen balon hücre yoğunluk seviyesinde %53,2 ($p < 0.05$) oranında bir düşüş tespit edilmiştir.

4.5.4.2. Lobüler enflamasyon

Nonalkolik karaciğer yağlanmasında bilinen düzeydeki basit yağlanmaya balonlaşma olmaksızın hafif derecede lobüler enflamasyon da eşlik edebilir. Karaciğer dokularında tespit edilen lobüler yağlanma durumlarına ilişkin yapılan skorlama sonuçları *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri için ayrı ayrı Şekil 4.54.'te yer alan grafiklerde verilmiştir.

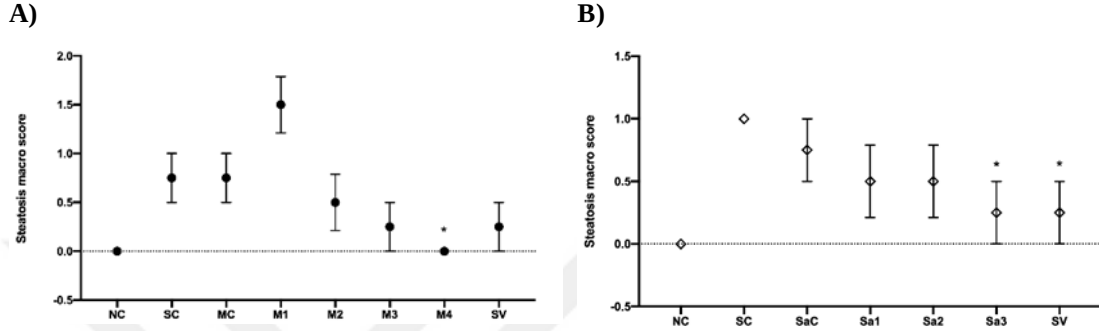


Şekil 4.54. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların karaciğer dokularında lobüler enflamasyon skorları. * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.54.'te verilen sonuçlar doğrultusunda HFD grubuna göre ekstre verilen tüm gruplarda karaciğer dokularında lobüler enflamasyon yoğunluğunda azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) lobüler enflamasyon düzeylerinde %28,5 oranında bir azalma olurken, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) karaciğer dokularındaki lobüler enflamasyon düzeylerinde ise %16,6 oranında bir düşüş görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta lobüler enflamasyon gözlemlenmezken ($p < 0.01$), 200 ve 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen gruplarda karaciğer dokusunda lobüler enflamasyon seviyesinde yaklaşık %60 ($p < 0.05$) oranında bir düşüş tespit edilmiştir.

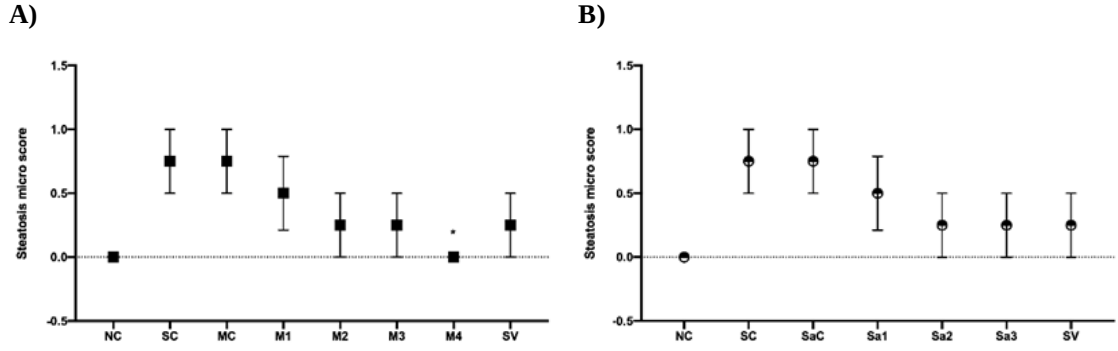
4.5.4.3. Makrosteatoz ve mikrosteatoz

Nonalkolik karaciğer yağlanması steatoz yani yağlanma makro ve mikroveziküllerde tespit edilebilir. Karaciğer dokularında tespit edilen makrosteatoz durumlarına ilişkin yapılan skorlama sonuçları Şekil 4.55.'te, mikrosteatoz durumlarına ilişkin yapılan skorlama sonuçları Şekil 4.56.'da yer alan grafiklerde verilmiştir.



Şekil 4.55. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların karaciğer dokularında makrosteatoz seviyeleri. * $p < 0.05$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.55.'te verilen sonuçlar doğrultusunda HFD grubuna göre 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi hariç diğer tüm ekstre gruplarında karaciğer dokularında makro steatoz yoğunluğunda azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) makro steatoz bir değişiklik gözlemlenmezken, *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) karaciğer dokularındaki makro steatoz düzeylerinde ise %24,8 oranında bir düşüş görülmüştür. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında makro steatoz seviyeleri için 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta makro steatoz gözlemlenmezken ($p < 0.01$), 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen grupta karaciğer dokusunda gözlenen makro steatoz seviyesinde %58,7 ($p < 0.05$) oranında bir düşüş tespit edilmiştir.



Şekil 4.56. *M. sylvestris* (A) ve *S. fruticosa* (B) ekstresi verilen grupların karaciğer dokularında mikrosteatoz seviyeleri. * $p < 0.05$ (SC grubuna göre). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. (NC: Normal diyet kontrol grubu, SC: Yağlı diyet kontrol grubu, MC: *M. sylvestris* için boş taşıyıcı grubu, M1: 75 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M2: 150 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M3: 300 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, M4: 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi grubu, SaC: *S. fruticosa* için boş taşıyıcı grubu, Sa1: 100 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa2: 200 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, Sa3: 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi grubu, SV: Simvastatin grubu)

Şekil 4.56.'de verilen sonuçlar doğrultusunda HFD grubuna göre tüm ekstre gruplarında karaciğer dokularında mikro steatoz yoğunluğunda azalma gözlemlenmiştir. HFD grubu ile karşılaştırıldığında *M. sylvestris* taşıyıcı grubunda (MC) ve *S. fruticosa* taşıyıcı grubunda (SaC) mikro steatoz bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Taşıyıcı grupla karşılaştırıldığında mikro steatoz seviyeleri için 450 mg/kg *M. sylvestris* ekstresi verilen grupta mikro steatoz gözlemlenmezken ($p < 0.01$), 200 ve 400 mg/kg *S. fruticosa* ekstresi verilen gruplarda karaciğer dokusunda gözlenen mikro steatoz seviyesinde %64,3 oranında bir düşüş tespit edilmiştir.

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Metabolik rahatsızlıklar arasında, non-alkolik karaciğer yağlanması yaygın olarak görülen kronik karaciğer hastalıklarındandır (Jennison vd., 2019). Son yıllarda bu hastalığın prevalansı dünya genelinde önemli bir şekilde değişmiştir (Estes vd., 2018). Yakın zamanda yayımlanmış bir epidemiyolojik araştırmada, Türkiye'de bu hastalığın görülme sıklığının %48,3 olduğu bildirilmiştir (Younossi, 2019). İlerleyen obezite salgınları ile yetişkinlerde ve çocuklarda kronik karaciğer hastalığının en yaygın nedeni haline gelmiştir ve hastalığın farmako-ekonomik boyutu da mevcuttur. Bu tez çalışmasında farmako-ekonomik boyutu oldukça büyük olan ve düzensiz hayat ve beslenme koşulları nedeniyle giderek yaygınlaşan, kesin bir çözümü olmayan karaciğer yağlanmasına, bitkisel drog preparatlarından yola çıkılarak kanıta dayalı sonuçlar tartışmalı olarak ortaya konulmuştur.

Türkiye bitki çeşitliliği açısından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir ve geleneksel tedavide bu zengin kaynaktan sıklıkla yararlanılmaktadır. Farmakope kalitesinde drog ve ekstre temini, bitkisel ilaç üretimi açısından önem taşımaktadır. Yapılan çalışmaların genellikle doğadan toplanan bitki droguları veya standardize edilmemiş ekstreler üzerinden olması çalışmanın niteliğini ve tekrarlanabilirliğini sınırlamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda mevcut tez çalışmasında, halk arasında karaciğer rahatsızlıklarında kullanılan bitki drogularından Avrupa Farmakopesi kalitesinde standardize ekstreler hazırlanarak, *in vitro* hücre kültüründe karaciğer yağlanması modeli ile ön tarama yapılmış ve en yüksek etkinliğin tespit edildiği ekstre geliştirilen özgün mikroemülsiyon sistemleri içerisine enkapsüle edilmiş ve bu fitoterapötik formülasyonların *in vivo* non-alkolik karaciğer yağlanması üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Standardize ekstreler ön eleme amacı ile *in vitro* hücre kültüründe karaciğer yağlanması modeli ile çalışılmış ve iki drog ekstresi ileri *in vivo* çalışmalar için seçilmiştir. *In vivo* deneylerde 7 hafta özel yağlı yem ile beslenen sıçanlarda yağlı karaciğer modeli oluşturulmuştur. Titrasyon metodu ile geliştirilen özgün mikroemülsiyon formülasyonuna akut toksiste sonuçlarına göre belirlenen 4 farklı dozda (75, 150, 300 ve 450 mg/kg) yüklenen *M. sylvestris* ekstresi ve 3 farklı dozda (100, 200 ve 400 mg/kg) *S. fruticosa* ekstresi dışı Wistar albino sıçanlara 8 hafta boyu günlük gavaj yoluyla verilerek haftalık kilo takibi yapılan hayvanların karaciğer indeksleri hesaplanmıştır. 15. haftanın sonunda hayvanlardan alınan serum ve karaciğer örnekleri biyokimyasal analizlerle değerlendirilmiş, ayrıca alınan karaciğer dokuları histopatolojik

olarak balon hücre oluşumu, lobüler enflamasyon ve makro-mikrosteatoz açısından değerlendirilmiştir

Tez kapsamında gerçekleştirilen araştırmalarda, etnobotanik ve deneysel çalışmalarda etkinliği ortaya konulmuş *A. sativum*, *M. sylvestris*, *P. ovata*, *S. fruticosa*, *T. parthenium* ve *T. officinale* bitkilerine ait droglar temin edildikten sonra Avrupa Farmakopesi'ne uygun ekstralarının fitokimyasal standardizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek *in vitro* yağlı karaciğer modelinde denenmiştir. *In vitro* hücre kültürü deneyleri ile gerçekleştirilen ön tarama çalışmaları sonucunda etkili görülen *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstraları, iki farklı ve özgün mikroemülsiyon sistemlerine yüklenerek özgün fitoterapötik prototipler geliştirilmiştir. Bu özgün fitoterapötik prototipler deney hayvanlarında denenmiş, serum ve karaciğer örnekleri üzerinden biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapılmıştır. Ayrıca hayvanların vücut ve karaciğer ağırlık takipleri de yapılarak ekstre yüklü formülasyonların bu parametreler üzerine etkileri ilk defa bu tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir.

Aşağıda yer alan sonuç tartışma bölümünde, öncelikle drog-çözücü seçimi, ekstraksiyon ve karakterizasyonla birlikte fitokimyasal standardizasyon çalışmalarından detaylı olarak literatürle karşılaştırmalı olarak bahsedilmiştir. Daha sonra *in vitro* hücre kültürü çalışmaları, formülasyon ve son olarak da etkinlik ve güvenliğin ortaya konulması için *in vivo* deneylerin sonuçları drog, drog bileşimi ve literatürdeki benzer çalışmalar dikkate alınarak aşağıda yer alan alt başlıklarda tek tek tartışılmıştır.

5.1. Bitkisel Drog Materyali, Ekstraksiyon ve Standardizasyon

Bitki drogları farmakopede belirtilen çözücülerle (%99,9'luk etanol, metanol ve %70'lik etanol) belirtilen şartlarda ayrı ayrı ekstre edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan bitkisel droglar seçilirken etnobotanik kullanımlar referans alındığından ve karaciğer hastalıklarının tedavisinde literatürde geçen etnobotanik çalışmalarda (Amiri vd., 2013; Arenas vd., 2013; Asadollahi vd., 2019; Perfumi vd., 1991) genellikle sulu-polar preparasyonlar kullanıldığından, ekstralar hazırlanırken de polar çözücüler tercih edilmiştir. Aynı zamanda Farmakope'de yer alan analizlerde belirtilen çözücülerin de genellikle bu polar çözücüler olması nedeniyle, her bir drogun farmakopede ekstraksiyonu için kullanılan polar çözücü tez çalışmalarının ekstraksiyon aşamasında birebir kullanılmış, tez kapsamında ilgili drog belirtilmiş olan çözücü ile ekstre edilmiştir.

Böylelikle bu tez çalışması kapsamında etnobotanik kullanımları doğrulamak üzere yer alan, polar preparasyonlara uygun bir çalışma tasarlanmıştır.

Standardizasyon çalışmalarında öncelikle farmakopeye belirtilen, daha sonra literatürdeki türe özgü sekonder metabolitlerin parmakizi analizleri YPİTK yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (PhEur9, Sağlık Bakanlığı, 2016; Sriraman vd., 2015; http-2). Ardından YPİTK yöntemi ile varlığı tespit edilen metabolitlerin, madde miktar tayinleri YBSK yöntemi ile yapılmış ve tüm çalışılan ekstrelerin analiz edilen sekonder metabolitlerinin miktarları başlık 4.2. de belirtildiği üzere, farmakope ve literatüre uygun değerlerde ve aralıklarında çıkmıştır. Bu başlıkta drogların ekstraksiyon ve standardizasyon bulguları literatür verileri ile tartışmalı olarak bitkilerin Latince adlarının alfabetik sırasına göre yapılmıştır.

Literatürdeki *A. sativum* ekstre verimleri karşılaştırıldığında daha önceki çalışmalarda *A. sativum* soğanlarının alkolle hazırlanan ekstrelerinin %3-8 arasında ekstre verimine sahip olduğu görülmüştür (Canizares vd., 2002). Bu tez çalışmasında da *A. sativum* ekstresinin verimi %5,5 olarak tespit edilmiştir. Sarımsakta hem uçucu hem uçucu olmayan bileşenler mevcuttur. Uçucu olmayan bileşenleri fenolik bileşikler ve saponinlerdir (Lanzotti, 2006). Tiyosülfınatlar ve organosülfür bileşikler sarımsakta yer alan uçucu ve son derece kararsız, stabil olmayan bileşik gruplarıdır. Tiyosülfınatlar çeşitli sülfür bileşiklerine dönüşürler. Sarımsağa kendine özgü kokusu ve biyolojik aktivitelerinden sorumlu bileşikler içindeki türe özgü kükürtlü bileşiklerdir ve literatürdeki çalışmaların büyük çoğunluğu da bu bileşikler üzerinedir. Bu kükürtlü bileşikleri içinde de en önemlileri ve Farmakope’de belirtilen allisinidir. Sarımsak bütün halde iken bu bileşik alliin olarak mevcuttur ve ezildiğinde alliinaz enzimi devreye girer ve bir tiyosülfınat olan allisin oluşur. Allisin birçok bileşiğe çevrilebilen reaktif bir ara üründür ve taze kesilmiş veya parçalanmış sarımsağa özgün kokusunu verdiği bilinmekedir (Londhe vd., 2011). *A. sativum* ekstresindeki allisin miktarının Avrupa Farmakopesi’nde %0,45’in üzerinde olması gerektiği kayıtlı olup, tez çalışması sonucunda *A. sativum* metanol ekstresinin allisin miktarı %1,49 olarak bulunmuş ve farmakope açısından uygun olduğu görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda *A. sativum* ekstrelerinin allisin analizleri yapılmış ancak çalışılan *A. sativum* bitki materyali farklı kültürlerden toplanmıştır. Üstelik daha önceki bu çalışmalarda belirtilen allisin miktarlarının farmakope limitlerinin altında olduğu görülmektedir (Bocchini vd., 2001;

Iberl vd., 1990; Rahman vd., 2012). Bilinen kaynaklardan ve Farmakope standartlarında bitki materyali ile çalışmanın önemi ve kalite farkı da bu tez çalışmasından alınan sonuçlarla ortaya konulmuştur.

