

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI**

**TEDAVİDE KULLANILAN GÜNEY AFRİKA KAYNAKLI
PELARGONIUM SIDOIDES DC. YERİNE KULLANILABİLECEK
BİR BİTKİ: *PELARGONIUM ENDLICHERIANUM* FENZL.**

**Hazırlayan
Gökçe ŞEKER KARATOPRAK**

**Danışmanlar
Prof. Dr. Müberra KOŞAR
Doç.Dr. M. Betül YERER AYCAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2013-4164 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

Doktora Tezi

**Mart 2015
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı Soyadı: Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Tedavide Kullanılan Güney Afrika Kaynaklı *Pelargonium sidoides* DC. Yerine Kullanılabilecek Bir Bitki: *Pelargonium endlicherianum* Fenzl." adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi doktora tez önerisi ve tez yazımı yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Danışman

Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Yardımcı Danışman

Doç Dr. M. Betül YERER AYCAN

Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Prof. Dr. Müberra KOŞAR danışmanlığında Gökçe ŞEKER KARATOPRAK tarafından hazırlanan “Tedavide Kullanılan Güney Afrika Kaynaklı *Pelargonium sidoides* DC. Yerine Kullanılabilecek Bir Bitki *Pelargonium endlicherianum* Fenzl.” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı’nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

13/03/2015

Danışman: Prof. Dr. Müberra KOŞAR
Erciyes Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL
Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ
Anadolu Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Üye: Doç.Dr. Betül YERER AYCAN
Erciyes Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye: Yard. Doç. Dr. Perihan GÜRBÜZ
Erciyes Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulu’nun..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi lisans mezunu olarak çalışmaya başladığım Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda, çalışmalarımı yönlendirerek ve araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Müberra Koşar'a, tez boyunca yardımcı danışmanlığımı yapan Sayın Doç. Dr. Betül Aycan'a, anabilim dalı hocalarımdan Yrd. Doç. Dr. Perihan Gürbüz'e, mesai arkadaşlarım Arş. Gör. Çiğdem Yücel, Arş. Gör. Berrak Altınsoy, Arş. Gör. Selen İlğün, Yrd. Doç. Dr. Eren Demirpolat ve Arş. Gör. Alim Hüseyin Dokumacı'ya, bu çalışmada maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (TDK-2013-4164) ve doktora eğitimim boyunca bursiyeri olduğum TÜBİTAK-BİDEB (2211)'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca beni destekleyerek yanımda olan, üzüntüme ve sevincime ortak olan sevgili eşime, tezimin her aşamasında bitirmeme bilmeyerek engel olan canım oğluma, en zor anlarımda yanımda olan beni bugünlere getiren canım anneme, babama ve ablalarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

**TEDAVİDE KULLANILAN GÜNEY AFRİKA KAYNAKLI
PELARGONIUM SIDOIDES DC. YERİNE KULLANILABİLECEK
 BİR BİTKİ: *PELARGONIUM ENDLICHERIANUM* FENZL.**

Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Mart 2015

Danışman : Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Yardımcı Danışman: Doç.Dr. M. Betül YERER AYCAN

KISA ÖZET

Bu tez kapsamında Geraniaceae familyasına dahil olan *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. bitkisinin köklerinden elde edilen % 11’lik etanol, % 70’lik metanol ekstraktları ve %70’lik metanol ekstresinin etil asetat ve butanol fraksiyonlarının antioksidan, antimikrobiyal ve immün sistem üzerine olan aktiviteleri ile kimyasal bileşimleri incelenmiştir. Ekstrelerin spektrofotometrik (toplam fenol, toplam flavonoit, toplam flavonol) ve kromatografik (YBSK KS/KS ve YBSK) olarak kompozisyonları belirlenmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerini belirlemek amacıyla 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikal süpürücü etki, 2,2’- azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS•) radikal süpürücü etki, β -karoten-linoleik asit birlikte peroksidasyonu engelleyici etki, askorbat-Fe(III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunu engelleyici etki, demir(II) şelat (kelat) aktivite, spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması, spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması, Fe(III) ü Fe(II) ye indirgeme özellikleri, IL-1 β indüklenen A549 ve lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen RAW 264.7 hücrelerinde glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz aktivitesi ölçülmüştür. Antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi için *P. vulgaris* TSA, *S. epidermidis* ATCC 3699, *B. cereus* ATCC 7064, *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. typhimimum* CCM 5445, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 11230, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* (İZOLAT), *C. glabrata* RSKK 0419 bakteri ve mantar türleri üzerinde disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) belirleme çalışmaları yapılmıştır. İmmün sistem üzerine aktivite testleri için immün sistemin

önemli unsurlarından olan makrofajlar bakteriyal komponent olan LPS ile stimüle edilerek TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-10 ve araşidonik asit metaboliti ve aynı zamanda siklooksijenaz-2 ürünü Prostaglandin E₂ (PGE₂) düzeyleri ölçümü yapılmıştır. % 11'lik etanol ve % 70'lik metanol ekstreleri aktivite deneyleri sonucunda karşılaştırıldığında % 70'lik metanol ekstresinin tüm deneylerde daha aktif olarak bulunduğu tespit edilmiştir. % 70'lik metanol ekstresinin fraksiyonlanması ile elde edilen etil asetat ve butanol fraksiyonlarında aktivite sonuçları ikiye bölünmüş şeklidedir. Etil asetat ekstresi olan apolar fraksiyon antioksidan ve antimikrobiyal deneylerde daha iyi sonuç verirken, butanol fraksiyonu olan polar fraksiyon ise immün sistem üzerindeki modölatör aktivite deneylerinde daha aktif bulunmuştur. Fraksiyonların kimyasal bileşimleri incelendiğinde ise etil asetat fraksiyonunun fenolik asitler ve flavonoidler başta olmak üzere fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu bulunmuş ve butanol fraksiyonunda ise daha çok gallik asit türevi bileşikler bulunmuştur. Ekstrelerde en fazla miktarda aposinin maddesi belirlenmiştir. Ülkemizde yetişen *P. endlicherianum* kökleri üzerinde bu şekildeki kapsamlı bir çalışma ilk kez yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Pelargonium endlicherianum* Fenzl, Geraniaceae, antioksidan, antimikrobiyal, immün sistem

**A HERB: *PELARGONIUM ENDLICHERIANUM* FENZL. INSTEAD
OF THERAPEUTICALLY USED *PELARGONIUM SIDOIDES* DC.
ORIGINATED FROM SOUTHERN AFRICA**

Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Pharmacognosy

Ph.D. Thesis, March 2015

Supervisor : Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Co Supervisor: Assoc.Prof. M. Betül YERER AYCAN

ABSTRACT

In the content of this thesis the roots of the *P. endlicherianum* Fenzl. belonging to the Geraniaceae family were used. 11 % Ethanol, 70% methanol extracts and its fractions ethyl acetate and butanol extracts that were obtained by the fractionation of 70 % methanol extract were prepared and antioxidant, antimicrobial, the effects on immune system and chemical composition were investigated. Chemical composition of extracts were analysed by spectrophotometric (total phenol, total flavonoids, total flavonols) and chromatographic (HPLC MS/MS, HPLC) techniques. In order to determine the antioxidant activity of the extracts, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonic acid) (ABTS^{•+}) radical scavenging activity, β -carotene-linoleic acid co-oxidation assay, lipid peroxidation assay, iron(II) chelate formation, reduction, 2-deoxy-*D*-ribose degradation by site and non site specific OH[•] radical activity assay, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity on IL-1 β stimulated A549 cells and lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 264.7 cells were evaluated. *P. vulgaris* TSA, *S. epidermidis* ATCC 3699, *B. cereus* ATCC 7064, *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. typhimurium* CCM 5445, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 11230, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* (ISOLATE), *C. glabrata* RSKK 0419 bacteria and fungus strains were used for antimicrobial activity of the extracts via disk diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) assays. Determining the activity of extracts on immun system, the important elements of the immun system,

macrophages, stimulated with bacterial component LPS and the levels of TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-10 and the metabolite of arachidonic acid and also the product of cyclooxygenase 2; PGE₂ were measured. As a result of activity assays 70 % methanol extract was more active than 11 % ethanol extract. Activity results of ethyl acetat and butanol extracts obtained from by fractionation of 70 % methanol were divided. The apolar ethyl acetat fraction showed better results in antioxidant and antimicrobial assays while butanol fraction showed activity on immun system assays. When the chemical composition of the fractions analyzed, it was found that ethyl acetat fraction was rich in phenolic compounds especially phenolic acids and flavonoids and in butanol fraction gallic acid derivatives were found. Apocynin was identified in all extracts. A comprehensive study with *P. endlicherianum* root growing in our country has been firstly carried out in this way.

Key Words: *Pelargonium endlicherianum* Fenzl, Geraniaceae, antioxidant, antimicrobial, immun system

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR.....	xvi
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 BOTANİK ÖZELLİKLER	5
2.1.1. Geraniaceae (Turnagagasıgiller) Familyasının Genel Özellikleri...	5
2.1.2. Geraniaceae (Turnagagasıgiller) Familyasının Botanik Özellikleri	6
2.1.3. <i>Pelargonium</i> L'Herit Cinsi	6
2.1.4. <i>Pelargonium</i> Türlerinin Dağılımı.....	7
2.1.5. <i>Pelargonium</i> 'un İsimlendirilmesinde Karışıklık.....	8
2.2. TÜRKİYE'DE YETİŞEN <i>PELARGONIUM</i> TÜRLERİ.....	9
2.2.1. <i>Pelargonium endlicherianum</i> Fenzl.	9
2.2.2. <i>Pelargonium quercetorum</i> Agnew.	11
2.3. <i>PELARGONIUM SIDOIDES</i> DC.	12
2.4. FARMAKOPELERDE KAYITLI OLAN <i>PELARGONIUM</i> TÜRLERİ....	13
2.5. <i>PELARGONIUM</i> TÜRLERİNİN ETNOBOTANİK KULLANIMI	13
2.5.1. <i>Pelargonium</i> Türlerinin Uçucu Yağı (Geranium Yağı) ve Aromaterapide Kullanımı.....	16
2.6. <i>PELARGONIUM</i> TÜRLERİNİN KİMYASAL BİLEŞİKLERİ	17
2.6.1. <i>Pelargonium</i> Türlerinin Uçucu Yağ Profili	19
2.6.2. Ülkemizde Yetişen <i>P.endlicherianum</i> Uçucu Yağı Üzerinde Yapılmış Kimyasal Çalışmalar	20

2.7. *PELARGONIUM* TÜRLERİ İLE YAPILAN BİYOAKTİVİTE

ÇALIŞMALARI	21
2.7.1. Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....	21
2.7.2. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları.....	22
2.7.3. Antitüberküloz Aktivite Çalışmaları	23
2.7.4. İmmünomodülatör Aktivite Çalışmaları	23
2.7.5. Mukosiliyer Sistem Üzerine Aktivite Çalışmaları	23
2.7.6. Antiviral Aktivite Çalışmaları.....	24
2.7.7. Klinik Çalışmalar	24
2.7.8. Ülkemizde Yetişen <i>Pelargonium</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Çalışmalar.....	24
2.8. ANTİOKSİDANLAR	26
2.8.1 Moleküler Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri.....	26
2.8.1.1. Oksijen Türevi Serbest Radikaller.....	27
2.8.1.2. Serbest Olmayan Oksijen Türevi Radikaller.....	28
2.8.1.3. Reaktif Azot Türleri	28
2.8.2 Serbest Radikallerin Doku ve Hücredeki Hasarları	29
2.8.2.1. Lipit Peroksidasyon	30
2.8.2.2. Protein Oksidasyonu.....	31
2.8.2.3. DNA'nın Oksidatif Hasarı.....	31
2.8.2.4. Karbonhidratlarda Oksidatif Hasar	31
2.8.3 Antioksidanlar ve Savunma Mekanizmaları	31
2.8.3.1. Enzimatik Olan Antioksidan Savunma Mekanizması....	34
2.8.3.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar.....	35
2.8.3.3. Enzimatik Olmayan Eksojen Antioksidanlar	35
2.9. İMMÜN SİSTEM	39
2.9.1. Edinsel Bağışıklık	40
2.9.1.1. Hücresel İmmün Cevap	40
2.9.1.2. Hümorale İmmün Cevap	41
2.9.2. İmmün Yanıtın Evreleri	41
2.9.3. Doğal Bağışıklık.....	41
2.9.4. Doğal Bağışıklığın Yapıtaşları	42
2.9.4.1. Epitel Tabakası	42

2.9.4.2. Fagositik Hücreler: Nötrofiller ve Monosit Makrofajlar	42
2.9.4.3. Doğal Öldürücü Hücreler	43
2.9.4.4. Kompleman Sistem	43
2.9.4.5. Sitokinlerin işlevleri ve sınıflandırılması	44
2.9.5. Enflamasyon.....	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
3.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN MATERYAL VE KİMYASAL MADDELER	48
3.1.1. Bitkisel Materyal	48
3.1.2. Kimyasal Maddeler	48
3.1.3. Kullanılan Aletler	49
3.2. DENEYSEL ÇALIŞMA	49
3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı.....	49
3.2.2. Kimyasal Kompozisyon Analizleri	50
3.2.2.1. Toplam Fenol Miktar Tayini	50
3.2.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini	50
3.2.2.3. Toplam Flavonol Miktar Tayini	50
3.2.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Kütle- Spektrometresi (YBSK-KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi	51
3.2.2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Analizi..	51
3.2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	52
3.2.3.1. A 549 ve RAW 264.7 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi .	52
3.2.3.2. A 549 ve RAW 264.7 Hücrelerinin Pasajı	53
3.2.3.3. Hücre Dondurma ve Saklama.....	53
3.2.3.4. FCS'nin İnaktivasyonu.....	53
3.2.3.5. A 549 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi	54
3.2.3.6. RAW 264.7 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi.....	54
3.2.3.7. A 549 Hücrelerinde Gerçek Zamanlı Büyüme Profili Deneyi	54
3.2.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....	57

3.2.4.1. İndirgenme Gücünün Belirlenmesi	57
3.2.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH [•]) Radikalini Süpürücü Etki Tayini	58
3.2.4.3. β -karoten / linoleik asit Birlikte Oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini	58
3.2.4.4. 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS ⁺ •) Radikalini Süpürücü Etki Tayini	59
3.2.4.5. Askorbat –Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu.....	59
3.2.4.6. Demir(II) Şelat (Kelat) Aktivite	60
3.2.4.7. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-deoksiriboz Bozulması	60
3.2.4.8. Spesifik Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-deoksiriboz Bozulması	60
3.2.4.9. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Antioksidan aktivite tayini	60
3.2.4.10.1. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Sitozolik Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi:	62
3.2.4.10.2. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi:	63
3.2.5. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Bikinkonik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Miktarının Tayini.....	64
3.2.6. Antimikrobiyal Aktivite	65
3.2.6.1. Deneylerde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	65
3.2.6.2. Deneylerde Kullanılan Mikroorganizmaların Standardizasyonu.....	65
3.2.6.3. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkinin Test Edilmesi.....	65
3.2.6.4. Besi Yerlerinin İnokülasyonu.....	66
3.2.6.5. Ekstrelerin Disklere Emdirilmesi	66
3.2.6.6. Disklerin Yerleştirilmesi	66
3.2.6.7. İnkübasyon	66
3.2.6.8. İnhibisyon Zonlarının Ölçümü	66

3.2.6.9. Negatif Kontrol.....	66
3.2.6.10. Pozitif Kontrol.....	67
3.2.6.11. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)	67
3.2.7. İmmün Sistem Üzerine Etki	69
3.2.7.1. Prostaglandin E ₂ Sitokin Seviyesinin Ölçümü	69
3.2.7.2. İnterferon – γ Sitokin Seviyesinin Ölçümü	70
3.2.7.3. TNF- α Sitokin Seviyesinin Ölçümü	70
3.2.7.4. İnterlökin-10 (IL-10) Sitokin Seviyesinin Ölçümü	71
3.2.7.5. İnterlökin-6 (IL-6) Sitokin Seviyesinin Ölçümü	72
3.2.7.6. İnterlökin-1 β (IL-1 β) Sitokin Seviyesinin Ölçümü	72
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	73
4. BULGULAR.....	74
4.1. EKSTRELERİN HAZIRLANIŞI, SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOĞRAFİK BİLEŞİM ANALİZLERİ.....	74
4.1.1. Ekstrelerin Hazırlanışı.....	74
4.1.2. Toplam Fenol, Flavonoit ve Flavonol Miktar Tayini.....	74
4.1.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Kütle-Spektrometresi (YBSK- KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi.....	75
4.1.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Analizi.....	78
4.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI.....	84
4.2.1. A549 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi	84
4.2.2. RAW 264.7 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi.....	86
4.2.3. GZHA Canlılık Deneyi	87
4.3. A549 VE RAW 264.7 HÜCRELERİNDE BİKİNKONİKASİT YÖNTEMİ İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ	95
4.4. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI	96
4.4.1. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi	96
4.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH [•]) Radikalini Süpürücü Etki Tayini	97
4.4.3. β -Karoten/Linoleik Asit Birlikte Oksidasyonu İnhibe Edici Etki Tayini	98

4.4.4. 2,2'- azino-bis (3- ethylbenziazoline-6- sulphonic acid) (ABTS ⁺ •)	
Radikalini Süpürücü Etki Tayini	99
4.4.5. Askorbat –Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun	
İnhibisyonu.....	100
4.4.6. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-	
deoksiriboz Bozulması	102
4.4.7. Spesifik Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-deoksiriboz	
Bozulması.....	103
4.4.8. Demir(II) Şelat Aktivite	103
4.4.9.A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Antioksidan Aktivite	
Tayini.....	104
4.4.9.1. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi:.....	104
4.4.9.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi:	106
4.5. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE	112
4.5.1. Disk Difüzyon	112
4.5.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerleri (µg/mL)	
.....	112
4.6. İMMÜN SİSTEM ÜZERİNE AKTİVİTE	113
4.6.1. Prostaglandin E ₂ Sitokin Seviyesinin Ölçümü	113
4.6.2. İnterferon –γ Sitokin Seviyesinin Ölçümü	115
4.6.3. TNF-α Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	115
4.6.4. İnterlökin-10 (IL-10) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	118
4.6.5. İnterlökin-6 (IL-6) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	118
4.6.6. İnterlökin-1β (IL-1β) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	119
5. TARTIŞMA SONUÇ	120
KAYNAKLAR	140
ÖZ GEÇMİŞ	

KISALTMALAR

A549	İnsan Akciğer Kanseri Hücreleri
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonat)
Afr	Afrika yerel dili
AlCl ₃ .6H ₂ O	Alüminyum klorit heksahidrat
AscAE	Askorbik Asit Eşdeğeri
ASH	Antijen Sunucu Hücreler
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BCA	Bikarbonik Asit
BHA	Bütilleniş Hidroksi Anisol
BHT	Bütilleniş Hidroksi Toluen
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
CD	Farklılaşma Kümesine Göre İsimlendirilen Hücre Yüzey Molekülleri
CI	Hücre Endeksi
CO ₂	Karbondioksit
COX-2	Siklooksijenaz-2
Cu ⁺⁺	Bakır
CuSO ₄	Bakır Sülfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DTT	Ditiyotritol
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EPs [®] 7630	<i>Pelargonium sidoides</i> Sıvı Kök Ekstresi
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FBS	Fetal Sığır Serum

FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
FeCl ₃	Demir(III)klorür
FeCl ₂	Demir(II) klorür
GC	Gaz Kromatografisi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi
G-CSF	Granülosit Koloni Stimülan Faktör
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HRP	Horseradish Peroksidaz
I.N.T.	Io-donitrotetrazolyum
IC ₅₀	Yüzde Ellisini İnhibe Eden Konsantrasyon
ICAM-1	Hücreler Arasında Adezyon Molekülleri-1
Ig	İmmün Globülin
IL	İnterlökin
INF	İnterferon
İng	İngilizce
iNOs	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
K ₂ S ₂ O ₈	Potasyumpersülfat
KH ₂ PO ₄	Potasyumdihidrojen Fosfat
LDL	Düşük Ağırlıklı Lipoprotein
LOOH	Lipit Peroksitleri
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MDA	Malondialdehit
MDCK	Köpek Böbrek Hücre Hattı

MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mM	Milimolar
mL	Mililitre
MTT	(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromit)
MyD88	Miyeloid Farklılaştırma Faktörü-88
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaCl	Sodyum Klorür
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaNO ₂	Sodyum Nitrat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NK	Doğal Öldürücü
NO	Nitrik Oksit
P11	<i>Pelargonium endlicherianum</i> Yüzde 11 Etanol Ekstresi
PAMP	Patojen Aracılıklı Moleküler Örnekleri
PBS	Fosfat Tamponu
PC-3	Prostat Kanseri Hücresi
Pe but	<i>Pelargonium endlicherianum</i> Butanol Ekstresi
Pe etas	<i>Pelargonium endlicherianum</i> Etil Asetat Ekstresi
Pe 70	<i>Pelargonium endlicherianum</i> Yüzde 70 Metanol Ekstresi
PG	Propilgallat
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGG	1,2,3,4,6-pentagalloil Glukoz
PRR	Patojen Kalıplarını Tanıma Reseptörleri
RAW 264.7	Abelson Fare Lösemi Virüsü Transform Edilmiş Makrofaj Hücre Hattı

RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü
SOD	Süperoksit Dismutaz
SRB	Sulforhodamin B
TBA	Tiyo-barbitürik Asit
TBHQ	Tersiyer Butil Hidrokinon
TCA	Trikoloro Asetik Asit
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidin
TNF	Tümör Nekroz Faktör
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XOD	Ksantin Oksidaz
YBSK	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1.	<i>Pelargonium</i> türlerinin Afrika’da geleneksel olarak kullanımı	14
Tablo 2.2.	<i>Pelargonium</i> türlerinin kimyasal bileşikleri	18
Tablo 2.3.	<i>Pelargonium</i> türlerinin uçucu yağ profili	20
Tablo 2.4.	<i>Pelargonium sidoides</i> ’e ait klinik çalışmalar	25
Tablo 2.5.	Reaktif türler	27
Tablo 2.6.	Temel sitokinlerin sınıflandırılması.....	44
Tablo 3.1.	YBSK-KS/KS gradient akış tablosu.....	51
Tablo 3.2.	YBSK gradient akış tablosu	52
Tablo 3.3.	Cayman PGE ₂ express EIA kit (500141) prosedürü	69
Tablo 4.1.	Ekstre verimleri, toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları	75
Tablo 4.2.	YBSK-KS/KS analizi sonucu tanımlanan bileşikler	75
Tablo 4.3.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin YBSK sonuçları	82
Tablo 4.4.	Standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları	82
Tablo 4.5.	IL-1 β (-) grupta A549 hücrelerinde ekstrele ve kontrole ait hücre endeksi verileri	94
Tablo 4.6.	IL-1 β (+) grupta A549 hücrelerinde ekstrele ve kontrole ait hücre endeksi verileri	94
Tablo 4.7.	A549 hücre lizatlarında protein miktarları	95
Tablo 4.8.	RAW 264.7 hücre lizatlarında protein miktarları	95
Tablo 4.9.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin disk difüzyon değerleri.....	112
Tablo 4.10.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin MİK değerleri (μ g/ml).....	112

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	<i>Pelargonium</i> cinsinin dünyadaki dağılımı	8
Şekil 2.2.	<i>P. endlicherianum</i> (Bütün Çiçek ve Habitat)	10
Şekil 2.3.	<i>P. endlicherianum</i> (Çiçek)	10
Şekil 2.4.	<i>P. endlicherianum</i> ' un Türkiye'deki dağılımı	11
Şekil 2.5.	<i>Pelargonium quercetorum</i> çiçeği	12
Şekil 2.6.	<i>Pelargonim sidoides</i> a) çiçek b) yaprak c) kök	13
Şekil 2.7.	Antioksidanların sınıflandırılması	33
Şekil 2.8.	Flavonoitlerin genel kimyasal yapısı	38
Şekil 2.9.	İmmün sistemin komponentleri	40
Şekil 3.1.	<i>Pelargonium endlicherianum</i> Fenzl. bitkisinin kurutulmuş kökleri	48
Şekil 3.2.	Gerçek zamanlı hücre analizörü	55
Şekil 3.3.	GZHA e-plaka ekim şeması.	57
Şekil 3.4.	Süperoksit dismutaz aktivitesi.....	62
Şekil 3.5.	Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi	64
Şekil 3.6.	<i>P.endlicherianum</i> ekstrelerinin disk difüzyon çalışmasına ait resim	67
Şekil 3.7.	<i>P.endlicherianum</i> ekstrelerinin bazı bakterilere ait MİK Çalışması	68
Şekil 4.1.	Gallik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması.	76
Şekil 4.2.	Dihidroksi benzoik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması.....	76
Şekil 4.3.	Kafeik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması.	77
Şekil 4.4.	Aposinine ait kütle spektrumu ve parçalanmaları	77
Şekil 4.5.	1,2,3,4,6 pentagalloil glukoza ait kütle spektrumu ve parçalanması	78
Şekil 4.6.	Butanol ekstresinin ana pikine ait kütle spektrumu ve parçalanması	78
Şekil 4.7a.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerine ait YBSK kromatogramları.....	80
Şekil 4.7b.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerine ait YBSK kromatogramları.....	81
Şekil 4.8.	Aposinine ve butanol ekstresinin ana pikine ait UV spektrumu.....	83
Şekil 4.9.	<i>Pelargonium endlicherianum</i> bileşimindeki maddelerin kimyasal formülleri .	84
Şekil 4.10.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin A549 hücrelerinin canlılığına olan etkisi.	85
Şekil 4.11.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin RAW 264.7 hücrelerinin canlılığına olan etkisi.....	86
Şekil 4.12.	<i>P. endlicherianum</i> %11'lik etanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	87
Şekil 4.13.	<i>P. endlicherianum</i> %70'lik metanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	87
Şekil 4.14.	<i>P. endlicherianum</i> etil asetat ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	88

Şekil 4.15.	<i>P. endlicherianum</i> butanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	89
Şekil 4.16.	IL-1 β (-) grupta <i>P. endlicherianum</i> %11'lik etanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	89
Şekil 4.17.	IL-1 β (+) grupta, <i>P. endlicherianum</i> %11'lik etanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri.	90
Şekil 4.18.	IL-1 β (-) grupta, <i>P. endlicherianum</i> %70'lik metanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri.	91
Şekil 4.19.	IL-1 β (+) grupta, <i>P. endlicherianum</i> %70'lik metanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	91
Şekil 4.20.	IL-1 β (-) grupta, <i>P. endlicherianum</i> etil asetat ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	92
Şekil 4.21.	IL-1 β (+) grupta, <i>P. endlicherianum</i> etil asetat ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	93
Şekil 4.22.	IL1 β (-) grupta, <i>P. endlicherianum</i> butanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	93
Şekil 4.23.	IL-1 β (+) grupta, <i>P. endlicherianum</i> butanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri	94
Şekil 4.24.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasiteleri	96
Şekil 4.25.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin ve standartların DPPH $^{\bullet}$ radikali süpürücü etkileri.	97
Şekil 4.26.	<i>P. endlicherianum</i> ekstre ve standartların β -karoten-linoleik asit peroksidasyonuna etkileri.	98
Şekil 4.27.	<i>P. endlicherianum</i> ekstre ve standartların β -karoten-linoleik asit peroksidasyonuna etkileri	99
Şekil 4.28.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin ve standartların ABTS $^{+\bullet}$ radikalini süpürücü etkileri	100
Şekil 4.29.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu.	101
Şekil 4.30.	1,1,3,3 tetrametoksipropan'a ait standart eğri.	101
Şekil 4.31.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin ve standartların Askorbat –Fe (III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun inhibisyonu deneyinde MDA miktarına olan etkisi.	102

Şekil 4.32.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin ve askorbik asitin spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması inhibisyonu.	103
Şekil 4.33.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin IL-1 β uygulanmayan A549 hücrelerinde glutatyon peroksidaz aktivitesi.	104
Şekil 4.34.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin IL-1 β uygulanan A549 hücrelerinde glutatyon peroksidaz aktivitesi.	105
Şekil 4.35.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin LPS(-) ve LPS(+) RAW 264.7 hücrelerinde Glutatyon peroksidaz aktivitesi	106
Şekil 4.36.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin IL-1 β uygulanmayan A549 hücre süpernatantlarında SOD aktivitesi.	107
Şekil 4.37.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin IL-1 β uygulanan A549 hücre süpernatantlarında SOD aktivitesi	108
Şekil 4.38.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin IL-1 β uygulanmayan A549 hücre lizatlarında SOD aktivitesi.....	109
Şekil 4.39.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin IL-1 β uygulanan A549 hücre lizatlarında SOD aktivitesi.....	110
Şekil 4.40.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin LPS(-) ve LPS(+) RAW 264.7 hücre lizatlarında SOD aktivitesi.....	111
Şekil 4.41.	PGE ₂ kit ölçüm prensibi.....	113
Şekil 4.42.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde PGE ₂ miktarına olan etkisi.....	114
Şekil 4.43.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde İnterferon – γ miktarına olan etkisi.....	115
Şekil 4.44.	TNF- α kit ölçüm prensibi	116
Şekil 4.45.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde TNF- α miktarına olan etkisi	117
Şekil 4.46.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde IL-10 miktarına olan etkisi	118
Şekil 4.47.	<i>P. endlicherianum</i> ekstrelerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde IL-6 miktarına olan etkisi	119
Şekil 5.1.	Vanilin ve vanilik asit biyosentez yolağı.....	122
Şekil 5.2.	DPPH $\bullet$ radikali ile antioksidan arasındaki reaksiyon.....	124

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğada yetişen bitkilerden faydalanma bilgisi insanlık tarihi kadar eskidir ve bitkilerin tıbbi amaçlarla kullanımı da binlerce yıl önceye dayanmaktadır. Günümüzde kullanılmakta olan birçok ilacın yapısında bitkisel kökenli kimyasal aktif maddeler bulunmakla birlikte, doğrudan tedavi amaçlı ilaç olarak kullanılan bitkiler ve tedaviye yardımcı bitkiler de modern tıpta yerini almıştır. Ayrıca dünyanın gelişmiş ülkeleri saf, sentetik veya yarı sentetik hammaddelerle üretilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinden dolayı bitkisel kaynaklara yönelmiş durumdadırlar.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kayıtlarına göre dünya nüfusunun büyük bir bölümü tedavi amacıyla geleneksel tıptan yararlanmaktadır. Bu yararlanma daha çok Uzakdoğu ülkelerindeki toplumlarda yaygın olmakla birlikte, son yıllarda batı toplumlarında da tamamlayıcı tıp olarak kabul edilen uygulamaların artmasıyla bitkisel ürünlere olan talepte de artış göstermektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 91 ülkenin farmakopeleri ve tıbbi bitkileri üzerine yapılmış olan bazı yayınlarına dayanarak hazırladığı bir raporda kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarının 20.000 civarında olduğu tespit edilmiştir. Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye'de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, yüzyıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Türkiye'nin de resmi farmakopesi olan Avrupa Farmakopesi'nde yer alan 40 familyaya ait 101 adet tıbbi bitki türü ülkemizde yetişmektedir.