M. sylvestris çiçeklerinden elde edilen ekstre verimi bu tez çalışması kapsamında %12 olarak bulunmuşken daha önceki çalışmalarda ise %15 civarında tespit edilmiştir (Beghdad vd., 2014). *M. sylvestris* yaprakları ve çiçekleri, özellikle flavonoit ve müsilaj içeriğinden dolayı farklı rahatsızlıklar için kullanılmaktadır (Billeter vd., 1991). Ayrıca çiçeklerde bir antosiyanin olan malvin, A vitamini ve tanenler diğer önemli bileşikler arasındadır (Farina vd., 1995). *M. sylvestris* çiçekleri ve yaprakları geleneksel olarak, boğaz ağrısı eşliğinde soğuk algınlığı, kuru öksürük ve bronşit tedavisinde kullanılmaktadır. Tahriş önleyici özellikleri ile ses kısıklığını tedavi etmek için de kullanımı yaygındır (Gasparetto vd., 2012). Bilgimiz dahilinde, daha önceki çalışmalarda *M. sylvestris* çiçek ekstreleri malvin içeriği açısından standardize edilmemiş ve malvin içeriği açısından standardize ekstrelerle biyolojik aktivite çalışmaları yapılmamıştır. Avrupa Farmakopesi'nde *M. sylvestris* çiçeklerinden elde edilen ekstrede malvin varlığı İTK yöntemi ile ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasında bu antosiyanin bileşiği *M. sylvestris* çiçeklerinden hazırlanan %70'lik etanol ekstresinde YPİTK yöntemi ile tespit edilmiştir ve YBSK analizinde miktarı %0,19 olarak bulunmuştur. Ekstrenin içeriğinin farmakopeye uygun olduğu teyit edilmiştir. Bu anlamda bu tez çalışması malvin içeriği ile standardize *M. sylvestris* çiçeklerinin %70'lik etanol ekstresinin karaciğer yağlanması karşı etkilerinin incelendiği ilk çalışma niteliği taşımaktadır.

P. ovata tohum ekstrelerine ait daha önceki çalışmalarda verim ile ilgili bir bilgiye rastalanmamışken bu tez çalışmasında *P. ovata* tohum ekstrelerinin verimi %1 olarak bulunmuştur. Bitkinin tohumlarında yer alan müsilajları farmasötik eksipiyenler olarak kullanılabilir. Müsilajlar farmasötik sanayiinde en sık kullanılan adjuvanlar arasındadır. *P. ovata* müsilajları bağlanmaları, parçalanmaları, emülsifiye olmaları, film oluşturmaları nedeniyle farklı farmasötik müstahzarlarda bitkisel kökenli olmaları ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle önem kazanmaktadır (Swathi vd., 2011; Sarfraz vd., 2017). Tez kapsamında *P. ovata* ekstresi içerisinde var olan β -sitosterol miktarı kantitatif olarak (a/a) %0,33 olarak hesaplanmıştır. Literatüre göre *P. ovata* tohum ekstresi β -sitosterol içermektedir ve sonuçlar kullanılan ekstrenin literatüre göre standardize bir ekstre olduğu teyit edilmiştir (Nakamura vd., 2005). Daha önceki çalışmalarda *P. ovata* tohum ekstreleri β -sitosterol içeriği açısından araştırılmamış ancak diğer *Plantago*

türlerinin tohumlarında β -sitosterol madde miktar tayini yapılmıştır (Nakamura vd., 2005).

S. fruticosa ekstresinin daha önceki çalışmalarda elde edilen verimi %3-8 civarında bulunmuşken bu tez çalışması kapsamında çalışılan ekstrenin verimi %6,5 olarak bulunmuştur. *S. fruticosa* yapraklarından hazırlanan etanol ekstresinin Avrupa Farmakopesi'ne göre içermesi gereken rosmarinik asit varlığı YPİTK'da tespit edilmiş; literatürde *Salvia* türlerinin türe özgü sekonder metaboliti olan salvigenin de YBSK'da rosmarinik asitle beraber analiz edilmiştir. Ekstre içerisinde salvigenin yüzdesi %3,68; rosmarinik asit yüzdesi %1,96 olarak bulunmuştur. Salvigenin daha önceki çalışmalarda *S. fruticosa* toprak üstü kısımlarının hekzan ve diklorometan ekstrelerinden izole edilmiştir (Exarchou vd., 2015; Topçu vd., 2013). Ancak *S. fruticosa* ekstresi daha önceki çalışmalarda salvigenin üzerinden standardize edilmemiş, miktar tayini yapılmamıştır. Bu anlamda bu tez çalışması ile ilk kez *S. fruticosa* yapraklarının etanol ekstresi iki farklı flavon bileşiği olan hem rosmarinik asit hem de salvigenin içerikleri açısından standardize edilmiş ve bu standardize ekstrenin karaciğer yağlanmasına karşı etkinliği ilk kez bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.

T. parthenium ekstresinin verimi bu tez çalışmasında, literatürde daha önce çalışılan verimleri ile kıyaslandığında 2-3 kat daha fazla bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda *T. parthenium* toprak üstü kısımlarının alkol ekstrelerinin verimleri %2-3 olarak tespit edilmişken, bu tez çalışmasında %9 verimle elde edilmiştir (Pavela vd., 2010; Vegh vd., 2014). Tütün biyolojik olarak aktif olan en önemli sekonder metabolitleri seskiterpen laktonlardır, bu seskiterpen laktonların en önemlisi ise partenolittir. Partenolit, bitkinin yapraklarında %0,2-%0,5 aralığında bulunur, ancak gövdelerde bulunmaz ve toplam seskiterpen içeriğinin %85'ini oluşturur (Bohlmann vd., 1982; Heptinstall vd., Pareek vd., 2011). *T. parthenium* toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresi partenolit içeriği açısından YPİTK ve YBSK ile çalışılmış ve droga ait ekstrenin partenolit miktarı %0,5 olarak Avrupa Farmakopesine uygun şekilde tespit edilmiştir. Daha önce partenolit içeriği açısından standardize edilmiş *T. parthenium* ekstreleri ile yapılmış çalışmalar mevcuttur (Heptinstall vd., 1992; Sur vd., 2009). Ancak ilk kez bu tez çalışması kapsamında yağlı karaciğer hastalığına karşı partenolit içeriği açısından standardize *T. parthenium* ekstresi ile çalışılmıştır.

T. officinale ekstresinin ise daha önceki çalışmalarda elde edilen verimi %25 civarında bulunmuşken, bu tez çalışması kapsamında *T. officinale* ekstresinin verimi %8 olarak bulunmuştur (Aabideen vd., 2020). Bu tez çalışması kapsamında ekstre verimleri literatür ile karşılaştırıldığında büyük oranda uyumluluk göstermiştir. *T. officinale* preparasyonları özellikle çiçek, yaprak ve köklerde bulunan fitokimyasallar nedeniyle araştırmalara konu olmuştur. Bitkide bulunan başlıca fitokimyasallar: karotenoidler; flavonoidler (örn., kersetin, krizoriol, luteolin-7-glukozit); fenolik asitler (örn., kafeik asit, klorojenik asit, şikorik asit); polisakaritler (örn., inülin); seskiterpen laktonlar (örn., taraksinik asit, taraksakozit, 11p,13-dihidrolaktusin, ikserin D); steroller (örneğin, taraksasterol, β -sitosterol, stigmasterol); triterpenler (örneğin, α -amirin) olarak sıralanabilir (Amin Mir vd., 2013; Singh vd., 2008). Bu tez çalışmasında ise *T. officinale* ekstresinin klorojenik asit ve rutin içeriği YPİTK yöntemi ile teyit edilmiş ve Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen klorojenik asit madde miktar tayini YBSK yöntemi ile araştırılarak miktarı %0,3 olarak tespit edilmiştir.

Tüm YPİTK ve YBSK çalışmalarından alınan sonuçlar doğrultusunda çalışılan tüm ekstrelerin fitokimyasal standardizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek, ekstrelerin fitokimyasal açıdan Farmakope'ye uygunlukları ortaya konulmuştur.

5.2. *In vitro* ön tarama deneyleri

6 farklı ekstre ayrı ayrı hücre kültüründe yağlı karaciğer modelinde Nil KırmızıS1 boyaması ile ve yine hücre kültüründe GSH, MDA, ALT ve AST ölçümleri ile araştırılmıştır. Bu çalışmaların tamamı HepG2 hücre hattında çalışılacağı için öncelikle tüm ekstrelerin bu hücre üzerinde toksik olmayan dozları belirlenmiştir. Bu amaçla ekstrelerin 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda MTT metodu ile sitotoksikite çalışmaları yapılmış ve *S. fruticosa* ekstresi hariç diğer ekstrelerin neredeyse tamamı bu hücre hattında denenen maksimum dozda (1 mg/mL) dahi toksisite göstermemiştir. *S. fruticosa* ekstresi için sitotoksikite çalışması sonucunda çalışılabilecek maksimum konsantrasyon 0,25 mg/mL ve altı olarak tespit edilmiştir. Diğer tüm ekstreler de eşit çalışma koşulları olması adına 0,25 mg/mL konsantrasyonda çalışılmıştır. *S. fruticosa* ekstresi ve majör bileşenleri daha önceki çalışmalardan da HepG2 hücrelerinde toksisiteyi bilinen maddelerdir. Bu çalışma kapsamında *S. fruticosa* ekstresinin majör metabolitlerinden birisi olarak belirlenen salvigenin bileşiği daha önceki çalışmalarda

HepG2 hücrelerine karşı antikanser etki açısından araştırılmış ve tek başına salvigeninin HepG2 hücrelerinde antikanser etkisinin $IC_{50}=165,56 \mu\text{g/mL}$ olduğu tespit edilmiştir (Şekerler vd., 2020). Diğer ekstrelerin daha önceki çalışmalarda HepG2 hücrelerine karşı sitotoksik etkileri üzerine herhangi bir deneysel çalışması bulunmamaktadır.

Çalışılabilecek maksimum ortak konsantrasyon sitotoksikite deneyleri ile belirlendikten sonra hücre kültüründe yağlı karaciğer araştırmaları için farklı deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu paragrafta sırasıyla hücre kültüründe yapılan tüm deneylerin ne amaçla yapıldığı ve yağlı karaciğer modeli ile ilişkisi açıklanmıştır. Çalışma konsantrasyonları belirlendikten sonra hücre kültürü çalışmalarında araştırılan parametrelerden birisi olan lipit peroksidasyonu, yağların yükseltgenmesi sonucu bozulması anlamına gelmektedir (Daraie vd., 2012). Lipit peroksidasyon deneyinde çalışılan ekstrelerin lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerini düşürmesi amaçlanmıştır. Hücre ortamındaki bir diğer çalışma ise hücrelerdeki glutatyon seviyelerinin ölçümüne dayanmaktadır. Glutatyon, hücreleri serbest radikaller, peroksitler ve ağır metaller gibi reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerinden koruyan bir antioksidandır. Yağlı karaciğer modelinde hücre kültürü ortamının Nil Kırmızısı adı verilen floresan özellikli bir boya ile boyanması sonucu elde edilen kırmızı renkli yağ hücrelerinin tespiti yapılmış ve boyanan vakuollerin yoğunluk derecesi ile ekstre muamelesinden önce ve sonra hücre ortamında yağlanma düzeyleri tespit edilmiştir. *In vitro* gerçekleştirilen bir diğer çalışma olan hücre ortamında karaciğer için önemli iki enzim olan ALT ve AST miktarları ölçülmüş ve sonuçlar pozitif kontrol olan resveratrolle karşılaştırılmıştır. Tartışma bölümü olan bu bölümde, aşağıda yer alan alt başlıklarda *in vitro* sonuçlar yalnızca etkili bulunan 3 ekstrenin (*A. sativum*, *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri) sonuçları üzerinden değerlendirilmiştir.

5.2.1. *A. sativum* ekstresinin *in vitro* sonuçları

Denenen konsantrasyonda (0,25 mg/mL) lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerinin düşürülmesinde en yüksek etkinlik *A. sativum* ekstresinde gözlemlenmiştir. *A. sativum* ekstresi lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerini %48,2 oranında azaltmıştır. Pozitif kontrol olan resveratrol ise MDA düzeylerinde %31,8 oranında azalma sağlamıştır. *A. sativum*'un farklı ekstreleri daha önceki çalışmalarda da lipit peroksidasyonu yönünden enzimatik olarak araştırılmış ve ekstrelerin lipit peroksidasyon

ürünlerinin düzeylerini düşürme gücü yüksek bulunmuştur (Bozin vd., 2008; Ünyayar vd., 2006). Bontempo ve diğerleri ise 2021 yılında yayınlanan bir çalışmada allisin içeriği analiz edilen ve siyah sarımsak olarak belirtilen *A. sativum* ekstrelerinin HepG2 hücrelerinde lipit peroksidasyon ürünlerine ait analizleri gerçekleştirmiş ve ekstrenin, lipit peroksidasyon seviyelerinin inhibisyonunda etkili olduğunu tespit etmişlerdir (Bontempo vd., 2021). Ancak Bontempo ve diğerlerinin yaptığı bu çalışmada elde edilen bulgular bu tez çalışması ile karşılaştırıldığında bu tez çalışmasında elde edilen ekstrenin allisin içeriği açısından madde miktarı bilinen bir ekstre olması tez çalışmasının niteliğini ve sonuçların tekrarlanabilirliğini arttırdığından dolayı önem taşımaktadır.

Hücre kültüründe glutatyon ölçümlerinde ortamdaki en fazla glutatyon düzeyi artışı *A. sativum* verilen grupta görülmüştür. *A. sativum* ekstresi verilen grupta glutatyon düzeyleri %59,1 oranında artmıştır. *A. sativum* ekstresi verilen grupta Nil Red boyama sonucunda ortamdaki yağ vakuollerinin miktarı oleik ve palmitik asitle indüklenmiş hücre ortamına göre pek farklılık göstermemiştir. AST ve ALT düzeylerinde *A. sativum* ekstresi sırasıyla %65 ve %50 oranında bir azalmaya neden olmuştur. Ekstre genel olarak *in vitro* karaciğer yağlanması metodunda iyi sonuçlar vermiş olmasına rağmen ileri çalışmalar için seçilmemiştir. *A. sativum* ekstresi ile çalışmalara devam edilememesinin nedeni bu tez konusu önerisi sunulduktan sonra *A. sativum* ekstreleri ile klinik bir çalışmada non-alkolik karaciğer yağlanması çalışması yapılmış olmasıdır (Soleimani vd., 2020). Ayrıca denenen 6 ekstre içerisinde *A. sativum* ekstresi ile yakın ve daha iyi etki gösteren ekstrelerin de mevcut olması *A. sativum* ekstresi ile yapılan çalışmaların ileri düzeye taşınmaması için bir diğer gerekçe olmuştur.

5.2.2. *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstrelerinin *in vitro* sonuçları

Lipit peroksidasyon deneyinde MDA düzeylerinde *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstrelerinde sırasıyla %36,4 ve %27,3 oranında azalma tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda *M. sylvestris* çiçeklerinden elde edilen ekstrelerle enzimatik olarak lipit peroksidasyon seviyeleri üzerine olan etkileri incelenmiş ve *M. sylvestris* yaprak ekstreleri ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlar alındığı görülmüştür (Barros vd., 2010). *M. sylvestris*'in hem çiçekleri hem de yapraklarından elde edilen ekstrelerin farklı organ hasarı durumlarında (böbrek, beyin, kalp vb.) lipit peroksidasyon ürünlerine ait düzeyleri düşürdüğü daha önce yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Barros vd., 2010;

Marouane vd., 2011; Saad vd., 2017; Zhen-Yu, 2005; Zuo vd., 2017). Yine bu tez çalışması kapsamında elde edilen bulguların daha önceki çalışmalardan bir farkı hem Farmakopeye uygun standardize ekstre ile çalışılmasıdır. Ayrıca bir diğer önemli yanı elde edilen lipit peroksidasyon deney sonuçlarının hem hücre kültüründen hem de hayvan deneylerinden alınmış ve sonuçların birbirlerini destekliyor olmasıdır. *S. fruticosa* metanol ve su ekstraktları A375 hücre hattında lipit peroksidasyon inhibisyonu açısından önceki çalışmalarda Kyriakou ve diğerleri (2017) tarafından araştırılmıştır. Ekstrenin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre ortamında lipit peroksidasyonunu düşürdüğü görülmüş ancak bu çalışmada ekstrenin herhangi bir fitokimyasal analizi yapılmamıştır (Kyriakou vd., 2017).

Tez kapsamında çalışılan glutatyon ölçümlerinde ortamdaki glutatyon düzeylerini en fazla *M. sylvestris* ekstresi %49,7 oranında arttırmıştır. Resveratrol ise %28 oranında bir artışa neden olmuştur. Çalışılan tüm ekstraktlar resveratrole yakın sonuçlar verirken *T. parthenium* ekstresi ortamdaki glutatyon seviyesini %22,3 oranında düşürmüştür. Nil Red boyama deneyinde *M. sylvestris* ile muamele edilen ortamda yağ veziküllerinin daha az bulunduğu tespit edilmiştir. *S. fruticosa* ekstresinin de Nil kırmızısı boyama sonuçlarında ortamda bulunan yağ oranını azalttığı görülmüştür. Resveratrol ALT seviyesini %30,9 oranında düşürürken; *S. fruticosa* ekstresi ALT düzeylerini %53,5, *M. sylvestris* ekstresi ise %38,5 oranında düşürmüştür. AST düzeyleri için ise resveratrol %93 oranında AST seviyelerinde düşüşe yol açarken *M. sylvestris* ise %46,5 oranında sonuç vermiştir.

Hücre kültürü sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, *M. sylvestris* ekstresi genel olarak tüm deneylerde en belirgin etkinin görüldüğü ekstre olurken onu farklı parametrelerde *A. sativum* ve *S. fruticosa* ekstraktları takip etmiştir. Hücre kültürü sonuçlarına göre *in vivo* deneyler için *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstraktları seçilmiştir. Ayrıca alınan sonuçlarda bu üç ekstre hemen hemen birbirine yakın değerlerde etkili bulunduğu için ve tez çalışmaları planlanırken ileri çalışmalara 1 veya 2 ekstrenin taşınacağı planlandığı için, *in vivo* çalışmalara *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstraktları ile devam edilmiştir.

5.3. Formülasyon

Tez kapsamında ekstraktların özgün taşıyıcı sistemleri geliştirilmiş ve bunun için mikroemülsiyonlar seçilmiştir. 2 farklı özgün mikroemülsiyon sistemi geliştirilmiş olup

in vitro çalışmalar sonucunda belirlenen 2 ekstre olan *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstralarının her birisi farklı mikroemülsiyonların içerisine yüklenmiştir. Mikroemülsiyonlar için yağ fazı olarak soya ve tarçın yağları kullanılmış ve yine farklı YEM ve YYEM'ler yardımı ile önformülasyon çalışmaları sonucunda tespit edilen optimum formülasyonlar hazırlanıp bunların stabilite ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda farklı sıcaklık koşullarında (4, 25 ve 40°C) boş formülasyonların karakterizasyon parametrelerinin stabil kaldıkları 3 ve 6. aylarda yapılan ölçüm ve analizlerde ortaya konulmuştur. Ayrıca yüklü ve boş formülasyonlarla yapılan çalışmalar sonucunda formülasyonların oral kullanım için pH, viskozite gibi parametreler açısından uygun olduğu tespit edilmiştir. Damlacık boyutu, M1 formülasyonu için düşük PDI değerleri ile 0,401 nm ile 1,365 nm arasında değişmektedir. M1 formülasyonunun PDI değerleri 0,590 ile 0,453 olarak tespit edilmiştir. M2 formülasyonu için ise PDI değeri 0,194 ile 0,378 arasındadır. M2 formülasyonunun damlacık boyutları 3,935 nm ile 132,1 nm arasındadır. Polidispersite indeksi ne kadar yüksekse, formülasyon içindeki damlacık boyutunun tekdüzeliği o kadar düşük olmaktadır (Shakeel vd., 2007). M1 boş ve yüklü formülasyonların pH değerleri, oral mukoza dokusu ile uyumlu normal cildin pH değerlerine yaklaşarak 6.99-6.26 arasında bulunmuştur. M2 için ise pH değer aralığı 6,35-7,11 olarak kaydedilmiştir. M1 boş mikroemülsiyonun viskozitesi 613 cP olarak belirlenmiştir. *S. fruticosa* etanol ekstresi yüklendiğinde ise viskozite değeri 666 cP olarak bulunmuştur. M2 boş mikroemülsiyonunun viskozitesi ise 269 cP, yüklü M2 formülasyonunun ise 285 cP olarak belirlenmiştir. Elektriksel iletkenlik, mikroemülsiyonların mikro yapısının analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Abd-Allah vd., 2010). M1 formülasyonlarının elektrik iletkenliği 9 ile 15 $\mu\text{S}/\text{cm}$ arasında bulunmuştur. M2 için ise elektrik iletkenlik değeri 0 olarak tespit edilmiştir. M1 mikroemülsiyonların zeta potansiyel değerleri (-0.00884)-(-0.000224) mV olarak belirlenirken M2 mikroemülsiyonlarının zeta potansiyelleri 0,0184-(-0,019) olarak tespit edilmiştir. Kırılma indisi ölçümü yapılmış ve M1 için 1.44498 ile 1.4444 arasında, M2 için 1,4673-1,4514 arasında olduğu bulunmuştur.

5.4. *In vivo* alışmalar

Halk kullanımından yola çıkılarak seçilen bitki droglarından elde edilen ekstrelerden *in vitro* alışmalarda alınan sonuçlar bitki preparasyonlarının etnobotanik kullanımları için bilimsel bir doğrulama olmuştur. *In vivo* alışmalar için *in vitro* denemeler doğrultusunda seçilen *S. fruticosa* ve *M. sylvestris* ekstreleri halk arasında da çeşitli karaciğer hastalıklarında, obezitede veya doğrudan karaciğer yağlanmasında kullanılan bitkilerdir (Amiri vd., 2013; Arenas vd., 2013; Asadollahi vd., 2019; Perfumi vd., 1991). Bu başlıkta da bu iki bitki formölasyonlarının *in vivo* deneylerde araştırılan biyokimyasal parametreleri her bir parametre ayrı paragrafta olacak şekilde literatürle karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır.

In vivo çalışma sonuçlarına göre *M. sylvestris* ekstresi hayvanların genel vücut kütle artış hızlarını düşürmeye yardım etmezken serum ve karaciğer örneklerinden alınan sonuçlar bu ekstrelerin yağlı karaciğere bağlı farklı kan ve karaciğer fonksiyon değerlerinin düzelmesine yardımcı olduğunu ortaya koymuştur. *S. fruticosa* ekstresi ise hayvanların karaciğer indekslerini düşürerek bu ekstrenin karaciğer hacminin artışına etkili olduğu ortaya konulmuştur.

GSH-Px, karaciğer mitokondrilerinde yüksek oranda eksprese edildiği ve GSH-Px karaciğerde bir antioksidan olduğu; daha önceki çalışmalarda NAYKH'da GSH'nin önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. GSH-Px, ana NAYKH belirteçlerinden birisi olduğu bilinmektedir (Vairetti vd, 2021). Bu tez çalışmasının sonuçları, *S. fruticosa* etanol ekstresinin *in vivo* NAYKH modelinde GSH-Px seviyelerini arttırdığını göstermiştir. Böylece NAYKH için önemli parametrelerden biri olan GSH-Px seviyesinde değişikliğe neden olan ajanların tedavide etkili olabileceği düşünülebilir. Daha önceki çalışmalarda, başka bir *Salvia* türü olan *S. officinalis* ekstresinin, hepatotoksisite oluşturulan hayvanlarda GSH-Px seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (Samiei vd., 2019). Başka bir çalışmada, *S. officinalis* infüzyonlarının içilmesinin de karaciğer antioksidan düzeylerini arttırdığı gözlenmiştir (Lima vd. 2005). Bir alışmada, *S. fruticosa*'nın su ekstrelerinin ve ana metaboliti olan rosmarinik asitin sağlıklı hücre hatlarında GSH-Px seviyelerini arttırdığı gözlenmiştir (Altay ve Bozoğlu, 2017). Ancak bu tez alışması, *S. fruticosa* etanol ekstresinin NAYKH ile indüklenen hayvanlarda GSH-Px seviyelerini arttırdığını gösteren ilk çalışmadır. *M. sylvestris* ieklerinden elde edilen ekstrelerin daha önceki çalışmalarda da nefrotoksisite nedeniyle düşen serum

GSH-Px seviyesini düzenlediği ortaya konulmuştur (Babaei vd., 2017). Bu tez çalışmasının sonucunda da *M. sylvestris* ekstresinin hem serum hem karaciğer GSH-Px düzeylerini arttırmaya yardımcı olduğu ortaya konulmuştur. Her iki ekstre de serum ve karaciğer GSH-Px düzeylerini yaklaşık olarak aynı ölçüde arttırmış ancak *M. sylvestris* ekstresinden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak daha anlamlı bulunmuştur.

SOD biyokimyasal antioksidan bir parametre olarak bilinmekte, NAYKH durumunda antioksidan seviyelerinin daha düşük olması beklenmektedir. Çalışmalar, kontrollerle karşılaştırıldığında NAYKH hastalarında SOD gibi antioksidan düzeylerinde azalmalar olduğunu göstermiştir (Madan vd., 2006). *S. officinalis* ve *S. refleksa* türleri ile yapılan önceki çalışmalarda, bu ekstrelerin karaciğer hastalıklarında serum SOD düzeylerini arttırdığı bulunmuştur (Hoveizi vd., 2020, Malenčićmalenčić vd., 2000). *S. fruticosa* etanol ekstresi ile yapılan bu tez çalışmasının sonucunda ekstrenin karaciğer ve serum SOD değerlerini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca daha önceki çalışmalarda *S. fruticosa* majör metabolitlerinden olan salvigeninin de lipit seviyelerinin düşürülmesinde gen düzeyinde etkili bulunmuştur (Serino vd., 2021). *M. sylvestris* toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin serum SOD değerini arttırdığı daha önceki çalışmalarda da ortaya konulmuş olsa da Avrupa Farmakopesi'ne göre malvin içeriği açısından standardize bir ekstre ile ilk kez bu çalışma kapsamında sonuçlar ortaya konulmuştur (Marouane vd., 2011). Ayrıca karaciğer örneklerinin SOD seviyelerine *M. sylvestris* çiçeklerinden elde edilen ekstrelerin etkisi de ilk kez bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır. Tez kapsamında SOD seviyelerine ilişkin elde edilen sonuçlarda *S. fruticosa* ekstresi serum SOD seviyelerinde daha fazla artışa neden olmuşken, *M. sylvestris* ekstresi ise karaciğer SOD seviyelerinde daha etkili olarak tespit edilmiştir.

MDA seviyeleri, NAYKH, NASH veya fibroz belirteçleri ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Zelber-Sagi vd., 2020). Daha önceki çalışmalarda *S. officinalis* yapraklarından elde edilen farklı polar ekstrelerin MDA seviyelerine etkileri *in vivo* çalışmalarda araştırılmıştır (Samiei vd., 2020). *S. fruticosa* ekstresinin NAYKH için önemli bir parametre olan MDA düzeylerine etkisi ilk kez bu tez çalışmasında detaylı olarak araştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. *M. sylvestris* yaprak ekstrelerinin daha önceki çalışmalarda akut böbrek ve karaciğer hasarında MDA düzeylerinin iyileştirilmesinde etkili olduğu ortaya konulmuştur (Najafi vd., 2017). Bu tez çalışmasında ise NAYKH modelinde düşen MDA düzeylerinin düzenlenmesinde *M.*

sylvestris çiçek ekstrelerinin etkisi araştırılmış ve düşen MDA düzeylerinin yükselmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir. MDA düzeyleri için elde edilen verilerde *S. fruticosa* ve *M. sylvestris* ekstreleri hem serum hem karaciğer değerleri için yaklaşık olarak aynı oranda etkili bulunmuşlardır.

Serum ve karaciğer lipit düzeylerinin NAYKH durumunda yükseldiği bilinmektedir ve trigliserit NAYKH durumunda düzeyi artan lipit değerlerinden birdiğeri olarak kayıtlıdır (Jiménez-Agüero vd., 2014). Önceki çalışmalarda *S. fruticosa* sulu ekstreleri, streptozotosin ile indüklenen diyabet modelinde araştırılmış ve bu çalışmada sıçanların trigliserit seviyeleri de ölçülmüştür. Daha önce yapılmış bu çalışmada elde edilen sonuçlarda, *S. fruticosa* sulu ekstresinin trigliserit düzeyleri üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Benwahhoud vd., 2001). Bu tez çalışmasında ise, *S. fruticosa* etanol ekstresinin NAYKH gelişen sıçanlarında trigliserit düzeylerini azalttığı gözlemlenmiştir. *M. sylvestris* antosiyaninlerinin serum lipitlerini düşürdüğü daha önceki bir çalışmada ortaya konulmuştur (Zhen-Yu, 2005). Ancak bu tez çalışması kapsamında ilk defa standardize *M. sylvestris* ekstresinin özellikle karaciğer dokusunda da lipit düzeylerine etkili olduğunu ortaya koymuştur. Lipit düzeylerinin düşürülmesinde her iki ekstre de pozitif kontrol olan simvastatin ile kıyaslandığında daha az etkili bulunmuş, ancak simvastatine oldukça yakın değerlerde etki göstermişlerdir.

Hayvan deneylerinde karaciğer parametrelerine ait biyokimyasal analiz sonuçları Tablo 4.12.'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 4.12. Ekstre yüklü formülasyonların in vivo koşullarda karaciğer parametrelerine etkileri

	<i>S. fruticosa</i> (400 mg/kg)	<i>M. sylvestris</i> (450 mg/kg)
GSH-Px (artış)	%19,4	%15,6
SOD (artış)	%23,6	%22,2
MDA (azalma)	%43,7	%42,4
Trigliserit (azalma)	%34,4	%25,1

ALP tez çalışmasında serum örneklerinden analiz edilen bir diğer parametredir. Önceki çalışmalarda, tipik aminotransferaz yükselmelerinden ziyade, NAYKH'li hastalarda alkalın fosfatazda biyopsi ile kanıtlanmış bir yükselme gözlemlenmiştir (Pantsari ve Harrison, 2006). Daha önce yapılan çalışmalarda *S. officinalis*'in ALP düzeylerine etkisi araştırılmış ve polar ekstrelerinin ve salvialonik asidin ALP düzeylerini

düşürdüğü gözlenmiştir (Ahmadi ve Abdollahy, 2012; He ve Shen, 2014; Khosravi vd., 2013). Ancak bu tez çalışması, *S. fruticosa* ekstresinin NAYKH durumunda ALP düzeylerini azalttığını gösteren ilk çalışmadır. Gentamisinle oluşturulan nefrotoksisite modelinde *M. sylvestris* çiçek ekstrelerinin etkisi araştırılmış ve verilen ekstrenin özellikle 200 mg/kg dozda ALP değerlerini normalleştirdiği daha önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur (Yarijani vd, 2019). Ancak daha önce yapılan ilgili çalışmada kullanılan *M. sylvestris* ekstresi fitokimyasal yönden araştırılmamıştır. Özellikle biyolojik etki tekrarlanabilirliği açısından bitkisel ürünlerde kimyasal profilin veya marker maddelerin ortaya konulması ve hatta miktar tayininin yapılması gereklidir (Bauer, 1998). Bundan dolayı hem detaylı fitokimyasal analizi hem de NAYKH modelinde yükselen ALP düzeylerinin araştırılması yönünden, ayrıca verilen ekstrelerin bir farmasötik formülasyon sistemi ile uygulanmış olması açısından bu tez çalışması daha önceki çalışmalardan farklılık göstermektedir. Formülasyon ile hayvanlara ekstre uygulamada teknik kolaylık sağlanmış olması ise çalışmaya ayrıca bir katkı sağlamıştır.