Pelargonium cinsi Geraniaceae familyasına dahil olup yaklaşık 270 farklı türe sahip çok yıllık çalimsı bitkilerdir ve cinsin yaklaşık %80'i Güney Afrika'da yetişmektedir. *Pelargonium sidoides* DC. Güney Afrika'da geleneksel ilaç olarak kullanılan

Geraniaceae familyasının geofit türlerinden biridir. Bu bitkinin etli, parlak kırmızı yumru veya rizomları farklı kültürel gruplar tarafından yaygın olarak diyare ve dizanteride; köklerinden hazırlanan dekoksasyonlar gastrointestinal bozukluklar, göğüs ağrısı, solunum yolu enfeksiyonları ve tüberküloz tedavisinde uzun yıllar geleneksel olarak kullanılmıştır. Bu sebeple *P. sidoides* köklerinden yıllar süren klinik araştırmalar sonucu bitkinin yerel adından gelen ve uluslararası ismi “Umckaloabo” olan ilaç üretilmiştir. İlacın üst solunum yolları hastalıkları ve soğuk algınlığında, bağışıklık sistemini güçlendirerek belirtilerin şiddetini hafıflettiği ve hastalığın süresini kısalttığı belirtilmiştir.

Günümüzde doğal kaynaklı fenolik antioksidanlara olan yoğun ilginin sebebi sadece oksidatif hasarın sebep olduğu çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici özelliklerine değil aynı zamanda gıda ürünlerinin ömrünü uzatmalarına da bağlanmıştır. Bitkiler serbest radikal süpürücü çok çeşitli moleküller içerir ki bunlar; flavonoidler, antosiyaninler, karotenoidler, vitaminler ve endojen metabolitlerdir. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar singlet ve triplet oksijen radikali süpürülmesinde, peroksit dekompozisyonunda ve enzim inhibisyonu ve indüksiyonunda görev alırlar. Oksijen molekülü gibi elektron kabul edici moleküller kolaylıkla serbest radikallerle reaksiyona girerek reaktif oksijen türevlerine (ROS) dönüşürler. Serbest radikallerin biyomoleküllerde (lipit, protein ve nükleik asit) oksidatif hasarı indüklediği ve sonuçta insanda ateroskleroz, yaşlanma, kanser, diyabet, enflamasyon, AIDS ve çeşitli dejeneratif hastalıklara sebep olduğu kanıtlanmıştır. *P. sidoides* ve *P. reniforme* ile yapılan kimyasal çalışmalarda her iki bitkinin de çeşitli kumarinler, kumarin glikozitleri, flavonoidler, proantosiyanidinler, fenolik asitler ve fenilpropanoid türevleri içerdiği belgelenmiştir. *P. reniforme* ile yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında bitkinin içerdiği tanen ve flavonoidler dolayısıyla radikal süpürücü etkisinin yüksek olduğu gözlenmiştir.

Pelargonium türlerinin önemi, Güney Afrika’da geleneksel ilaç olarak kullanılan *P. reniforme* ve *P. sidoides* ile belgelenmiştir. Günümüzde *P. sidoides*’in etanolik ekstresi EPs® 7630 kulak, burun ve boğaz hastalıkları ile birlikte solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. EPs® 7630’un kullanım amacını bilimsel olarak kanıtlamak için antimikrobiyal aktivite ve nonspesifik immün fonksiyonları üzerine etkileri çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre

İnterferon aktivitesinde ve nitrik oksit açığa çıkarmada belirgin immunomodülatör aktivite gözlenmiştir. Gen ekspresyonu deneyleri (iNOS, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-10, IL-12, IL-18) sadece kullanılabilir verileri doğrulamakla kalmamış ayrıca *Leishmania* ile enfekte makrofajlarla enfekte olmamış makrofajların kıyaslanmasında belirgin farklılıkları açıkça göstererek TNF- α , IL-1 α ve IL-12 protein üretimi doğrulanmıştır.

Geraniaceae familyası yeryüzünde 11 cins ve 750 tür içermektedir. Bu familya Türkiye’de *Biebersteina*, *Geranium*, *Erodium* ve *Pelargonium* olmak üzere 4 cins ve toplam 62 tür ile temsil edilmektedir. Bu familyanın en önemli cinsi olan *Pelargonium*’ların Türkiye Florasında 2 türü kayıtlıdır. *P. endlicherianum*’da bu türlerden biridir.

Yapılan kaynak taramalarında ülkemizde doğal olarak yetişen *P. endlicherianum* kökleri ile yapılan herhangi bir aktivite çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmada Eskişehir yöresinden toplanan *P. endlicherianum*’un *P. sidoides* ile benzer etkilere sahip olup olmadığı ve benzer bir ilaç geliştirilmesinde potansiyel ilaç hammaddesi olup olamayacağının araştırılması amacıyla, köklerinden elde edilen ekstreler ile *in vitro* antioksidan, antimikrobiyal ve immün sistem üzerine aktivitelerinin incelenmiştir.

P. endlicherianum Fenzl. ülkemizde halk arasında “solucanotu” adı ile bilinmekte ve köklerinden hazırlanan dekoksasyon ve taze çiçekler barsak parazitlerine karşı kullanılmaktadır. Bu bitkinin kökleri ile ilgili yapılmış aktivite çalışması yoktur. Bu sebeple antibakteriyal, antioksidan özelliklerinin belirlenmesi ve immün sistem üzerine aktivite çalışması planlanmıştır. *P. endlicherianum* bitkisi antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşimi bakımından incelenmiştir. Bu amaçla farklı polaritelerde hazırlanan ekstreler *in vitro* aktivite testlerinden 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH $\cdot$) radikal süpürücü etki, 2,2’-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit) (ABTS $\cdot$) radikal süpürücü etki, β -karoten-linoleik asit birlikte peroksidasyonu engelleyici etki, Askorbat-Fe(III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunu engelleyici etki, demir(II) şelat aktivite, spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması, spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması, Fe(III)’ü Fe(II)’ye indirgeme özellikleri ve IL-1 β ile indüklenen A549 ve LPS ile indüklenen RAW 264.7 hücrelerinde antioksidan aktivite tayini, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz aktivitesi ölçülerek değerlendirilmiştir. Ayrıca ekstrelerin kimyasal kompozisyonu kromatografik yöntemlerle

incelenmiştir. Antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi için *P. vulgaris* TSA, *S. epidermidis* ATCC 3699, *B. cereus* ATCC 7064, *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. typhimurium* CCM 5445, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 11230, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* (İZOLAT), *C. glabrata* RSKK 0419 bakteri ve mantar türleri üzerinde disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirleme çalışmaları yapılmıştır.

İmmünmodölatör aktivite testleri için immün sistemin önemli unsurlarından olan makrofajlar bakteriyel komponent olan lipopolisakkarit ile stimüle edilerek TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-10 ve araşidonik asit metaboliti ve aynı zamanda siklooksijenaz-2 ürünü prostaglandin E₂ (PGE₂) düzeyleri ölçümü yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BOTANİK ÖZELLİKLER

2.1.1. Geraniaceae (Turnagagasıgiller) Familyasının Genel Özellikleri

Bu familyanın tohumlarının merkezinde turnaların gagasına benzeyen bir gaga şekli mevcuttur ve “Gerenos” Yunan sözlüğünde “turna” anlamına gelmektedir. Bu sebeple familyaya Geraniaceae (Turnagagasıgiller) adı verilmiştir. Tohumlar olgunlaştığı zaman kapsüllerinden fırlayarak etrafa dağılırlar. Familyaya ait cinsler *Erodium*, *Geranium*, *Hypseochoris*, *Monsonia*, *Pelargonium*, *Rhynchotheca*, *Sarcocaulon*, *Biebersteinia*’dır. Türkiye’de yetişen cinsler *Erodium*, *Geranium*, *Pelargonium*, *Biebersteinia*’dır (1-4). Türkiye florasında Geraniaceae familyasında yer alan cinslerin tayini şu şekilde yapılmaktadır (5):

1. Çiçek durumu rasemoz; meyve karpelleri gagalaşmamış; yapraklar çiçeklenme zamanında bütün, 3-pennatisekt

1. *Biebersteinia*

1. Çiçek durumu umbella, simoz veya tek çiçekli; meyva karpelleri gagalaşmış; taban yaprakları genellikle mevcut

2. Arka sepal pedunkule yapışmış nektarlı mahmuzla beraber; korolla kesinlike zigomorf; fertil stamenler 7, yaysı

4. *Pelargonium*

2. Sepalller mahmuzlu değil; korolla zayıf zigomorf veya değil; fertil stamenler 5 veya 10, yaysı değil

3. Yaprakların boyu eninden uzun değil, palmat damarlı; fertil stamenler genellikle 10

2. *Geranium*

3. Yaprakların boyu eninden uzun, pennat damarlı; fertil stamenler 5, 5 pul benzeri staminotlarla alternan

3. *Erodium*

2.1.2. Geraniaceae (Turnagagasigiller) Familyasının Botanik Özellikleri

Bir, iki veya çok yıllık otsu, nadiren odunsu, ılıman ve subtropikal bölgelerde yetişen bitkiler. Yapraklar alternan veya karşılıklı, birleşik veya basit loplu, sitüpullü. Çiçekler kimoza veya umbellalarda nadiren tek. Sepaller 5 serbest ve petaller 5 serbest. Stamenler tipik olarak 5-15, pistil 1 veya 3-5 loplu, ovaryum üst durumlu, 3-5 lokuluslu ve karpelli, ovüller her lokulusta 1-2, anatrop, plasentasyon eksensel. Meyve genellikle merikarplara ayrılan bir kapsula ancak uzun olan stilus orta eksene bağlı kalırken merikarpın tohum taşıyan alt ucu, yay (*Geranium*) veya spiral (*Erodium*) şeklinde kıvrılarak yukarı kalkar ve eksenden ayrılır. Familyaya ait çiçekler genellikle pembe, mor-kırmızı, leylak rengi, mavi ve beyaz ama sarı renkli çiçek yoktur (6-10).

2.1.3. *Pelargonium* L'Herit Cinsi

Çok yıllık, dike yakın sürünücü yüksekliği 2,5m'yi bulan çalılıklar. Yapraklar basit, karşılıklı ya da nadiren helisel dizilişli stipulalı petiolat; lamina; palmat, pinnatifit-parçalı. Çiçek durumu, umbellada 2- ∞ (nadiren 1) zigomorf çiçek, 5 kiremitsi çanak yapraklar genellikle lanseolat, tabanda birleşik ve gösterişli. Taç yapraklar 5, hipogin, beyaz, pembe, mor renkli; 2 üst petal diğer petallerden daha büyük. Fertil stamenler 7 (4 uzun, 1 orta, 2 kısa), hipogin, filamentler birleşik aşağıda, salgı organı yok. Ovaryum 5 loblu genellikle oval, 5 hücreli; meyve gagalı, olgunlaştığı zaman, tepenin tabanından ayrılan 5 merikarp şeklinde (1,11).

Sistematikteki yeri

Alem : Plantae

Bölüm : Magnoliophyta

Sınıf : Magnoliopsida

Takım : Geraniales

Familiya : Geraniaceae

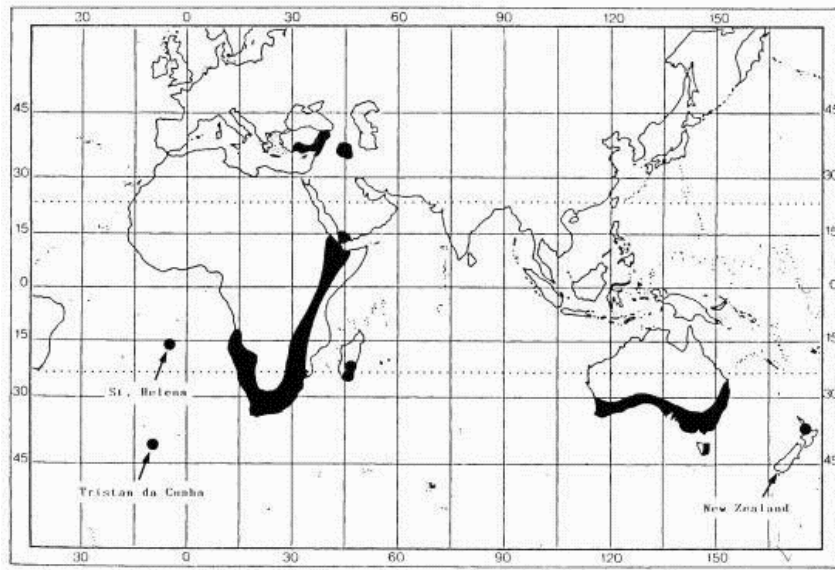
Cins : *Pelargonium*

2.1.4. *Pelargonium* Türlerinin Dağılımı

Pelargonium türlerinden ilk olarak *P. triste* (L). l'Hérit 1632'de John Tradescant tarafından Cape Town (Afrika)'dan toplanmıştır. 1700'lerin başında bu bitki Avrupa'ya ve İngiltere'ye bahçelere ekilmek amacıyla getirilmiştir. İngiltere'ye ilk tanıtılan *Pelargonium* türü *P. triste* (L). l'Hérit'dir. *P. cucullatum* (L). l'Hérit 1672'de Paul Hermann tarafından Masa Dağlarının yamaçlarından toplanmıştır. Bu türler İngiltere'nin Kraliyet Botanik Bahçesi'nde 1690'da yetiştirilmeye başlanmıştır.

Pelargonium'ların çoğu Güney Yarımküre'de bulunurken cinsin yaklaşık 200 türü Güney Afrika'da yetişmektedir. Birçok tür Namib Çölünden (Kuzey) Cape'e (Güney) kadar ve kıyı boyunca batı sahillerine kadar geniş bir alanda bulunur. Birçok tür düzensiz, izole gruplar şeklinde batı sahil şeridinden ayrılır. Cins Cape florasının belirgin bir parçası iken bazı türler de çalılık, taşlık ve kumlu arazilerde yetişir. Güneybatı Cape'in çeşitli mikro habitatları nedeniyle türleşmede artış bu bölgede *Pelargonium* türünün zengin çeşitliliğini açıklar.

Diğer *Pelargonium* türleri Batı Tropik Afrika, Arabistan, Suriye, Batı Hindistan, Avustralya ve Yeni Zelanda'nın Madagaskar adalarında bulunur. *Pelargonium* türü ayrıca doğal olarak İspanya, Kaliforniya ve İtalya'da yetişir. Cinsin geniş dağılımının sebebi kıtasal sürüklenme olarak tahmin edilmektedir (12,13). *Pelargonium* cinsinin ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren 2 türü bulunmaktadır. Bunlar *P. endlicherianum* ve *P. quercetorum* Agnew.' dir (14).



Şekil 2.1. *Pelargonium* cinsinin dünyadaki dağılımı (15)

2.1.5. *Pelargonium*'un İsimlendirilmesinde Karışıklık

İsimlendirmede karışıklık *Pelargonium*'ların yerel kullanımda *Geranium* olarak adlandırılması sonucu ortaya çıkmıştır. *Geranium* ve *Pelargonium* cinslerinde isim karışıklığı Linnaeus'dan (1753) önce ortaya çıkmış ve Linnaeus'un sınıflandırmasında da her iki cins de *Geranium* altında sınıflandırılmıştır. 17. yüzyılda *Pelargonium*'lar Avrupa'ya ilk tanıtıldığında muhtemelen benzer meyve yapılarından dolayı *Geranium* olarak isimlendirilmişlerdir. Yaklaşık 200 yıl önce botanikçiler büyük farklılıkları ortaya çıkarmışlar ve iki cins birbirinden ayrılmıştır (10,13).

2.1.6. *Pelargonium* Cinsinde Filogenetik İlişkiler

Nukleus, kloroplast ve mitokondrial kodlu alanlar filogenetik işaretli kaynaklar olarak kullanılarak bugüne kadar tanınmış *Pelargonium* türlerinin filogenetik sınıflandırılması yeniden yapılmıştır. Cins; biyocoğrafik dağılım, yayılma kapasitesi, polen biyolojisi ve karyolojik çeşitlilik gibi farklı evrimsel örneklerle kendi içinde A1, A2, B, C1 ve C2 olarak 5 sınıfa ayrılmıştır (16).

A sınıfı Güney Afrika'daki *Pelargonium*'ların %70'ini içerir. Ağaçsı çalılık, çalılık, kökü etli olanlar, geofitler ve tek yıllık otsular bu sınıftadır. A sınıfı kendi içinde A1 ve A2 olarak iki alt sınıfa ayrılır (17).

B sınıfı genellikle yabancı otluk, bodur, tek yıllık otsu türleri içine alır. Bu sınıfta geniş yayılım kapasitesine sahip türler vardır (18).

C sınıfı büyük ölçekli kromozomlara sahip olan *Pelargonium* türlerini içerir. Doğu ve Batı Cape, Tropik Batı Afrika, Madagaskar ve Anadolu'da dağılım gösterir. Allopolyploid olarak farzedilen Anadolu'da yetişen *P. endlicherianum* ve *P. quercetorum* Agnew. bu sınıftadır (19).

2.2.TÜRKİYE'DE YETİŞEN *PELARGONIUM* TÜRLERİ

2.2.1. *Pelargonium endlicherianum* Fenzl.

15-35 cm boyunda, tüylü rizomlu çok yıllık bitkidir. Tabanda, stipula (kulakçık) ve kuru yaprak sapı olan yapraklar mevcut. Rozet yapraklar dairesel, 2,5-6 cm, petiol 9-10 cm, taban kordat (kalp şeklinde), gövde yaprakları 1,8-4 cm, petiol 1,5-6 cm ve helisel dizilişli. Bazal yapraklar uzun petiolat, yaprak şekli orbikular, yaprak kenarı krenat, çok kısa ve palmat loplul, gövde yaprakları alternat. Çiçek durumu sapı (pedinkul) 6-7 cm, tabanda 5 küçük derin loblu yaprak yer almakta, umbella 4-7 çiçekten oluşmuş. Pedisel 2,1-3,4 cm, mahmuz 11-14 mm . Çanak yapraklar doğrusal dikdörtgenimsi, aşağıda konnat. Öndeki petaller 2,5 x 1,2 cm boyunda, 3-3,5 kat diğerlerinden daha büyük, tabanda tırnaklı, geniş spatül şeklinde, tepede küçük girinti, dalgalı; koyu pembe-kırmızı ve damarlar morumsu renkte. Arkadaki petaller 7x2 mm boyunda. Stamenler 7, filamentler aşağıda konnat, anterler oynak. Ovaryum 5 karpelli, yoğun tüylü ovaryum gagası 1-1,5 cm boyunda.

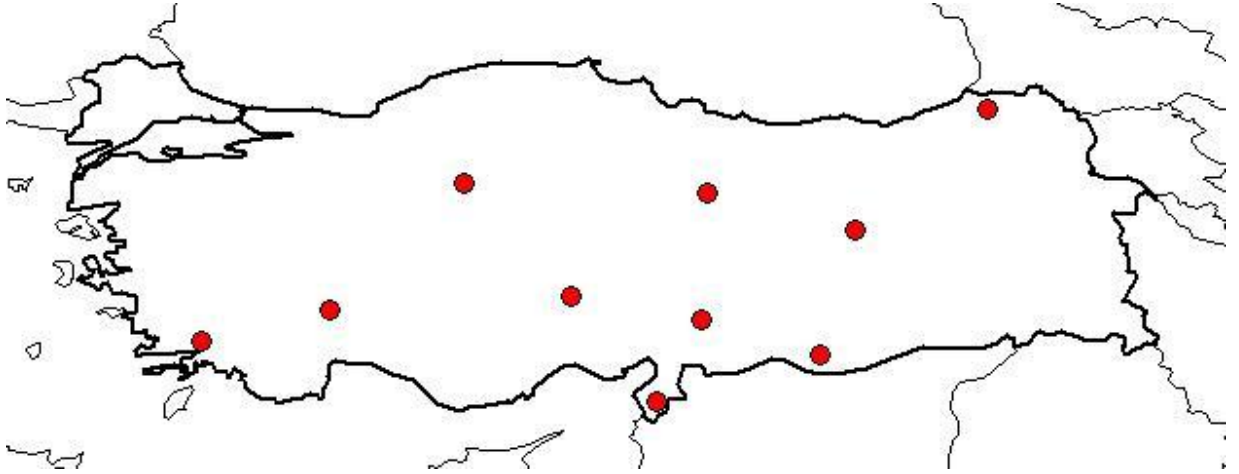
Çiçeklenme zamanı temmuz ayıdır. Taşlık, kayalık ve eğimli arazilerde yetişir. 1300-1500 m yüksekliklerde ve genellikle Orta Doğu ve Güney Anadolu ve Suriye'de yayılış gösterir. Türkiye'deki dağılımı özellikle Akdeniz ve İran-Turan bölgeleri arasındaki geçiş alanıdır. Tür Doğu Karadeniz Bölümü; Yukarı Sakarya ve Yukarı Kızılırmak Bölgeleri; Yukarı Fırat ve Hakkari, Akdeniz Bölgesi'nde yer almaktadır (1, 14). *P. endlicherianum*'un Türkiye'deki dağılımı Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.2. *P. endlicherianum* (Bütün Çiçek ve Habitat)(20)



Şekil 2.3. *P. endlicherianum* (Çiçek) (20)



Şekil 2.4. *P. endlicherianum*' un Türkiye'deki dağılımı (21).

2.2.2. *Pelargonium quercetorum* Agnew.

Çok yıllık otsu bitki. 50-100 cm boyundadır, gövde üstte dallanmış, küçük guddeli ve seyrek olarak aşağı kısmı sert tüylü, üst kısmı tüysüz. Tabanda stipulalar ovat-oblong ve kağıtimsı. Yapraklar geniş, tüysüz ve 18 cm uzunluğunda, elsi parçalı, ortası genellikle 7 loblu, kenarları oymalı ya da dişli. Umbellalar 1-3, 30 üzerinde çiçeğe sahip, pedünküller 7-25 cm uzunluğunda birbirinden ayrı. Brakteler 10-18 adet, ovat, 8-10 mm boyunda, kağıtsı ve silli. Pediseller 15-28 mm boyunda. Sepaller ovat, 10-17 mm, kısa mukrol ve koyu pembe. Çiçekler farklı güzel kokulu. Üstte 2 petal, arkaya kıvrılmış damarlar koyu renkli. Aşağıdaki 3 petal 3-5 mm boyunda, bazen eksik. Stamenler 10 adettir (7 fertil, 3 tanesi verimsizdir). Meyvenin gagası 35-45 mm, yoğun olarak, ön tarafın yüzeyi yumuşak. Merikarplar oblong 9 mm, yumuşak tüyler geriye doğru (11).

Takson genel olarak Kuzey Irak'ta yayılış gösterirken Türkiye'de Hakkari ilinde yayılış göstermektedir. Yörede bahar aylarında popüler olan bu bitki Tolk ya da Tolik olarak bilinir. Yüksek rakımları ve nemi seven bu bitkinin aynı zamanda Kari (*Arum elongatum* Stev.) bitkisine benzer özellikleri bulunmaktadır. Yöre halkı tarafından önem verilen bu bitkinin yörede aynı zamanda ticari bir değeri de bulunmaktadır. Yöre halkı bu bitkiyi tıbbi amaçla kullanmanın yanı sıra gıda amaçlı olarak ta kullanmaktadır (11, 22).



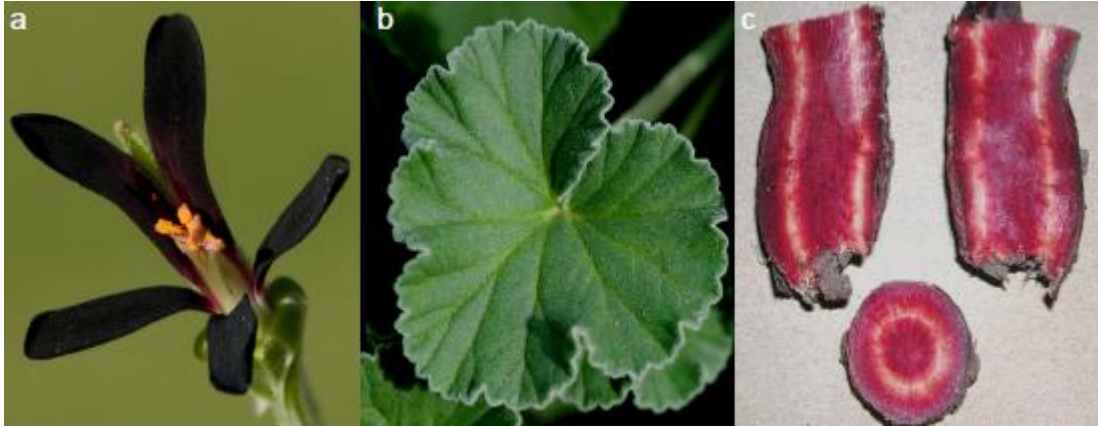
Şekil 2.5. *Pelargonium quercetorum* çiçeği (23)

2.3. *PELARGONIUM SIDOIDES* DC.

Kordat şekilli, uzun saplı ve kısa salgı tüylerine sahip kadifemsi yaprakları ile çok yıllık otsu bir bitki. Zigomorfik tübuler çiçekleri küçük ve koyu kestane ya da genellikle siyah renkli olarak uzun silindirik şekilli saplardan çıkar. Her çiçek beş lanseolat şekilli petalden oluşur. Üstteki iki petal üzerinde ayırt edici olarak iki belirgin çizgi mevcut. Çiçekler 15-17 mm çapında. Pedisel gelişmiş hipantiyum ile kıyaslandığında genellikle kısa ve petaller koyu kırmızı mor. Polen yeşilimsi sarı renkli.

Çiçekleri yaz aylarında kuraklığa karşı yüksek toleransa sahiptir. Bitkinin koyu kırmızı kahverengi yumrulu rizomları vardır. Doğada türler; toprak altı kök sistemlerinin yeniden büyümesi yoluyla ve tohumlarıyla rejenere olabilir.

Yapraklar havadaki dallar üzerinde, rozet şeklinde, yaşlı yaprak sapı ve stipula (kulakçık) örtülmüş, çiçeklendiği zaman 25-30 cm yüksekliğindedir. Gövde yer altında kalınlaşmış. Lamina basit, sıklıkla ince uzun yumuşak tüyler, salgı tüylerinin arasında gümüş renkte. Lamina kalbe benzer, tabanı kalp şeklinde, tepesi yuvarlaklaşmış, kenarlar oymalı dişli, 15-90 mm aralığında uzun ve geniş. Yaprak sapı (petiol) 70-250 mm uzunluğunda. Stipüller 3 köşeli, sivri uçludur, 5-12 mm uzunluğunda (24, 25).



Şekil 2.6. *Pelargonium sidoides* a) çiçek b) yaprak c) kök (25)

2.4. FARMAKOPELERDE KAYITLI OLAN *PELARGONIUM* TÜRLERİ

P. sidoides ve *P. reniforme* kökleri, anavatanları olan Güney Afrika'da Zulu Kabilesi şifacıları tarafından, binlerce yıldır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. 1897 yılında Charles Stevens adındaki bir İngiliz subay, Afrika ziyareti sırasında *P. sidoides* ve *P. reniforme* bitkilerinden yapılan karışımların yerli halk tarafından tüberküloz hastalığına karşı kullanıldığını görünce yakalandığı tüberküloz hastalığının tedavisi için bu karışımı kullanmış ve tedaviden fayda görünce karışımı İngiltere'ye götürmüştür. Avrupa'ya bu şekilde gelen *Pelargonium* 'lar üzerinde halen başta Almanya olmak üzere pek çok Avrupa ülkesinde ciddi yatırımlar ve bilimsel çalışmalar yapılmaktadır (26). *P. sidoides* ve *P. reniforme* türünün toprak altı kısımları ülkemizin de dahil olduğu birçok ülkede resmi olarak kabul gören Avrupa Farmakopesi'nde kayıtlı olarak bulunmaktadır (27).

2.5. *PELARGONIUM* TÜRLERİNİN GELENEKSEL KULLANIMI

Pelargonium türlerinin Afrika'ya özgü tıbbi kullanımlarının tarihi eskiye dayanır. Temel kullanım amaçları intestinal problemler, diyare ve dizanteri içindir. Bu aktiviteler de esanslı ve esanssız birçok türün fraksiyonları ile yapılan deneylerde düz kas üzerindeki antispazmodik mekanizması ile açıklanmıştır. *Pelargonium* türlerinin yara tedavi edici özellikleri amacıyla kullanılmaları ise kısmen antimikrobiyal özellikleri ile açıklanabilir (28). Ayrıca ateş tedavisi, karaciğer komplikasyonları ve diğer durumlarda da kullanılmıştır. *Pelargonium* türlerinin Afrika'ya özgü geleneksel kullanımları Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. *Pelargonium* türlerinin Afrika’da geleneksel olarak kullanımı (10, 13, 29-41)

Bilimsel Ad	Bilinen İsmi	Geleneksel Kullanım	Kozmetikle İlişkili Kullanım
<i>P. cucullatum</i>	Wilde malva (İng.)	Tüm bitki diyare tedavisinde ve kulak ağrısında.	Açık yaralarda antiseptik kapatıcı olarak.
<i>P. graveolens</i>	Rose-scented pelargonium (İng.)	Tüm bitki diüretik, depresyon ve solunum yolu rahatsızlıklarında.	Tüm bitki akne ve dermatit de
<i>P. luridum</i>	Umsongelo (Afr.)	Kök infüzyonu sırt ve karın ağrısında bebeklerde ateş, diyare ve dizanteride.	Yaprak dekoksiyonu cilt yaralarında
<i>P. bowkeri</i>		Yaprakları Afrika’da dizanteri tedavisinde.	
<i>P. sidaefolium</i>		Yaprakları Afrika’da dizanteri tedavisinde.	
<i>P. tragacanthoides</i>		Nevralji, gut, romatizma, soğuk algınlığı ve grip için	
<i>P. betulinum</i>	Kanferblaar (Afr.), Camphor scented Pelargonium (İng.)	Yapraklarının ve ince dallarının dekoksiyonu soğuk algınlığı, öksürük ve üst solunum yolu enfeksiyonları için, yaprak infüzyonu intestinal kramplarda ve gazda dahilen, yaprak ve ince dallarının dekoksiyonu sinüzit için inhaler	Dövülerek küçük cilt yanıklarına
<i>P. minimum</i>		Menstrüal düzensizliklerde ve düşük ilacı olarak	
<i>P. inquinans</i>	Scarlet pelargonium (İng.)	Kök ve yaprakları ezilerek soğuk algınlığı ve baş ağrısı için	

Tablo 2.1. *Pelargonium* türlerinin Afrika’da geleneksel olarak kullanımı (10, 13, 29-41)
(Devamı)

Bilimsel ad	Bilinen ismi	Geleneksel Kullanım	Kozmetikle ilişkili kullanım
<i>P. peltatum</i>	Ityolo perennial herb (Afr.) Ivy leaved pelargonium (İng.)	Yaprak özü boğaz ağrısı için alınmış ve yapraklar antiseptik olarak	Yaprak tozu küçük yanıklara
<i>P. quercifolium</i>		Yaprak dekoksiyonu yüksek kan basıncı, kalp hastalıkları ve romatizma için dahilen	
<i>P. zonale</i>	Malva (İng.)	Taze yapraklar kulak ağrısında	
<i>P. triste</i>	Kaneeltjie, rooivortel (Afr.)	Kök infüzyonu diyare ve dizanteride	
<i>P. papilionaceum</i>	Butterfly pelargonium (İng.), ‘Rambossie (Afr.)	Yapraklar medisinai faydalarından dolayı tütüne alternatif olarak	
<i>P. grossularioides</i>	Gooseberry leaved pelargonium (İng) ; rooribas (Afr.)	Düşük ilacı olarak	
<i>P. alchemilloides</i>		Köklerinin infüzyonu ise Güney Afrika’nın Zulu Kabilesinde diyare tedavisinde	Yapraklarını ezerek çıban, yara tedavisinde
<i>P. antidysentericum</i>		Tuber kısmının kaynamış sütle hazırlanan dekoksiyonu diyare tedavisinde ve yaprakları ile hazırlanan çay mide bulantısı, diyare ve dizanteri için	

P. sidoides ve *P. reniforme* kökleri binlerce yıldır öksürük ve tüberküloz dahil olmak üzere akciğer enfeksiyonları için; toprak üstü kısımları ise yara iyileştirmesini hızlandırmak için kullanılmaktadır. Afrika’da “Umckaloabo” adıyla anılan *P. sidoides* bitkisinin bu yerel ismi “umKhulkane”, akciğer hastalıkları ve “uHlabo”, göğüs ağrısı

anlamına gelen Zulu kelimelerinin birleşiminden ortaya çıkmıştır ve bitkinin geleneksel kullanım amaçlarını çok iyi yansıtmaktadır (42).

Pelargonium'ların Afrika dışında kullanımları ile ilgili birkaç rapor vardır. İran'da *P. graveolens*'in tansiyon düşürücü ve ağrı dindirici olarak kullanıldığı bildirilmiştir (43). *P. quercetorum*'un ise İran, Kürdistan bölgesinde antiparaziter olarak geleneksel kullanımı mevcuttur (44). *P. quercetorum* ülkemizde solunum yolu enfeksiyonları ve deri yaralarını tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca tohumları ve yaprakları çibaneleri deşmek amacıyla kullanılmaktadır. Kurt düşürücü etkiye sahip olan ve bu özelliğiyle çok önemsenen bu bitkinin aynı zamanda kronik baş ağrıları, boyun ağrıları ve migren için de kullanıldığı belirtilmiştir (22).

2.5.1. *Pelargonium* Türlerinin Uçucu Yağı (Geranium Yağı) ve Aromaterapide Kullanımı

Birçok *Pelargonium* türü, hibritleri ve bunlardan elde edilmiş kültürleri uçucu yağ üreten kokulu yapraklara sahiptirler (45). Yüksek kalitede yağ *Pelargonium*'ların yaprak, gövde ve yaprak sapında bulunur. Uçucu yağ elde etmek için bitki çiçek açmadan hasat edilir ve işlenir. *Pelargonium* uçucu yağı hatalı olarak Geranium yağı şeklinde deklare edilmiştir ancak yağ eldesinde kullanılan türlerin tamamı *Pelargonium*'lara aittir (10).

Uluslararası Standart Organizasyonu'na (İSO) göre Geranium yağı Geraniaceae familyasına ait *Pelargonium* türlerinin taze veya hafif soldurulmuş otsu kısımlarının buhar distilasyonu ile elde edilen yağ olarak tanımlanmıştır (46).

1800'lü yılların başından itibaren *Pelargonium* cinsine ait olan gül kokulu geraniumlar ticari olarak uçucu yağ elde etmek amacıyla kültür edilmeye başlanmıştır. *Pelargonium* kültürleri genellikle Çin, Mısır, Fransa'nın Reunion adası ve Fas'da yetiştirilmektedir. *P. capitatum*, *P. graveolens*, *P. radens* daha kaliteli yağ eldesi amacıyla kültür programına dahil edilmiştir (10). Geranium uçucu yağının aromaterapide premenstrual gerginlik ve menopozal problemlerde, lenfotik sistem ve immün sistem stimülasyonunda, dolaşım problemleri, hemoroid ve flebit, boğaz ağrısı, tonsilit, astım, aşırı mukus salgılanması gibi durumlarda kullanımı bulunur. Geranium uçucu yağının ciltte mantar, genel enfeksiyonlar, akne, yanık, ezik, zona, egzema ve dermatit gibi durumların tedavisinde belirgin olarak faydalı olduğu bilinmektedir (47).

2.6. *PELARGONIUM* TÜRLERİNİN KİMYASAL BİLEŞİKLERİ

P. sidoides ile yapılan çalışmalarda kökün etken maddeleri olarak kumarin ve türevleri, fenolik asit ve türevleri, flavonoidler, tanenler ve türevleri gösterilmektedir (Tablo 2.2) (26).

Türkiye’de yetişen *Pelargonium* türlerinin kökleri ile ilgili olarak yapılmış kimyasal bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Tablo 2.2. *Pelargonium* türlerinin kimyasal bileşikleri

Bileşikler	<i>P. reniforme</i>	<i>P. sidoides</i>	EPs®7630
<i>Fenolik asitler, fenilpropanoitler ve türevleri</i>			
Gallik asit	+	+	+
Gallik asit metil ester	+	+	+
<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	+		
Protokateşik asit	+		
Vanilik asit	+		
Kafeik asit	+		
Ferulik asit	+		
<i>p</i> -Kumarik asit	+		
<i>p</i> -Kumaraldehit	+		
Şikimik asit			+
Şikimik asit 3- <i>O</i> -gallat	+	+	+
<i>Kumarinler</i>			
6,7-Dioksi-7-Hidroksi-6-metoksikumarin (Skopoletin)	+	+	+
5,6,7-Trioksi		+	+
7-Hidroksi-5,6-dimetoksikumarin (Umkalin)			
7-Asetoksi-5,6-dimetoksikumarin		+	
5,6,7-Trimetoksikumarin		+	+
6-Hidroksi-5,7-dimetoksikumarin (Fraksinol)	+		
5,6-Dihidroksi-7-metoksikumarin (Izofraksetin)	+		
6,7,8-Trioksi-6,7,8-Trihidroksikumarin	+	+	+
6,8-Dihidroksi-7-metoksikumarin		+	+
8-Hidroksi-6,7-dimetoksikumarin (Fraksidin)	+		
7,8-Dihidroksi-6-metoksikumarin (Fraksetin)		+	+
5,6,7,8-Tetraoksi-6,8-Dihidroksi-5,7-dimetoksikumarin		+	+
5,6,7,8-Tetrametoksikumarin (Artelin)		+	+
8-Hidroksi-5,6,7-trimetoksikumarin	+	+	+
<i>Kumarin glikozitleri</i>			
Magnolizit		+	
İzofraksozit		+	
Umkalin-7- β -D-glukozit		+	+

Tablo 2.2. *Pelargonium* türlerinin kimyasal bileşikleri (Devamı)

Bileşikler	<i>P. reniforme</i>	<i>P. sidoides</i>	EPs®7630
<i>Kumarin sülfatlar</i>			
5,6-Dimetoksikumarin-7-sülfat		+	+
6,7-Dihidroksikumarin-8-sülfat		+	
6-Hidroksi-5,7-dimetoksikumarin-8-sülfat		+	
8-Hidroksi-5,7-dimetoksikumarin-6-sülfat		+	
<i>Flavonoitler</i>			
Kemferol-3-O- β -D-glukozit	+		
Kemferol-3-O- β -D-galaktozit	+		
Kersetin-3-O- β -D-glukozit	+		
Mirsetin-3-O- β -D-glukozit	+		
<i>Flavan-3-ol/Proantosiyanidinler</i>			
Kateşin	+	+	
Gallokateşin	+	+	
Proantosiyanidin	+	+	+
<i>Diğer</i>			
Reniformin	+		
β -Sitosterol	+	+	
β -Sitosterol-3-O- β -D-glukozit	+		

2.6.1. *Pelargonium* Türlerinin Uçucu Yağ Profili

Genellikle parfümeri, kozmetik ve aromaterapide kullanılan, belirgin kokuya sahip olan *Pelargonium* türlerinin uçucu yağları birçok farklı şekilde sınıflandırılır. Yağların kimyasal kompozisyonları kullanılan kültürler, hava şartları (güneş, yağmur, sıcaklık), toplama zamanı, gübre kullanılması gibi etmenlere göre değişiklik göstermektedir. Farklı *Pelargonium* türlerine ait uçucu yağ profili GC ve GC/MS ile aydınlatılmıştır. Başlıca bileşikler olarak sitronellol, geraniol ve esterleri bulunmuştur. Tablo2.3’ de uçucu yağ profili verilen türler koku sınıflandırmasında gül kokulu gruba dahildir. Ticari geranium yağ eldesinin yapıldığı *P. graveolens*; *P. capitatum* ve *P. radens*’in hibritleşmesiyle elde edilen tür olup içeriğindeki 10-Epi-ödesmol ile Mısır ve Fas geranium yağlarının kokularına benzediği düşünülmektedir (10, 35).

Tablo 2.3. *Pelargonium* türlerinin uçucu yağ profili

Bileşik	<i>P. capitatum</i>	<i>P. radens</i>	<i>P. graveolens</i>
α - pinen	+		
mirsen	+	+	
limonen	+	+	
linalol	+	+	+
<i>cis</i> -rose oksit	+	+	
<i>trans</i> - rose oksit	+	+	
menton	+	+	+
izomenton	+	+	+
sitronellol	+	+	+
geraniol	+		+
sitronellil format	+		+
geranil format	+		+
sitronellil asetat	+		
geranil asetat	+		
β -karyofilen	+		
gaya-6,9-dien	+		+
germakren D	+		
α - fellandren		+	
<i>p</i> -simen		+	
10-epi-ödesmol			+

Ülkemizde de yetişen ancak İran Kürdistan Bölgesi'nden toplanarak GC ve GC/MS ile uçucu yağ analizi yapılan *P. quercetorum*'un uçucu yağ profilinde α -pinen ve α -fenil asetat yüksek oranda bulunurken, limonen ve β -karyofilen daha az miktarda, mirsen ve timol gibi önemli bileşikler ise % 1,5'in altında bulunmuştur (44).

2.6.2.Ülkemizde Yetişen *P. endlicherianum* Uçucu Yağı Üzerinde Yapılmış Kimyasal Çalışmalar

Ülkemizde yetişen *P. endlicherianum* üzerinde toprak üstü kısımları ile yapılmış birkaç çalışma bulunmaktadır. Bitkinin toprak üstü kısımlarından su distilasyonu ve tepe boşluğu (Headspace) yöntemiyle elde edilen uçucu yağ karşılaştırmalı olarak Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) ile analiz edilmiştir. Uçucu yağda germakren-D, β -karyofillen, T-kadinol, α -karyofillen, α -pinen, β -pinen ana bileşenler olarak bulunmuştur (48).

2.7. PELARGONIUM TÜRLERİ İLE YAPILAN BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI

2.7.1. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Antioksidan özelliği bilinen ve bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik madde grupları başlıca fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, antosiyaninler ve karotenlerdir (49). *Pelargonium* cinsine ait türler ise fenolik bileşiklerce oldukça zengindir.

P. inquinans Ait. ile yapılan *in vitro* antioksidan aktivite deneylerinde metanol, etil asetat, butanol, *n*-hekzan ve su ekstraktları 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikalini (DPPH[•]) güçlü süpürücü etki göstermişlerdir. *in vitro* ve aynı zamanda hücre ortamında da güçlü antioksidan etkiye sahip etil asetat ekstresi ve bu ekstrelerden izole edilen 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glukoz'un ise doza bağlı olarak hücreyi oksidatif olarak hasardan koruduğu gözlenmiştir (50). *P. betulinum* ve *P. crispum* türlerinin ham aseton ekstraktlarıyla yapılmış olan DPPH[•] radikali süpürücü etki tayini deneyinde, IC₅₀ değeri $4,72 \pm 0,14$ μ g/mL olan askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmış ve ekstraktların IC₅₀ değerleri sırasıyla $4,13 \pm 0,14$ μ g/mL ve $4,49 \pm 0,18$ μ g/mL şeklinde bulunmuştur. Bu iki türde askorbik asit kadar antioksidan aktivite göstermiştir (28).

P. graveolens L'Herit. ex Ait.'in yaprak ve çiçeklerinden elde edilen metanol ve su ekstraktları, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) ve 2,2'-azinobis (3-ethylbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS^{•+}) radikallerini süpürücü etki tayininde butil hidroksi toluen (BHT) ile kıyaslanabilir derecede aktif bulunurken uçucu yağı ise BHT' den daha aktif bulunmuştur (35).

P. reniforme CURT. türünden izole edilen tanen ve flavonoidlerin referans antioksidan madde olarak kullanılan askorbik asitten daha yüksek DPPH[•] radikalini süpürücü etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (51).

P. radula (Cav.) L'Hérit türünün yapraklarının etanol, su ekstraktları ve uçucu yağı ile yapılan radikal süpürücü etki, şelat kapasitesi, indirgeme gücü ve β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu engelleyici etki tayininde ekstraktlar antioksidan olarak bulunurken uçucu yağın ise ekstraktlardan daha aktif olduğu gözlenmiştir (52).

P. purpureum Steud. yaprak ekstraktları ile yapılan *in vivo* bir çalışmada plazma ve bazı organların antioksidan kapasitesinin ölçümü yapılmıştır. Çalışmada demir indirgeme ve total radikal yakalayıcı antioksidan parametreleri ölçülmüştür. Sonuçlara göre *P.*

purpureum, plazma, kalp ve akciğer doku homojenatlarında antioksidan kapasiteyi artırmıştır (53).

2.7.2. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Yapılan bir çalışmada *P. glutinosum* (Jacq.) L'Hér., *P. pseudoglutinosum* R.Knuth., *P. scabrum* (Burm.f.) L'Hér. ve *P. sublignosum* R.Knuth. ekstrelerinin antimikrobiyal özelliği minimum inhibisyon konsantrasyonu ile değerlendirilmiştir. Buna göre ekstreler Gram pozitif bakteriler üzerinde dikkate değer antimikrobiyal etki gösterirken, *P. pseudoglutinosum* MİK=39 µg/mL ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir (28).

P. radula türünden saflaştırılan izokersitrin ve rutin *Staphylococcus aureus*, *Proteus rettgeri*, *Candida tropicalis* ve *Microsporum gypseum* üzerinde güçlü inhibisyon etki göstermişlerdir. *Staphylococcus* sp. ve *Candida lusitaniae* sadece izokersitrin ile inhibe olurken *Fusarium graminearum* sadece rutin ile inhibe olmuştur (54).

P. sidoides ve *P. reniforme* kök ekstrelerinin gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve β -hemolitik *Streptococcus* 1451, gram negatif bakterilerden *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* üzerinde agar dilüsyon metoduyla yapılan bir antimikrobiyal çalışmada metanol ekstrelerinin orta derecede antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilirken, etil asetat, *n*-butanol ve su fraksiyonlarının daha yüksek aktivite gösterdiği ve ayrıca *P. sidoides* ve *P. reniforme*'nin aktiviteleri arasında belirgin bir fark olmadığı vurgulanmıştır. Aynı çalışmada EPs® 7630'un *S. aureus*'un dirençli suşlarına 3,3 mg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonunda etkili olduğu ancak antibiyotiklerle kıyaslandığında etkinin zayıf olduğu gösterilmiştir (42).

P. reniforme'nin kök ve yaprak ekstreleri *S. epidermidis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumonia* gibi alkol suistimali sonrası karaciğere yüksek derecede endotoksin salarak harabiyet oluşturan bakterilere karşı etkili bulunmuştur ve bu durum Afrika'da geleneksel kullanımına da açıklık getirmektedir (55).

İnsan midesine yapışmış olan *Helicobacter pylori* üzerinde standardize *P. sidoides* ekstresi olan EPs® 7630 ile yapışmayı önleyici (anti- adhesive) aktiviteye bakılan bir çalışmada ekstre 10 mg/mL konsantrasyonda oldukça aktif bulunmuştur ve *H. pylori* tedavisinin ilk aşamasında EPs® 7630'un kullanımının yararlı olduğu bildirilmiştir (55). Farklı bir *in vitro* çalışmada da EPs® 7630'un gastrik epitel hücrelerine yapışmış halde

bulunan konakçı *H. pylori*'nin büyümesini 100 mg/mL konsantrasyonda inhibe ettiği bildirilmiştir (57).

2.7.3. Antitüberküloz Aktivite Çalışmaları

P. reniforme'nin aseton, kloroform ve etanol ekstralarının 5×10^3 mg/L minimum inhibisyon konsantrasyonda *Mycobacterium tuberculosis* üzerinde aktivite gösterdiği ancak *P. sidoides*'in aktivitesinin bulunmadığı yapılan bir çalışmada belirtilirken farklı bir çalışmada *P. sidoides* kök ekstralarının 12,5 µg/mL konsantrasyonda *M. tuberculosis*'in büyümesini % 96 inhibe ettiği belirtilmiştir (58, 59).

2.7.4. İmmünmodülatör Aktivite Çalışmaları

Birçok literatürde çeşitli bitki ekstralarının polifenol ve polifenolik bileşiklerce zengin olduğu ve immünmodülatör aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Polifenolik içeriği zengin olan *P. sidoides* Güney Afrika'da tüberküloz, solunum yolu enfeksiyonu, dizanteri gibi hastalıklarda kullanılan flavonoid, tanen ve alkaloid içeren bir bitkidir. *Pelargonium sidoides* ile yapılan immünmodülatör aktivite çalışmalarında enflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonu (iNOs, IL-1, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α/γ , TNF- α) çalışılmıştır, sonuçlara göre *P. sidoides*'den hazırlanan bütün ekstralar ve elde edilen bileşikler TNF, IFN ve NO salımı üzerine belirgin immünmodülatör aktivite gösterirken, gen ekspresyonu deneylerinde (iNOs, IL-1, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α/γ , TNF- α) LPS ve *Leishmania* ile enfekte edilen ve edilmeyen makrofajlar arasında da belirgin farklılıklar görülmüştür (43, 60, 61).

Flow sitometri yöntemiyle kanın tamamını temel alarak yapılan bir deneyde; kan, *Candida albicans* ile enfekte edilip EPs® 7630'un terapötik dozu uygulanmıştır. Fagositoz, oksidatif hasar ve mayaların hücre içi ölüm oranında EPs® 7630'un pozitif sonuçlar gösterdiği belirtilmiştir (62).

2.7.5. Mukosiliyer Sistem Üzerine Aktivite Çalışmaları

EPs® 7630' un 1, 30,100 µg/mL konsantrasyonları ile yapılan çalışmalarda mukosiliyer sistem savunması üzerine etki bulunmuştur (63).

2.7.6. Antiviral Aktivite Çalışmaları

P. sidoides ile yapılan bir çalışmada, *P. sidoides*' in *Herpes simplex* virus tip 1 ve tip 2 ye karşı güçlü antiviral etkisi bulunmuştur. Sonuçlar bu ekstrenin virüsün konakçı hücreye penetre olmasından önce etki ettiğini ortaya koymuştur (64).

EPs® 7630 ile yapılan bir deneyde MDCK (köpek böbrek hücre hattı) hücreleri H1N1, H3N2, RSV, HCo-229e, paraifluenza 3 ve coxsackie A9 ile enfekte edilmiş ve EPs® 7630'un bu virüslere karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (65).

2.7.7. Klinik Çalışmalar

Bugüne kadar birçok klinik çalışma yapılmış olup bu çalışmaların çift körlü ve plasebo kontrollü çalışmalar olduğu belirtilmiştir (Tablo 2.3'de bu çalışmaların özeti vardır). EPs® 7630'un özellikle çocuklarda akut bronşit ve tonsillo farenjite karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar sonucunda yetişkinler ve çocuklar antibiyotik tedavisine alternatif olarak bu ürünü kullanmayı desteklemişlerdir. Güvenilir olduğu ve yan etkilerinin çok az olduğu teyit edilmiştir (32).

2.7.8. Ülkemizde Yetişen *Pelargonium* Türleri Üzerinde Yapılmış Çalışmalar

P. endlicherianum'un toprak üstü kısımları ile yapılan çalışmada β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu engelleyici etkisi ve serbest radikal (DPPH•) süpürücü etkisi incelenmiş ve bitkinin toprak üstü kısımlarının kuvvetli antioksidan aktivitesi olduğu belirtilmiştir (66). Farklı bir çalışmada *P. endlicherianum* kök ekstreleri ve Umca® DPPH• radikalini süpürücü etkileri sırasıyla %70'lik metanol > %11'lik etanol > Umca® olarak bulunmuştur. β -Karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etkileri sırasıyla kloroform > %11'lik etanol > %70'lik metanol > Umca® olarak bulunmuştur (67).

P. endlicherianum kök ekstreleri ve Umca® ekstresinin *E. coli*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktivitelerine 0,125-4 mg.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında bakılmış ve % 70'lik metanol ekstresinin en güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (67).

P. endlicherianum'un % 70'lik metanol ve % 11'lik etanol ekstresi ile yapılan bir çalışmada *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. mirabilis*, *S. agalactia*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. caprae* ve *L. acidophilus* gibi bakterilere karşı antibakteriyel aktivite tespit edilmiş olup % 70'lik metanol ekstresi daha aktif bulunmuştur (69). Çalışmaya göre *P. endlicherianum*'un geniş spektrumda antibiyotik

etkinliğinin olduğu fakat *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *C. albicans*, *C. glabrata*'ya karşı antifungal etkisinin olmadığı belirtilmiştir (69).

Tablo 2.4. *Pelargonium sidoides* 'e ait klinik çalışmalar (32)

Endikasyon	Deney tipi/boyutu	Kaynaklar
Üst solunum yolu enfeksiyonu (akut ve kronik)	Gözlemsel;166 çocuk	Heil ve Reitermann (1994)
Akut bronşit	Gözlemsel;259 çocuk	Dome ve Schuster (1996)
Akut bronşit	Gözlemsel;742 çocuk	Haidvogel et al. (1996)
Akut bronşit	Rastgele, kontrollü, 60 çocuk	Blochin et al. (1999)
Nezle	Rastgele, kontrollü, 60 çocuk	Blochin ve Heger (2000)
Tonsillo farenjit	Rastgele, Plasebo kontrollü 143 çocuk	Bereznoy et al (2003)
Akut bronşit	Rastgele, Plasebo kontrollü 468 yetişkin	Matthys et al. (2003)
Akut bronşit	Rastgele, Plasebo kontrollü 124 yetişkin	Chuchalin et al. (2005)
Sinüzit	Gözlemsel; 361 çocuk ve yetişkin	Schapowal ve Heger (2007)
Akut bronşit	Gözlemsel; 205 hasta	Matthys ve Heger (2007)
Akut bronşit	Gözlemsel; 742 çocuk	Haidvogel ve Heger (2007)
Akut bronşit	Gözlemsel;0-93 yaş arası 2099 hasta	Matthys ve Heger (2007)
Akut bronşit	Rastgele, Plasebo kontrollü çift körlü, 18-66 yaş arası 217 hasta	Matthys ve Heger (2007)
Akut bronşit	Rastgele, Plasebo kontrollü, çift körlü, 405 yetişkin	Schulz (2008)
Akut bronşit	Rastgele, Plasebo kontrollü, çift körlü, 200 ve 220 çocuk ve ergen	Schulz (2008)
Soğuk algınlığı	Rastgele, Plasebo kontrollü, çift körlü, 103 yetişkin.	Lizogub et al. (2007)
Akut bronşit	Rastgele, Plasebo kontrollü, çift körlü, deney 1: 405 yetişkin, deney 2: 399 çocuk	Agbabiaka et al. (2008)

P. quercetorum toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstre ile yapılan çalışmada A-549 ve PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivite değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda *P.*

quercetorum'un A-549 hücrelerinde erken dönem apoptozis indüksiyonuna neden olduğu, PC-3 hücrelerinde ise apoptotik ya da nekrotik hücre ölümüne neden olmadığı belirtilmiştir (70).

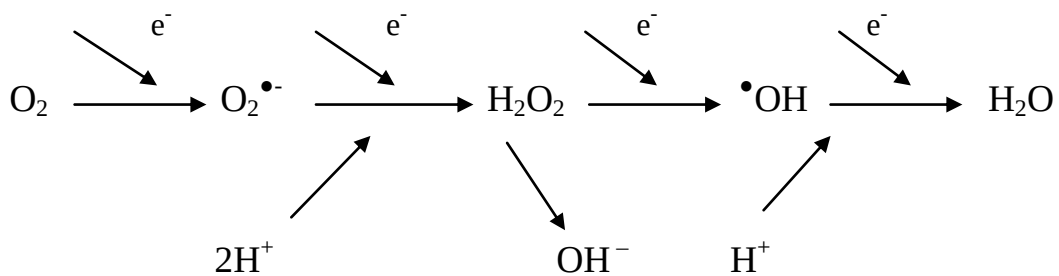
2.8. ANTİOKSİDANLAR

Oksidasyonu engelleyen antioksidanlar, yaşlanma ve dejeneratif hastalıkların oluşumundan sorumlu tutulan reaktif oksijen türlerinin biyolojik bileşenleri uyarması ile ilişkilendirilmesinden bu yana daha çok dikkat çekmeye başlamıştır. Günümüzde yaşlanmanın, kanserin, aterosklerozun ve diğer ciddi hastalıkların oluşumunda düşük ağırlıklı lipoprotein (LDL), hücre membranı ve DNA'nın maruz kaldığı oksidatif hasarla doğru orantılı olduğu kanıtlanmıştır (71).

Günümüzde yapılan çalışmaların amacı bu oksidatif süreci geciktirmek veya durdurmaktır. Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Yapılan çalışmalar da fenolik bileşiklerin belirgin aktivitelerinin olduğunu göstermiştir (72, 73).

2.8.1. Moleküler Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Moleküler oksijen (O_2) yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. Bir radikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer (74).



Reaktif oksijen türleri normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\bullet OH$), lipid peroksitler (LOOH), peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$) ve peroksinitrit ($^{\bullet}OONO$) gibi

radikallerdir. Bu radikaller DNA ve proteinlere hasar vererek kanser oluşumuna ve LDL'yi oksitleyerek kardiyovasküler hastalıklara yol açmaktadır.

Serbest radikaller aslında tamamen zararlı değildir, vücudumuzun bazı yaşamsal hormonlarının üretiminde ve aktivasyonunda serbest radikallere de ihtiyacı vardır. Enfeksiyon durumunda ve yabancı maddelerin uzaklaştırılmasında da serbest radikaller vücut içerisinde devreye girer ancak sağlıklı hücrelerin de DNA ve protein gibi yapılarına hasar vererek birçok hastalık oluşumuna sebep olabilirler (75).