AST ve ALT seviyelerinin genellikle karaciğer fonksiyonunu değerlendirmek için kullanıldığı bilinmektedir. Önceki çalışmalar da ALT'nin NAYKH ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Dahası, AST ve ALT değerleri, artan NAYKH riski ile ilişkilendirilmiştir. ALT/AST oranı, hepatik yağ infiltrasyonunun ve hepatik steatozun derecesini değerlendirmek için kullanılabildiği de bilinmektedir (Zou vd., 2020). Daha önce yapılan çalışmalarda *S. fruticosa* uçucu yağının serum AST ve ALT seviyelerine etkisi araştırılmış ve uçucu yağın AST ve ALT seviyelerine etkili olmadığı tespit edilmiştir (Bülbül vd., 2016). Bu tez çalışması sonucunda ise, yağlı beslenme sonucu yükselen AST ve ALT düzeylerinde ekstre yüklü formülasyonların uygulanmasıyla düşüş gözlemlenmiştir. Ancak *S. fruticosa* ekstresinin bu tez çalışması kapsamında standardize edildiği fenolik bileşiklerden birisi olan rosmarinik asitin daha önceki çalışmalarda hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak total kolesterol, trigliserit, LDL-C, ALT, AST ve MDA düzeylerini azalttığı ve HDL-C, SOD ve adenosin trifosfat düzeylerini artırdığı ortaya konulmuştur. Hematoksilen&eoizin boyama ve Nil red yöntemleri ile, rosmarinik asitin iyi bir lipid düşürücü etkiye ve karaciğer hasarı üzerinde önemli koruyucu etkilere sahip olduğu daha önce Luo ve diğerlerinin 2021'de yapmış olduğu çalışmada gösterilmiştir. Daha önce yapılan bu çalışmada transmisyon elektron mikroskobu ve JC-1 floresan sonuçları, rosmarinik asitin hepatositlerde mitokondriyal hasarı iyileştirebileceği gösterilmiştir. Ek olarak flow sitometre sonuçları, rosmarinik asitin L02 hücrelerinde

radikal oluşumunu ve apoptozu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlar, rosmarinik asitin mitokondriyal hasarı onararak NAYKH belirteçlerini belirgin şekilde azalttığını göstermiştir (Luo vd., 2021). Başka bir çalışmada alınan sonuçlara paralel olarak bu tez çalışması sonucunda daha önce *M. sylvestris* çiçekli toprak üstü kısımları ile yapılan hepatoprotektif etki çalışmalarında ekstrenin kan değerlerini (ALT, ALP, AST vb.) iyileştirdiği ve büyük ölçüde parasetamol ile indüklenen karaciğer hasarını önlediği bulunmuştur (Hussain vd., 2014). Ayrıca sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede artan ALT ve AST düzeylerini *M. sylvestris* ekstrelerinin düşürdüğü de daha önce yapılmış deneysel başka bir çalışmanın sonuçlarında yer almaktadır (Yarijani vd., 2018). Bu tez çalışmasında serum ve karaciğer değerlerine ilave olarak *M. sylvestris* verilen gruplarda non-alkolik karaciğer yağlanmasına bağlı karaciğer histopatolojisinde var olan balonlaşma, enflamasyon ve steatoz gibi parametrelerin de ekstre kullanımı ile düzelebildiği gözlemlenmiştir. Özellikle enflamasyon ve balon hücre oluşumunu *M. sylvestris* ekstresinin 450 mg/kg dozda önlediği tez çalışması ile ortaya konulmuştur. Daha önce yapılan bir klinik çalışmada, *M. sylvestris* topraküstü kısımlarının toz edilerek kapsüllerde hastalara verilmesi durumunda, karaciğer hasarı olan hastalarda *M. sylvestris* uygulanmasının hastaların ALT-AST düzeylerinde olumlu bir etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Aktaş vd., 2014). Serum AST seviyelerini *M. sylvestris* ekstresi daha fazla düzenlemişken, *S. fruticosa* ekstresi de *M. sylvestris* ekstresine kıyasla serum ALT düzeylerini daha fazla düşürmüştür.

Kan şekeri düzeyi NAYKH ile doğrudan ilişkilendirilemese de bu tez çalışmasında kan şekeri düzeyleri de bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Daha önceki diyabet çalışmalarında *S. fruticosa* ekstrelerinin kan şekeri üzerindeki azaltıcı etkisi gösterilmiştir (Perfumi vd., 1991). Bu tez çalışması kapsamında da daha önceki çalışmalarda olduğu gibi *S. fruticosa* ekstresinin kan glikoz düzeylerini bir miktar düşürdüğü belirlenmiştir. *S. fruticosa* sulu infüzyonları daha önceki çalışmalarda diyabete karşı araştırılmış ve kan glikozunu düşürmede başarılı sonuçlar alınmıştır (El-Wahab vd., 2015). Daha önce yapılan klinik bir çalışmada *M. sylvestris* yapraklarını içeren takviyelerin kan şekerini düşürdüğü bulunmuş olsa da (Shahriyari vd., 2018), bu tez çalışması NAYKH ile ortaya çıkan kan şekerinin yükselmesi durumunu *M. sylvestris* çiçeklerinden elde edilen ekstrelerin düşürebileceğinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır.

Hayvan deneylerinde serum parametrelerine ait biyokimyasal analiz sonuçları Tablo 4.13.'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Ayrıca hem *in vivo* deneylerde hem *in*

vitro deneylerde ortak olarak çalışılan parametrelerin de karşılaştırma tablosu Tablo 4.14.'te yer almaktadır.

Tablo 4.13. Ekstre yüklü formülasyonların *in vivo* koşullarda serum parametrelerine etkileri

	<i>S. fruticosa</i> (400 mg/kg)	<i>M. sylvestris</i> (450 mg/kg)
GSH-Px	%25,3	%41,5
SOD	%41,4	%21,3
MDA	%40,5	%40,1
Trigliserit	%26,3	%45,5
ALP	%30,9	%21
AST	%5,6	%31
ALT	%19,4	%24,4
HDL	%40,7	%25,5
LDL	%22,9	%24,1
Toplam kolesterol	%27,1	%15,3
Glikoz	%21,8	%37,6
İnsülin	%38,2	%43,1

Tablo 4.14. Ekstre *in vitro*-*in vivo* sonuç karşılaştırması

	<i>S. fruticosa</i>	<i>M. sylvestris</i>
GSH <i>in vivo</i>	%25,3	%41,5
GSH <i>in vitro</i>	%12,3	%49,7
MDA <i>in vivo</i>	%40,5	%40,1
MDA <i>in vitro</i>	%27,3	%36,4
AST <i>in vivo</i>	%5,6	%31
AST <i>in vitro</i>	%27,9	%46,5
ALT <i>in vivo</i>	%19,4	%24,4
ALT <i>in vitro</i>	%53,5	%38,5

Genel anlamda, bilgimiz dahilinde *S. fruticosa* ekstresi ile daha önce NAYKH modelinde *in vitro* ya da *in vivo* herhangi bir deneysel çalışma bulunmamaktadır ve bu tez çalışması bu kapsamda yapılmış ilk çalışmadır. Ancak diğer *Salvia* türleri ile daha önceki çalışmalarda NAYKH ile ilgili bazı araştırmalar yapılmıştır. Chia olarak bilinen ve diyetlerde yer alan *S. hispanica* tohumları ile yapılan bir klinik çalışmada *S. hispanica* tohumu verilen hasta gruplarında non-alkolik karaciğer yağlanması önlenildiği gösterilmiştir (Medina-Urrutia vd., 2020). Daha önce yapılan başka bir çalışmada ise *S.*

grossheimii toprak üstü kısımlarından hazırlanan alkol ekstreleri sıçanlarda alkolle indüklenen karaciğer yağlanmasına karşı araştırılmış ve pozitif kontrole yakın sonuçlar elde edilmiştir (Hosseini vd., 2019). *S. plebeia* yapraklarının etanol ekstreleri ise non-alkolik karaciğer yağlanma modeli oluşturulmuş hayvanlarda denenmiş ve kan ve karaciğer enzimlerinde ekstre verilen hayvanlarda düşüş gözlemlenmiştir (Choi vd., 2016). Öte yandan yine bilğimiz dahilinde *M. sylvestris* de dahil olmak üzere *Malva* türlerinde daha önce karaciğer yağlanmasına karşı deneysel bir çalışma yapılmamıştır ve bu tez çalışması bu kapsamda detaylıca yapılan ilk çalışmadır.

Kısaca tekrarlandığında ve özetlendiğinde tez çıktısı olarak ilk defa gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen bulgular NAYKH için halk tıbbından yola çıkılarak geliştirilmiş ve *in vivo* deneylerde iyi sonuçlar alınmış iki farklı standardize fitoterapötik prototipler ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasında çalışmalara 6 drog ile başlanmıştır. Bu droglardan elde edilen 6 farklı ekstreden %50'si yani 3 tanesi (*A. sativum*, *M. sylvestris* ve *S. fruticosa* ekstreleri) hücre kültürü çalışmalarında başarılı sonuçlar vermiştir. Hücre kültürü deneylerinde ekstrelerin hücredeki toksisiteleri belirlendikten sonra sonuçlar 5 farklı parametre üzerinden değerlendirilmiştir. İleri çalışmalar için ve geliştirilen özgün formülasyonlara yüklemek için 2 ekstre (*S. fruticosa* ve *M. sylvestris*) seçilmiştir. Bu aşamada 3 ekstre içerisinde 2 tanesi ile devam etmemizdeki esas neden maddi olarak 3 grup daha ilave hayvan ile çalışma imkanımızın olmayışı ve tez projeleri tasarlanırken ileri çalışmalar için 1-2 ekstrenin seçilebileceğinin düşünülerek projelerin ve bütçelerinin tasarlanmış olmasıdır. Bu aşamada 3 ekstre içerisinde *A. sativum* ekstresinin seçilmeme nedeni ise *A. sativum* ekstresi ile 2020 yılında bir NAYKH çalışmasının gerçekleştirilmiş olmasıdır (Soleimani vd., 2020). Diğer ekstrelerle hiç çalışılmamış olunması tezin özgünlüğünü daha da güçlendireceğinden *S. fruticosa* ve *M. sylvestris* ekstreleri ile devam edilmiştir.

Tez çalışmasında 2 adet özgün mikroemülsiyon formülasyonu geliştirilmiştir. Bu formülasyonlardan birisine farklı dozlarda *S. fruticosa* ekstresi, diğerine ise farklı dozlarda *M. sylvestris* ekstresi yüklenmiştir. Bu özgün fitoterapötik formülasyon prototipleri ile *in vivo* deneylerde biyokimyasal olarak serum örneklerinden 12, karaciğer örneklerinden 4 farklı parametre; histopatolojik olarak ise 4 ayrı parametre incelenmiştir. *In vivo* deneyler 12 gruba ayrılan toplamda 96 sıçanla çalışılmıştır. Deney hayvanları ile araştırılan parametreler içerisinde *S. fruticosa* ekstresi biyokimyasal analizlerin %50'sinde anlamlı olarak daha iyi sonuç vermiştir. *M. sylvestris* ekstresi ise biyokimyasal

analizlerde parametrelerin %56,3'ünde daha etkili bulunmuştur. Histopatoloji çalışmalarında ise *S. fruticosa* ekstresi pozitif kontrolle kıyaslandığında aynı düzeyde etki göstermişken, *M. sylvestris* ekstresi ise %75 oranda anlamlı biçimde daha etkili bulunmuştur.

Bulgular doğrultusunda gelecekte yapılması önerilen ve planlanan çalışmalar arasında bu tez çalışmasında geliştirilen formülasyonların NAYKH üzerinde etkilerinin klinik araştırmalarda da araştırılmasıdır.

Genel değerlendirme olarak, tasarlanıp geliştirilen özgün fitoterapötik formülasyonlar hayvan deneylerinde umut vaat edici sonuçlar vermiş, pek çok farklı parametre açısından değerlendirilerek sonuçlar istatistiklerle ortaya konulmuştur. Tez kapsamında bir fitoterapötik prototip olarak denenen *S. fruticosa* ve *M. sylvestris* ekstreleri yüklü formülasyonların klinik çalışmalara geçebilecek potansiyelde olduğu ve klinik denemelerden sonra piyasada karaciğer yağlanması karşı kullanılacak etkili ürün potansiyellerinin bulunduğu ortaya konulmuştur. Böylelikle kadim Materia Medica bilgilerinin, yani geleneksel Farmakognozinin modern ve analitik yöntemlerle teknolojik formülasyonları ortaya konulmuş ve kanıta dayalı doğrulamaları yapılmıştır. Bu bitkiler yıllardan bu yana halk arasında gıda olarak kullanılmakta ve *in vitro* ve *in vivo* toksisite çalışmaları da bu bitkilerden elde edilen formülasyonların oral kullanımının güvenli olduğunu ortaya koymaktadır. Her iki durum da göz önüne alındığında tez kapsamında çalışılan ekstre yüklü formülasyonlar etkinlik ve toksisite açısından umut vadetmektedir. Tez çalışmasından elde edilen bulgular ileri klinik araştırmalar, faz çalışmaları ve farmakokinetik deneylerle ileri projelerde geliştirilerek henüz kanıtlanmış ve etkin bir tedavisi bulunmayan NAYKH için önemli bir bilimsel alt yapı niteliğindedir.

KAYNAKÇA

- Aabideen, Z. U., Mumtaz, M. W., Akhtar, M. T., Mukhtar, H., Raza, S. A., Touqeer, T., Saari, N. (2020). Anti-obesity attributes; UHPLC-QTOF-MS/MS-based metabolite profiling and molecular docking insights of *Taraxacum officinale*. *Molecules*, 25 (21), 4935.
- Abd-Allah, F. I., Dawaba, H. M., Ahmed, A. M. (2010). Development of a microemulsion-based formulation to improve the availability of poorly water-soluble drug. *Drug Discov. Ther.*, 4 (4), 257-66.
- Abenavoli, L., Aviello, G., Capasso, R., Milic, N., Capasso, F. (2011). Milk thistle for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepat. Mon.*, 11 (332), 173-177.
- Adams, J. B., Audhya, T., McDonough-Means, S., Rubin, R. A., Quig, D., Geis, E., Lee, W. (2011). Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity. *Nutr. Metab.*, 8 (1), 1-32.
- Adams, L. A., Angulo, P., Lindor, K. D. (2005). Nonalcoholic fatty liver disease. *Cmaj*, 172(7), 899-905.
- Ahmadi, R., and Abdollahy, E. (2012). The effects of *Salvia officinalis* extract on serum level of creatine kinase and alkaline phosphatase in male rats. *Razi J. Med. Sci.*, 19 (96), 20-25.
- Ajayi, T. O. and Moody, J. O. (2015). Ethnobotanical survey of plants used in the management of obesity in Ibadan, South-Western Nigeria. *Nig. J. Pharm. Res.*, 11 (1), 22-31.
- Aktaş, B., Çoban, Ş., Başar, Ö., Yaman, S., Yılmaz, B., Ekiz, F., Yüksel, O. (2014). Fulminant liver failure and renal failure related with *Malva sylvestris*. *Turk. J. Gastroenterol.*, 25, 437.
- Al Humayed, S. (2017). Protective and therapeutic effects of *Crataegus aronia* in non-alcoholic fatty liver disease. *Arch. Physiol. Biochem.*, 123 (1), 23-30.
- Altay, A., and Bozoğlu, F. (2017). *Salvia fruticosa* modulates mRNA expressions and activity levels of xenobiotic metabolizing CYP1A2, CYP2E1, NQO1, GPx, and GST enzymes in human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. *Nutr. Cancer*, 69 (6), 892-903.

- Amin Mir M, Sawhney SS, Jassal MMS (2013). Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale* Wudpecker. *J. Pharm. Pharmacol.* 2 (1):001–005
- Amirkalali, B., Poustchi, H., Keyvani, H. (2014). Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Its Predictors in North of Iran. *Iran J. Public. Health.*, 43 (9), 1275.
- Amiri, H., Fakour, S., Akradi, L. (2018). Biochemical and histopathological study on preventive effects of *Punica granatum* L. extract on fatty liver disease in the rats receiving high fat diet. *Sci. J. Kurdistan Univ. Med. Sci.*, 23 (3), 45-55.
- Amiri, M. S. and Joharchi, M. R. (2013). Ethnobotanical investigation of traditional medicinal plants commercialized in the markets of Mashhad, Iran. *Avicenna J. Phytomed.*, 3 (3), 254.
- Annino, J. S. ve Giese, R. W. (1976). Clinical chemistry, principles and procedures, 4th edition, Little Brown and Company, Boston., 76-82.
- Ann, J. Y., Eo, H., Lim, Y. (2015). Mulberry leaves (*Morus alba* L.) ameliorate obesity-induced hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in high-fat diet-fed mice. *Genes. Nutr.*, 10 (6), 1-13.
- Anwer, T., Safhi, M. M., Makeen, H. A., Alshahrani, S., Siddiqui, R., Sivakumar, S. M., Alam, M. F. (2021). Antidiabetic potential of *Moringa oleifera* Lam. leaf extract in type 2 diabetic rats, and its mechanism of action. *Trop. J. Pharm. Res.*, 20 (1), 95-103.
- Arenas, P. M., Molaes, S., Aguilar Contreras, A., Doumecq, B., Gabrielli, F. (2013). Ethnobotanical, micrographic and pharmacological features of plant-based weight-loss products sold in naturist stores in Mexico City: the need for better quality control. *Acta Bot. Bras.*, 27 (3), 560-579.
- Ari, S., Temel, M., Kargioğlu, M., Konuk, M. (2015). Ethnobotanical survey of plants used in Afyonkarahisar-Turkey. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 11(1), 1-15.
- Asadollahi, M., Firuzi, O., Jamebozorgi, F. H., Alizadeh, M., Jassbi, A. R. (2019). Ethnopharmacological studies, chemical composition, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of eleven *Salvia* in Iran. *J. Herb. Med.*, 17, 100250.
- Askari, F., Rashidkhani, B., Hekmatdoost, A. (2014). Cinnamon may have therapeutic benefits on lipid profile, liver enzymes, insulin resistance, and high-sensitivity C-