Tablo 2.5. Reaktif türler (76,77)

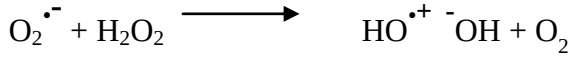
RADİKALLER		RADİKAL OLMAYANLAR	
REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)			
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\bullet-}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO^{\bullet}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksil	$RO^{\bullet}$	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil	$HO_2^{\bullet-}$	Ozon	O_3
REAKTİF AZOT TÜRLERİ (RNS)			
Azot Oksit	$NO^{\bullet-}$	Nitröz asit	HNO_2
Azot Dioksit	$NO_2^{\bullet-}$	Diazot trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO-$
		Alkil peroksinitrit	$LOONO$

2.8.1.1. Oksijen Türevi Serbest Radikaller

Süperoksit Anyon Radikali

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur (78). Milisaniyelik bir yarı ömrüyle zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır. $O_2^{\bullet-}$, oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi de buna karşı organizmayı korur. Zayıf bir oksidan olarak $O_2^{\bullet-}$ 'nin kendi başına önemli bir hücre hasarına yol açması muhtemel görülmemektedir. Bununla birlikte $O_2^{\bullet-}$ aynı zamanda önemli bir oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları

da başlatabilir. Bunlardan biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Haber –Weiss reaksiyonu $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 'in demir varlığında etkileşerek güçlü bir reaktif olan $OH^{\bullet}$ vermesi reaksiyonudur (79).



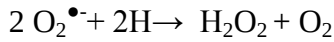
Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)

Şekerler, aminoasitler, fosfolipitler, DNA ve organik asitler gibi birçok molekülle hızlı bir etkileşime giren $OH^{\bullet}$ radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Hidroksil radikali suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması, hidrojen peroksitin transistion metallerle reaksiyona girmesi (Fenton Reaksiyonu), Peroksinitrit radikalinin bozulması, UV ışınlarıyla oluşan, H_2O_2 ' deki O-O bağının homolitik fizyonu gibi farklı yollarla oluşur (78, 79).

2.8.1.2. Serbest Olmayan Oksijen Türevi Radikaller

Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile süperoksitten üretilir.



Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektronu olmadığından bir serbest radikal değildir ancak serbest oksijen radikali üretme potansiyeli nedeniyle serbest radikal kabul edilir. Çünkü Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin ($O_2^{\bullet-}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) oluşturur. Ayrıca lökositlerde myeloperoksidaz aracılığıyla oldukça güçlü bir oksidan olan hipoklorik asite ($HOCl$) çevrilir (80) .

Hidrojen peroksit radikali moleküler yapısı itibariyle suya çok benzemektedir ve bu sebeple hücre içi ve dışında yayılabilir özellik gösterir. Aynı zamanda bu radikal tiroid bezleri tarafından fiziksel homeostasiyi sağlamak amacıyla kullanılırken, idrarda da antibakteriyel ajan olarak bulunur (81).

2.8.1.3. Reaktif Azot Türleri

Son yıllarda yapılan yoğun çalışmalar serbest radikaller biyokimyasının genel kurallarında hızlı bir değişikliğe yol açtı. Serbest radikallerin de herhangi bir bileşik

sınıfı gibi geniş aralıkta kimyasal ve fiziksel özelliklerinin olduğu kabul edilmiş, kısa ömürlü ve reaktif olmaları gerektiği şartı ortadan kalkmıştır. Bu duruma en ilginç örneklerden biri de çok fazla reaktif olamayan ve önemli fizyolojik işlevleri olan nitrik oksittir. Reaktif oksijen türleri gibi reaktif nitrojen türleri de biyolojik ortamda serbest radikallerin birçok etkiye sahip olan daha kararlı türler oluşturması ile meydana gelirler (82).

Nitrojen Oksit

Makrofajlardan salınan nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (iNOS) aracılığıyla L- arjinininden sentezlenen ve serbest oksijen radikalleri ile bir araya geldiğinde peroksinitrit radikale dönüşen bir moleküldür. NO, konak immün sisteminde bakteri, mantar, virüs ve parazit gibi patojenlere karşı elzem bir mediatördür. Ayrıca NO, nörotransmisyon, vazodilatasyon ve nörotoksisite gibi fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynar. NO, hücrel immün yanıtta mikroorganizmaları etkisiz hale getirmekte faydalı bir molekül olsa da aşırı miktarda üretimi halinde doku hasarına ve dolayısıyla çeşitli hastalıklara yol açmaktadır (83, 84).

Peroksinitrit

Peroksinitrit, nitrik oksit ile süperoksitin formasyonu sonucu oluşan, fizyolojik şartlarda kimyasal olarak stabil olmayan bir radikaldir. Peroksinitrit düşük molekül ağırlıklı proteine bağlı tiyol ile reaksiyona girerek tiyil radikallerinin oluşumu ile tiyol oksidasyonuna sebep olur. Peroksinitrit bütün büyük biyomolekül sınıflarıyla (protein, lipid, DNA) reaksiyona girerek nitrik oksitten ve süperoksitten bağımsız olarak hasara yol açmaktadır (82).

2.8.2. Serbest Radikallerin Doku ve Hücredeki Hasarları

1. DNA Hasarı
2. Nükleotit yapıdaki enzimlerin yıkımı
3. Protein ve lipidlerle kovalent bağlanma
4. Enzim inaktivasyonu
5. Proteinlerin oksidatif hasara uğraması
6. Lipit peroksidasyonu

7. Zar yapılarının ve fonksiyonlarının etkilenmesi

8. Yaşlılık pigmentlerinin birikimi

9. Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü yapılardaki oksidasyon ve redüksiyon olaylarının bozularak damarlarda aterofibrotik değişikliklerin oluşumu

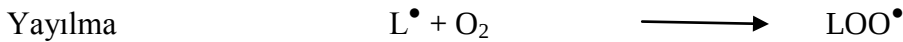
10. Zar proteinlerinin hasarı ve transport sistemlerinin bozulması (85, 86, 87, 88, 89)

Reaktif radikallere bağlı hasar lipit, protein ve DNA oksidasyonu yolu ile oluşur.

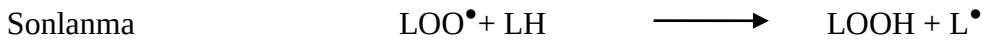
2.8.2.1. Lipit Peroksidasyon

Biyomembranlar ve hücre içi organeller, membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı dolayısıyla oksidatif ataklara duyarlıdırlar (79). Reaktif oksijen radikalleri özellikle LDL olmak üzere lipoprotein oksidasyonuna neden olabilirler (90).

Çoklu doymamış lipitlerin otooksidasyon prosesleri bir radikal zincir reaksiyonu içerir ve bu da genelde lipitlerin ışık, sıcaklık, iyonize radyasyon, metal iyon veya metalloprotein katalizörlerine maruz kalması ile başlar. Ayrıca lipoksijenaz enzimi de oksidasyonu başlatabilir. Otooksidasyonun klasik rotası başlangıç (lipit serbest radikali oluşumu), yayılma ve sonlanmadır (nonradikal ürünlerin oluşumu).



($LOO^\bullet$ Lipit peroksil radikali)



($LOOH$: Lipit hidroperoksiti)

Sonlanma safhasında oluşan lipit radikali zincir reaksiyonu oluşumunu başlatır (91). Lipit peroksitleri ($LOOH$) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir (92). Bazı araştırmacılara göre hücre hasarı oluşumunda DNA ve proteinlere yapılan ataklardan sonra ikinci sırada lipit peroksidasyonu gelmektedir ve sonuç olarak

hücre ölümü gerçekleşmektedir. Membranda hasar oluşması ile hücre içindeki esansiyel metabolitler hücre dışına çıkarken protein sentezi için önemli bir ajan olan Ca(II) hücre içinde hızlı bir şekilde artarak hücre ölümüne neden olur (93).

2.8.2.2. Protein Oksidasyonu

Proteinleri oluşturan aminoasitler karboksil ve amino grubu içermeleri sebebiyle genel olarak lipitlere göre daha yüksek derecede oksitlenme eğilimindedirler. Bu moleküller yan zincirlerinde oksidatif transformasyona girecek olan indirgenmiş karbon atomları içerir. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Protein hasarından sonra enzim aktivitesinde azalma, sitoliz ve hatta hücre ölümü gerçekleşebilir (93). Birçok çalışmada parkinson, diyabet, alzheimer, renal tümör oluşumu, romatoid artrit gibi hastalıklar protein karbonil gruplarının artışı ile ilişkilendirilmiştir (94).

2.8.2.3. DNA'nın Oksidatif Hasarı

DNA zincirinde oksidatif hasarın temel hedefi purin, pirimidin bazları ve şeker yapısıdır. Bazlarda oluşan hasar sarmalların bütünlüğünü bozarken, şeker kalıntısında oluşan hasar sarmallarda kırılmalara sebep olur (93). Güçlü bir reaktif oksijen türü olan OH[•] radikali DNA bazının çifte bağlarına katım reaksiyonu gösterip, timinin metil grubundan ve 2-deoksiriboz'un C-H bağlarından hidrojen atomu kopararak DNA'ya hasar verir. Hücre içinde yüksek miktarda reaktif oksijen türleri, transkripsiyon faktörlerini ve ilişkili genleri aktive ederek DNA hasarını artırarak kanser oluşumunu hızlandırır (95).

2.8.2.4. Karbonhidratlarda Oksidatif Hasar

Karbonhidratların radikaller tarafından oksidasyonunda ilk olarak C-H bağlarından hidrojen atomu ayrılması gerçekleşir ve α -hidroksialkil radikalleri oluşur. Bu radikaller, asit ve baz katalizli reaksiyonlarda yakınındaki C-OH bağıyla reaksiyona girerek glikozidik bağların kopmasına ve O₂ ile de peroksil radikali oluşumuna sebep olurlar (96).

2.8.3. Antioksidanlar ve Savunma Mekanizmaları

Antioksidanlar, oksitlenebilir substratla karşılaştıklarında vücutta veya gıdada düşük konsantrasyonlarda substratın oksidasyonunu belirgin şekilde engeller veya önlerler.

Antioksidanların sağlık otoritelerinin de ilgi alanına girmesinin sebebi vücutta reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri ve reaktif klorin türleri ile ilişkili dejeneratif hastalıkları önlemede yardımcı olmalarıdır (91).

Antioksidanlar etkilerini başlıca şu şekillerde gösterirler:

1. Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığı ile veya doğrudan temizlenmesi
2. Reaktif oksijen türlerinin baskılama yoluyla engellenmesi
3. Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi

Antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir

1) Yapılarına göre

- a) Enzimler
- b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller

2) Kaynaklarına göre

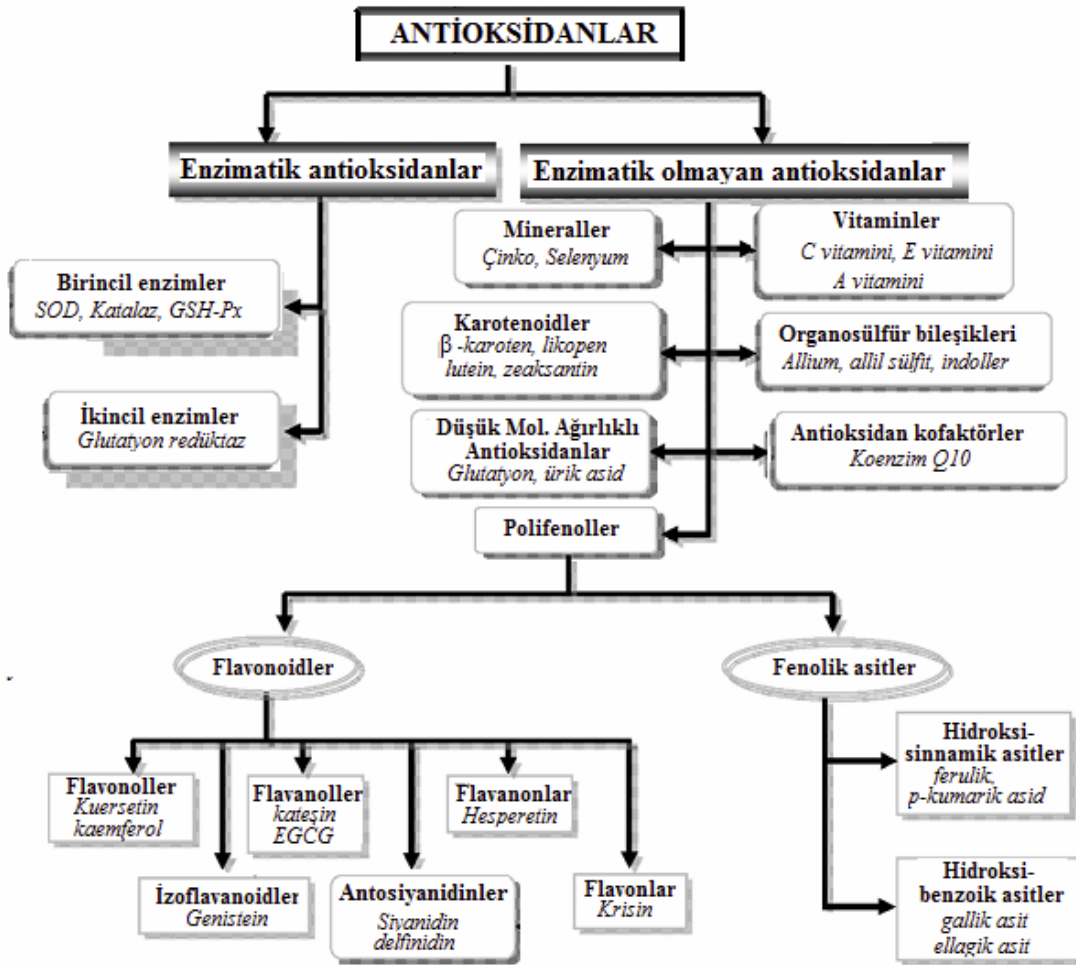
- a) Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
- b) Dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar)

3) Çözünürlüklerine göre

- a) Suda çözünenler
- b) Lipitde çözünenler

4) Yerleşimlerine göre

- a) Hücre içinde bulunanlar
- b) Ekstraselüler sıvılarda bulunanlar (97)



Şekil 2.7. Antioksidanların sınıflandırılması (SOD= Süperoksit dismutaz; GSH-Px= Glutasyon peroksidaz, EGCG= Epigallokateşingallat) (98)

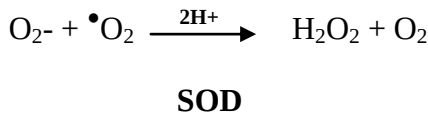
Antioksidan savunma mekanizması şunlardan oluşur:

- Ajanlar serbest radikalleri ve diğer reaktif türlerini katalitik olarak uzaklaştırırlar. Süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimleri bu kısımda yer alır.
- Demir, bakır ve haem gibi pro-oksidanların varlığında proteinler yapar. Transferrinler, heptaglobinler, hemopeksinler ve metalloproteinler bu kısımda yer alır.
- Proteinler farklı mekanizmalarla biyomolekülleri oksidatif hasara karşı korurlar.
- Küçük moleküllü ajanlar reaktif oksijen ve reaktif azot türlerini (ROS/RNS) süpürürler. Glutasyon, askorbik asit ve α -tokoferol örnek olarak verilebilir (99).

2.8.3.1. Enzimatik Olan Antioksidan Savunma Mekanizması

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalının ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. İnsanda süperoksit dismutazın iki izomer tipi bulunmaktadır. Bu izomerler sitozolde bulunan Cu-Zn SOD ve mitokondride bulunan Mn SOD'dur (79).



Bu reaksiyon, süperoksit anyonunun pH 11 ve altında oldukça stabil olmasına rağmen, enzim katalizi olmasa bile normal fizyolojik pH değerlerinde oldukça hızlı yürümektedir. Bununla birlikte, gerçekte tüm aerobik organizmaların SOD içerdiği belirlenmiştir. SOD enzimi reaksiyon hızını artırmak için yeterince güçlü bir katalisttir (100).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan hücresel antioksidanlardır. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutasyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutasyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir.

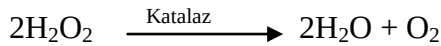
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir (75, 99, 100).



Katalaz (Cat)

Süperoksit anyon radikali süperoksit dismutaz tarafından H_2O_2 'e dönüştürülerek etkisiz hale getirilir ancak oluşan H_2O_2 parçalanarak $OH^\bullet$ radikaline dönüştüğü için ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. H_2O_2 'i ortamdan uzaklaştırma görevi katalaz enzimine aittir.

Katalaz; hidrojen peroksidi (H_2O_2), suya ve oksijene parçalayan yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir (78).



2.8.3.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar

Melatonin

Melatonin, en zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini ($OH^\bullet$) ortadan kaldıran çok güçlü lipofilik bir antioksidandır. Hücrenin hemen bütün organallerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilir ve böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir (101).

Glutasyon

Önemli bir antioksidan olan glutasyon (GSH) karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptittir. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (101).

Biluribin

Süperoksit ve hidroksil radikalini süpürerek lipid peroksidasyonunu inhibe eder (102).

Ürik Asit

Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak C vitamininin prooksidasyon özelliğini baskılar ancak lipid peroksidasyonu engelleyici özelliği yoktur (102).

2.8.3.3. Enzimatik Olmayan Eksojen Antioksidanlar

Vitamin E

Tokoferoller ve ilişkili maddeler (tokoller, tokotrienoller), belirli sebze yağlarında, tahıllarda ve diğer bitkisel ürünlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bileşiklerdir.

Buğday tohumu, mısır, ayçiçeği ve pamuk tohumu gibi yağlar bu tür bileşiklerce zengindir. Bu bileşikler düşük konsantrasyonda da olsa hayvan dokularında da bulunurlar. Hayvan vücudunda lipoprotein, mikrosom veya mitokondriyal membran gibi lipitçe zengin kısımlara yerleşmişlerdir. Memeli hücre membranlarında vitamin E konsantrasyonu düşük olmasına rağmen, normal faaliyet gösteren hücrelerde otooksidatif olayları engellemek için yeterlidir. Tokoferoller arasında antiosidan aktivite sıralaması $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ 'dır.

Vitamin E mükemmel singlet oksijen ve $\text{OH}^\bullet$ radikali söndürücü olmasına rağmen *in vivo* olarak antioksidan etkisi peroksil ve alkoksil radikallerini süpürücü etkisi ile bağlantılıdır. Peroksil radikalleri ile hızlı bir şekilde reaksiyona girdiği ve yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Zincir kırma gücü antioksidan özelliğinin temelidir (93).

Vitamin C

Vitamin C; omurilik, akciğer, göz gibi birçok hayvan dokusunun aköz kısımlarında yüksek oranlarda bulunur. Bitkilerde ve bazı meyvelerde % 1'den fazla orandadır. Birçok organizma bu bileşiği kendi sentezlemesine rağmen insan dahil birkaç türün diyetleri ile birlikte almaları gerekir çünkü enodiol yapısı nispeten düşük pKa (4.2 civarı) sergiler ve buna bağlı olarak bir çok dokuda monoanyon olarak oluşur.

Askorbik asit çeşitli ürünlerde özellikle de gıda endüstrisinde antioksidan olarak kullanılmaktadır. Sentetik izomeri sadece yan zincirdeki hidroksil grubunun konfigürasyonunda farklılık gösterir, güçlü bir antioksidandır ama vitamin aktivitesi çok azdır.

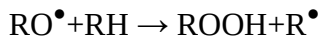
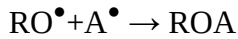
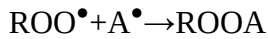
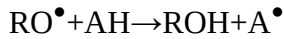
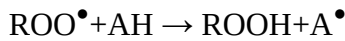
Askorbik asit güçlü indirgeyici ajandır. Birçok oksidatif serbest radikal ile reaksiyona girecek termodinamiğe sahiptir. $\text{O}_2^\bullet$ ve $\text{OOH}^\bullet$ gibi zayıf oksidatif ajanlarla bile hızlı reaksiyona girer (93).

Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerde asıl olarak sekonder metabolit sınıfı olan fenilalanin kaynaklı ve bazı bitkilerde daha az ölçüde tirozin kaynaklıdır. Kimyasal olarak fenolikler aromatik halkaya sahip, bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan ve bunların fonksiyonel türevlerini de kapsayan bileşiklerdir. Şekerlerle birlikte bulunurlar ve suda çözünabilirler. Bitkiler ve gıdalar basit fenoller, fenil propanoitler, benzoik asit

türevleri, flavonoidler, stilbenler, tanenler, lignanlar ve ligninler gibi geniş ölçekte fenolik bileşik türevlerine sahiptir. Uzun zincirli karboksilik asitlerle birlikte fenolik asitler ayrıca suberin ve kütinin yapısında da bulunurlar.

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin ilk detaylı kinetik çalışması Boland ve ten- Have (1947) tarafından yapılmıştır. Buna göre serbest radikal sonlandırıcıların etki mekanizması aşağıdaki gibidir. Fenolik antioksidanlar (AH), lipid radikallerine kolay bir şekilde elektron vererek lipid oksidasyonuna müdahalede bulunurlar. Daha sonraki reaksiyonlar, yayılan zincir reaksiyonuyla yarışa girerler.



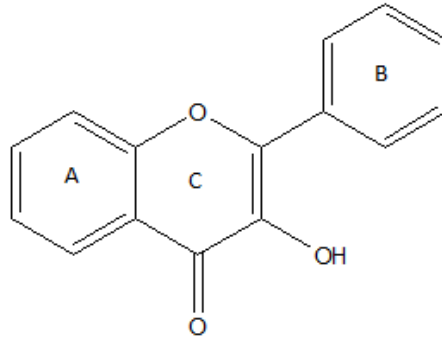
Doğada bu reaksiyonlar ekzotermiktir. Aktivasyon enerjisinin artışı A-H ve R-H bağ bölünme hızının artışına bağlıdır. Bu yüzden antioksidanların etkinliği A-H bağ gücünün azalması ile artar. Sonuç ürünü fenoksi radikali yeni bir serbest radikal reaksiyonu başlatmaz veya zincir reaksiyonla hızlı oksidasyona maruz kalır. Bu bakımdan fenolik antioksidanlar mükemmel hidrojen veya elektron vericidirler, buna ilaveten radikal ara ürünleri nispeten rezonans delokalizasyonuna bağlı olarak stabildirler ve moleküler oksijenin atak edeceği uygun kısımlardan yoksundurlar (91).

Flavonoidler

Doğal fenolik bileşikler içinde flavonoidler en büyük grubu oluşturur. Flavonoidler merkezi piran halkasının değişik oksidasyon seviyeleri ile birlikte temel difenilpropan (C₆-C₃-C₆) iskeleti taşır. Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Flavonoidler serbest radikal süpürücü etkileri yanında metallerle şelat oluşturarak muhtemel serbest radikallerin oluşumlarının da önüne geçerler.

Tekrarlanan çalışmalar flavonoidlerin çok sayıda hidroksil grubu içermesi sebebiyle etkili antioksidan olduklarını göstermiştir. Flavonoidlerin B halkası oksidasyonun baş hedefidir çünkü B halkası, karbonil grubuyla elektron yoğunluğu azalan A ve C

halkalarına göre elektronca daha zengindir. Bu özellikler fenollerin oksidasyon mekanizmasıyla da uygundur, hidroksil radikali gibi elektron verici süstitüentler bileşiğin oksidasyon potansiyelini azaltabilir ve orto hidroksilasyon fenoksilin stabilizasyonunu sağlayabilir. Flavonoitlerdeki hidroksil grubunun glikozilasyonu antioksidan aktiviteyi düşürür (91, 93, 101).



Şekil 2.8. Flavonoitlerin genel kimyasal yapısı

Fenolik Asitler

Şikimik asit yolağının metabolitleri C6-C3 fenilpropanoit birimlerinden türeyen özel bileşiklerdir ve bitki dokularında yaygın olarak bulunur. Bitkilerde fenolik asitler başlıca benzoik ve sinnamik asit olarak oluşurlar. Yapılan antioksidan etki testlerinin çoğunda sinnamik asit türevleri daha üstün bulunmuştur bunun da sebebi muhtemelen yan zincirdeki genişletilmiş konjugasyon ile ara ürün serbest radikallerinin sağlanan stabilitesidir. Çoğu bildiride hem benzoik hem de sinnamik asit türevlerinin antioksidan etkilerinin benzen halkasındaki hidroksilasyonla geniş ölçüde çeşitlendiği gösterilmiştir. Elektron verici süstitüentlerin gücü veya sayısı arttıkça fenolik asitlerin daha kolay oksitlendikleri ve buna bağlı olarak daha iyi antioksidan oldukları öngörülmüştür. Kafeik asit, ferulik asit, gallik asit, sinapik asit gibi birçok fenolik asit türevi ile yapılan çalışmalarla fenolik asitlerin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (91, 93, 101).

Tanenler

Bu grup bileşikler oligomerik ve polimerik yapılar içerirler. Tanenler sulu solüsyondaki proteinleri çöktirebilen polifenollerdir ve bitkilerde oldukça yaygındır. Özellikle meşe ve mazi gibi ağaçların kabuklarında yüksek miktarlarda bulunurlar. Tanenler ayrıca bazı tip polisakkaritlerle, nükleik asitlerle ve alkaloidlerle kompleks oluştururlar. Yapılarına göre hidroliz olabilenler ve kondanse tanenler olarak sınıflandırılırlar.

Birçok bileşik antioksidan veya radikal süpürücü özelliktedir. Örneğin tannik asit veya geranın gibi gallotanen türevleri Cu(II) katalizli askorbik asit oksidasyonunu inhibe eder. Aktiviteleri metal iyon kompleksi ile ilişkilendirilse de tanenler ayrıca yüksek stabilitede serbest radikal oluşturmaları ile de etki gösterirler. Tanenler ayrıca singlet oksijen, hidroksil radikali ve süperoksit radikalini de süpürücüdürler (91, 93, 101).

Sentetik Fenolik Antioksidanlar

Gıdalarda antioksidan uygulaması federal yönetmeliklerce yürütülür. FDA yönetmelikleri ürünlerin içerik etiketlerinde antioksidanların belirtilmesini istemektedir. Gıdalarda kullanımına izin verilen sentetik antioksidanlar butillenmiş hidroksi tolueen (BHT), butillenmiş hidroksi anisol (BHA), propilgallat (PG) ve tersiyerbutil hidroquinon (TBHQ)'dur.

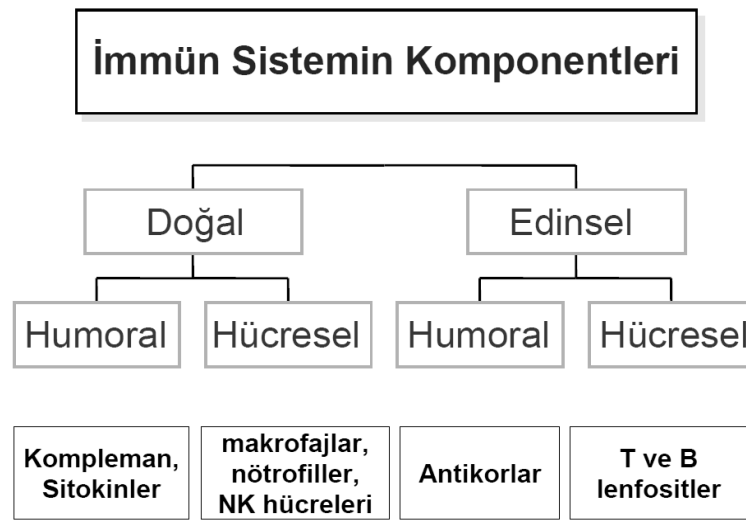
BHA ve BHT gıda endüstrisine tanıtılmadan ve kabul edilmeden önce petrol ürünlerini oksidatif bozulmadan koruma amaçlı kullanılan monohidrikfenolik antioksidanlardır. Kimyasal olarak BHA 3-terciyerbutil4-hidroksianisol (% 90) ve 2-terciyerbutil-4-hidroksianisol (% 10)'un karışımıdır. BHT hayvansal yağların oksidasyonunu bitkisel yağların oksidasyonundan daha iyi baskılar. BHA bütün gıda antioksidanları arasında esansiyel yağların aroma ve rengini korumada en başarılı olanıdır. BHA tahıllarda ve şekerleme ürünlerinde kullanılan hindistan cevizi ve palmye çekirdeği yağı gibi doymuş asit içeren yağlardaki kısa zincir oksidasyon reaksiyonlarını etkili şekilde kontrol eder.

Propil gallat; gallik asitin, propil alkol ile esterifikasyonu sonrasında distilasyonla alkolün uzaklaştırılması sonucu oluşur. Beyaz kristal toz haldedir, suda az çözünür, özellikle hayvansal yağlarda ve bitkisel yağlarda stabilizör olarak kullanılır. Isıtma işlemlerinde etkisini kaybettiği için kızartma işlemlerine uygun değildir. PG demir iyonları ile şelat yaparak mavi-siyah kompleks oluşturur. PG genellikle sitrik asit gibi şelatörlerle prooksidatif demir ve bakır katalizörlerini ortadan kaldırmak için kullanılırlar (91, 93, 101).

2.9. İMMÜN SİSTEM

Vücuda giren patojen mikroorganizmalar, doğal ve edinsel bağışıklık olan, immün sistemin iki sınıfı tarafından yok edilmektedir (103). Doğal immün sistem temelde patojenleri tanıyan farklı hücre tiplerinin antimikrobiyal yanıtı oluşturmasıyla

enfeksiyona karşı fiziksel ve kimyasal bariyer oluşturma esasına dayanır. Doğal immüitenin hücresel elemanları fagositik makrofajlar ve granülositler, antijen sunan dendritik hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler ve T lenfositlerdir (104). Edinsel bağışıklık ise T ve B lenfositlerden oluşup belirli bir antijene özgü olan bağışıklıktır (105). Hücresel aracılı immünitede makrofajlar, lenfositler rol oynamaktadır. Makrofajlar, konak savunma mekanizmalarını içeren doğal ve edinsel bağışık yanıtta önemli role sahip hücrelerdir. Fagositoz, antijen sunumu, sitokin salınımı ve serbest radikallerin oluşumu gibi fonksiyonlara sahip bu hücreler, konağın mikroorganizmalarla mücadelesinde vazgeçilmez yere sahiptir (106).



Şekil 2.9. İmmün sistemin komponentleri

2.9.1. Edinsel Bağışıklık

Edinsel bağışıklık belirli bir antijene özgün olup, antijenle tekrarlayan karşılaşmalarda daha hızlı ve güçlü cevap oluşturan antikor ve T lenfositlerin aracılık ettiği ve sorumlu hücrelerin özgül bir antijen için uzun vadeli belleğe sahip olduğu konak savunma sistemidir. Bu savunma, organizmanın patojene primer veya sekonder yanıtına göre humoral veya selüler düzeyde olabilir. Hücre aracılı (selüler) yanıt esas olarak T lenfositlerden kurulu iken antikor aracılı (humoral) bağışıklık B lenfositlerden ve plazma hücrelerinden kuruludur (107).

2.9.1.1. Hücresel İmmün Cevap

Mantar, polen, yabancı doku gibi etkenlere karşı sağlanan hücresel bağışıklıkta T lenfositler görevlidir. T lenfosit antijenleri de denilen CD sistemi (clusters of designation) ile ifade edilen membran reseptörleri, immün hücrelerde doğal olarak

bulunmaktadır. CD4 ve CD8 gibi bir takım yüzey glikoproteinleri T lenfositlere eklenerek olgunlaşır. T lenfositler yabancı cismi ancak Major doku uygunluk kompleksi (MHC) ile bir kompleks oluşturunca tanır ve hassas bir bölüm oluştururlar. Sitotoksik T-lenfositleri olgun T hücrelerinden oluşur ve organizmaya giren ve organizmada oluşan yabancı medde ve cisimleri tanıyarak çıkardıkları özel enzimler ve kemotaksi yoluyla onları yok ederler (108).

2.9.1.2. Hümmoral immün Cevap

Bakterilere ve virüs enfeksiyonlarına karşı verilen hümmoral bağışıklığı sağlamada B hücreleri plazmositlere dönüşürler ve salgıladıkları antikorlar ile antijenleri yok ederler (107). B hücreleri yüzeylerinde antijenleri tanıyan ve hücre aktivasyon işlemlerini başlatan reseptörler olarak görev alan antikorlar içeren ve antikorları üretebilen tek hücre gruplarıdır. Kemik iliğinde B lenfositlerini oluşturacak lenfoblastların yüzeyine immünglobulinler bağlanır. IgM bağlı B hücreleri henüz olgun değilken IgD bağlanınca olgunlaşarak antijenik uyarıya hazır duruma gelirler (109).

2.9.2. İmmün Yanıtın Evreleri

İmmün yanıtın evreleri: antijen tanınması, lenfositlerin aktivasyonu, antijenin ortadan kaldırılması, immün cevabın sonlandırılması ve bellektir.

Lenfositlerin aktivasyonu için iki çeşit sinyal gerekmektedir. Antijenin, lenfositlerin antijen reseptörlerine bağlanması (sinyal 1) tüm immün yanıtların başlatılabilmesi için gereklidir. Mikroplarla ve mikroplara karşı oluşan doğal immün yanıtlar tarafından oluşturulan diğer sinyaller (sinyal 2) de primer immün cevapta lenfositlerin aktivasyonu için geçerlidir. Antijenlerle karşılaşan lenfosit klonları hızla çoğalmaya başlar ve bazı lenfositler efektör lenfositlere dönüşürler. Efektör hücreler ve ürünleri genelde doğal bağışıklığında yardımıyla mikropları elimine ederek antijenleri ortadan kaldırır. Enfeksiyon temizlendikten sonra lenfosit aktivasyonunu sağlayan uyarım sona erer. İmmün yanıt ortadan kalktıktan sonra kalan hücreler bellek hücrelerini meydana getirir ve bu hücreler aynı mikropla karşılaşma durumunda hızlı şekilde yanıt cevap oluşturabilirler (109).

2.9.3. Doğal Bağışıklık

Makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri, nötrofiller, eozinofiller, doğal öldürücü hücreler (NK) ve doğal öldürücü T (NKT) hücrelerinin sorumluluğunda gerçekleşen

doğal bağışıklık; bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı, doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip savunma sistemidir (110). Doğal bağışıklık hücreleri patojen saldırısını yüzeydeki patojen kalıplarını tanıma reseptörleri (PRR) ile tanırırlar. Bu reseptörler doğrudan veya dolaylı olarak mikrobiyal nükleik asit, lipoprotein ve karbonhidrat gibi patojen aracılıklı moleküler paternleri (PAMP) teşhis ederler (111).

2.9.4. Doğal Bağışıklığın Yapıtaşları

2.9.4.1. Epitel Tabakası

Deri, sindirim ve solunum sistemleri, enfeksiyona karşı fiziksel ve kimyasal engeli oluşturan epitelyum tabakası ile örtülüdür. Epitel hücreleri yüzeylerinde glikozillenmiş glikoprotein yapısında musin içerirler ve patojen bağlanmasına ve saldırısına karşı koyarlar. Konağı mikrobiyal çevreden β -defensin ve lizozim gibi antimikrobiyal efektörler üreterek fiziksel olarak korurken bir takım sitokin ve kemokin salgılayarak da lokal enflamasyon yanıtına yardımcı olurlar (112).

2.9.4.2. Fagositik Hücreler: Nötrofiller ve Monosit Makrofajlar

Nötrofiller kanda yoğun bulunan hücreler olmakla birlikte polimorfonükleositler olarak da bilinirler. Enfeksiyon sırasında mikroorganizmaları, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetikleyerek ve patojenleri sitoplazmik granüllerle birleştirerek fagositozla etkisiz hale getirirler (113).

Makrofaj ve monositler kemik iliğinden köken alan fagositik tabiattaki hücrelerdir. Kemik iliğinde myeloid kök hücrelerden promonosit olarak üretildikten sonra oluşan ihtiyaca göre monosit-makrofaj dönüşümü gerçekleştirerek doku içinde yerleşip makrofaj özelliği ve etkinliğini kazanırlar (114).

Makrofajlar fagositoz, antijen sunumu ve sitokin üretimi gibi üç ana göreve sahiptir ve aktivasyonları doğal ve kazanılmış immunitenin etkinliği için kilit rol oynar. Vücut patolojik bir stimulasyonla veya hasarla uyarıldığında makrofajlar Toll-like reseptörler (TLR) gibi yüzey reseptörleri ile birbirlerini etkilerler. Hücrelerin tam aktivasyonu için protein tirozin kinaz, fosfatidil inozitol 3-kinaz, mitojen aktive edilmiş protein kinaz ve çeşitli transkripsiyon faktörleri (örneğin $[NF]_{-KB}$ nükleer faktör) gibi uyarıcı enzimlerle yönetilen hücresel uyarı dizilerine ihtiyaç vardır. Bütün bu olaylar sonucu makrofajlar çeşitli proenflamatuvar sitokinler ($TNF-\alpha$, IL-1), kemokinler ve kemoatraktanlar (IL-8,

MCP-1), sitotoksik ve enflamatuvar moleküllerin (NO, ROS ve PGE₂) salınımını ve ayrıca glikoproteinlerin (CD80 ve CD86) ve adhezyon moleküllerinin (selektin ve integrin) yüzey seviyelerini artırır (115).

Makrofajlar, patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı reseptörler aracılığıyla tanımaktadır. Toll-benzeri reseptörleri mikrobiyal ligandlar için işlevsel olarak tanımlanmış enflamasyon yanıtlarını başlatan reseptörlerdir (116). Toll-like reseptörlere bağlanarak makrofajları uyaran önemli patojenle ilişkili moleküler paternler; bakteriyel karbonhidratlar (lipopolisakkaritler), fungal glukanlar (zymosan) ve sentetik çift sarmal RNA molekülü (Poly I:C) örnek verilebilir (117, 118). Lipopolisakkarit (LPS), Gram negatif bakterilerin dış membran komponenti olup TLR4'ü stimüle ederek, iNOs, TNF- α , IL-6 ve COX-2 gibi proenflamatuvar sitokinlerin ve proteinlerin aşırı üretimine yol açarak septik şok ve çeşitli enflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar (119, 120, 121).

2.9.4.3. Doğal Öldürücü Hücreler

Doğal öldürücü hücreler lenfositlerin üçüncü bir sınıfını oluşturup, B ve T hücrelerinden farklıdır. Sitotoksik lenfositler olup T hücrelerinden farklı olarak T hücre alması taşımazlar. İmmün sistemde önemli rol oynayan doğal öldürücü hücreler aktive olduklarında belli tümör hücre hatlarını, intraselüler patojenlerle enfekte olan hücreleri ve antibody kaplı hücreleri güçlü sitotoksiteleri ile yıkabilirler. Aktive olmuş doğal öldürücü hücreler IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinler üretebilirler (122).

2.9.4.4. Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi birbiri ardına aktive olarak patojenleri opsonize eden çok sayıda plazma proteinlerinden oluşur. Kompleman proteinleri proteolitik bölünmeyle aktive olan proteazlardır. Kompleman sistemin enfeksiyona karşı savunmasında üç önemli yol vardır. İlki çok sayıda üretilen kompleman proteinlerinin patojenlere kovalent bağlanma yoluyla mikroorganizmaların fagosit hücrelere bağlanmasında aracılık yapmaktır. İkinci olarak sistemin ara ürünleri nötrofiller ve monositler için kemoatraktan görevi görmektedir. Üçüncü olarak ise sistemin aktivasyonu sonunda mikroorganizmaların hücre membranında oluşan protein kompleksinin membranda bir delik oluşturması ve mikroorganizmanın yıkımıdır (123).

2.9.4.5. Sitokinlerin İşlevleri ve Sınıflandırılması

Sitokinler yabancı antijenlere ve ajanlara karşı organizmanın reaksiyonlarının kontrol ve düzenlenmesinde önemli rol oynarken aynı zamanda hücreler arası ilişkileri de düzenleyerek lokal ve sistemik enflamatuvar cevapta önemli rol oynarlar. Lenfositlerin meydana getirdiği sitokinlere lenfokin, monositlerin meydana getirdiği sitokinlere ise monokin denir. Lökositler tarafından salgılandıkları zaman ise interlökin olarak adlandırılmaktadır. Kemokin deyimi ise *kemotaktik* ajanların ve sitokin parçalarının birleştirilmesiyle üretilmiş olup bunlar, makrofaj ve monositleri enfeksiyon noktasına çekebilen bir grup sitokindir (124, 125).

Tablo 2.6. Temel sitokinlerin sınıflandırılması (126)

Sitokin	İmmün Sistem Kaynağı	Esas Hedefler	Esas Etkiler
IL-1 α IL-1 β	Makrofajlar, LGL'ler, B hücreleri	T hücreleri, B hücreleri, makrofaj, endotel, doku hücreleri	Lenfosit ve makrofaj uyarımı, lökosit/endotel adezyonu artışı, yüksek ateş, akut faz proteinleri
IL-2	T hücreleri	T hücreleri	T hücre farklılaşması ve çoğalması, sitotoksik lenfosit ve makrofaj uyarımı
IL-3	T hücreleri		Birçok hücre çeşidine koloni uyarım faktörü
IL-4	T hücreleri	T hücreleri, B hücreleri	B hücre büyüme faktörü, izotop seçimi, IgE, IgG1
IL-5	T hücreleri	B hücreleri	B hücre büyüme ve farklılaşma, Ig A seçimi
IL-6	T hücreleri, B hücreleri	B hücreleri, hepatositler	B hücre farklılaştırılması, akut faz proteinlerinin artırılması
IL-7		Pre- B hücreleri, T hücreleri	B hücreleri ve T hücreleri çoğalması
IL-8	Monositler	Nötrofil, bazofil, T hücreleri, keratinositler	Kemotaksi, angiogenez, süperoksit salınımı, granül salınımı

Tablo 2.6. Temel sitokinlerin sınıflandırılması (126) (Devamı)

Sitokin	İmmün Sistem Kaynağı	Esas Hedefler	Esas Etkiler
IL-9	T hücreleri		T hücre yaşamını uzatır, mast hücre uyarımı, eritropoetin ile aynı etki
IL-10	T hücreleri	TH1 hücreleri	Sitokin sentezi önlenimi
IL-11		Kemik iliği öncülleri, osteoklastlar	Osteoklast oluşumu, koloni uyarıcı faktör, in vivo trombosit sayısında artış, proenflamatuvar sitokin üretiminin önlenmesi
IL-12		T hücreleri	TH1 hücreleri uyarımı
IL-13	Uyarılmış T lenfositleri	Monositler, B hücreleri	B hücre büyüme ve farklılaşma faktörü, proenflamatuvar sitokin üretiminin önlenmesi
IL-14	T hücreleri		Uyarılmış B lenfositlerinin çoğalması, Ig salgılarının önlenmesi
IL-15	Monositler	T hücreleri, uyarılmış B hücreleri	Çoğalma
IL-16	Eozinofiller, CD8+ T hücreler	CD4+ T hücreler	CD4+ hücrelere kimyasal çekim
IL-17	CD4+ T lenfositler	Epitel, fibroblast, endotel	IL-6 salınımı, G-CSF, PGE ₂ , ICAM-1 artışı, CD34+ öncüllerin canlılığı için fibroblastların uyarımı
IL-18	Makrofajlar	PBMC, TH1 eş-faktör uyarımı	IFN γ üretiminin artırılması, NK aktivitesinin artırılması
IL-21	T hücreleri, mast hücreleri	T hücreleri, B hücreleri, mast hücreleri, eozinofiller, hepatositler	Akut faz reaktiflerinin artırılması, LPS'den sonra seviyede artış
IL-22	Uyarılmış T hücreleri	TH2 hücreleri	IL-4 üretimini önler
TGF β		Birçok hücre türü	Enflamatuvar sitokin üretimini azaltır, yara iyileşme cevabını ve nedbe dokusu gelişimini artırır, büyümeyi baskılar
TNF β (LT)	Lenfositler		TNF α gibidir
IFN α	Lökositler	Doku hücreleri	MHC klas I uyarımı, antiviral durum, NK hücre uyarımı, çoğalmayı önleme, IL-12 üretiminin artırılması

Tablo 2.6. Temel sitokinlerin sınıflandırılması (126) **(Devamı)**

Sitokin	İmmün Sistem Kaynağı	Esas Hedefler	Esas Etkiler
IFN α	Lökositler	Doku hücreleri	MHC klas I uyarımı, antiviral durum, NK hücre uyarımı, çoğalmayı önleme, IL-12 üretiminin artırılması
IFN β	Fibroblastlar, epitel	Doku hücreleri, lökositler	MHC klas I uyarımı, antiviral durum, çoğalmayı önleme
IFN γ	T hücreleri, NK hücreleri	Doku hücreleri, lökositler, TH2 hücreleri	MHC klas I ve II uyarımı, makrofaj uyarımı, lökosit/endotel adezyonu artışı, antiviral durum, TH1 hücreleri çoğalımının azaltılması

2.9.5. Enflamasyon

Hastalık yapıcı bakterilere karşı yangısal yanıtta dokudaki dendritik hücreler Toll benzeri reseptörler (TLR) vasıtasıyla patojenlerin varlığını tespit eder ve bunlara karşı sitokin ve kemokin gibi araçlar salgılar (127). TLR'ler mikrobiyal ligandlar için işlevsel olarak tanımlanmış enflamasyon yanıtlarını başlatan reseptörlerdir. TLR'lere bağlanarak makrofajları uyaran önemli patojenle ilişkili moleküler paternlere bakteriyel karbonhidratlar; lipopolisakkaritler (LPS) örnek verilebilir (128).

Doğal immün sistemin merkezi reseptörü olan TLR, bir dizi kinaz yolağını ve transkripsiyon faktör aktivasyonunu indükleyerek patojenlere karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlar (129). TLR sinyal yolağı iki yoldan oluşur bunlar; MyD88 (miyeloid farklılaştırma faktörü 88) bağımlı ve MyD88 bağımsız sinyal yoludur. MyD88 bağımlı yollardaki sinyal kaskadları proenflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve reaktif oksijen türleri gibi doğal immünite etkenlerinin oluşumuna neden olur (129, 130). Bu hücre içi sinyal kaskadları enflamasyona neden olan enflamatuvar mediatörlerin oluşumuna katkıda bulunan NF- κ B transkripsiyon faktörünü, p38 mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol3-kinaz ve gen ekspresyonunun diğer düzenleyicilerini aktive eder (129, 131, 132).

Yangısal yanıtta önemli rol oynayan nötrofiller, doku hasarı sonucu oluşan çeşitli çözünür araçlarla beraber dolaşımı terk ederek enfeksiyonun olduğu bölgeye göç eder

ve patojen bakteriyi doğrudan içine alarak yok ederler. Aynı zamanda Toll benzeri reseptörler aracılığıyla patojen makromoleküller ile de ilişkide olan nötrofiller, reseptörlerin aktivasyonu ile sitokin ve kemokin üretimine neden olarak enflamasyon bölgesine nötrofil, makrofaj ve lenfositlerin (B ve T lenfositler) göç etmesini sağlar. Aktive edilmiş nötrofiller bakterileri yok eden enzimler, mikrop öldürücü peptitler ve süperoksit anyon gibi reaktif oksijen türlerini de açığa çıkarırlar. Doku hasarının olduğu bölgede patojen yoğunluğunun fazla olması durumunda immün sistemin doğal savunma mekanizması patojenleri yok edemez ve enfeksiyonun kontrol altına alınabilmesi için kazanılmış immün yanıt gereksinim duyulur. Makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücreler dahil doğal immün yanıt ile kazanılmış immün yanıt arasında işlev gören özelleşmiş hücreler patojen kaynaklı antijenleri ikincil lenfoid organlara taşıyarak kazanılmış immün yanıtı başlatır. Dendritik hücrelerin aktive olmasıyla lenf düğümlerine göçleri başlar ve T hücreleri ile karşılaşmak için hazır halde beklerler. Dendritik hücrelerin aktivasyonu T hücre yanıtının başlaması için gereken majör doku uygunluk kompleksinde (MHC-peptit kompleksi) artışla birlikte uyarıcı moleküllerin ifadesinde de artışa neden olur. B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşabilmesi için T hücrelerinin aktifleşmesi gereklidir (127). Protein antijenlerden kaynaklanan peptitleri gösterme işlevini MHC kodlanan moleküller yerine getirir. Antijen sunucu hücrelerle (ASH) hücre dışından alınan proteinler proteolitik olarak ASH vezikülleri içinde sindirilir ve oluşturulan peptitler yeni sentezlenen sınıf II MHC moleküllerinin oluşuna bağlanarak, temel olarak hücre dışı proteinlerden kaynaklanan sınıf II MHC molekülleri ile ilişkili peptitlere özgül $CD4^+$ yardımcı T hücreleri tarafından tanınır. Enfekte ettikleri hücrelerin sitoplazmasında yaşayan ya da fagosit edilenlerden sitoplazmaya geçen mikrobiyal proteinler sitozolik proteazlarca yıkılır ve yeni sentezlenen sınıf I MHC moleküllerinin oluşuna bağlanır. Sınıf I MHC molekülleri CD^+8 sitolitik T hücrelerince tanınır. Mikroorganizmalar ASH'leri aktive ederek, özgül T hücrelerini uyarmak için, antijenle birlikte sinyaller sağlayan membran proteinlerinin ekspresyonunun ve sitokin salgılamalarını sağlar (109).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN MATERYAL VE KİMYASAL MADDELER

3.1.1. Bitkisel Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılan *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. Eskişehir Dağküplü köyü'nden 2012 yılında toplanmıştır. Bitkinin Herbaryum örneği Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır (ESSE 14453).



Şekil 3.1. *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. bitkisinin kurutulmuş kökleri

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitededir. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi analizlerinde YBSK kalitesinde çözücüler ve standart maddeler kullanılmıştır. Tüm deneylerde kullanılan su ise deiyonize ve distile sudur.

3.1.3. Kullanılan Aletler

Rotavapor (Ilmvac vakum pompası, Heidolph Laborat 4000 efficient)

Liyofilizatör (Labconco Freezone 4.5)

Santrifüj cihazı (Thermo scientific SL 16R, Hettich mikro 200R)

Ultrasonik banyo (Elma S 100H Elmasonic)

Su banyosu (Memmert)

Çalkalamalı su banyosu (Nüve ST 402)

Vorteks karıştırıcı (Velp scientifica)

pH metre (Inolab pH 720 WTW)

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Cihazı (Agilent Technologies 1200 Series)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)

Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy HT)

Steril kabin (Safe Fast Elite)

Hücre sayım cihazı (Roche Innovatis Cedex Xs)

Gerçek zamanlı hücre analizörü (Roche)

Karbondioksitli etüv (New Brunswick Galaxy 170R)

LC-MS/MS (Shimadzu 20A Prominence)

3.2. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölümde *P. endlicherianum* 'un toprak altı kısımları üzerinde yapılan ekstraksiyon işlemleri, ekstrele uygulanan miktar tayini ve aktivite çalışmaları hakkında bilgi verilmektedir.

3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkisel materyallerin kurutulmuş toprak altı kısımları (500 g) kabaca toz edilerek 250 g toz edilmiş kök kısmı %11'lik etanol ve 250 g toz edilmiş kök kısmı %70'lik metanol ile çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 8'er saat süreyle üç kez ekstre edildi. Elde edilen ekstratlar birleştirilip vakum altında rotavaporda (37-38 °C) yoğunlaştırıldı. Tüm ekstratlar liyofilize edildi ve analiz anına kadar +4 °C'de saklandı. %70'lik metanol

ekstresi etil asetat ve *n*-butanol ile fraksiyonlandı. Etil asetat ve butanol ekstreleri elde edilerek vakum altında rotavaporda (37-38 °C) yoğunlaştırılıp liyofilize edildi.

3.2.2. Kimyasal Kompozisyon Analizleri

Bitkisel materyallerden elde edilen ekstreler fenolik bileşikler bakımından spektrofotometrik ve kromatografik olarak incelendi.

3.2.2.1. Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı (133). 6 mL distile su içeren 10 mL'lik kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. 1 dakika sonra 1,5 mL %20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 25 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm'de absorbansı ölçüldü ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve sonuçlar ortalama değerler olarak verildi.

3.2.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit analizi Zhishen ve ark (1999)'nın çalışmalarında kullandıkları metot modifiye edilerek yapıldı (134). Buna göre 1 mL ekstre t=0. dakikada 0,3 mL % 5'lik NaNO₂ çözeltisi ile karıştırıldı, t=5. dakika'da 0,3 mL % 10'luk AlCl₃.6H₂O çözeltisi ilavesinden sonra, t=6. dakika'da 2 mL 1 M NaOH çözeltisi eklendi ve 2,4 mL su ilave edilerek karıştırıldı. 510 nm'de köre karşı absorbans ölçüldü. Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoit miktarları katesine eşdeğer olarak mg CE/g_{ekstre} olarak hesaplandı. Katesinin kalibrasyon eğrisi aynı şekilde etanol kullanılarak hazırlandı. Bütün ölçümler 3 paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler alındı.

3.2.2.3. Toplam Flavonol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonol miktarları rutine eşdeğer olarak (RE) mg RE/g_{ekstre} olarak hesaplandı (135). 2 mL bitki ekstresi (10 g/L) 2 mL etanolik alüminyum triklorit (20 g/L) ve 6 mL sodyum asetat (50 g/L) karıştırıldıktan sonra 20 °C de 2,5 saat bekletildi ve 440 nm'de ölçüm yapıldı. Aynı işlemler kalibrasyon eğrisi hazırlamak üzere 0,5-0,015 mg/mL konsantrasyonlardaki etanolik rutin çözeltileri ile gerçekleştirildi. Bütün ölçümler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

3.2.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Kütle-Spektrometresi (YBSK-KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

Cihaz	: Shimadzu 20A Prominace sıvı kromatografisi sistemi
Dedektör	: Applied Biosystems 3200 Q-Trap MS/MS
İyonlaşma modu	: Elektro Sprey İyonizasyon (ESI), negatif iyonlaşma
Kolon	: GL Science Intersil ODS 4,6x 250 mm, 5µm
Kolon sıcaklığı	: 40°C
Akım hızı	: 1 mL/dk
Hareketli faz A	: metanol: su: formik asit (10:89:1 h/h/h)
Hareketli faz B	: metanol: su: formik asit (89:10:1 h/h/h)
Akış programı	:

Tablo 3.1. YBSK KS/KS gradient akış tablosu

Zaman(dk)	B kons
0.01	15
15.00	40
18.00	45
30.00	45
35.00	75
38.00	85
39.00	95
40.00	100

3.2.2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Analizi

Cihaz	: Agilent 1100 sıvı kromatografisi sistemi
Dedektör	: PDA dedektör (200-500 nm arası)
Kolon	: C18 analitik kolon (250 x 4.6 mm, 5 µm partikül çapı)
Sıcaklık	: 22 °C
Akım hızı	: 1 mL/dak

Hareketli faz : A) metanol/su/asetik asit (10:88:2, h/h/h)

B) metanol/su/asetik asit (90:8:2, h/h/h)

C) metanol

Tablo 3.2. YBSK gradient akış tablosu

zaman (dak)	hareketli faz A (%)	hareketli faz B (%)	hareketli faz C (%)
0	85	15	0
15	70	30	0
18	60	40	0
30	60	40	0
35	100	0	0
37	85	0	15
48	70	0	30
50	85	15	0

YBSK’da ayrılan bileşiklerin tutunma zamanları ve UV spektrumları standartlarla karşılaştırılarak tanımlandı. Bütün standart ve örnek çözeltiler üçer kere analiz edilerek ortalama değerler verildi.

3.2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu çalışmada ATCC’den (CCL-185 İnsan Akciğer Kanseri Hücresi) temin edilen A549 hücreleri ve Gazi Üniversitesi’nden temin edilen RAW 264.7 (Abelson fare lösemi virüsü transforme edilmiş makrofaj hücre hattı) kullanıldı. Çalışmalar süresince bu hücreler +37 °C’de CO₂’li inkübatörde delikli kapaklı hücre kültür kapları içinde tutuldu ve düzenli olarak takip edilip besiyerleri iki gün ara ile değiştirilerek kültür sürdürüldü. Çoğalan hücrelerin bir kısmı dondurulup -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.3.1. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

A549 hücreleri ve RAW 264.7 hücreleri, +37 °C’ de çözülüp, hücrenin üzerine 5 mL PBS eklenerek 1600 rpm’de 5 dakika 20 °C’de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra hücre pelleti üzerine 5 mL kadar taze besiyeri ekleyip yavaşça pipetleyerek homojenize edildi ve delikli hücre kültür kabına aktararak CO₂’li inkübatöre kaldırıldı.

3.2.3.2. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinin Pasajı

Flask içerisinde kültüre edilen hücreler iki günlük inkübasyon süresi sonunda, 15 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı ve 800 g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet, penisilin içeren yaklaşık 5 mL PBS (pH;7,3) tamponu içinde hücrelere zarar vermeyecek şekilde çözülüp aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pellet önceden hazırlanmış besiyeri içinde çözülerek kültür kabına aktarıldı.

Pasajlama işleminin iki gün arayla yapılma nedeni olası kontaminasyonlardan ve ölü hücre kalıntılarının zararlı etkilerinden canlı hücrelerin etkilenmesini önlemektir.

3.2.3.3. Hücre Dondurma ve Saklama

Hücreler besiyeri değiştirirken olduğu gibi santrifüj ve yıkama işlemlerine tabi tutuldu. Hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Hücreler 1 mL PBS ile süspand edilerek, steril tüpe aktarıldı ve üzerine 1 mL krio çözeltisi karışımından eklendi (% 5 DMSO) ve hazırlanan krioların kademeli olarak donmalarını sağlamak için ilk olarak +4 °C'de yarım saat, -20 °C'de 3 saat bekletildikten sonra -80 °C'de saklandı.

3.2.3.4. FCS'nin İnaktivasyonu

FCS, besiyerinin en önemli besin kaynağıdır. İnaktivasyon işlemi ile ısıya duyarlı komplement proteinler denatüre edildi. Ayrıca 0,22 µm'lik filtreden geçirilmelerine rağmen mikoplazma gibi mikroorganizmalar hala ortamda mevcut olabileceği için ısıyla gerçekleştirilen bu inaktivasyon prosesi sayesinde besiyeri kontaminasyon riski azalmış oldu.

İnaktivasyon işleminde -20 °C'de muhafaza edilen FCS alınıp 37 °C'lik su banyosuna konuldu ve burada aralıklarla çalkalanarak erimesi sağlandı. Tamamen eridikten sonra 15 dakika kadar yine aralıklı olarak karıştırıldı ve FCS'nin ısısının 37 °C'ye gelmesi beklenip su banyosunun ısısı +56 °C'ye çıkarıldı. 5 dakika su banyosunu ısısının +56 °C'ye gelmesi beklenip ısı tamamen yükselince her 10 dakikada bir karıştırmak suretiyle yarım saat su banyosunda bekletildi süre sonunda steril tüplere bölünüp -20 °C'de saklandı.