- reactive protein in nonalcoholic fatty liver disease patients. *Nutr. Res.*, 34 (2), 143-148.
- Avcı, G., Kupeli, E., Eryavuz, A., Yesilada, E., Kucukkurt, I. (2006). Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 107(3), 418-423.
- Babaei, Z. A., Fallah, H. H., Kianbakht, S., Changaei, P., Mirjalili, A., Salehi, J. (2017). *Malva sylvestris* L. protects from fluoride nephrotoxicity in rat. *J. Med. Plants*. 16 (61), 21-32.
- Bahmani, M., Shahinfard, N., Rafieian-Kopaei, M., Saki, K., Shahsavari, S., Taherikalani, M., Baharvand-Ahmadi, B. (2015). Chicory: A review on ethnobotanical effects of *Cichorium intybus* L. *J. Chem. Pharm. Sci.*, 8 (4), 672-682.
- Barham, D., and Trinder, P. (1972). An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst.*, 97 (1151), 142-145.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. (2010). Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food Chem. Toxicol.*, 48 (6), 1466-1472.
- Baser, K.H.C., Honda, G., Miki W. (1986). Herb Drugs and Herbalists in Turkey. Tokyo Publishing & Printing Co., Ltd., Tokyo
- Bauer, R. (1998). Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: Can acceptable drug standards be achieved?. *Drug Inf. J.: DIJ/Drug Information Association*, 32 (1), 101-110.
- Beghdad, M. C., Benammar, C., Bensalah, F., Sabri, F. Z., Belarbi, M., Chemat, F. (2014). Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content in leaves, flowers, stems and seeds of mallow (*Malva sylvestris* L.) from North Western of Algeria. *Afr. J. Biotechnol.*, 13 (3), 231-234.
- Benwahhoud, M., Jouad, H., Eddouks, M., Lyoussi, B. (2001). Hypoglycemic effect of *Salvia fruticosa* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 76 (1), 35-38.
- Billeter M, Meier B, Sticher O. (1991) 8-Hydroxyflavonoid glucuronides from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry*, 30, 987-990
- Bocchini, P., Andalo, C., Pozzi, R., Galletti, G. C., Antonelli, A. (2001). Determination of diallyl thiosulfinate (allicin) in garlic (*Allium sativum* L.) by high-performance

- liquid chromatography with a post-column photochemical reactor. *Anal. Chim. Acta*, 441 (1), 37-43.
- Bohlmann F, Zdero C. (1982). Sesquiterpene Lactones and Other Constituents from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*, 21, 2543–9.
- Bontempo, P., Stiuso, P., Lama, S., Napolitano, A., Piacente, S., Altucci, L., Rigano, D. (2021). Metabolite Profile and *In Vitro* Beneficial Effects of Black Garlic (*Allium sativum* L.) Methanol Extract. *Nutrients*, 13 (8), 2771.
- Bose, S., Laha, B., Banerjee, S. (2014). Quantification of allicin by high performance liquid chromatography-ultraviolet analysis with effect of post-ultrasonic sound and microwave radiation on fresh garlic cloves. *Pharmacogn. Mag.*, 10 (2), S288.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chem.*, 111 (4), 925-929.
- Brown, G. T., and Kleiner, D. E. (2016). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism*, 65 (8), 1080-1086.
- Bulbul, A., Evcimen, M., Sevilmili, S., Ulutas, E., Bulbul, T. (2016). Use of sage (*Salvia triloba* L.) and laurel (*Laurus nobilis* L.) oils in quail diets II. The effect on the oxidative status of serum and breast meat and on some serum biochemical parameters. *Eur. J. Vet. Sci.*, 32 (3), 167-173.
- Bulut, G., Bozkurt, M. Z., Tuzlaci, E. (2017). The preliminary ethnobotanical study of medicinal plants in Uak (Turkey). *Marmara Pharm. J.*, 21(2), 305-310.
- Caizares, P., Gracia, I., Gmez, L. A., de Argila, C. M., de Rafael, L., Garca, A. (2002). Optimization of *Allium sativum* solvent extraction for the inhibition of in vitro growth of *Helicobacter pylori*. *Biotech. Progr.*, 18 (6), 1227-1232.
- Choi, M. S., Lee, M. K., Jung, U. J., Kim, H. J., Do, G. M., Park, Y. B., Jeon, S. M. (2009). Metabolic response of soy pinitol on lipid-lowering, antioxidant and hepatoprotective action in hamsters fed-high fat and high cholesterol diet. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53 (6), 751-759.
- Choi, S. I., Cho, I. H., Han, S. H., Jeon, Y. J., Choi, J. G., Kim, J. S., Lee, J. H. (2016). Antiobesity effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in high-fat diet-induced obese mice. *J. Med. Food*, 19 (11), 1048-1056.

- Cicero, A. F., Colletti, A., Bellentani, S. (2018). Nutraceutical approach to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): the available clinical evidence. *Nutrients*, 10 (9), 1153.
- Cui, Y., Wang, X., Xue, J., Liu, J., Xie, M. (2014). *Chrysanthemum morifolium* extract attenuates high-fat milk-induced fatty liver through peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated mechanism in mice. *Nutr. Res.*, 34 (3), 268-275.
- Daraie, B., Pourahmad, J., Hamidi-Pour, N., Hosseini, M. J., Shaki, F., Soleimani, M. (2012). Uranyl acetate induces oxidative stress and mitochondrial membrane potential collapse in the human dermal fibroblast primary cells. *Iran. J. Pharm. Sci.: IJPR*, 11 (2), 495.
- Davaatseren, M., Hur, H. J., Yang, H. J., Hwang, J. T., Park, J. H., Kim, H. J., Sung, M. J. (2013). *Taraxacum officiale* (dandelion) leaf extract alleviates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver. *Food Chem. Toxicol.*, 58, 30-36.
- Davoodi, I., Rahimi, R., Abdollahi, M., Farzaei, F., Farzaei, M. H., Memariani, Z., Najafi, F. (2017). Promising effect of *Rosa damascena* extract on high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver. *J. Tradit. Complement. Med.*, 7 (4), 508-514.
- Day, C. P., ve James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two “hits”?. *Gastroenterol.*, 114(4), 842-845.
- Delfan, B., Bahmani, M., Kazemeini, H., Zargaran, A., Kopaei, M. R., Samani, M. A., Shahsavari, S. (2016). Identification of Effective Medicinal Plants for Hyperlipidemia: An Ethnobotanical Study in Lorestan Province, West of Iran. *Trad. Integ. Med.*, 1 (1), 28-34.
- El-Wahab, A., Mohamed, A., Toaima, W. I., Emad, S. (2015). Effect of Different Planting Locations in Egypt on *Salvia fruticosa* Mill. Plants. *Egyptian J. Desert Res.*, 65 (2), 281-297.
- Estes, C., Anstee, Q. M., Arias-Loste, M. T., Bantel, H., Bellentani, S., Caballeria, J., Colombo, M., Craxi, A., Crespo, J., Day, C. P., Eguchi, Y., Geier, A., Kondili, L. A., Kroy, D. C., Lazarus, J. V., Loomba, R., Manns, M. P., Marchesini, G., Nakajima, A., Razavi, H. (2018). Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J. Hepatol.*, 69 (4), 896–904.
- Exarchou, V., Kanetis, L., Charalambous, Z., Apers, S., Pieters, L., Gekas, V., Goulas, V. (2015). HPLC-SPE-NMR characterization of major metabolites in *Salvia*

- fruticosa* Mill. Extract with antifungal potential: Relevance of carnosic acid, carnosol, and hispidulin. *J. Agricult. Food Chem.*, 63 (2), 457-463.
- Faraji, S., Daneghian, S., Alizadeh, M. (2020). Effects of chicory (*Cichorium intybus* L.) on nonalcoholic fatty liver disease. *Tradit. Med. Res.*, 5 (6), 476-486.
- Farina, A., Doldo, A., Cotichini, V., Rajevic, M., Quaglia, M. G., Mulinacci, N., Vincieri, F. F. (1995). HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva silvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. *J. Pharm. Biomed.*, 14 (1-2), 203-211.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226 (1), 497-509.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, 18 (6), 499-502.
- Gasparetto, J. C., Martins, C. A. F., Hayashi, S. S., Otuky, M. F., Pontarolo, R. (2012). Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva silvestris* L.: a millennial herbal medicine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 64 (2), 172-189.
- Gürbüz, İ., Özkan, A. M. G., Akaydin, G., Salihoğlu, E., Günbatan, T., Demirci, F., Yeşilada, E. (2019). Folk medicine in düzce province (Turkey). *Turk. J. Bot.*, 43 (6), 769-784.
- Gürdal, B., ve Kültür, Ş. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 146(1), 113-126.
- Han, H. Y., Lee, S. K., Choi, B. K., Lee, D. R., Lee, H. J., Kim, T. W. (2019). Preventive effect of *Citrus aurantium* peel extract on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 42 (2), 255-260.
- He, X., and Shen, Q. (2014). Salvianolic acid B promotes bone formation by increasing activity of alkaline phosphatase in a rat tibia fracture model: a pilot study. *BMC Complement. Alternat. Med.*, 14 (1), 1-8.
- Heptinstall S, Awang DW, Dawson BA, Kindack D, Knight DW. (1992). Parthenolide Content and Bioactivity of Feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip.). Estimation of Commercial and Authenticated Feverfew Products. *J. Pharm. Pharmacol.*, 44, 391–5.
- Heredia-Díaz, Y., García-Díaz, J., López-González, T., Chil-Nuñez, I., Arias-Ramos, D., Escalona-Arranz, J. C., Martínez-Figueroa, Y. (2018). An ethnobotanical survey

- of medicinal plants used by inhabitants of Holguín, Eastern Region, Cuba. *Aromáticas*, 17 (2), 160-196.
- Hiller, A. (1987). National cholesterol education programme. Recommendations for HDL-cholesterol measurements. *Clin. Chem*, 33, 895.
- Hong, X., Tang, H., Wu, L., Li, L. (2006). Protective effects of the *Alisma orientalis* extract on the experimental nonalcoholic fatty liver disease. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58 (10), 1391-1398.
- Hosseini, S. M. R., Razmgah, G. R. G., Nematy, M., Esmaily, H., Yousefi, M., Kamalinejad, M., Mosavat, S. H. (2018). Efficacy of black seed (*Nigella sativa*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) on non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled clinical trial. *Iran Red. Crescent. Med. J.*, 20 (3), 19-35.
- Hosseini, S. M., Asadbegy, M., Karamian, R., Yari, S. (2019). Phytochemical Contents of *Salvia grossheimii* SOSN. Species Extract and Its Protective Effect on Alcohol-Induced Fatty Liver in Rats. *Iranian Red. Cres. Med. J.*, 21 (11), 7.
- Hoveizi, E., Pouratar, F., Kesmati, M., Shahriari, A. (2020). Induction of Apoptosis in Human Cancer A549 Cells Through Hydroalcoholic Extract of *Salvia officinalis*. *J. Cell & Tissue*, 11 (2), 100-112.
- Hussain, L., Ikram, J., Rehman, K., Tariq, M., Ibrahim, M., Akash, M. S. H. (2014). Hepatoprotective effects of *Malva sylvestris* L. against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Turk. J. Biol.*, 38 (3), 396-402.
- Iberl, B., Winkler, G., Müller, B., Knobloch, K. (1990). Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Med.*, 56 (03), 320-326.
- Im, J. Y., Ki, H. H., Xin, M., Kwon, S. U., Kim, Y. H., Kim, D. K., Lee, Y. M. (2015). Anti-obesity effect of *Triticum aestivum* sprout extract in high-fat-diet-induced obese mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79 (7), 1133-1140.
- Izdebska, M., Piątkowska-Chmiel, I., Korolczuk, A., Herbet, M., Gawrońska-Grzywacz, M., Gieroba, R., Dudka, J. (2017). The beneficial effects of resveratrol on steatosis and mitochondrial oxidative stress in HepG2 cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 95 (12), 1442-1453.
- Jennison, E., Patel, J., Scorletti, E., Byrne, C. D. (2019). Diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgraduate Med. J.*, 95 (1124), 314–322.
- Jiang, G., Ramachandraiah, K., Murtaza, M. A., Wang, L., Li, S., Ameer, K. (2021). Synergistic effects of black ginseng and aged garlic extracts for the amelioration of

- nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. *Food Sci. Nutr.*, 9 (6), 3091-3099.
- Jiménez-Agüero, R., Emparanza, J. I., Beguiristain, A., Bujanda, L., Alustiza, J. M., García, E., Banales, J. M. (2014). Novel equation to determine the hepatic triglyceride concentration in humans by MRI: diagnosis and monitoring of NAFLD in obese patients before and after bariatric surgery. *BMC Med.*, 12 (1), 1-14.
- Kamatou, G. P., Viljoen, A. M., Steenkamp, P. (2010). Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chem.*, 119 (2), 684-688.
- Kaya, E. and Yilmaz, Y. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease: A growing public health problem in Turkey. *Turk. J. Gastroenterol.*, 30 (10), 865-871.
- Kei, S. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 90 (1), 37-43.
- Khavasi, N., Somi, M., Khadem, E., Ayati, M. H., Torbati, M., Fazljou, S. M. (2018). Daily consumption of the *Capparis spinosa* reduces some atherogenic indices in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, clinical trial. *Iran Red. Cres. Med. J.*, 20 (6), 122-131.
- Khosravi, M., Khakpour, S., Tajadod, G., Tokazabani Balasi, F. (2013). Effect of *Salvia officinalis* hydroalcoholic extract on liver enzymes in male rat. *Med. Sci. J. Islam. Azad Univesity-Tehran Med. Br.*, 23 (2), 113-119.
- Kilic, O., ve Bagci, E. (2013). An ethnobotanical survey of some medicinal plants in Keban (Elaz-Turkey). *J. Med. Plants Res.*, 7(23), 1675-1684.
- Kundu, B. B., Vanni, K., Farheen, A., Jha, P., Pandey, D. K., Kumar, V. (2021). *Dioscorea bulbifera* L. (Dioscoreaceae): A review of its ethnobotany, pharmacology and conservation needs. *S. Afr. J. Bot.*, 140, 365-374.
- Kuzu, N., Bahcecioglu, I. H., Dagli, A. F., Ozercan, I. H., Ustündag, B., Sahin, K. (2008). Epigallocatechin gallate attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by high fat diet. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 23 (2), e465-e470.
- Kyriakou, S., Tragkola, V., Plioukas, M., Anestopoulos, I., Chatzopoulou, P. S., Sarrou, E., Panayiotidis, M. I. (2021). Chemical and Biological Characterization of the Anticancer Potency of *Salvia fruticosa* in a Model of Human Malignant Melanoma. *Plants*, 10 (11), 2472.
- Lanzotti, V., (2006). The analysis of onion and garlic. *J. Chromatograp. A*, 1112, 3–22.

- Leclercq, I. A., Farrell, G. C., Sempoux, C., dela Peña, A., Horsmans, Y. (2004). Curcumin inhibits NF- κ B activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. *J. Hepatol.*, 41 (6), 926-934.
- Lee, J. H., Felipe, P., Yang, Y. H., Kim, M. Y., Kwon, O. Y., Sok, D. E., Kim, M. R. (2009). Effects of dietary supplementation with red-pigmented leafy lettuce (*Lactuca sativa*) on lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high-fat high-cholesterol diet. *Br. J. Nutr.*, 101 (8), 1246-1254.
- Leoni, S., Tovoli, F., Napoli, L., Serio, I., Ferri, S., Bolondi, L. (2018). Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J. Gastroenterol.*, 24(30), 3361.
- Li, Z., Xu, J., Zheng, P., Xing, L., Shen, H., Yang, L., Ji, G. (2015). Hawthorn leaf flavonoids alleviate nonalcoholic fatty liver disease by enhancing the adiponectin/AMPK pathway. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 8 (10), 17295.
- Lima, C. F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2005). The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.*, 97 (2), 383-389.
- Liu, M., Xu, L., Yin, L., Qi, Y., Xu, Y., Han, X., Peng, J. (2015). Potent effects of dioscin against obesity in mice. *Sci. Reports*, 5 (1), 1-11.
- Liu, Y. L., Lin, L. C., Tung, Y. T., Ho, S. T., Chen, Y. L., Lin, C. C., Wu, J. H. (2017). *Rhododendron oldhamii* leaf extract improves fatty liver syndrome by increasing lipid oxidation and decreasing the lipogenesis pathway in mice. *Int. J. Med. Sci.*, 14 (9), 862.
- Londhe, V. P., Gavasane, A. T., Nipate, S. S., Bandawane, D. D., Chaudhari, P. D. (2011). Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases: An overview. *Angiogenesis*, 12, 13.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Luo, C., Sun, H., Peng, J., Gao, C., Bao, L., Ji, R., Jin, Y. (2021). Rosmarinic acid exerts an antagonistic effect on nonalcoholic fatty liver disease by regulating the YAP1/TAZ-PPAR γ /PGC-1 α signaling pathway. *Phytother. Res.*, 35 (2), 1010-1022.