3.2.3.5. A549 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi

%70'lik metanol, %11'lik etanol, etil asetat ve butanol ekstraheleri A549 (İnsan küçük hücreli olmayan akciğer karsinoma hücresi) hücreleri üzerindeki sitotoksitesisi sülforhodamin B (SRB) kolorimetrik yöntemle belirlendi. A549 hücreleri F12K-Kaighn Medium besi yerinde çoğaltıldı. Hücreler 96 kuyucuklu mikropakta trikloroasetikasit ile fiks edilerek SRB'nin protein komponentlerine bağlanması sağlandı. Çalışmadan 24 saat önce flastaki hücreler sayılarak 96 kuyucuklu mikropala kuyucuk başına 100 µL' de 25 000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

24 saat sonunda plağa yapışmış olan hücrelerin üstündeki besi yerleri atıldı ve hazırlanan ekstraher 0,125 mg/mL, 0,250 mg/mL, 0,5 mg/mL konsantrasyonda 100 µL alınarak plağa eklendi ve 37 °C'de karbondioksitli etüvde 24 saat bekletildi. Süre sonunda +4 °C'de bekletilen %40'lık soğuk TCA çözeltisi kuyucuklara ilave edildi ve plak +4 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyuların içeriği uzaklaştırılarak 5 defa deiyonize su ile yıkandı. Kuyular kurutulduktan sonra %1 asetik asit içinde hazırlanmış % 0,4 SRB boyası kuyulara 50 µL eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Kuyuların içeriği uzaklaştırıldıktan ve 5 defa %1 asetik asit çözeltisi ile yıkandıktan sonra kuyular kurutuldu, daha sonra 10 nM Tris bazı 100 µL eklenerek 5 dk çalkalayıcıda çalkalandı. Mikropala okuyucuda 490 nM de absorbanlar ölçüldü (136, 137). Deneyler dört paralel çalışıldı.

3.2.3.6. RAW 264.7 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi

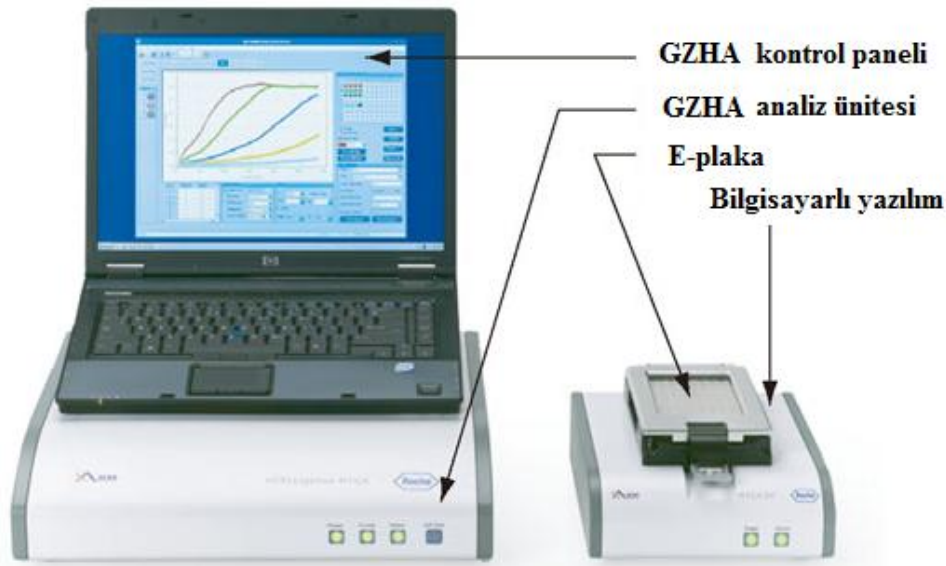
Yukarıda belirtilen prosedüre göre ekstraherin 2,5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında, aposininin ise 0,01 mM, 0,03 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM konsantrasyonlarda RAW 264.7 hücreleri üzerine olan toksisiteyi değerlendirildi. Deneyler üç paralel, iki tekrarlı çalışıldı.

3.2.3.7. A549 Hücrelerinde Gerçek Zamanlı Büyüme Profili Deneyi

Deney esası, yapışan tipteki hücrelerin mikroelettrot kaplı yüzeye yapıştıklarında empedansta meydana getirdikleri değişimin ölçülmesine dayanmaktadır. Empedans ölçümü hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi verir ve bu sayede herhangi bir boya ve kimyasal kullanmadan

hücrelerin mevcut durumu hakkında gerçek zamanlı olarak bilgi edinilir. Ölçümlerle toksik maddeye maruz kalan hücrenin yapışkanlığı, proliferasyonu ve morfolojisi üzerinde fikir sahibi olunması sağlanır.

GZHA, 96'lık altın plak, cihaz istasyonu ve analiz ünitesi olarak üç ana bileşene sahiptir (Şekil 3.2). 96'lık e-plak karbondioksitli inkübatörde bulunan cihaz istasyonuna elektronik olarak bağlanmaktadır. Cihaz istasyonu inkübatör dışında bulunan analiz ünitesine bağlıdır. Sistemden e-plak'a sabit akımlı elektrik sağlanmaktadır ve her bir mikro kuyudaki empedans değişimi bireysel olarak sistem analiz ünitesinde analiz edilmektedir.



Şekil 3.2. Gerçek zamanlı hücre analizörü

Hücre endeksindeki (CI) artış, hücre sayısının, adezyonunun veya yaygınlığının artışından kaynaklanmaktadır. CI' daki azalma ise hücre ölümünden veya tutunan hücrelerin morfolojik değişimlerinden dolayı daha az yaygın olmasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla deneydeki yorum CI üzerinden yapılmaktadır. MTT, SRB gibi kolorimetrik ölçümlere dayalı gelişme inhibisyonu deneylerindeki gibi test bileşiğinin uygulandığı kuyuların CI değeri kontrol CI' sına bölünerek % canlılık gibi bir sonuca varılabilmektedir (138, 139, 140).

Deney Grupları 1. Çalışma:

* A549 hücrelerinde sadece besiyeri uygulanmış grup (Kontrol grubu)

* A549 hücrelerinde *P. endlicherianum* %11'lik etanol ekstresi 125, 250, 500 µg/mL

* A549 hücrelerinde *P. endlicherianum* %70'lik metanol ekstresi 125, 250, 500 µg/mL

* A549 hücrelerinde *P. endlicherianum* etil asetat ekstresi 125, 250, 500 µg/mL

* A549 hücrelerinde *P. endlicherianum* butanol ekstresi 125, 250, 500 µg/mL

Deney Grupları 2. Çalışma:

A549 IL-1 β (-) ve A549 IL-1 β (+) hücrelerinde sadece besiyeri uygulanmış grup (Kontrol grubu)

* A549 IL-1 β (-) ve A549 IL-1 β (+) hücrelerinde *P. endlicherianum* %11'lik etanol ekstresi 50, 100, 200 µg/mL

* A549 IL-1 β (-) ve A549 IL-1 β (+) hücrelerinde *P. endlicherianum* %70'lik metanol ekstresi 50, 100, 200 µg/mL

* A549 IL-1 β (-) ve A549 IL-1 β (+) hücrelerinde *P. endlicherianum* etil asetat ekstresi 50, 100, 200 µg/mL

* A549 IL-1 β (-) ve A549 IL-1 β (+) hücrelerinde *P. endlicherianum* butanol ekstresi 50, 100, 200 µg/mL

A549 hücrelerinin 5. pasajında öncelikle GZHA kullanılarak profillemeye deneyi yapıldı. Hücrelerin istenilen sayıda çoğaltılmasından sonra, sayımları için tripan mavisi metodu ile çalışan Innovatis Cedex Xs cihazı kullanıldı. Elde edilen hücre sayısı/mL verilerine dayanarak hücreler 6250 hücre sayılarında e-plakanın her bir kuyucuğuna 100 µL hacminde ekildi. İlk çalışmada yaklaşık 23. saatte %11'lik etanol, %70'lik metanol, etil asetat ve butanol ekstraktleri kuyucuktaki son konsantrasyonları 125, 250, 500 µg/mL olacak şekilde hazırlanarak plağa 10 µL hacminde uygulandı. Kontrol grubuna sadece besiyeri uygulandı. Ekstreler uygulandıktan sonra ekstraktlerin hücreler üzerindeki etkisi 48 saat boyunca izlendi.

SRB genel doz tarama ve IC₅₀ deneylerinde elde edilen veriler moleküller üzerinde bir ön fikir sahibi olunmasını sağladı. Bu verilere dayanarak moleküllerin etkilerinin gerçek zamanlı olarak görülebilmesi amacıyla 2. çalışma uygulandı.

İkinci çalışmada hücreler 6250 hücre sayılarında e-plakanın her bir kuyucuğuna 100 µL hacminde ekildi. Hücre endeksi 1'e ulaştıktan sonra plağın dikey olarak ilk yarısına 10

μL % 2 FBS içeren besiyeri diğer yarısına 10 μL 1 ng/mL konsantrasyonda IL-1 β eklendi, IL-1 β (-) ve IL-1 β (+) deney grupları oluşturuldu. 6 saat sonra IL-1 β (-) grubuna 10 μL % 2 FBS içeren besiyeri diğer yarısına 10 μL 5ng/ mL konsantrasyonda IL-1 β eklenerek IL-1 β (+) grupta enflamasyon oluşturuldu. 3 saat inkübasyondan sonra %11'lik etanol, %70'lik metanol, etil asetat ve butanol ekstreleri kuyucuktaki son konsantrasyonları 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde hazırlanarak plağa 10 μL hacminde uygulandı. Kontrol grubuna sadece besiyeri uygulandı. Ekstreler uygulandıktan sonra ekstrelerin hücreler üzerindeki etkisi 48 saat boyunca izlendi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)
B	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E11 (200.00ug/ml)
C	A549 (6250) Kor	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)
D	A549 (6250) Kor	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (50.00ug/ml)
E	A549 (6250) E11 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)
F	A549 (6250) E11 (50.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (100.00ug/ml)
G	A549 (6250) E11 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)
H	A549 (6250) E11 (100.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)	A549 (6250) E70 (200.00ug/ml)

Şekil 3.3. GZHA e-plaka ekim şeması

3.2.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

3.2.4.1. İndirgenme Gücünün Belirlenmesi

Ekstrelerin demir(III)'ü indirgeme kapasiteleri Oyaizu 1986 yöntemine göre yapıldı (141). 1 mL ekstre çözeltisi 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ve 2.5 mL %1'lik potasyum hekzasiyanoferrat çözeltisi ile karıştırıldı. 50 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL % 10'luk trikloro asetik asit (TCA) ilave edildi ve karışım 10 dakika santrifüj edildi. Son olarak, 2,5 mL üst kısım, 2,5 mL su ve 0.5 mL %1'lik FeCl₃ ilave edilip karıştırılarak 700 nm'de absorbansları okundu. Ekstrelerin ve ekstrelerin bileşiminde bulunan aposinin ve vanilik asitin indirgenme güçleri askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak verildi (142). Pozitif kontrol olarak

BHT, BHA, rozmarinik asit, askorbik asit ve gallik asit kullanıldı. Büyük AscAE değeri zengin indirgenme kapasitesini göstermektedir. Tüm analizler 4 paralel olarak çalışıldı ve ortalama değerler olarak verildi.

3.2.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin DPPH• radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.'nın metoduna göre yapıldı (143). Tris-HCl tamponu (50 nM, pH 7,4) ve 1mL 0,1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH•) ile karıştırıldı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontrol olarak BHT, BHA, rozmarinik asit, askorbik asit ve gallik asit kullanıldı. Ekstrelerin bileşiminde bulunan aposinin ve vanilik asit de aktiviteleri bakımından incelendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm'de okundu. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. IC₅₀ değerleri nonlineer regregasyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon 7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplandı. Analizler 4 paralel olarak tekrarlandı ve ortalama değerler kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Abs_{\text{kontrol}} - Abs_{\text{örnek}}) / Abs_{\text{kontrol}}] \times 100$$

3.2.4.3. β -karoten / linoleik asit Birlikte Oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi β -karoten soldurma deneyine göre yapıldı (144,145). Tween 20 (120 mg) ve linoleik asit (120 mg) tartılıp kloroformla yıkanarak bir kaba alındı daha sonra bu kaba 1,2 mL β -karoten (1mg/mL kloroform içerisinde) eklendi ve karışımdaki kloroform rotavoporda uçurularak uzaklaştırıldı. 300 mL distile su eklenerek yavaşça karıştırıldı. Kontrol, standart ve örnekler konulmadan aynı prosedürle hazırlandı. Kontrol ve örneklerin şahitleri ise aynı şekilde β -karotensiz olarak ayrıca hazırlandı. Ekstreler, standartlar ve kontroller hazırlanan emülsiyonlarla beraber tüplere aktarıldı ve 470 nm'de spektrofotometrede ölçümleri alındı. Daha sonra tüplerdeki bu örnekler otooksidasyon için 50 °C'de 120 dakika su banyosunda bekletildi ve her 15 dakikada bir ölçüm yapılarak solma derecesi izlendi. Deneyler üç paralel olarak tekrarlandı ve ortalama değerleri hesaplandı.

$$AA\% = [1 - (Abs^0_{\text{örnek}} - Abs^{120}_{\text{örnek}}) / (Abs^0_{\text{kontrol}} - Abs^{120}_{\text{kontrol}})] \times 100$$

3.2.4.4. 2,2'-azino-bis (3- etilbenzathiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS^{•+}) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkilerine bakıldı (146). ABTS^{•+} radikali (7 mM) ABTS'in sulu çözeltisi ile K₂S₂O₈ (2,45 mM, son konsantrasyon)' un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirildi ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm'de 0,700 (± 0,030) olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltileri (10 µL) karıştırıldı ve 734 nm'de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplandı. Deneyler üç paralel olarak tekrarlandı ve ortalama değerleri hesaplandı.

3.2.4.5. Askorbat –Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu

Ekstrelerin hidroksil radikalini süpürücü etkileri Aruoma ve ark. yöntemine (1997) göre yapılmıştır (147). Sığır beyin ekstresi (Folch type VII) 10 mM PBS (pH 7,4) ile karıştırılıp buz banyosu içerisinde şeffaf bir süspansiyon olana kadar (5 mg/mL fosfolipid lipozomu) ultrasonik banyoda bekletildi. 0,2 mL lipozom, 0,5 mL PBS tamponu, 0,1 mL 1 mM FeCl₃ ve 0,1 mL ekstre çözeltileri karıştırıldı ve peroksidasyon reaksiyonu 0.1 ml 1 mM askorbat ilavesiyle hızlandırıldı. Karışım 37 °C'de 60 dakika inkübe edilerek inkübasyondan sonra öncelikle 50 µL %2'lik (a/h) butillenmiş hidroksi toluen (etanol içerisinde) daha sonra da 1 mL %2,8 (a/h) trikloroasetik asit ve 1 mL %1 (a/h) 2-tiyobarbitürik asit (TBA, 0,05 M NaOH içerisinde) ilave edildi. Karışım 100 °C'de su banyosunda 20 dakika ısıtıldı. Reaksiyon sonucunda oluşan (TBA)₂-MDA kromojenleri 2 mL *n*-butanol ile ekstre edilerek butanol fazlarının absorbansı 532 nm'de okundu. Standart olarak 1,1,3,3-tetrametoksipropan kullanıldı. 50 µL Tetrametoksipropan 100 mL deiyonize su ile tamamlanarak 10, 20, 40, 80, 160, 320 µL stoktan çekildi ve her bir dilüsyon 10 mL' ye tamamlandı. Hazırlanan dilüsyonlar 3,05; 6,09; 12,18; 24,36; 48,72; 97,44 nmol/L konsantrasyonda çalışıldı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanarak MDA miktarı nmol /mL olarak belirlendi. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı ve IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 version 7.0, SPSS Inc., Chicago, IL) hesaplandı. Değerler üç paralel deneyin ortalaması olarak verildi.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Abs_{\text{kontrol}} - Abs_{\text{örnek}}) / Abs_{\text{kontrol}}] \times 100$$

3.2.4.6. Demir(II) Şelat (Kelat) Aktivite

Demir(II) iyonlarının ekstrelerle kelasyonu Carter (1971)'e göre yapıldı (148). İki yüz mikrolitre ekstre çözeltisi 100 µL 2,0 mM sulu FeCl₂ ve 900 µL metanol karıştırıldı. Reaksiyon karışımının 5 dakikalık inkübasyonundan sonra reaksiyon 400 µL 5,0 mM ferrozin çözeltisi ile hızlandırıldı ve 10 dakikalık bekleme süresinden sonra absorbans 562 nm' de okundu. Demir kelasyon aktivitesi kontrolün absorbansı (A_k) ve örnek absorbansı (A_ö) kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı ve Na₂EDTA'ya eşdeğer (mg_{Na2EDTA}/g_{örnek}) verildi. Sonuçlar üç paralel deneyin ortalaması olarak verildi.

$$[(A_k - A_{\text{ö}}) / A_k] \times 100$$

3.2.4.7. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması

Reaksiyon karışımı 100 µL ekstre çözeltisi, 500 µL 5,6 mM 2-deoksiriboz (50 mM KH₂PO₄-NaOH tamponu, pH 7.4 içerisinde), 200 µL önceden karıştırılmış 100 µL FeCl₃ ve 104 mM EDTA (1:1, h/h) çözeltisi, 100 µL 1,0 mM H₂O₂ ve 100 µL 1.0 mM sulu askorbik asit çözeltisinden oluşmaktadır. Karışım vorteksle karıştırılıp 50 °C'de 30 dakika inkübe edilmiş daha sonra 1 mL % 2,8 trikloroasetik asit ve 1 mL %1,0 tiyobarbitürik asit ilave edilerek karışım tekrar 50 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Oluşan oksidasyon 532 nm'de ölçüldü. İnhibisyon yüzdesi kontrolün absorbansı (A_k) ve örnek absorbansı (A_ö) kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı ve sonuçlar üç paralel deneyin ortalaması olarak verildi (149).

$$[(A_k - A_{\text{ö}}) / A_k] \times 100$$

3.2.4.8. Spesifik Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-deoksiriboz Bozulması

Ekstrelerin spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını engelleme güçleri yukarıda spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması bölümündeki gibi yapıp prosedürde EDTA yerine tampon çözelti kullanıldı. Hesaplamalar da aynı prosedüre göre uygulandı (149).

3.2.4.9. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Antioksidan Aktivite Tayini

A549 hücrelerinin 7. pasajı stoktan alınarak su banyosunda (37 °C'de) çözdürüldü. Hücreler santrifüj ile çöktürülmüş ve DMSO içeren besiyeri uzaklaştırıldı. 1 mL taze

besiyerinde süspande edildikten sonra 75 cm²'lik flaska alınarak 10 mL besiyeri ilave edildi. Hücreler flask içinde % 80-90 doluluğa ulaştıktan sonra iki ayrı flaska bölünerek hücrelerin istenilen sayıda çoğaltılmasından sonra, sayılmaları için Innovatis Cedex Xs cihazı kullanıldı. Hücreler 48 kuyucuklu iki plağa her kuyucukta 1×10^6 olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Plaklardan birine 1 ng/ mL konsantrasyonda 10 µL IL-1β, diğerine ise 10 µL besiyeri uygulandı. 3 saat inkübasyondan sonra %11'lik etanol, %70'lik metanol, etil asetat ve butanol ekstraları SRB canlılık testi ve GZHA büyüme profili deneylerinde karar verilen konsantrasyonlarda kuyucuktaki son konsantrasyonları 50, 100, 200 µg/mL olacak şekilde hazırlanarak kuyucuklara uygulandı. Kontrol grubuna sadece besiyeri uygulandı. Ekstreler eklendikten sonra 3 saat inkübe edildi. Sitozolik süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi için her kuyucuktaki süpernatant 10 000 g'de 15 dakika 4 °C'de santrifüj edilip süpernatant kısmı alındı. Pellet, soğuk 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA ve 1 mM DTT içeren tampon ile homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra 4 °C'de 10.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınarak deney çalışmasına kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

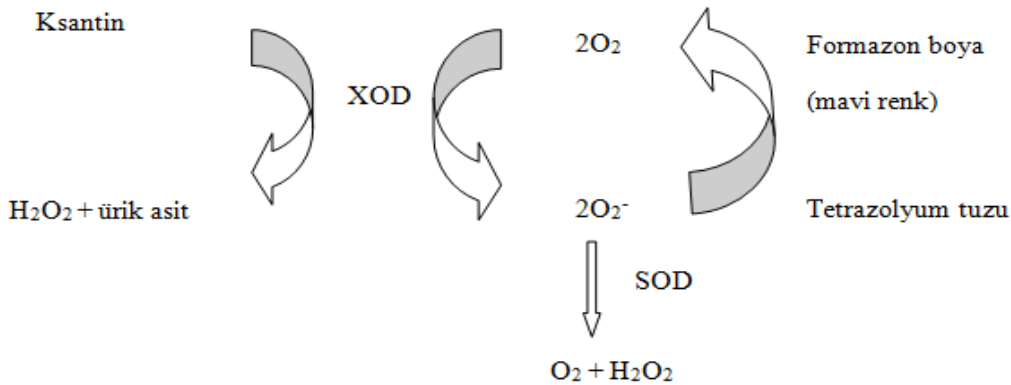
RAW 264.7 hücreleri stoktan alınarak su banyosunda (37 °C'de) çözündürüldü. Hücreler santrifüj ile çöktürülerek DMSO içeren besiyeri uzaklaştırıldı. 1 mL taze besiyerinde süspande edildikten sonra 75 cm²'lik flaska alınarak 10 mL besiyeri ilave edildi. Hücreler flask içinde % 80-90 doluluğa ulaştıktan sonra iki ayrı flaska bölünerek hücrelerin istenilen sayıda çoğaltılmasından sonra, sayılmaları için Innovatis Cedex Xs cihazı kullanıldı. Hücreler 12 kuyucuklu plağa 1×10^6 olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Ekstreler 25 µg/mL konsantrasyonda kuyucuklara ilave edildi ve tekrar 24 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak 6 kuyucuğa taze besiyeri, 6 kuyucuğa ise 1 µg/mL konsantrasyonda LPS içeren besiyeri eklendi. 6 saat inkübasyonun ardından kuyucuklardaki süpernatantlar alınarak 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi, santrifüj sonunda süpernatant alınarak analiz anına kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler soğuk PBS ile yıkandı ve hücre kazıyıcı ile plaka yüzeyinden kazınarak alındı. 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 50 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0.5 % Triton x-100, 1 mM DTT ve 1 X Proteaz inhibitörü ile hazırlanan karışımın 100 µL'si içerisinde hücreler pipetajla dağıtıldı. Hücreler ultrasonikatör yardımı ile sonike edildi ve +4 °C'de 10.000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant

kısmı dipte kalan pelletten uzaklaştırılarak analiz anına kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.4.10.1. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi:

A549 ve RAW 264.7 hücrelerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi süperoksit dismutaz ölçüm kiti (Cayman) ile ölçüldü. 96 kuyucuklu plakta SOD standart kuyucuklarına 200 µL seyreltilmiş radikal dedektör ve 10 µL standart, örnek kuyucuklarına 200 µL seyreltilmiş radikal dedektör ve 10 µL ekstre çözeltileri ilave edildi. Bütün kuyucuklara 20 µL dilüe ksantin oksidaz ilave edilip plak kapatılarak 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Absorbans 460 nm’de Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy HT)’da okundu. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Bütün standart ve örneklerin ortalama absorbansı standart A’nın absorbansına bölünerek linearize oran (LR) elde edildi.

$$\text{SOD (U/mL)} = \left[\frac{\text{Örnek LR-Y ekseninde değişim}}{\text{Eğim}} \times \frac{0,23 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \right]$$



Şekil 3.4. Süperoksit dismutaz aktivitesi

Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle süperoksit radikali üretilmekte ve oluşan süperoksit radikali, I.N.T. (Io-donitrotetrazolium) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturmakta ve bu renk şiddeti 460 nm dalga boyunda ölçülmektedir.

3.2.4.10.2. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Glutasyon Peroksidaz (Gpx) Aktivitesi

GPx aktivite tayininde, H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutasyon (GSH), GPx tarafından okside glutatyon (GSSG) oksitlenir ve oksitlenen GSSG'nin glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Kullanılan NADPH miktarı absorbandsdaki azalış şeklinde 340 nm dalga boyunda izlenir.

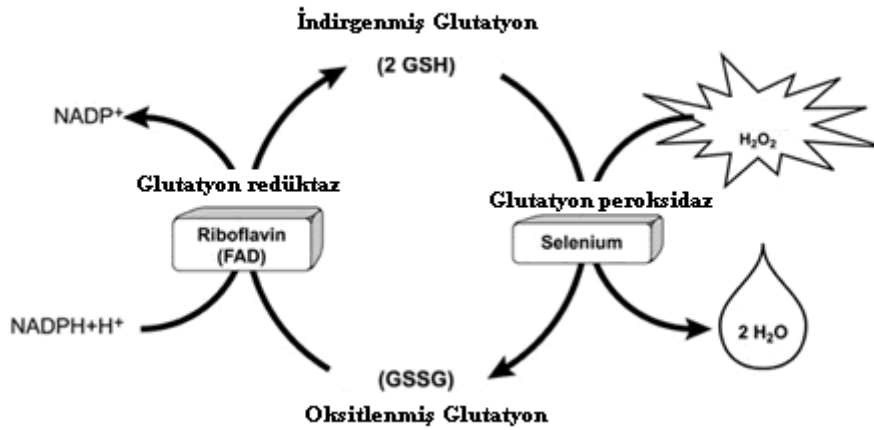
A549 ve RAW 264.7 hücrelerinde glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi, glutasyon peroksidaz Ölçüm kiti (Biovision) ile ölçüldü. Örnek kuyucuklarına 8 µL örnek, 42 µL tampon, 40 µL reaksiyon karışımı eklendi. Çözücü kontrol kuyucuğuna 50 µL tampon, 40 µL reaksiyon karışımı eklendi. Plak 15 dakika inkübe edildi. Her kuyucuğa 10 µL kümen H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatıldı, plak dikkatlice birkaç saniye çalkalandıktan sonra 340 nm'de her dakika ölçüm alınarak toplam 5 okuma yapıldı. İlk okuma A₁, son okuma A₂ olarak değerlendirilmiştir.

NADPH standart eğrisini oluşturmak için 1mM NADPH standardından 0, 20, 40, 60, 80, 100 µL kuyucuklara eklenerek son hacim 100 µL'ye tampon sistemi ile tamamlandı. 340 nm 'de absorbands ölçülerek standart eğri oluşturuldu. GPx aktivitesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\Delta A_{340nm} = [(\text{Örnek } A_1 - \text{Örnek } A_2) - (\text{Çözücü Kontrol } A_1 - \text{Çözücü Kontrol } A_2)]$$

ΔA_{340nm} değeri NADPH standart eğrisine uygulanarak B değeri bulundu. Aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{GPx aktivite} = \frac{B}{(T_2 - T_1) \times V} \times \text{Örnek dilüsyonu} = \text{nmol/dak/mL} = \text{mU/ mL}$$



Şekil 3.5. Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi

3.2.5 A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Bikinkonik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Miktarının Tayini

Bu yöntem, alkali çözeltideki proteinlerin Biüre reaktifi ile Cu^{+2} den Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve daha sonra Cu^{+1} in BCA ile verdiği renkli kompleksin (renk yeşilden koyu mora dönüşür) 562 nm'deki spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

Reaktif A: 10 g BCA, 20 g Na_2CO_3 , H_2O , 1,6 g $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, H_2O , 4 g NaOH, 9,5 g NaHCO_3 tartılarak 1 L distile su içerisinde çözöldü. Çözeltinin pH' sı 11,25 'e ayarlandı.

Reaktif B: 2 g CuSO_4 . 5 H_2O distile suyla 50 ml ye tamamlandı.

50 hacim Reaktif A ve 1 hacim Reaktif B karıştırıldı.

Standart olarak sığır serum albumin ile 15 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 1,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda çalışıldı.

96 kuyucuklu plağa örnekler, standart ve kör 10 μL , hazırlanan çalışma reaktif 200 μL olarak eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. 562 nm'de absorbans ölçöldü. Protein standartlarından elde edilen doğru denklemi kullanılarak örneklerdeki protein miktarı belirlendi (150).

3.2.6. Antimikrobiyal Aktivite

3.2.6.1. Deneylerde Kullanılan Mikroorganizmalar

Proteus vulgaris TSA
Bacillus cereus ATCC 7064
Bacillus cereus ATCC 11778
Staphylococcus epidermidis ATCC 3699
Staphylococcus aureus ATCC 29213
Staphylococcus aureus ATCC 29213
Salmonella typhimurim CCM 5445
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Streptococcus pyogenes ATCC 19615
Escherichia coli ATCC 11230
Escherichia coli ATCC 25922
Candida albicans ATCC 90028
Candida tropicalis (İZOLAT)
Candida glabrata RSKK 0419

3.2.6.2. Deneylerde Kullanılan Mikroorganizmaların Standardizasyonu

Deneylerde kullanılan mikroorganizmaların standardizasyonu, Klinik Laboratuar Standartları Ulusal Komitesi'ne göre disk difüzyon metodu izlenerek yapıldı (151). Disk difüzyon yöntemi kullanmadan önce, bakteri örnekleri 0,5 McFarland standardı ile karşılaştırılarak standardize edildi. Bakteri kültürleri öncelikle izole koloniler elde etmek amacıyla agar ortamına ekildi, 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra 4-5 tane iyi izole olmuş koloni, öze yardımıyla %0,9'luk serum fizyolojik içine alındı. Hazırlanan bakteri süspansiyonu, daha önce hazırlanmış olan 0,5 McFarland standardı ile karşılaştırılarak süspansiyonun bulanıklığı ayarlandı.

3.2.6.3. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkinin Test Edilmesi

Bitki ekstratlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri Klinik Laboratuar Standartları Ulusal Komitesi'ne göre disk difüzyon metodu ile test edildi (151). Denemeler sonrası çıkan sonuçlar referans diskleri ile karşılaştırıldı.

3.2.6.4. Besi Yerlerinin İnokülasyonu

Besi yerine mikroorganizma inokülasyonu için mikroorganizma süspansiyonuna steril eküvyon batırıldıktan sonra, besi yerinin her yerine eküvyonla süspansiyon yayıldı. Mikroorganizma süspansiyonu yayılan petriler, diskler uygulanmadan önce 5 dakika kurumaya bırakıldıktan sonra, diskler besi yerinin üzerine 10 dakika içinde uygulandı.

3.2.6.5. Ekstrelerin Disklere Emdirilmesi

Farklı hacimlerde (10, 20, 30, 40 µL) ekstreler 6 mm'lik boş, steril disklerle emdirilmeye çalışıldı. Disklerin 30 µL ve üzerindeki örneği ememediği, örneklerin bir kısmının disklerin dışına taşıdığı ve burada kuruduğu gözlemlendi. Diskler, 30 µL üzerinde ekstreyi uygun bir şekilde ememediği için bu miktarın kullanılması uygun bulunmadı. Ayrıca yapılan karşılaştırmada 30 µL emdirilmeye çalışılan diskler ile 20 µL emdirilmiş diskler arasında etki bakımından çok fazla bir fark olmadığı gözlemlendiği için disklere 20 µL ekstre emdirilmesine karar verildi.

3.2.6.6. Disklerin Yerleştirilmesi

Ekstreleri emdirmek amacıyla, Oxoid marka boş steril diskler kullanıldı. Ekstreleri içeren diskler, besi yerinin üzerine yerleştirildi. Disklerin tamamının agar üzerine dokunmuş olmasına dikkat edildi. Çalışmada 120 mm'lik steril plastik petri kapları kullanıldı ve bu petri kaplarına toplam 6 adet antibiyotik diski yerleştirildi.

3.2.6.7. İnkübasyon

Disklerin uygulandığı petri kapları, inokülasyonu takip eden 15. dakikada inkübe edilmeye başlandı. Bakteriler 37 °C'de 24 saat süre ile mayalar ise 30 °C'de 48 saat inkübe edildi.

3.2.6.8. İnhibisyon Zonlarının Ölçümü

İnkübasyon süresi sonucunda oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımıyla ölçülerek zon çapları mm (milimetre) olarak kaydedildi. Petri kaplarının fotoğrafları çekildikten sonra + 4 °C'de saklandı.

3.2.6.9. Negatif Kontrol

Negatif kontrol olarak metil alkol, etil alkol ve distile su emdirilmiş diskler kullanıldı. Çözücülere ek olarak boş antibiyotik diskleri de negatif kontrol için kullanıldı. Bu disklerin bütün bakteriler üzerine etkisi incelendi.

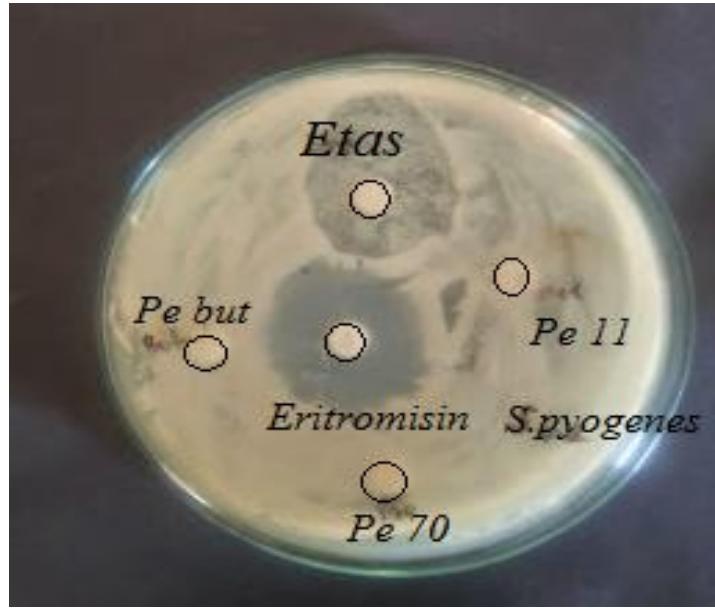
3.2.6.10. Pozitif Kontrol

Pozitif kontrol olarak standart antimikrobiyotik diskler olan bakteriler için Eritromisin ve mayalar için nistatin kullanıldı.

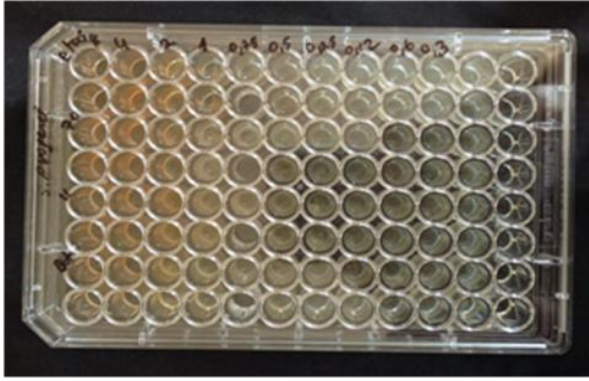
3.2.6.11. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Disk difüzyon testi sonucunda sadece aktivite gözlenen örnekler için MİK belirlendi (151). MİK testi yapıldıktan sonra üremenin olmadığı tüplerden örnek alınarak katı besi yerine ekildi, üremenin olmadığı konsantrasyon bulunarak MBC değeri ifade edildi.

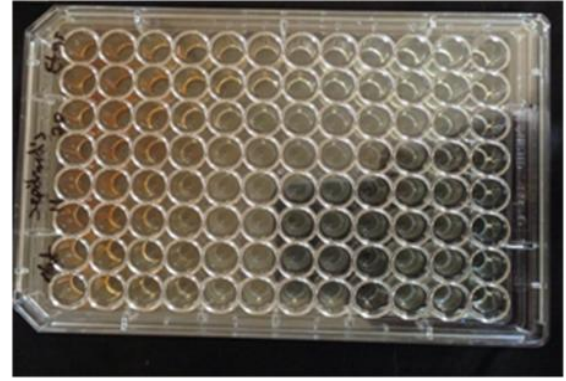
Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları 5 mL'lik Nutrient sıvı besiyerinde aktifleştirildikten sonra 8; 4; 2; 1; 0,75; 0,5; 0,25 µg/mL bitki ekstresi içeren 0,2 mL nutrient sıvı besiyerine % 1 oranında bakteri ekilip, 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda bulanıklığın bittiği konsantrasyon bakteri canlılığının bittiği nokta olarak kabul edilen MİK olarak belirlendi. Tüm analizler iki paralelli olacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 3.6. *P.endlicherianum* ekstrelerinin disk difüzyon çalışmasına ait resim



S. pyogenes



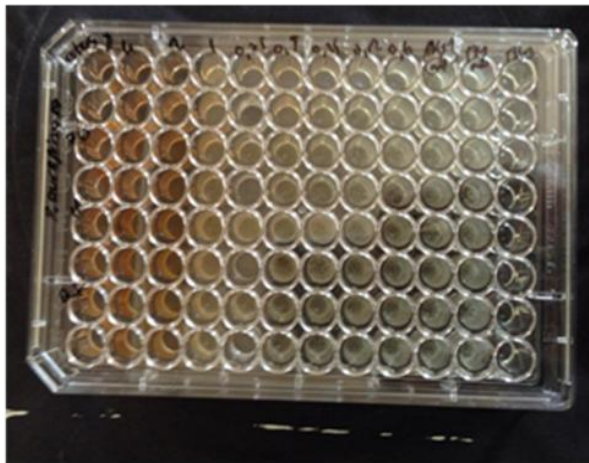
S. epidermidis



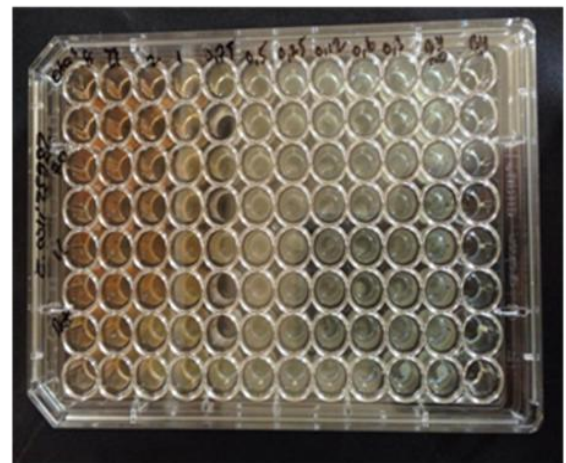
P. vulgaris



S. cerevisia



P. aeruginosa



E. coli ATCC 11230

Şekil 3.7. *P. endlicherianum* ekstralarının bazı bakterilere ait MİK çalışması

3.2.7. İmmün Sistem Üzerine Etki

1×10^6 sayıda kuyucuklara dağıtılan RAW 264.7 hücreleri 25 µg/ml konsantrasyonda ekstrerele 24 saat inkübe edildikten ve deney gruplarının yarısında LPS ile enflamasyon oluşturulduktan sonra kuyucuklardan toplanan süpernatant kısmı ile Prostaglandin E₂ (PGE₂), İnterferon-γ (IFN-γ), Tümör Nekroz Faktör alfa (TNF-α), İnterlökin-10 (IL-10), İnterlökin-6 (IL-6) ve İnterlökin-1β (IL-1β) sitokin seviyeleri ölçüldü.

Deney grupları:

LPS(-): KONTROL, Pe 11, Pe 70, Pe etas, Pe but, Aposinin

LPS(+): KONTROL, Pe 11, Pe 70, Pe etas, Pe but, Aposinin

3.2.7.1. Prostaglandin E₂ (PGE₂) Sitokin Seviyesinin Ölçümü

Cayman PGE₂ Express EIA kit (500141) prosedürüne göre ölçüm yapıldı.

Tablo 3.3. Cayman PGE₂ Express EIA kit (500141) prosedürü

Reaktif	Kör	Total Aktivite	Spesifik Olmayan Bağlanma	B ₀ (Maksimum Bağlanma)	Standart/Örnek
EIA Tampon	-	-	100 µL	50 µL	-
Standart/örnek	-	-	-	-	50 µL
Tracer	-	-	50 µL	50 µL	50 µL
Antibody	-	-	-	50 µL	50 µL
* Plak kapatılarak oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.					
* Plak yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.					
Tracer	-	5 µL	-	-	-
Ellman's Reaktif	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
* Plak kapatılarak oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.					
*Plak 420 nm'de okundu.					

PGE₂ standardı 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,3 pg/mL, 15,6 pg/mL konsantrasyonlarda çalışıldı.

Spesifik olmayan bağlanmanın ölçüldüğü kuyucukların ortalama absorbansı ve B₀ kuyucuklarının ortalama absorbansı hesaplandı. Doğrulanmış maksimum bağlanma için B₀ kuyucuklarının ortalama absorbansından, spesifik olmayan bağlanmanın ölçüldüğü

kuyucukların ortalama absorbansı çıkarıldı. Bütün örneklerin ve standartların absorbansından spesifik olmayan bağlanmanın ölçüldüğü kuyucukların ortalama absorbansı çıkarıldı ve doğrulanmış B_0 değerine bölündü. Bu değer 100 ile çarpılarak $\%B/B_0$ değeri elde edildi. Standart eğri lineer y değerine karşılık logaritmik x değerine göre oluşturuldu. Örneklerdeki PGE_2 konsantrasyonu standart eğriden elde edilen denkleme göre hesaplandı.

3.2.7.2. İnterferon $-\gamma$ (IFN- γ) Sitokin Seviyesinin Ölçümü

Sigma- Aldrich RAB 0224 kit prosedürüne göre ölçüm yapıldı.

*Çalışmadan önce bütün reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.

* Standartlar ve örnekler kuyucuklara 100 μ L eklenerek plak kapatılmış 2,5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*100 μ L biotinylated detection antibody eklenerek oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*Bütün kuyucuklara 100 μ L HRP-Streptavidin eklenerek 45 dakika inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*100 μ L Elisa kolorimetrik TMB Reaktif eklenerek 30 dakika karanlıkta inkübe edildi.

*Süre sonunda reaksiyon durdurucu solüsyon ile reaksiyon durduruldu ve 450 nm’de absorbans ölçüldü.

IFN- γ standardı 2000 pg/mL, 666,7 pg/mL, 222,2 pg/mL, 74,07 pg/mL, 24,69 pg/mL, 8,23 pg/mL, 2,74 pg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak standart eğri çizdirildi ve doğru denkleminde örneklerdeki IFN- γ miktarı hesaplandı.

3.2.7.3. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) Sitokin Seviyesinin Ölçümü

eBioscience Mouse TNF- α (BMS607/3) kit prosedürüne göre ölçüm yapıldı.

*Kuyucuklar yıkama tamponu ile iki kez yıkandı.

*Bütün kuyucuklara 50 μ L örnek dilüsyon çözeltisi eklendi.

*Standart kuyucuklarına 50 µL farklı konsantrasyondaki standartlar, örnek kuyucuklarına 50 µL örnek eklendi.

*Kuyucuklara 50 µL Biotin- Konjugat eklenerek oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 2 saat inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 6 kez yıkandı.

*100 µL dilüe edilmiş Streptavidin- HRP eklenerek, plak orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 6 kez yıkandı.

*100 µL TMB Substrat çözeltisi eklenerek plak orbital çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edildi.

*100 µL stop çözeltisi eklenerek 450 nm’de absorbans okundu.

TNF- α standardı 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,3 pg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak standart eğri çizdirildi ve doğru denkleminde örneklerdeki TNF- α miktarı hesaplandı.

3.2.7.4. İnterlökin-10 (IL-10) Sitokin Seviyesinin Ölçümü

eBioscience Mouse IL-10 (BMS614/2) kit prosedürüne göre ölçüm yapıldı.

*Kuyucuklar yıkama tamponu ile iki kez yıkandı.

*Bütün kuyucuklara 50 µL örnek dilüsyon çözeltisi eklendi.

*Standart kuyucuklarına 50 µL farklı konsantrasyondaki standartlar, örnek kuyucuklarına 50 µL örnek eklendi.

*Plak kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*Kuyucuklara 100 µL Biotin- Konjugat eklenerek oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*100 µL dilüe edilmiş Streptavidin- HRP eklenerek, plak orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*100 µL TMB Substrat çözeltisi eklenerek plak orbital çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edildi.

*100 µL stop çözeltisi eklenerek 450 nm’de absorbans okundu.

IL-10 standardı 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,3 pg/mL, 15,6 pg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak standart eğri çizdirildi ve doğru denkleminde örneklerdeki IL-10 miktarı hesaplandı.

3.2.7.5. İnterlökin-6 (IL-6) Sitokin Seviyesinin Ölçümü

Sigma- Aldrich RAB 0308 kit prosedürüne göre ölçüm yapıldı.

*Çalışmadan önce bütün reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.

*Standartlar ve örnekler kuyucuklara 100 µL eklenerek plak kapatıldı 2,5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*100 µL biotinylated detection antibody eklenerek oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*Bütün kuyucuklara 100 µL HRP-Streptavidin eklenerek 45 dakika inkübe edildi.

* Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*100 µL Elisa kolorimetrik TMB Reaktif eklenerek 30 dakika karanlıkta inkübe edildi.

*Süre sonunda stop solüsyonu ile reaksiyon durduruldu ve 450 nm’de absorbans ölçüldü.

IL-6 standardı 600 pg/mL, 200 pg/mL, 66,7 pg/mL, 22,2 pg/mL, 7,4 pg/mL, 2,5 pg/mL, 0,82 pg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak standart eğri çizdirildi ve doğru denkleminde örneklerdeki IL-6 miktarı hesaplandı.

3.2.7.6. İnterlökin-1β (IL-1β) Sitokin Seviyesinin Ölçümü

eBioscience Mouse IL-1β (BMS6002) kit prosedürüne göre ölçüm yapıldı.

*Kuyucuklar yıkama tamponu ile iki kez yıkandı.

*Bütün kuyucuklara 50 µL örnek dilüsyon çözeltisi eklendi.

*Standart kuyucuklarına 50 µL farklı konsantrasyondaki standartlar, örnek kuyucuklarına 50 µL örnek eklendi.

*Kuyucuklara 50 µL Biotin- Konjugat eklenerek oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 2 saat inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*100 µL dilüe edildi, Streptavidin- HRP eklenerek, plak orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.

*Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

*100 µL TMB Substrat çözeltisi eklenerek plak orbital çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edildi.

*100 µL stop çözeltisi eklenerek 450 nm’de absorbans okundu.

IL-1 β standardı 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,3 pg/ mL, 15,6 pg/mL, 7,8 pg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak standart eğri çizdirildi ve doğru denkleminde örneklerdeki TNF- α miktarı hesaplandı.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bütün istatistiksel analizler SPSS 12 istatistik programı ile yapıldı. Varyansların analizi ANOVA prosedürüne göre uygulandı. Ortalamalar arasındaki belirgin farklılıklar Tukey's pairwise kıyaslama testine göre $p < 0,05$ seviyesinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. EKSTRELERİN HAZIRLANIŞI, SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOĞRAFİK BİLEŞİM ANALİZLERİ

4.1.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkisel materyallerin kurutulmuş toprak altı kısımları kabaca toz edilerek %11'lik etanol ve %70'lik metanol ile çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 8'er saat süreyle üç kez ekstre edildi. Elde edilen ekstreler birleştirilip vakum altında rotavaporda (37-38 °C) yoğunlaştırıldı. Tüm ekstreler liyofilize edildi ve analiz anına kadar +4 °C'de saklandı.%70'lik metanol ekstresi, etil asetat ve *n*-butanol ile fraksiyonlanarak vakum altında rotavaporda (37-38 °C) yoğunlaştırılıp liyofilize edildi. Elde edilen ekstre verimleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi bitki ekstrelerinde en yüksek verim %70'lik metanol ekstresinden, en düşük verim %11'lik etanol ekstresinden elde edildi.

4.1.2. Toplam Fenol, Flavonoit ve Flavonol Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları deneysel kısımda verilen yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Toplam fenol miktarları gallik aside, toplam flavonoit miktarı kateşine ve toplam flavonol miktarı ise rutine eşdeğer olarak hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir. Bitkinin etil asetat ekstresinin diğer ekstrelere göre fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu bulundu. Toplam fenol miktarları bakımından ekstreler etil asetat> %70'lik metanol > %11'lik etanol> butanol şeklinde sıralanmıştır. Toplam flavonoit miktarı bakımından

en zengin ekstre ise %70'lik metanol ekstresidir. Toplam flavonol miktarı karşılaştırıldığında ise etil asetat ekstresinin flavonol miktarı açısından zengin olduğu görülmektedir. %70'lik metanol ekstresi ise etil asetat ekstresinden sonra yüksek flavonol miktarına sahip diğer ekstrelerdir.

Tablo 4.1. Ekstre verimleri, toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları

Ekstreler	Verim [%]	Toplam Fenolik [mg _{GAE} /g _{ekstre}]	Toplam Flavonoit [mg _{CA} /g _{ekstre}]	Toplam Flavonol [mg _{RE} /g _{ekstre}]
(Pe 11)	%7,57	173,93±7,72	36,03 ± 0,76	16,26±1,47
(Pe 70)	%21,37	201,85±6,44	41,70± 0,46	34,75±1,61
(Pe etas)	%16,6	305,91±10,52	82,16± 0,68	26,64±1,68
(Pe but)	%20,5	139,61±1,14	27,50± 0,52	9,25±1,80

Ortalama ± SD; (Pe 11),%11'lik etanol; (Pe 70), %70'lik metanol; (Pe etas), etil asetat ; (Pe but), butanol ekstreleri

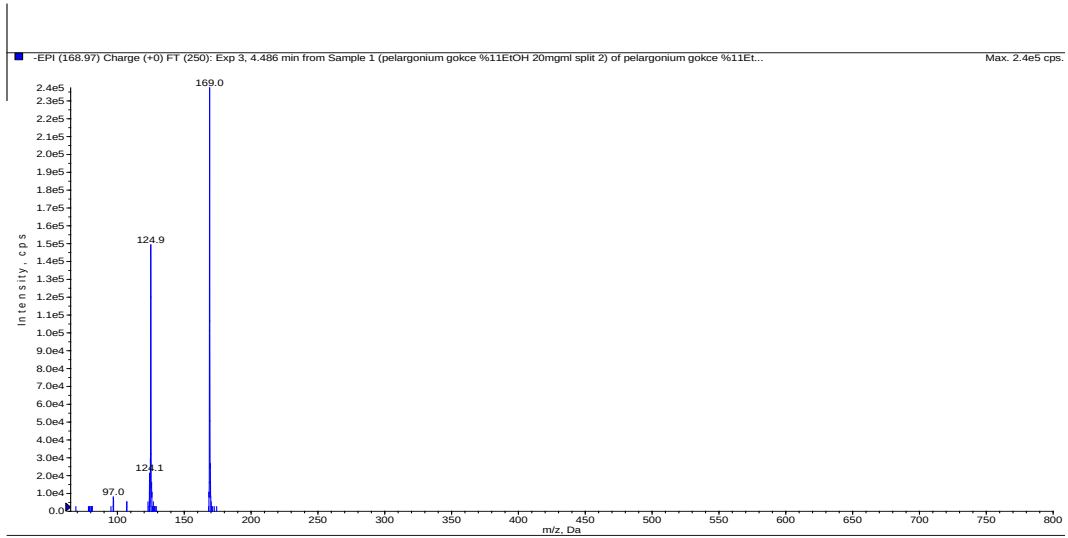
4.1.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Kütle-Spektrometresi (YBSK-KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

Ekstreler YBSK sistemi ile kromatografik olarak ayrıldıktan sonra KS dedektörü kullanılarak moleküler iyon pikleri ve temel pikler üzerinden değerlendirilmeleri yapıldı. Ekstrelerde tanımlanan bileşikler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. YBSK-KS/KS analizi sonucu tanımlanan bileşikler

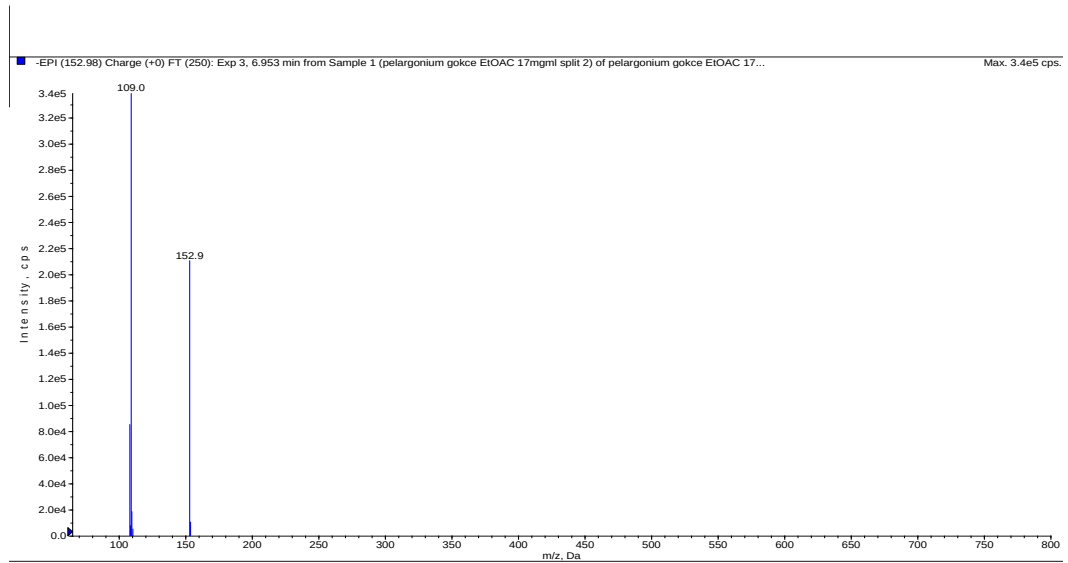
No	Adı	Rt	Ma (M-H)	Parçalanmalar	Ekstreler	Kaynak
1	Gallik asit	4,50	169	125, 97	Pe 11, Pe 70, Pe etas, Pe but	(Chen, Zhang, Wang, Yang, & Wang, 2011)(152)
2	Dihidroksibenzoik asit	7	153	109	Pe etas Pe 11	(Yang et al., 2013)(153)
3	Kafeik asit	11,40	179	135	Pe etas	
4	Homovanilik asit	10,90	181	166, 138, 109	Pe etas Pe 70	(Xiao et al., 2014)(154)
5	Aposinin	15,50	165	150, 122	Pe 70 Pe etas Pe 11	(Wojciech, Anna, Magdalena, & Maciej; Xiao et al., 2014)(154,155)
6	1,2,3,4,6-Pentagalloyl glukoz	15,04	939	469 (M-2H) ²⁺ 617, 769, 393, 317, 241, 211, 169, 125	Pe 11, Pe 70, Pe etas	(Li et al., 2009)(156)

YBSK ayrımı sonucu 4,5 dakikada kolonu terk eden m/z 169 [M-H] moleküler iyon pikine sahip bileşik gallik asit olarak tanımlandı.



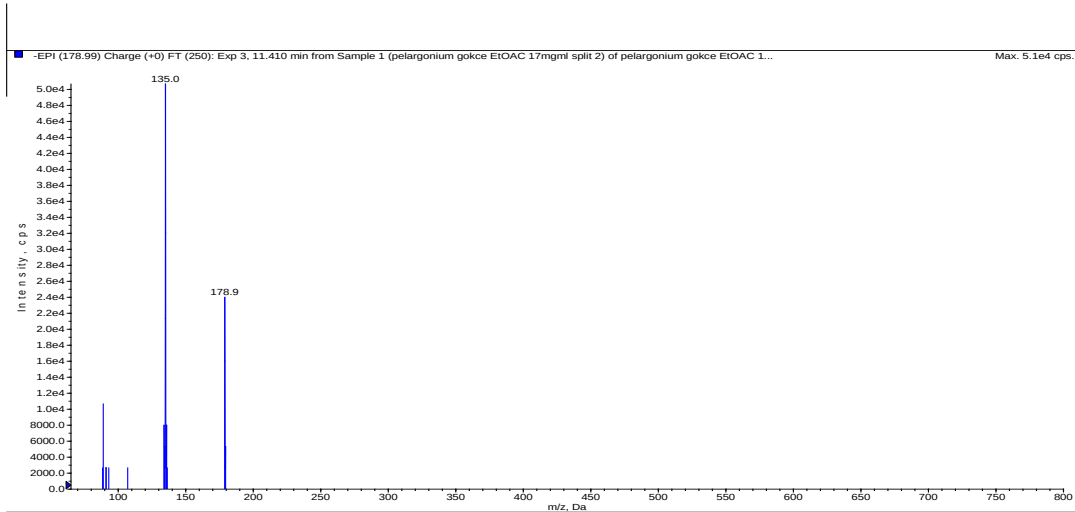
Şekil 4.1. Gallik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması

YBSK ayırımı sonucu 7 dakikada kolonu terk eden m/z 153 [M-H] moleküler iyon pikine sahip bileşik dihidroksibenzoik asit olarak tanımlandı (153).



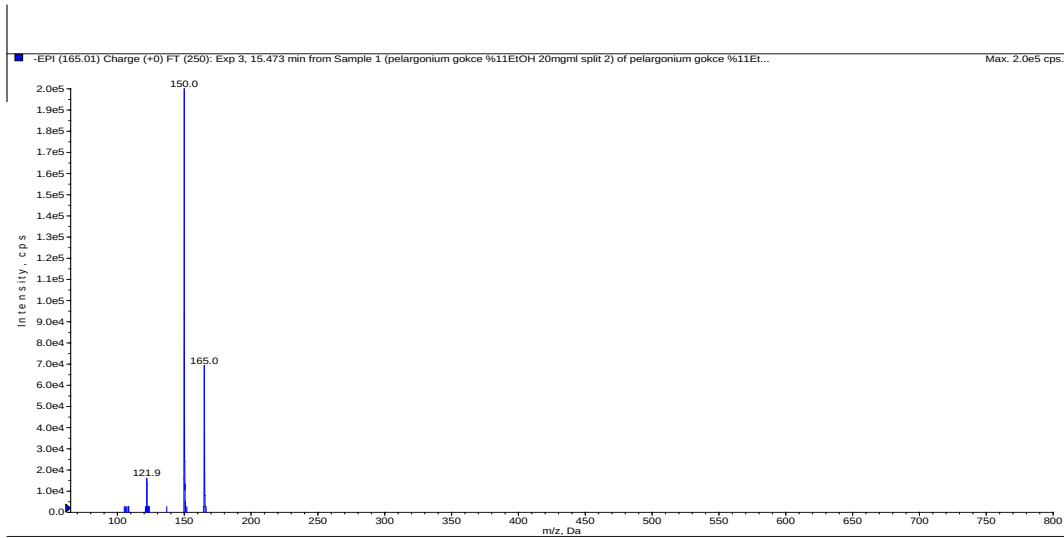
Şekil 4.2. Dihidroksi benzoik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması.

YBSK ayırımı sonucu 11,4. dakikada kolonu terk eden m/z 179 [M-H] moleküler iyon pikine sahip bileşik kafeik asit olarak tanımlandı.



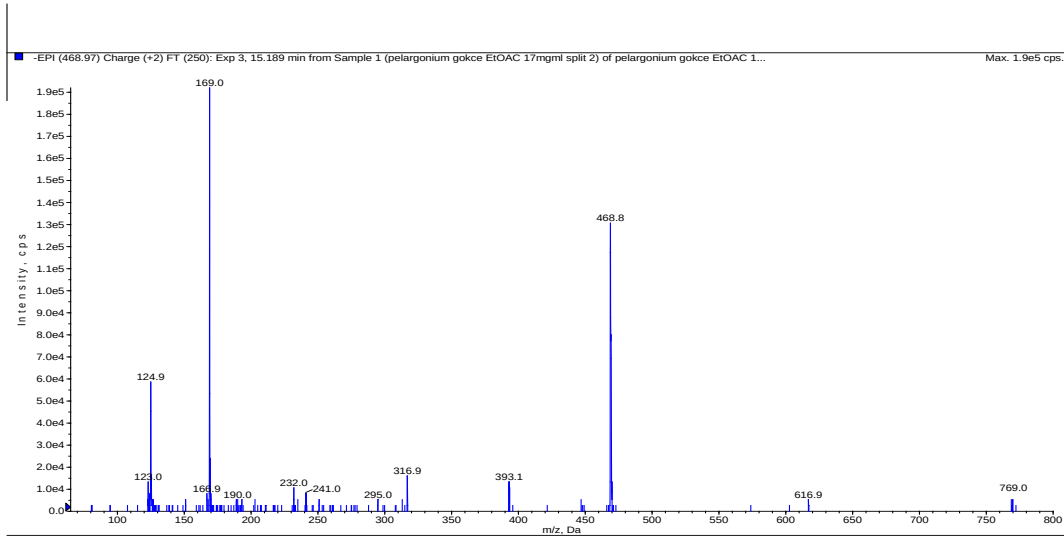
Şekil 4.3. Kafeik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması

YBSK ayırımı sonucu 15,5 dakikada kolonu terk eden m/z 165 [M-H] moleküler iyon pikine sahip bileşik asetofenon türevi olan aposinin olarak tanımlandı.