- Madan, K., Bhardwaj, P., Thareja, S., Gupta, S. D., Saraya, A. (2006). Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J. Clin. Gastroenterol.*, 40 (10), 930-935.
- Madduma Hewage, S., Prashar, S., Siow, Y. L. (2021). Lingonberry Improves Non-Alcoholic Fatty Liver Disease by Reducing Hepatic Lipid Accumulation, Oxidative Stress and Inflammatory Response. *Antioxidants*, 10 (4), 565.
- Mahboubi, M. and Mahboubi, M. (2020). Hepatoprotection by dandelion (*Taraxacum officinale*) and mechanisms. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 10 (1), 1.
- Marouane, W., Soussi, A., Murat, J. C., Bezzine, S., El Feki, A. (2011). The protective effect of *Malva sylvestris* on rat kidney damaged by vanadium. *Lipids Health Dis.*, 10 (1), 1-8.
- Mashmoul, M., Azlan, A., Mohtarrudin, N., Yusof, B. N. M., Khaza'ai, H., Khoo, H. E., Boroushaki, M. T. (2016). Protective effects of saffron extract and crocin supplementation on fatty liver tissue of high-fat diet-induced obese rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, 16 (1), 1-7.
- Malenčić, D., Gašić, O., Popović, M., Boža, P. (2000). Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem. *Phytotherapy Research: An Int. J. Pharm.Toxico. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, 14 (7), 546-548.
- Medina-Urrutia, A., Lopez-Urbe, A. R., El Hafidi, M., Gonzalez-Salazar, M. D. C., Posadas-Sánchez, R., Jorge-Galarza, E., Juárez-Rojas, J. G. (2020). Chia (*Salvia hispanica*)-supplemented diet ameliorates non-alcoholic fatty liver disease and its metabolic abnormalities in humans. *Lipids Health Dis.*, 19, 1-9.
- Mei, L., Tang, Y., Li, M., Yang, P., Liu, Z., Yuan, J., Zheng, P. (2015). Co-administration of cholesterol-lowering probiotics and anthraquinone from *Cassia obtusifolia* L. ameliorate non-alcoholic fatty liver. *PLoS One*, 10 (9), e0138078.
- Meng, Y., Liu, Y., Fang, N., Guo, Y. (2019). Hepatoprotective effects of *Cassia* semen ethanol extract on non-alcoholic fatty liver disease in experimental rat. *Pharm. Biol.*, 57 (1), 98-104.
- Menon, K. N., Angulo, P., Lindor, K. D. (2001). Severe cholestatic hepatitis from troglitazone in a patient with nonalcoholic steatohepatitis and diabetes mellitus. *Am. J. Gastroenterol.*, 96(5), 1631-1634.

- Mohamadi, N., Sharififar, F., Koohpayeh, A., Daneshpajouh, M. (2015). Traditional and Ethnobotanical uses of medicinal plants by ancient populations in Khabr and Rouchon of Iran. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 5 (11), 101-7.
- Mohammadifar, M., Taghizadeh, M., Abed, A., Soltani, A., Tamtaji, O., Khamechian, T., Talaei, S. A. (2020). Effect of *Ziziphus jujuba* Mill., *Cichorium intybus* L. and *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Combination extract on non-alcoholic fatty liver disease in rats. *J. Med. Plants.*, 18 (72), 133-142.
- Moradi, R., Hajialiani, M., Salmani, S., Almasi, M., Zangeneh, A., Zangeneh, M. M. (2019). Effect of aqueous extract of *Allium saralicum* RM Fritsch on fatty liver induced by high-fat diet in Wistar rats. *Comp. Clin. Path.*, 28 (5), 1205-1211.
- Naderian, M., Ebrahimi, H., Sohrabpour, A.A. (2016). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the middle eastern area: What is the exact estimation? *Hepatology.*, 64 (4), 1390-1391.
- Najafi, H., Mohamadi Yarijani, Z., Changizi-Ashtiyani, S., Mansouri, K., Modarresi, M., Madani, S. H., Bastani, B. (2017). Protective effect of *Malva sylvestris* L. extract in ischemia-reperfusion induced acute kidney and remote liver injury. *PLoS One*, 12 (11), e0188270.
- Nakamura, Y., Yoshikawa, N., Hiroki, I., Sato, K., Ohtsuki, K., Chang, C. C., Trosko, J. E. (2005). β -Sitosterol from psyllium seed husk (*Plantago ovata* Forsk) restores gap junctional intercellular communication in Ha-ras transfected rat liver cells. *Nutr. Cancer*, 51 (2), 218-225.
- Nassiri-Asl, M., Zamansoltani, F., Abbasi, E., Daneshi, M. M., Zangivand, A. A. (1986). Effects of *Urtica dioica* extract on lipid profile in hypercholesterolemic rats. *EEC*, 86, 609.
- Neuschwander-Tetri, B. A., Brunt, E. M., Wehmeier, K. R., Oliver, D., Bacon, B. R. (2003). Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR- γ ligand rosiglitazone. *Hepatology*, 38(4), 1008-1017.
- Nigam, P., Bhatt, S., Misra, A., Chadha, D. S., Vaidya, M., Dasgupta, J., Pasha, Q. M. (2014). Effect of a 6-month intervention with cooking oils containing a high concentration of monounsaturated fatty acids (olive and canola oils) compared with control oil in male Asian Indians with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Technol. Ther.*, 16 (4), 255-261.

- OECD. (2002), *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*, OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals*, Bölüm 4, OECD Yayın Evi, Paris, Fransa.
- Oh, H. S., Cho, W., Tak, S. B., Kim, S., Hong, S. P., Kim, S. O. (2019). *Triticum aestivum* ethanolic extract improves non-alcoholic fatty liver disease in mice fed a choline-deficient or high-fat diet. *J. Sci. Food Agric.*, 99 (5), 2602-2609.
- Paglia, D. E., and Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The J. Labor. Clin. Med.*, 70 (1), 158-169.
- Pantsari, M. W., and Harrison, S. A. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease presenting with an isolated elevated alkaline phosphatase. *J. Clin. Gastroenterol.*, 40 (7), 633-635.
- Pareek, A., Suthar, M., Rathore, G. S., Bansal, V. (2011). Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacog. Rev.*, 5 (9), 103.
- Park, H. J., Jung, U. J., Lee, M. K., Cho, S. J., Jung, H. K., Hong, J. H., Choi, M. S. (2013). Modulation of lipid metabolism by polyphenol-rich grape skin extract improves liver steatosis and adiposity in high fat fed mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, 57 (2), 360-364.
- Parsi, A., Torkashvand, M., Hajiani, E., Rahimlou, M., Sadeghi, N. (2020). The effects of *Crocus sativus* extract on serum lipid profile and liver enzymes in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized placebo-controlled study. *Obes. Med.*, 17, 100165.
- Pavela, R., Sajfritová, M., Sovová, H., Bárnet, M., Karban, J. (2010). The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Ind. Crop. Prod.*, 31 (3), 449-454.
- Peng, Q., Zhang, Q., Xiao, W., Shao, M., Fan, Q., Zhang, H., Cai, H. (2014). Protective effects of *Sapindus mukorossi* Gaertn against fatty liver disease induced by high fat diet in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450 (1), 685-691.
- Perfumi, M., Arnold, N., Tacconi, R. (1991). Hypoglycemic activity of *Salvia fruticosa* Mill. from Cyprus. *J. Ethnopharmacol.*, 34 (2-3), 135-140.
- Pezeshki, A., Safi, S., Feizi, A., Askari, G., Karami, F. (2016). The effect of green tea extract supplementation on liver enzymes in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Prevent. Med.*, 7 (28), 1-6.

- Polat, R., Cakilcioglu, U., Satıl, F. (2013). Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl—Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 148(3), 951-963.
- Promrat, K., Lutchman, G., Uwaifo, G. I., Freedman, R. J., Soza, A., Heller, T., Hoofnagle, J. H. (2004). A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 39(1), 188-196.
- Quan, H. Y., Kim, S. J., Jo, H. K., Kim, G. W., Chung, S. H. (2013). Betulinic acid alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting SREBP1 activity via the AMPK–mTOR–SREBP signaling pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 85 (9), 1330-1340.
- Rahman, M. M., Fazlic, V., Saad, N. W. (2012). Antioxidant properties of raw garlic (*Allium sativum*) extract. *Int. Food Res. J.*, 19 (2), 589-591.
- Rajabi, M., Kalvandi, R., Kahramfar, Z., Cheleh, T.C. (2020). Investigation of the Effect of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) on Characteristics of the Fatty Liver. *Artic. Complement. Med. J.*, 10 (2), 87-90.
- Rinella, M. E. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Jama*, 313(22), 2263-2273.
- Saad, A. B., Rjeibi, I., Alimi, H., Ncib, S., Smida, A., Zouari, N., Zourgui, L. (2017). Lithium induced, oxidative stress and related damages in testes and heart in male rats: The protective effects of *Malva sylvestris* extract. *Biomed. Pharmacother.*, 86, 127-135.
- Sağlık Bakanlığı (2016). *Türk Farmakopesi II, Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu*. (1. Baskı). Ankara.
- Sahebkar, A. (2011). Potential efficacy of ginger as a natural supplement for nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.*, 17 (2), 271.
- Samiei, S., Khadem, M., Pourbabaki, R., Ghazi-Khansari, M., Shahtaheri, S. J. (2019). Protective effect of *Salvia officinalis* extract on deltamethrin-induced hepatotoxicity in rats. *J. Mazandaran Univ. Med. Sci.*, 29 (178), 134-140.
- Samiei, S., Khadem, M., Pourbabaki, R., Amirkhanlou, F., Shahtaheri, S. J. (2020). Effect of *Salvia officinalis* Extract (Sage) on the Toxicity and Oxidative Stress of Deltamethrin in Kidneys of the Rats. *J. Occup. Hyg. Eng.*, 7 (3), 36-46.
- Sangsefidi, Z. S., Yarhosseini, F., Hosseinzadeh, M., Ranjbar, A., Akhondi-Meybodi, M., Fallahzadeh, H., Mozaffari-Khosravi, H. (2021). The effect of (*Cornus mas* L.) fruit extract on liver function among patients with nonalcoholic fatty liver: A double-blind randomized clinical trial. *Phyther. Res.*, 35 (9), 5259-5268.

- Sarfraz, R. M., Khan, H., Maheen, S., Afzal, S., Akram, M. R., Mahmood, A., Yasmeeni, T. (2017). *Plantago ovata*: A comprehensive review on cultivation, biochemical, pharmaceutical and pharmacological aspects. *Acta. Pol. Pharm.*, 74 (3), 739-46.
- Sargin, S. A. (2015). Ethnobotanical survey of medicinal plants in Bozyazı district of Mersin, Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, 173, 105-126.
- Sarper, F., Akaydin, G., Şimşek, I., Yeşilada, E. (2009). An ethnobotanical field survey in the Haymana district of Ankara province in Turkey. *Turk. J. Biol.*, 33(1), 79-88.
- Schulman, J. H., Stoeckenius, W., Prince, L. M. (1959). Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *The Journal of physical chemistry*, 63(10), 1677-1680.
- Schütz, K., Kammerer, D. R., Carle, R., Schieber, A. (2005). Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute. Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2), 179-186.
- Sedlak, J. and Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem*, 25, 192-205.
- Serino, E., Chahardoli, A., Badolati, N., Sirignano, C., Jalilian, F., Mojarab, M., Taghialatela-Scafati, O. (2021). Salvigenin, a trimethoxylated flavone from *Achillea wilhelmsii* C. Koch, exerts combined lipid-lowering and mitochondrial stimulatory effects. *Antioxidants*, 10 (7), 1042.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia. *J. Ethnopharmacol.*, 75(2-3), 95-115.
- Shahriyari, F., Askari, G. H., Sadeghianshahi, M. R., Ebadi Asl, H., Sharifatpour, R., Abbasi, H. (2018). The effect of Aerobic exercise and *Malva sylvestris* supplements on the lipid profile, glucose and WHR in obese and inactive women. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.*, 8 (S2), 121-128.
- Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M., Shafiq, S. (2007). Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. *Aaps Pharmscitech.*, 8 (4), 191-199.

- Sharma, P., Verma, P. K., Pankaj, N. K., Agarwal, S. (2021). The Phytochemical Ingredients and Therapeutic Potential of *Cynara scolymus* L. *Pharm. Biomed. Res.*, 7 (3), 141-160.
- She, X., Wang, F., Ma, J., Chen, X., Ren, D., Lu, J. (2016). *In vitro* antioxidant and protective effects of corn peptides on ethanol-induced damage in HepG2 cells. *Food Agr. Immunol.*, 27 (1), 99-110.
- Shen, L., Xiong, Y., Wang, D. Q., Howles, P., Basford, J. E., Wang, J., Liu, M. (2013). Ginsenoside Rb1 reduces fatty liver by activating AMP-activated protein kinase in obese rats. *J. Lipid Res.*, 54 (5), 1430-1438.
- Siew, Y. Y., Zareisedehizadeh, S., Seetoh, W. G., Neo, S. Y., Tan, C. H., Koh, H. L. (2014). Ethnobotanical survey of usage of fresh medicinal plants in Singapore. *J. Ethnopharmacol.*, 155 (3), 1450-1466.
- Singh A, Malhotra S, Subban R (2008) Dandelion (*Taraxacum officinale*) - hepatoprotective herb with therapeutic potential. *Pharmacogn Rev.* 2 (3), 163–167.
- Sirichaiwetchakoon, K., Lowe, G. M., Kupittayanant, S., Churproong, S., Eumkeb, G. (2020). *Pluchea indica* (L.) Less. tea ameliorates hyperglycemia, dyslipidemia, and obesity in high fat diet-fed mice. *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, 20, 1-12.
- Sohn, E. H., Kim, T., Jeong, Y. J., Han, H. S., Lea, Y., Cho, Y. M., Kang, S. C. (2015). Triglyceride control effect of *Agrimonia eupatoria* L. in oleic acid induced NAFLD-HepG2 model. *Kor. J. Plant Res.*, 28 (5), 635-640.
- Soleimani, D., Paknahad, Z., Askari, G., Iraj, B., Feizi, A. (2016). Effect of garlic powder consumption on body composition in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Adv. Biomed. Res.*, 5 (2), 1-6.
- Sriraman, S., Ramanujam, G. M., Ramasamy, M., Dubey, G. P. (2015). Identification of beta-sitosterol and stigmasterol in *Bambusa bambos* (L.) Voss leaf extract using HPLC and its estrogenic effect in vitro. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 115, 55-61.
- Sur, R., Martin, K., Liebel, F., Lyte, P., Shapiro, S., Southall, M. (2009). Anti-inflammatory activity of parthenolide-depleted Feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Inflammopharmacology*, 17 (1), 42-49.

- Susutlerpanya, W., Werawatganon, D., Siriviriyakul, P., Klaikeaw, N. (2015). Genistein attenuates nonalcoholic steatohepatitis and increases hepatic PPAR γ in a rat model. *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, 11, 56-71.
- Suttle, N. F. (1986). Copper deficiency in ruminants; recent developments. *The Vet. Record*, 119 (21), 519-522.
- Swathi, S., Neeharika, V., Lakshmi, P. K. (2011). Formulation and evaluation of fast dissolving tablets of freely and poorly soluble drug with natural and synthetic super disintegrants. *Drug Invent. Today*, 3 (10), 230-241.
- Şekerler, T., Şen, A., Bitiş, L., Şener, A. (2020). In vitro antihepatocellular carcinoma activity of secondary metabolites of *Centaurea kilaia* boiss. *J. Res. Pharm*, 24, 479-486.
- Taheri, S., Zarei, A., Ashtiyani, S. C., Rezaei, A., Zaheiri, S. (2012). Evaluation of the effects of hydroalcoholic extract of *Berberis vulgaris* root on the activity of liver enzymes in male hypercholesterolemic rats. *Avicenna J. Phytomed.*, 2 (3), 153.
- Topcu, G. Öztürk, M., Kuşman, T., Demirköz, A. A. B., Kolak, U., Ulubelen, A. (2013). Terpenoids, essential oil composition, fatty acid profile, and biological activities of Anatolian *Salvia fruticosa* Mill. *Turkish J. Chem.*, 37 (4), 619-632.
- Uzun, S. P., ve Koca, C. (2020). Ethnobotanical survey of medicinal plants traded in herbal markets of Kahramanmaraş. *Plant div.*, 42(6), 443-454.
- Ünyayar, S., Celik, A., Çekiç, F. Ö., Gözel, A. (2006). Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*, 21 (1), 77-81.
- Üstündağ Okur, N., Çağlar, E. Ş., Pekcan, A. N., Okur, M. E., Ayla, Ş. (2019). Preparation, optimization and *in vivo* anti-inflammatory evaluation of hydroquinone loaded microemulsion formulations for melasma treatment. *J. Res. Pharm.*, 23 (4), 662-670.
- Üstündağ-Okur, N., Gökçe, E. H., Eğrilmez, S., Özer, Ö., Ertan, G. (2014). Novel ofloxacin-loaded microemulsion formulations for ocular delivery. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 30 (4), 319-332.
- Vairetti, M., Di Pasqua, L. G., Cagna, M., Richelmi, P., Ferrigno, A., Berardo, C. (2021). Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. *Antioxidants*, 10 (3), 364.

- Van Handel, E. (1961). Suggested modifications of the micro determination of triglycerides. *Clin. Chem.*, 7 (3), 249-251.
- Végh, K., Alberti, Á., Riethmüller, E., Tóth, A., Béni, S., Kéry, Á. (2014). Supercritical fluid extraction and convergence chromatographic determination of parthenolide in *Tanacetum parthenium* L.: Experimental design, modeling and optimization. *J. Supercrit. Fluids*, 95, 84-91.
- Wang, D., Gao, Q., Wang, T., Qian, F., Wang, Y. (2017). Theanine: the unique amino acid in the tea plant as an oral hepatoprotective agent. *Int. J. Prev. Med.*, 26 (3), 384-391.
- Wang, T., Choi, R. C., Li, J., Bi, C. W., Ran, W., Chen, X., Tsim, K. W. (2012). Trillin, a steroidal saponin isolated from the rhizomes of *Dioscorea nipponica*, exerts protective effects against hyperlipidemia and oxidative stress. *J. Ethnopharmacol.*, 139 (1), 214-220.
- Wani, F. A., Albahrawy, A. Z., Rahiman, S. (2015). Hypolipidemic activity of olive oil (*Olea europaea*) against high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. *Open J. Pathol.*, 5 (03), 73.
- Wirngo, F. E., Lambert, M. N., Jeppesen, P. B. (2016). The physiological effects of dandelion (*Taraxacum officinale*) in type 2 diabetes. *Rev. Diabet. Stud.*, 13 (2-3), 113.
- Wu, Y., Zhou, F., Jiang, H., Wang, Z., Hua, C., Zhang, Y. (2018). Chicory (*Cichorium intybus* L.) polysaccharides attenuate high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease via AMPK activation. *Int. J. Biol*, 118, 886-895.
- Wu, Z., Zhang, Y., Gong, X., Cheng, G., Pu, S., Cai, S. (2020). The preventive effect of phenolic-rich extracts from Chinese sumac fruits against nonalcoholic fatty liver disease in rats induced by a high-fat diet. *Food Funct.*, 11 (1), 799-812.
- Xu, J., Wang, X., Cao, K., Dong, Z., Feng, Z., Liu, J. (2017). Combination of β -glucan and *Morus alba* L. leaf extract promotes metabolic benefits in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*, 9 (10), 1110.
- Yan, H. M., Xia, M. F., Wang, Y., Chang, X. X., Yao, X. Z., Rao, S. X., Gao, X. (2015). Efficacy of berberine in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PloS one*, 10 (8), e0134172.
- Yan, T., Yan, N., Wang, P. (2020). Herbal drug discovery for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Acta Pharm. Sin. B.*, 10 (1), 3-18.

- Yan, Z., Fan, R., Yin, S., Zhao, X., Liu, J., Li, L., Ge, L. (2015). Protective effects of *Ginkgo biloba* leaf polysaccharide on nonalcoholic fatty liver disease and its mechanisms. *Int. J. Biol. Macromol.*, 80, 573-580.
- Yang, X., Yang, L., Zheng, H. (2010). Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food Chem. Toxicol.*, 48 (8-9), 2374-2379.
- Yarijani, Z. M., Godini, A., Madani, S. H., Najafi, H. (2018). Reduction of cisplatin-induced renal and hepatic side effects in rat through antioxidative and anti-inflammatory properties of *Malva sylvestris* L. extract. *Biomed. Pharmacother.*, 106, 1767-1774.
- Yeşilada, E. (2002). Biodiversity in Turkish folk medicine. In *Biodiversity* (s. 119-135). Springer, Boston, MA.
- Younossi, Z. M. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J. Hepatol.*, 70 (3), 531–544.
- Yuan, X., Wang, J., Tang, X., Li, Y., Xia, P., Gao, X. (2015). Berberine ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by a global modulation of hepatic mRNA and lncRNA expression profiles. *J. Transl. Med.*, 13 (1), 1-11.
- Zelber-Sagi, S., Ivancovsky-Wajcman, D., Fliss-Isakov, N., Hahn, M., Webb, M., Shibolet, O., Tirosh, O. (2020). Serum malondialdehyde is associated with non-alcoholic fatty liver and related liver damage differentially in men and women. *Antioxidants*, 9 (7), 578.
- Zhao, W., Song, F., Hu, D., Chen, H., Zhai, Q., Lu, W., Wang, G. (2020). The protective effect of *Myristica fragrans* Houtt. extracts against obesity and inflammation by regulating free fatty acids metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, 12 (9), 2507.
- Ziamajidi, N., Khaghani, S., Hassanzadeh, G., Vardasbi, S., Ahmadian, S., Nowrouzi, A., Abdirad, A. (2013). Amelioration by chicory seed extract of diabetes-and oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) via modulation of PPAR α and SREBP-1. *Food Chem. Toxicol.*, 58, 198-209.
- Zhen-Yu, W. (2005). Impact of anthocyanin from *Malva sylvestris* on plasma lipids and free radical. *J. For. Res.*, 16 (3), 228-232.

- Zou, Y., Zhong, L., Hu, C., Sheng, G. (2020). Association between the alanine aminotransferase/aspartate aminotransferase ratio and new-onset non-alcoholic fatty liver disease in a nonobese Chinese population: a population-based longitudinal study. *Lipids Health Dis.*, 19 (1), 1-10.
- Zuo, H., Li, Y., Cui, Y., An, Y. (2017). Cardioprotective effect of *Malva sylvestris* L. in myocardial ischemic/reperfused rats. *Biomed. Pharmacother.*, 95, 679-684.
- http-1 <http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php> (Erişim Tarihi: 08.12.2021)
- http-2 <https://www.hptlc-association.org/methods/> (Erişim Tarihi: 01.02.2022)



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Ayşe Esra KARADAĞ
ORCID No : 0000-0002-3412-0807
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2009-2014, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
- 2014-2017, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Tezli Yüksek Lisans
- 2017-2022, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Doktora
- 2014-Halen, İstanbul Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi
- 2021- Halen, FitofaRx Farmasötik Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti. Kurucu ve Genel Müdürü

Bilimsel Faaliyetleri:

Bitirilen Tezler:

- Matrin ve Oksimatrinin Mikrobiyal Transformasyonu ve Metabolitlerinin Kolinesteraz İnhibisyonu, 2017, Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Prof. Dr. Fatih Demirci.
- Karaciğer Yağlanması Karşı Fitoterapötik Formülasyonların Geliştirilmesi, 2022, Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. Fatih Demirci

Çalıştığı Projeler:

- Matrin ve Oksimatrinin Mikrobiyal Transformasyonu ve Metabolitlerinin Kolinesteraz İnhibisyonu, Anadolu Üniversitesi BAP Projesi, Araştırmacı. 10.000 TL. (2015-2017) Proje no: 1601S029
- *Phlomis* L. üzerine *in vivo/in vitro* Aktivite Çalışmaları ve Fitokimyasal Analizler, Anadolu Üniversitesi BAP Projesi, Araştırmacı. 199.989 TL (2018-2020) Proje No: 1807S259

- Karaciğer Yağlanması Karşı Fitoterapötik Formülasyonların Geliştirilmesi, Anadolu Üniversitesi BAP Projesi, Araştırmacı. 39.999,44 TL (2020-2022) Proje No:2001S007
- *Allium sativum* L. Soğanlarından Hazırlanan Formülasyonların Osteoartrit Üzerine Etkisinin Araştırılması, Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Projesi, Araştırmacı. 42.716 TL (2019-2021) Proje No: 2019/113
- *Salvia fruticosa* Mill. Ekstrelerinden Tasarlanan Farmasötik Formülasyonların in vitro/in vivo Biyolojik Aktivite Çalışmaları, Anadolu Üniversitesi BAP Projesi, Araştırmacı. 192.600,02 TL (2020-2022) Proje No: 2006S081
- Lamiaceae uçucu yağlarında enzim inhibisyonu, Anadolu Üniversitesi Yayın Teşvik Projesi, Araştırmacı. 29.925 TL (2020-2021) Proje No: 2005S058
- Hibrit Sanal Tarama Yöntemleri ile Molekül Kütüphanesinden Belirlenecek Bileşikler ve Özgün Doğal Molekül Analoglarının Sentezi, COVID-19'a karşı etkinliklerinin in vitro ve in vivo antiviral etkilerinin araştırılması, TÜBİTAK 1004 projesi, Bursiyer. 669.500 TL (2020-2021) Proje No:18A003
- Karaciğer Yağlanması Karşı Fitoterapötik Formülasyonların Geliştirilmesi, TÜBİTAK 1002 Projesi, Yürütücü. 45.000 TL (01.12.2020-01.12.2021) Proje No: 220S351
- Standardize bazı ekstrelerin COX ve LOX enzim inhibisyonlarının araştırılması, MEDİPOL BAP Projesi, Araştırmacı. 9.942,48 TL (2020-2021) Proje No: 2020/12
- Naringenin yüklü anti-aging taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve in vitro değerlendirilmesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Projesi, Araştırmacı. 19.999 TL (2021-2022).
- Apiaceae Uçucu Yağlarının Biyootografik İncelenmesi, Anadolu Üniversitesi BAP Projesi, Araştırmacı. 44.990 TL (26.07.2021-26.07.2022). Proje No: 2105S094
- Standardize Ekstre ve Yağlardan Aft ve Boğaz Ağrısına Yönelik Özgün Gargara/Sprey Formülasyonlarının Tasarlanması ve Prototiplerinin Üretilmesi, TÜBİTAK 1512 Projesi, Yürütücü. 199.999 TL (01.08.2021-31.07.2022). Proje No: 2210437

Patent:

- Özgün heteroaril-pirazol türevi moleküller ve antifungal ajan olarak kullanımları (TÜRK PATENT Başvuru No: 2019/06570)
- Agelas Oroides Ekstresi ile Metal Nanopartiküllerin Sentezi (TÜRK PATENT Başvuru No: 2019/13811)
- *Opuntia ficus-indica* Bitkisinin Kladotlarından Elde Edilen Özgün Fraksiyonların Kanser Tedavisinde Kullanılması (TÜRK PATENT Başvuru No: 2019/22103)
- *Rosmarinus officinalis* L. uçucu yağından mikroemülsiyon formülasyonunun geliştirilmesi ve bu formülasyonların antifungal etkisi (TÜRK PATENT Başvuru No: 2020/05078)
- *Cistus creticus* toprak üstü kısmından elde edilen ekstraların jel formülasyonlarının hemostatik etkileri (TÜRK PATENT Başvuru No:2020/08345)
- *Phlomis* L. toprak üstü kısmından elde edilen ekstraların jel formülasyonlarının *in vivo in vitro* yara iyi edici etkileri (TÜRK PATENT Başvuru No:2020/08344)
- Lavanta ve rezene uçucu yağlarının ve amoksisilin kombinasyonlarının antimikrobiyal etkileri (TÜRK PATENT Başvuru No: 2020/16869)
- *Laurocerasus officinalis* meyvelerinden elde edilen metanol ekstresinin sitotoksik aktiviteleri (TÜRK PATENT Başvuru No: 2020/21364)
- *Styphnolobium japonicum* köklerinden elde edilen metanol ekstresinin sitotoksik aktiviteleri (TÜRK PATENT Başvuru No:2020/ 20720)
- *Allium sativum* L. Ekstresinden Hazırlanan Formülasyonlar ve Osteoartrit Üzerine Etkisi (TÜRK PATENT Başvuru No: 2021/008852)
- *Origanum majorana*, *Origanum minutiflorum*, *Origanum onites* ve *Origanum vulgare* Bitkilerinin Topraküstü Kısımlarından Elde Edilen Uçucu Yağların Ace-2 Enzimi İnhibe Edici Etkileri (TÜRK PATENT Başvuru No: 2021/018188)
- *Eucalyptus globulus* ve *Eucalyptus citriodora* Bitkilerinin Topraküstü Kısımlarından Elde Edilen Uçucu Yağların Ace-2 Enzimi İnhibe Edici Etkileri (TÜRK PATENT Başvuru No: 2021/018008)
- Use Of Specific Fractions Obtained From The Cladodes Of *Opuntia ficus-indica* Plant For Treating Cancer (Pct Başvuru No: Pct/Tr2020/051407)

- Development Of Microemulsion Formulation From *Rosmarinus officinalis* Essential Oil And The Antifungal Effect Of These Formulations (**Pct Başvuru No:** Pct/Tr2021/050283)
- Gel Formulations Obtained From *Cistus creticus* Extract And The Use Of These As Hemostatic Agents (**Pct Başvuru No:** Pct/Tr2021/050492)
- Gel Formulations Obtained From *Phlomis* Plant Extract And Their Use In Wound Treatment (**Pct Başvuru No:** Pct/Tr2021/050481)
- Synergic Effects Of Lavender And Fennel Essential Oils (**Pct Başvuru No:** Pct/Tr2021/051001)

Yayınlar:

1. **Karadağ A.E.**, Demirci B., Polat D.Ç., Okur M.E., (2018). Characterization of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. fruit volatiles and antibacterial evaluation. *Natural Volatiles&Essential Oils*, 5(4), 35-38.
2. Karakaş N., Okur M.E., Öztunç N., **Karadağ A.E.**, Kültür Ş., Demirci B., (2019). *Tilia tomentosa* Moench çiçeklerinin uçucu bileşenlerinin ve çeşitli *in vitro* biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. *Mersin Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12(2), 220-229.
3. **Karadağ A.E.**, Tosun F., (2019). In vitro Antimicrobial and Antioxidant Evaluation of *Melampyrum arvense* var. *elatius* L. and *Sedum spurium* M. Bieb. Extracts. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 57(2), 193-201. DOI: 10.23893/1307-2080.APS.05713
4. Okur M.E., Karakaş N., **Karadağ A.E.**, Yılmaz R., Demirci F., (2019). In vitro cytotoxicity evaluation of *Marrubium vulgare* L. methanol extract. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(4), 711-718.
5. **Karadağ A.E.**, Demirci B., Çeçen Ö., Tosun F., (2019). Chemical characterization of *Glaucosciadium cordifolium* (Boiss.) B. L. Burt & P. H. Davis essential oils and their antimicrobial, and antioxidant activities. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 49(2), 77-80.
6. Karakaş N., Okur M.E., Öztürk İ., Ayla S., **Karadağ A.E.**, Polat D.Ç., (2019). Blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruit extract antioxidant activity and cytotoxic effects on various cancer cell lines. *Medeniyet Medical Journal*, 34(3), 297-304.

7. **Karadağ A.E.**, Demirci B., Çaşkurlu A., Demirci F., Okur M.E., Orak D., Sipahi H., Başer K.H.C., (2019). *In vitro* Antibacterial, Antioxidant, Anti-inflammatory and Analgesic Evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. flower extracts. *South African Journal of Botany*, 125, 214-220.
8. Okur M.E., Karakaş N., **Karadağ A.E.**, Uludağ D., Polat D. Ç., (2019). Investigation of antioxidant and cytotoxic activities of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. fruit extract. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 49(3), 154-160.
9. Giray B., **Karadağ A.E.**, Şavluğ İpek Ö., Güzel M., Başpınar Küçük H., (2020). Design and Synthesis of Novel Cylopentapyrazoles Bearing 1,2,3-Thiadiazole Moiety as Potent Antifungal Agents. *Bioorganic Chemistry*, 95, 103509. doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103509.
10. Caskurlu A., **Karadağ A.E.**, Köse Y. B., Tosun F., (2020). *In vitro* Antifungal Activity of *Cistus creticus* L. Against Plant Pathogenic Fungi. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 58(4), 413-419.
11. **Karadağ A.E.**, Demirci F., (2020). Matrin ve Oksimatrinin Mikrobiyal Transformasyonu ve Metabolitlerinin *in vitro* Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(1), 24-34.
12. Okur M.E., Ayla Ş., **Karadağ A.E.**, Polat D.Ç., Demirci S., Seçkin İ., (2020). *Opuntia ficus indica* (L.) Miller fruits ameliorate cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.*, 43(5), 831-838. https://doi.org/10.1248/bpb.b19-01044
13. **Karadağ A.E.**, Demirci B., Kultur S., Demirci F., Baser K.H.C., (2020). Antimicrobial, Anticholinesterase Evaluation and Chemical Characterization of Essential Oil *Phlomis kurdica* Rech. fil. Growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 32(3), 242-246. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1743786>.
14. **Karadağ A.E.**, İpekçi E., Yağcılar A. P., Siafaka P., Üstündağ Okur N., (2020). Antimicrobial activities of mouthwashes obtained from various combinations of *Elettaria cardamomum* Maton., *Lavandula angustifolia* Mill. and *Salvia triloba* L. essential oils. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 7(1), 9-16.
15. Üstündağ Okur N., **Karadağ A.E.**, İpekçi E., Özcan Bülbül E., (2020) Kozmetik Preparat Çeşitleri ve Bu Preparatlarda Kullanılan Bitkiler ve Güncel Yaklaşımlar.

16. **Karadağ A.E.**, Çaşkurlu A., Tosun F., (2020). *In vitro* Anti-Helicobacter Pylori and Antimycobacterial Activity Evaluation of Selected Plants from Turkey. *Journal of Anatolian Enviromental and Animal Sciences*, 35(3), 231-235.
17. Okur M.E., **Karadag A.E.**, Üstündağ Okur N., Sipahi H., Özhan Y., Ayla S., Daylan B., Demirci B., Demirci F., (2020). *In Vivo* Wound Healing and *In Vitro* Anti-Inflammatory Activity Evaluation of *Phlomis russeliana* Extract Gel Formulations. *Molecules*, 25(11), 2695. <https://doi.org/10.3390/molecules25112695>
18. Okur M.E., Karakaş N., **Karadağ A.E.**, Öztunç N., Tosyalı İ.S., Demirci F., (2020). Evaluation of in vitro anti-cancer effects of *Styphnolobium japonicum* root extract in human colon (HT-9), brain (U-87), and prostate (PC-3) cancer cell lines. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 50(2), 103-110.
19. Heydari H., Konuklugil B., Giray B., **Karadag A.E.**, Güzel M., (2020). Identification and *in-vitro* Bioactivity Screening of Some Marine-Derived Fungi Species from Turkish Coastlines. *CBM-Cahiers de Biologie Marine.*, 61(5), 437-446.
20. Okur, M.E., Şakul, A.A., Ayla, S., **Karadağ, A.E.**, Şenyüz, C., Batur, Ş., Daylan, B., Özdemir, E.M., Palabiyik-Yücelik, S., Sipahi, H., Aydın, A., (2020). Wound Healing Effect of Naringin Loaded Gel in Alloxan Induced Diabetic Mice, *Journal of Pharmacy of Ankara University*, 44(3), 397-414.
21. Batur S., Ayla S., Sakul A.A., Okur M.E., **Karadağ A.E.**, Daylan B., Özdemir E.M., Kepil N., Günal M.E., (2020). An alternative Approach Wound Healing Field with *Polypodium vulgare*. *Medeniyet Medical Journal*, 35, 315-23.
22. **Karadağ A.E.**, Çaşkurlu A., Okur M.E., Guzelmeric E., Üstündağ Okur N., Tosun F., Yeşilada E., Demirci F., (2020). Haemostatic activity of a hydrogel formulation from *Cistus creticus* L. extract in rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 30(6), 844-847.

23. Okur M.E., **Karadağ A.E.**, Özhan Y., Sipahi H., Ayla S., Daylan B., Kültür Ş., Demirci B., Demirci F., (2021). Anti-inflammatory and Analgesic Evaluation and *In vivo-In vitro* Wound Healing Potential of the *Phlomis rigida* Labill. Extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 266, 113408.
24. **Karadağ A.E.**, Demirci B., Demirci F., Çeçen Ö., Tosun F., (2021). Chemical Characterization and Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Different Parts of *Cnidium silaifolium* ssp. *orientale* (Boiss.) Tutin. *Grasas y Aceites*, 72(2), e403 <https://doi.org/10.3989/gya.1146192>
25. Karakaş N., Okur M.E., Öztunç N., Polat D.Ç., **Karadağ A.E.**, (2021). *Laurocerasus officinalis* Roem. fruit extract induce cell death through caspase mediated apoptosis in gastric cancer cell lines. *Turkish Journal of Biology*, 46(2), 413-421.
26. **Karadağ A.E.**, Demirci B., Çeçen Ö., Ünal A., Tosun F., (2021). Volatile components and antimicrobial activity of the n-hexane extracts of *Neomuretia pisidica* (Kit Tan) Kljuykov, Degtjareva & Zakharova. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 8(1), 12-18.
27. **Karadağ A.E.**, Üstündağ Okur N., Demirci B., Demirci F., (2022). *Rosmarinus officinalis* L. essential oil encapsulated in microemulsions as an antimicrobial agent. *Journal of Surfactants and Detergents*, 25, 95-103.
28. Okur M.E., **Karadağ A.E.**, Reis R., Sipahi H., Arslan R., Demirci B., Demirci F., (2022). Phytochemical and *in vitro* pharmacological evaluation of *Phlomis pungens*. *Journal of Pharmacy of Ankara University*, 46(1), 11-22.
29. Demirci F., **Karadağ A.E.**, Biltekin S.N., Demirci B., (2022). In vitro ACE2 and 5-LOX Inhibition of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil and its Major Component 1,8-Cineole. *Records of Natural Products*, 16(2), 194-199.
30. Demirci F., **Karadağ A.E.**, Biltekin S.N., Demirci B., (2021). In Vitro ACE2 and 5-LOX Enzyme Inhibition by Menthol and Three Different Mint Essential Oils. *Natural Product Communications*, 16(11), 1-5.

31. **Karadağ A.E.**, Biltekin S.N., Demirci B., Demirci F., (2022). In vitro ACE2 Enzyme Inhibitory Activity Evaluation of Different *Salvia* Essential Oils. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 60(2),
32. Polat D.Ç., **Karadağ A.E.**, Parlar Köprülü R.E., Karantas I.D., Mutlu G., Çağlar E.Ş., Okur M.E., Üstündağ Okur N., Siafaka P.I. (2022). Phytochemical compounds loaded to nanocarriers as potential therapeutic substances for Alzheimer's Disease-Could they be effective? *Curr. Pharm. Des.*,
33. Demirci F., Teralı, K. **Karadağ, A.E.**, Biltekin, S.N., Ak Sakallı E., Demirci, B., Koşar M., Başer K.H.C. (2022). In Vitro and In Silico Evaluation of ACE2 and LOX Inhibitory Activity of *Origanum* Essential Oils and Carvacrol. *Planta Med.*,

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

- **Karadag A.E.**, Demirci B., Demirci F., (2021), “Anticollagenase enzyme inhibitions of *Citrus limon* and *Citrus bergamia* essential oils”, (Poster Bildiri), 5. Uluslararası Kozmetik Kongresi, Belek, Antalya, Türkiye.
- **Karadag A.E.**, Okur M.E., Okur Üstündağ N., Özhan Y., Reis R., Sipahi H., Ayla Ş., Daylan B., Demirci F., (2021), “*In vitro* and *in vivo* Cell Regenerative - Cicatrizing Activity Evaluation of *Phlomis* sp. Extract Gel Formulations”, (**Sözlü Bildiri**), 5. Uluslararası Kozmetik Kongresi, Belek, Antalya, Türkiye.
- **Karadag A.E.**, Biltekin S.N., Demirci B., Demirci F., (2021), “*In vitro* Evaluation of ACE2 and 5-LOX Inhibitions of *Mentha* Essential Oils and Menthol”, (Poster Bildiri), XIV. International Symposium “Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds”, Taşkent, Özbekistan.

- Çaşkurlu A.E., **Karadağ A.E.**, Demirci B., Demirci F., (2021), “The *in vitro* Antimicrobial Test by Checkerboard Method and Antifungal Effects of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with *Foeniculum vulgare* Essential Oil”, (Poster Bildiri), XIV. International Symposium “Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds”, Taşkent, Özbekistan.
- Üstündağ Okur N., **Karadağ A.E.**, İpekçi E., Özcan Bülbül E., (2020), “Kozmetik Preparat Çeşitleri ve Bu Preparatlarda Kullanılan Bitkiler ve Güncel Yaklaşımlar”, (**Sözlü Bildiri**), International Aegean Symposium on Natural and Medical Sciences, İzmir, Türkiye.
- Caskurlu A., **Karadağ A.E.**, Tosun F., (2020), “*In vitro* Antifungal Activity of *Cistus creticus* L. Against Plant Pathogenic Fungi”, (Poster Bildiri), 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurAsianBioChem 2020), Ankara, Türkiye.
- **Karadağ A.E.**, Demirci B., Çeçen Ö., Tosun F., Demirci F., (2019), “Chemical Characterization of *Cnidium silaifolium* ssp. *orientale* (Boiss.) Tutin Essential Oils and *in vitro* Biological Evaluation”, (Poster Bildiri), 50th International Symposium on Essential Oils (ISEO-50), Viyana, Avusturya.
- **Karadağ A.E.**, Demirci F., (2019), “*In vitro* biological and phytochemical evaluation of *Phlomis pungens* Willd. methanol extract”, (Poster Bildiri), 6th World Congress on Medicinal and Aromatic Plants (WOCMAP 2019), Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs.
- Okur M.E., Karakaş N., **Karadağ A.E.**, Polat D. Ç., (2019), “Blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruit extract antioxidant activity and cytotoxic effects on various cancer cell lines”, (**Sözlü Bildiri**), 6th World Congress on Medicinal and Aromatic Plants (WOCMAP 2019), Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs.
- **Karadağ A.E.**, Tosun F., (2019), “*In vitro* Antimicrobial and Antioxidant Evaluation of *Melampyrum arvense* var. *elatius* L. and *Sedum spurium* M. Bieb. Extracts”,

(Poster Bildiri), 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurAsianBioChem 2019), Ankara, Türkiye.

- Karakaş N., Okur M.E., **Karadağ A.E.**, Kültür Ş., Demirci B., (2019), “Investigation of volatile components and various *in vitro* biological activities of *Tilia tomentosa* (silver linden) Moench flowers”, (**Sözlü Bildiri**), The 5th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-5), Kapadokya, Nevşehir, Türkiye.
- **Karadağ A.E.**, Demirci B., Çeçen Ö., Tosun F., (2019), “Chemical characterization of *Glaucosciadium cordifolium* (Boiss.) B. L. Burt & P. H. Davis essential oils and their antimicrobial, and antioxidant activities”, (Poster Bildiri), Natural Products in Drug Discovery and Human Health (PSE Meeting 2019), Lisbon, Portekiz.
- **Karadağ A.E.**, Çaşkurlu A., Tosun F., (2019), “*In Vitro* Anti-Helicobacter And Anti-Micobacter Activity Evaluation Of Different Medicinal Plants Extracts From Turkey”, (**Sözlü Bildiri**), The 5th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-5), Kapadokya, Nevşehir, Türkiye.
- Okur M.E., Karakaş N., **Karadağ A.E.**, (2019), “Cytotoxic effects and anti-oxidant activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. fruit extract on various cancer cell lines”, (**Sözlü Bildiri**), EUFEPS Annual Meeting 2019, Frankfurt, Almanya.
- **Karadağ A.E.**, Antepüzümü Y., Okur Üstündağ N., Demirci F., (2019), “*In vitro* antimicrobial evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil based microemulsion formulations”, (Poster Bildiri), EUFEPS Annual Meeting 2019, Frankfurt, Almanya.
- **Karadağ A.E.**, Demirci B., Çaşkurlu A., Demirci F., Başer K.H.C., (2018). “GC-MS/LC-MS Phytochemical and *in vitro* Antibacterial Evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. flower extracts”, (Poster bildiri), 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (ISCNP-30) and the 10th International Conference on Biodiversity (ICOB-10), Atina, Yunanistan.

- **Karadag A.E.**, Tosun F., Ünal A., Miski M., (2018), “Evaluation of Antimicrobial / Antioxidant Activity of *Neomuretia pisidica* (Kit Tan) Kljuykov, Degtjareva & Zakharova Extracts and Evaluation of Total Phenolic Substance”, (**Sözlü Bildiri**), 4th International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants, Çeşme, İzmir, Türkiye.
- **Karadag A.E.**, Demirci B., Cecen Ö., Tosun F., (2018), “Volatile Components of the n-hexane Extract of *Neomuretia pisidica* (Kit Tan) Kljuykov, Degtjareva & Zakharova”, (Poster Bildiri), 12. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye.
- Ozdemir A., Altintop M.D., Sever B., Bulbul E.F., **Karadag A.E.**, (2018), “Synthesis and Evaluation of New Pyralozine Derivatives as Antibacterial Agents”, (Poster Bildiri), 12. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye.
- Ozdemir A., Altintop M.D., Sever B., Bulbul E.F., **Karadag A.E.**, (2018), “New Thiazolyl-Pyralozine Derivatives as Antibacterial Agents”, (Poster Bildiri), 12. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye.
- **Karadag A.E.**, (2018), “Homeopatik İlaçlarda Üretim Teknikleri”, (Poster Bildiri), 1. Uluslararası Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Kongresi (GETAT), İstanbul, Türkiye.
- **Karadag A.E.**, Demirci B., Demirci F., Baser H.C, (2017), “Chemical characterization of *Phlomis kurdica* Rech. Fil. essential oil from Turkey”, (Poster Bildiri), International Symposium on Advances in Lamiaceae Science 2017, Antalya, Türkiye.
- **Karadag A.E.**, Kultur S., Demirci F., (2016), “Phytochemical Composition and In Vitro Lipxygenase Inhibition of *Phlomis russeliana*, *P. rigida* and *P. pungens* Extracts”, (Poster Bildiri), 29th International Symposium on the Chemistry of Natural

Products (ISCNP-29) and the 9th International Conference on Biodiversity (ICOB-9), İzmir, Türkiye.

- Demirci F., **Karadag A.E.**, Guzel M., (2016), “Oxymatrine biotransformation by microorganisms and the effects of 5-lipoxygenase inhibitor activity evaluation”. (Poster Bildiri), 9th Joint Natural Products Conference, Kopenhag, Danimarka.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- Başpınar Küçük H., Giray B., **Karadağ A.E.**, Şavluğ İpek Ö., Güzel M., (2019), “Siklopentapirazol Bileşiklerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antifungal Aktivitelerinin Araştırılması”, (Poster Bildiri), 31. Ulusal Kimya Kongresi, İstanbul, Türkiye.
- **Karadag A.E.**, Kulaksız B., Alpınar K., (2019), “*Dracunculus vulgaris* Schott Ekstrelerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri/ Flavonoitlerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Analizi”, (**Sözlü Bildiri**), I. Ulusal Aroid Kongresi, Eskişehir, Türkiye.
- Okur M.E., Ayla Ş., **Karadağ A.E.**, Polat D.Ç., Demirci S., Seçkin İ., (2019), “Cisplatin Kaynaklı Nefrotoksisite: *Opuntia ficus-indica* Meyvelerinin Etkisinin Değerlendirilmesi”, (**Sözlü Bildiri**), 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (EMK 2019), Edirne.
- **Karadag A.E.**, (2018), “*Arum Arisarum* ve *Dracunculus* taksonlarının biyolojik aktiviteleri”, (**Davetli Konuşmacı**), II. Aroid Çalıştayı, Şanlıurfa.
- **Karadag A.E.**, Altintas A., (2018), “Hezarfen Hüseyin bin Ca’fer İstanköyü’nin Lisanül-Ettiba Adlı Tıp Eserinde Geçen Tıbbi Bitkiler”, (**Sözlü Bildiri**), 13. Türk Eczacılık Tarihi Toplantısı (TETT), İstanbul.

- **Karadag A.E.**, (2018), “Geçmişten Günümüze Tedavide Su”, (Poster Bildiri), 13. Türk Eczacılık Tarihi Toplantısı (TETT), İstanbul.
- **Karadag A.E.**, Karaca N., Demirci F., (2018), “Matrin ve Oksimatrinin Biyotransformasyon Metabolitlerinin Antikandidal ve Antibakteriyel Aktiviteleri”, (Sözlü Bildiri), 22. Bitkisel İlaç Hammadeleri Toplantısı (BİHAT), Antalya.
- **Karadag A.E.**, Karaca N., Coban Z., Demirci F., (2016), “*Phlomis rigida*, *Phlomis pungens* ve *Phlomis russeliana* Toprak Üstü Ekstrelerinin Antibakteriyel ve Anti-Helikobakter Piloni Aktiviteleri”, 21. Bitkisel İlaç Hammadeleri Toplantısı (BİHAT), Trabzon.
- **Guler A.E.**, Karatas S., (2014), “Gül, Gülsuyu ve Gülyağının Tedavide Kullanımı”. (Poster Bildiri), 11. Türk Eczacılık Tarihi Toplantısı, Kayseri.