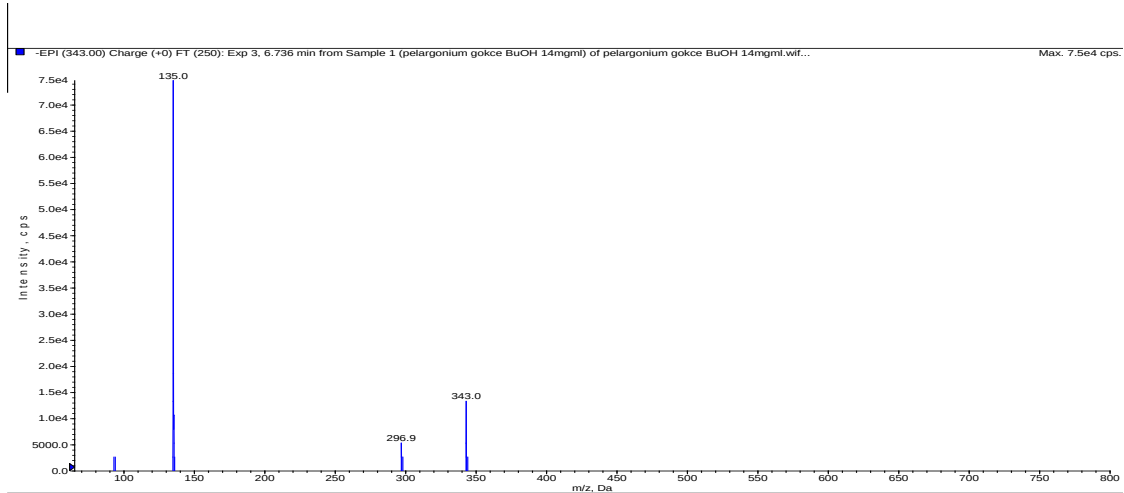
Şekil 4.4. Aposinine ait kütle spektrumu ve parçalanmaları

Ana pikle beraber gelen $[M-2H]^{2-}$ m/z 469 pikidir. Bu pikin gerçekte molekül ağırlığı 940 M-H piki ise 939'dur. İki kere parçalanmış hali ise ($z=2$) m/z 469'dur. 617 ve 769 pikleri de molekülü doğrulamaktadır. Literatür bilgilerine göre molekül pentagalloil glukozdur (154, 156, 157). Xio et all 2014 yayınında da asetofenon türevi ile beraber gelmesi sonuçlarımızı desteklemektedir. Pentagalloilglukoz daha önce *Pelargonium* türlerinden izole edilmiş ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir (50).



Şekil 4.5. 1,2,3,4,6 pentagalloyl glukoza ait kütle spektrumu ve parçalanması

Butanol ekstresinin m/z 343 molekül ağırlıklı maddesi ekstrenin ana piki olup m/z 505'in parçalanmaları 165, 150 ve 122'dir. %11'lik etanol ekstresinin ana bileşeni olan ve 15. dakikada gelen aposinin ile benzerlik göstermektedir. Bu molekülün de asetofenon türevi bir madde olduğu düşünülmektedir.



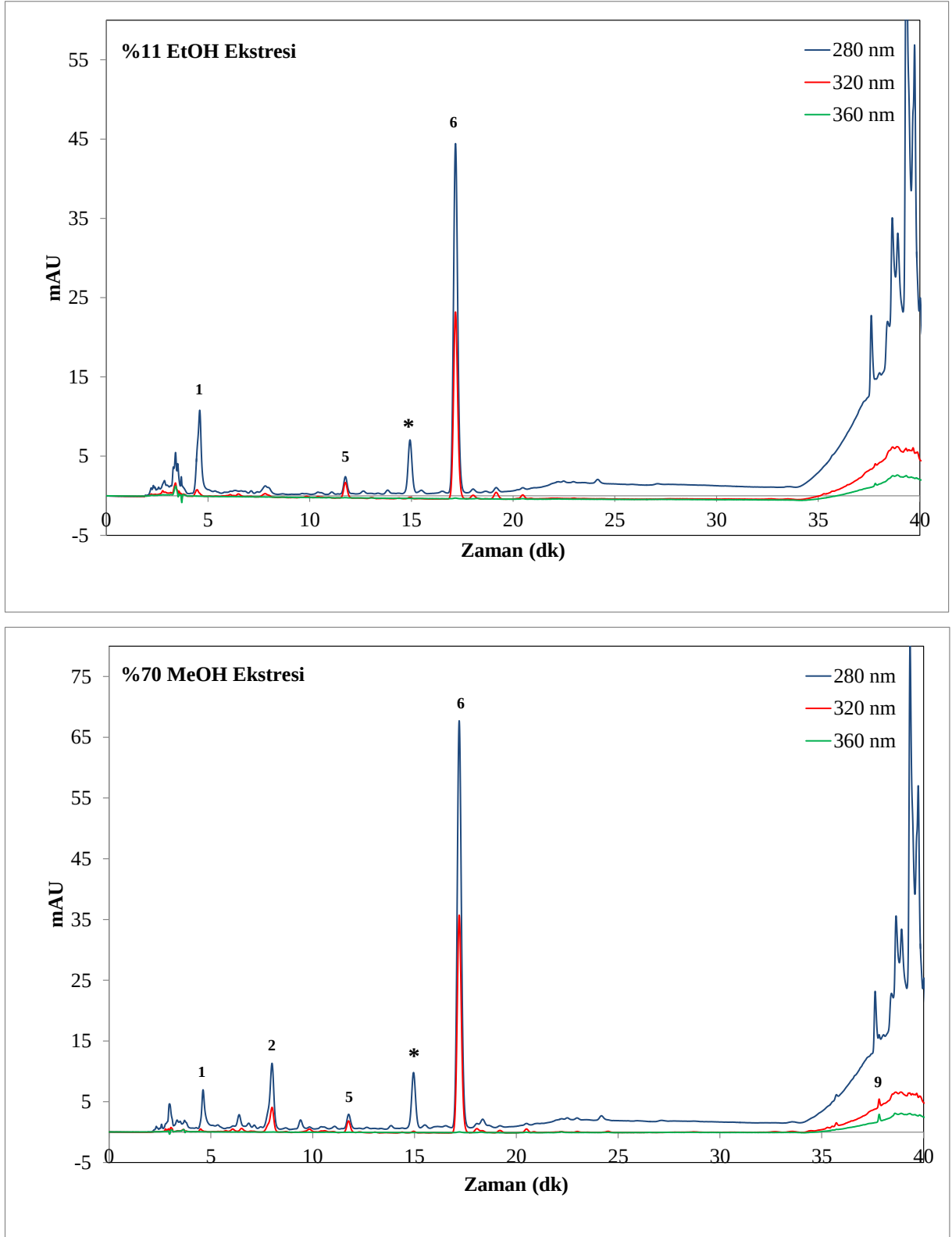
Şekil 4.6. Butanol ekstresinin ana pikine ait kütle spektrumu ve parçalanması

4.1.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Analizi

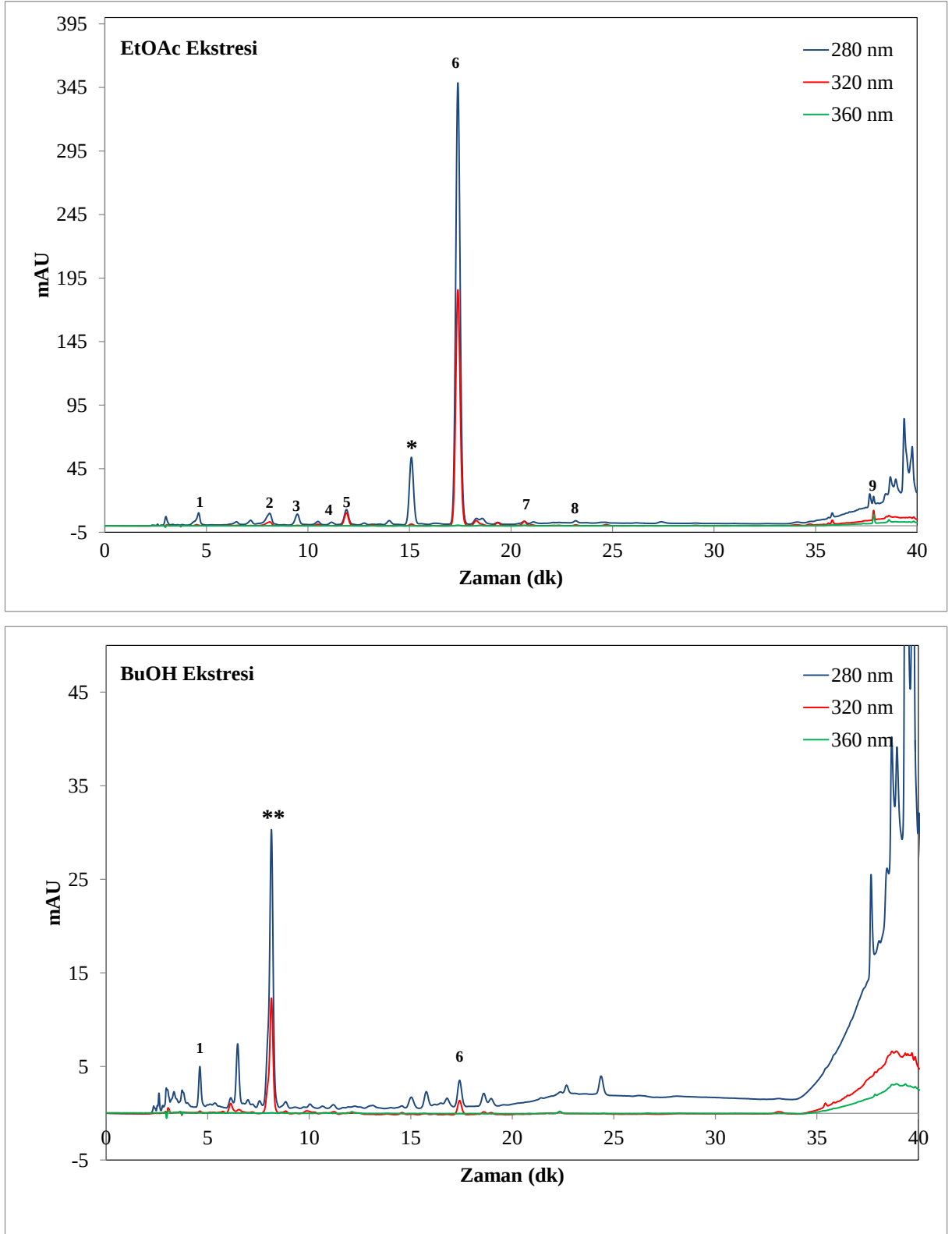
Ekstrelerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) sistemi ile yapılan analizlerinde PDA dedektör kullanıldı ve miktar tayinleri benzoik asit türevleri için 280 nm'de, hidroksisinnamik asit türevleri için 320 nm'de ve flavonoidler için ise 360 nm'de yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir. *P.endlicherianum* ekstrelerine ait

YBSK kromatogramları Şekil 4.7 a, b’de, aydınlatılmış bileşiklere ait kimyasal yapılar ise Şekil 4.9’da verilmiştir.

Ekstreler içerisinde gallik asit, 3,5-dihidroksi benzoik asit, vanilik asit, kersetin, aposinin, 1,2,3,4,6-pentagalloil glukoz, ferulik asit ve kafeik asit kalitatif ve kantitatif olarak belirlendi. Gallik asit, aposinin, 3,5-dihidroksi benzoik asit, 1,2,3,4,6-pentagalloil glukoz, vanilik asit, ferulik asit ve kateşin 280 nm’de kafeik asit 320 nm’de, kersetin 360 nm’de analiz edildi. Ekstrelerin içerisindeki tanımlanan bu bileşiklerin miktarları standart maddelerden hazırlanan kalibrasyon eğrileri (Tablo 4.4) kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.3’de verilmiştir. Maddelerin tanımlanmasında hem tutunma zamanları hem de UV spektrumları kullanılmıştır.



Şekil 4.7a. *P. endlicherianum* ekstrelerine ait YBSK kromatogramları.



Şekil 4.7b. *P. endlicherianum* ekstrilerine ait YBSK kromatogramları.

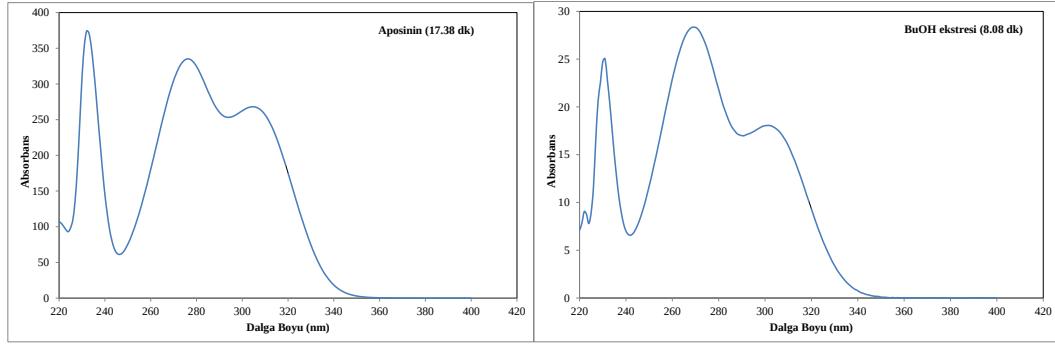
Tablo 4.3. *P. endlicherianum* ekstrelerinin YBSK sonuçları

Maddeler	Ekstreler ^a			
	(Pe 11)	(Pe 70)	(Pe etas)	(Pe but)
Gallik asit	1,070 ± 0,004 ^b	0,458 ± 0,008	0,968 ± 0,004	0,150 ± 0,000
3,5 dihidroksi benzoik asit	d.e.	d.e.	3,199 ± 0,052	d.e
Kafeik asit	d.e	d.e	0,072±0,003	d.e
Homovanilik asit	e.m	e.m	e.m	d.e
Vanilik asit	e.m	e.m	e.m	d.e.
Aposinin	2,486 ± 0,002	3,509 ± 0,016	17,378 ± 0,053	0,592 ± 0,000
1,2,3,4,6-Pentagalloil glukoz	d.e	d.e	0,541 ± 0,001	d.e
Ferulik asit	d.e	d.e	0,084 ± 0,000	d.e
Kersetin	d.e	0,554 ± 0,008	0,547 ± 0,001	d.e

(Pe 11), %11'lik etanol; (Pe 70), %70'lik metanol; (Pe etas), etil asetat; (Pe but), butanol; ^b % ekstre, Ort± SD; d.e., dedekte edilemedi, e.m; eser miktar

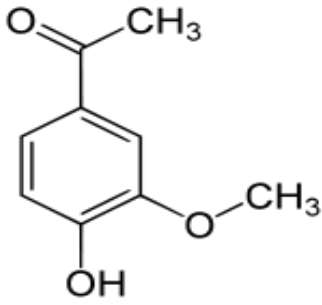
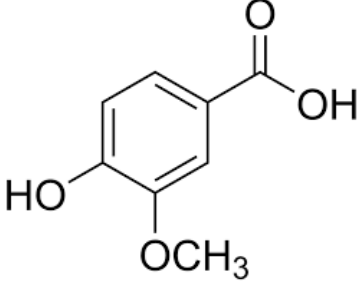
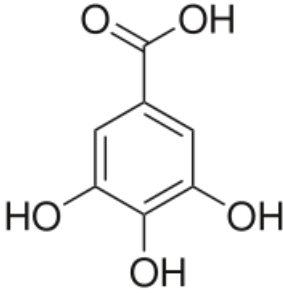
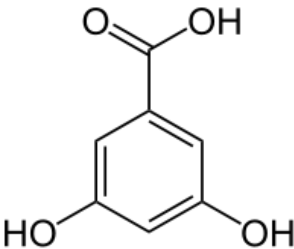
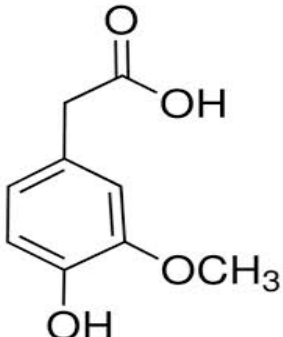
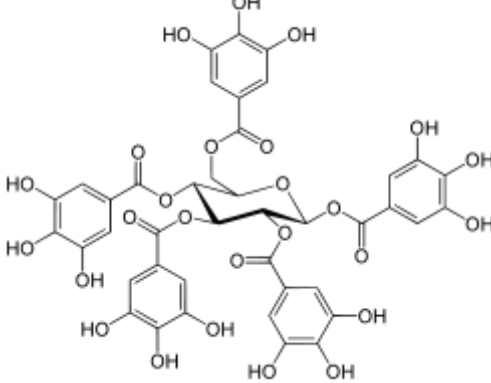
Tablo 4.4. Standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Kod	Madde	Kalibrasyon Denklemi [y=ax+b]	Korelasyon Katsayısı [r ²]
A	Gallik asit	y = 12571 x +16,78	0.998
B	3,5 dihidroksi benzoik asit	y = 1179 x + 1,956	0.998
C	Kafeik asit	y= 25376 x + 20,29	0.999
D	Vanilik asit	y = 7654 x + 37,34	0.996
E	Aposinin	y = 31807 x -148,8	0.999
F	1,2,3,4,6-Pentagalloil glukoz	y = 2236 x - 72,75	0.999
G	Ferulik asit	y =25649 x + 55,79	0.999
H	Kersetin	y = 17519 x - 29,49	0.999



Şekil 4.8. Aposinine ve butanol ekstresinin ana pikine ait UV spektrumu

Butanol ekstresinde ana pikin alıkonma zamanı 8,08'dir ve YBSK-KS/KS spektrumları ve YBSK/UV spektrumları incelendiğinde ve literatürle karşılaştırıldığında bu maddenin aposinin veya paeonol türevi olduğu düşünülmektedir. Bu pikin mass spektrumu incelendiğinde parçalanma iyonlarının 165, 150 ve 122 m/z değerlerini verdiği ve bu yarılmaların aposinine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca YBSK sisteminden alınan UV spektrumu da aposinine birebir benzerdir (Şekil 4.8). Bu nedenle bu pikin de aposinin türevi bir madde olabileceği düşünülmektedir. Aposinin türevlerinin ticari olarak temini mümkün olmadığından maddenin kalitatif ve kantitatif tayini yapılamamıştır.

 apocynin	 vanilic acid
 gallic acid	 3,5 dihydroxy benzoic acid
 homovanillic acid	 1,2,3,4,6-pentagalloyl glucose

Şekil 4.9. *Pelargonium endlicherianum* bileşimindeki maddelerin kimyasal formülleri

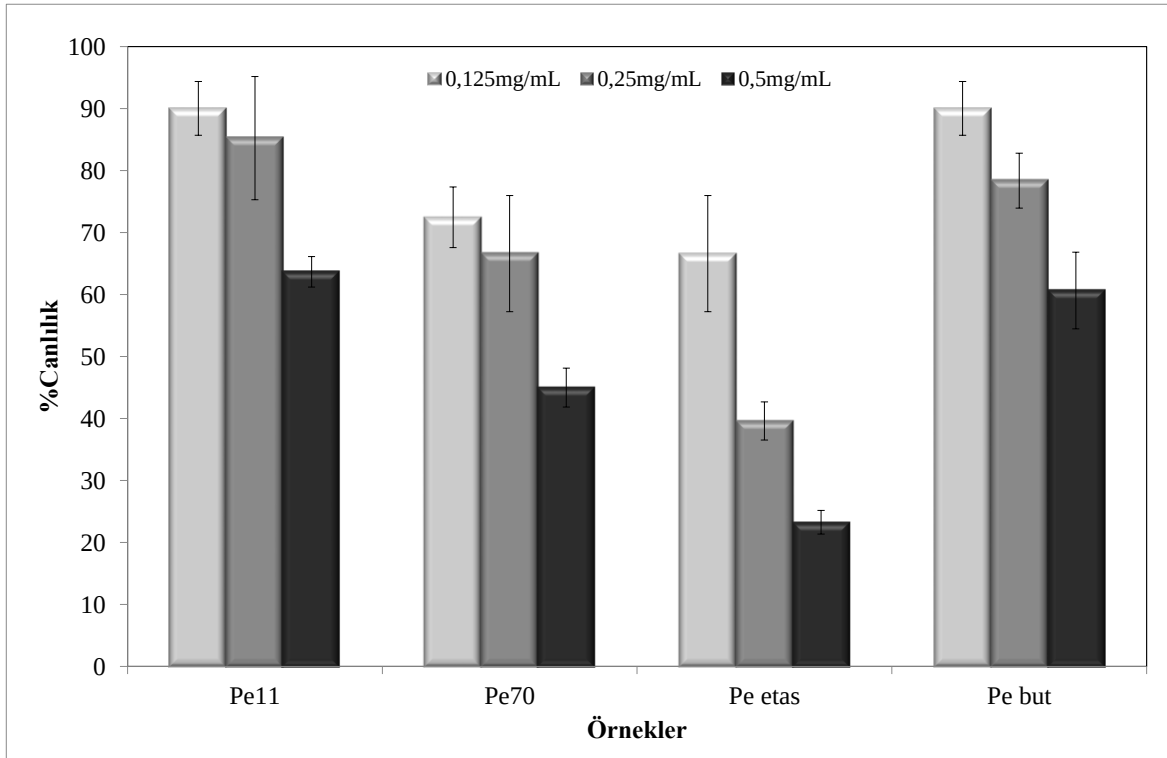
4.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

4.2.1. A549 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi

Sulforhodamin B (SRB) testi *in vitro* sitotoksikite taramasında sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Deneyin esası, TCA ile hücre kültür plağına fiks edilen hücrenin

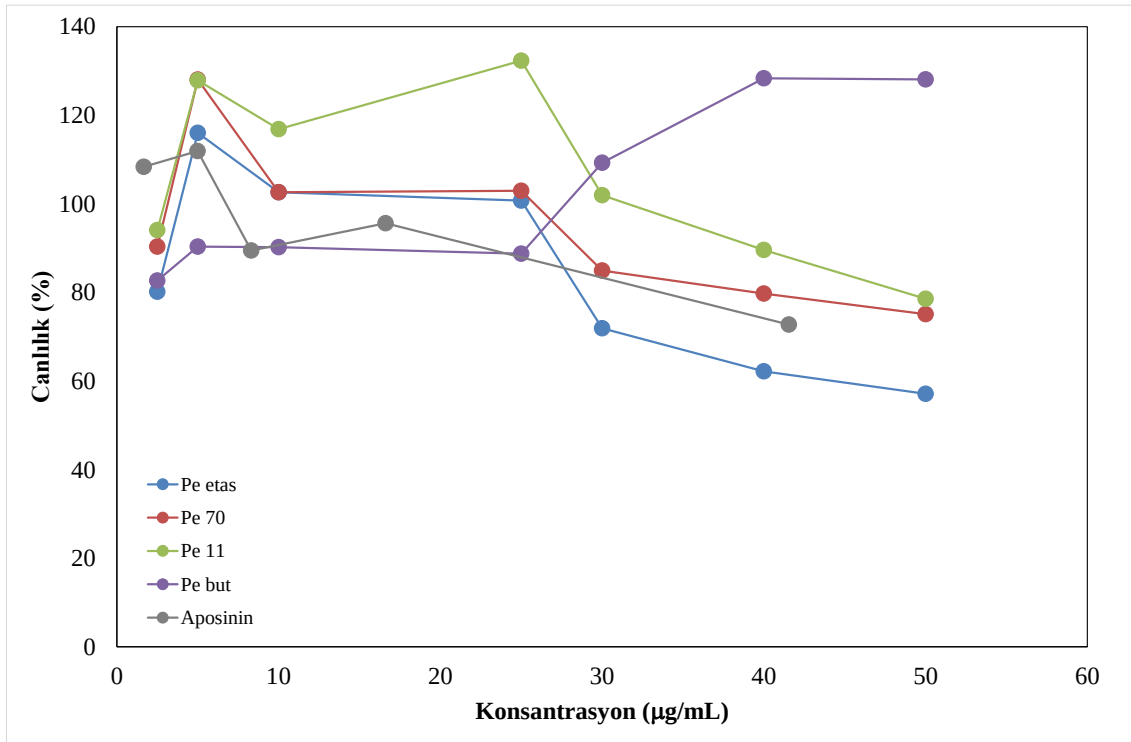
protein bileşiklerine SRB'nin bağlanmasıdır. SRB parlak pembe renkte, iki sülfonik grup içeren, asidik şartlarda temel aminoasit yapılarına bağlanan ve bazik şartlarda ayrılabilen, aminoksanten yapıda bir boyadır. SRB'nin hücresel proteinlerin temel aminoasitlerine bağlanmasıyla yapılan kolorimetrik değerlendirme hücre sayısı ile ilişkili olan total protein kütlesi hakkında fikir verir.

P. endlicherianum'dan elde edilen ekstrelerin toksisitesi A549 (insan akciğer kanser hücre serisi) hücreleri ile SRB deneyi kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar % hücre canlılığı olarak Şekil 4.10'da verilmiştir. Ekstreler 0,125; 0,25; 0,5 mg/mL konsantrasyonlarda test edildi. Tüm ekstreler yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını inhibe etmiştir. %70'lik metanol ekstresi 0,5 mg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını %50'in üzerinde inhibe etmiştir. Etil asetat ekstresi ise 0,25 ve 0,5 mg/mL konsantrasyonlarda hücre canlılığını %50'nin altına düşürmüştür.



Şekil 4.10. *P. endlicherianum* ekstrelerinin A549 hücrelerinin canlılığına olan etkisi.

4.2.2. RAW 264.7 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi



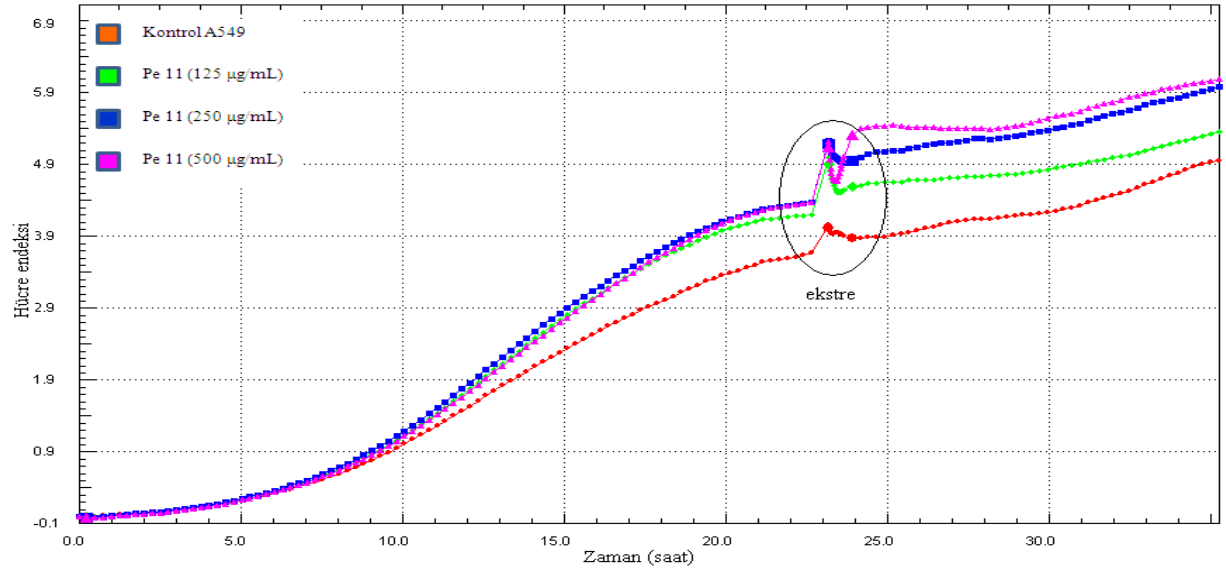
Şekil 4.11. *P. endlicherianum* ekstrelerinin RAW 264.7 hücrelerinin canlılığına olan etkisi

P. endlicherianum ekstrelerinin RAW 264.7 hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.11'de verilmiştir. %11'lik etanol ekstresi çalışılan konsantrasyonlarda canlılığı %50'nin altına düşürmemiştir. En yüksek canlılık yüzdesi 25 µg/mL konsantrasyonda bulunmuştur. Canlılık 25-50 µg/mL konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına ters olarak azalmıştır.

% 70'lik metanol ve etil asetat ekstreleri için en yüksek canlılık 5 µg/ mL konsantrasyonda bulunmuştur. 25 µg/mL konsantrasyonda canlılık %103 ve %100'dür. Canlılık, 25-50 µg/mL konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına ters olarak azalmıştır. Butanol ekstresinde 25 µg/mL konsantrasyonda canlılık %88,75'dir. Canlılık, 25-50 µg/mL konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak artmıştır. Aposininin 0,01 mM, 0,03 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM konsantrasyonlarda canlılığa olan etkisi incelendiğinde en yüksek canlılık yüzdesi 0,01 mM ve 0,03 mM konsantrasyonlarda bulunmuştur. 0,1 mM konsantrasyonda canlılık % 95,62'dir.

4.2.3. GZHA Canlılık Deneyi

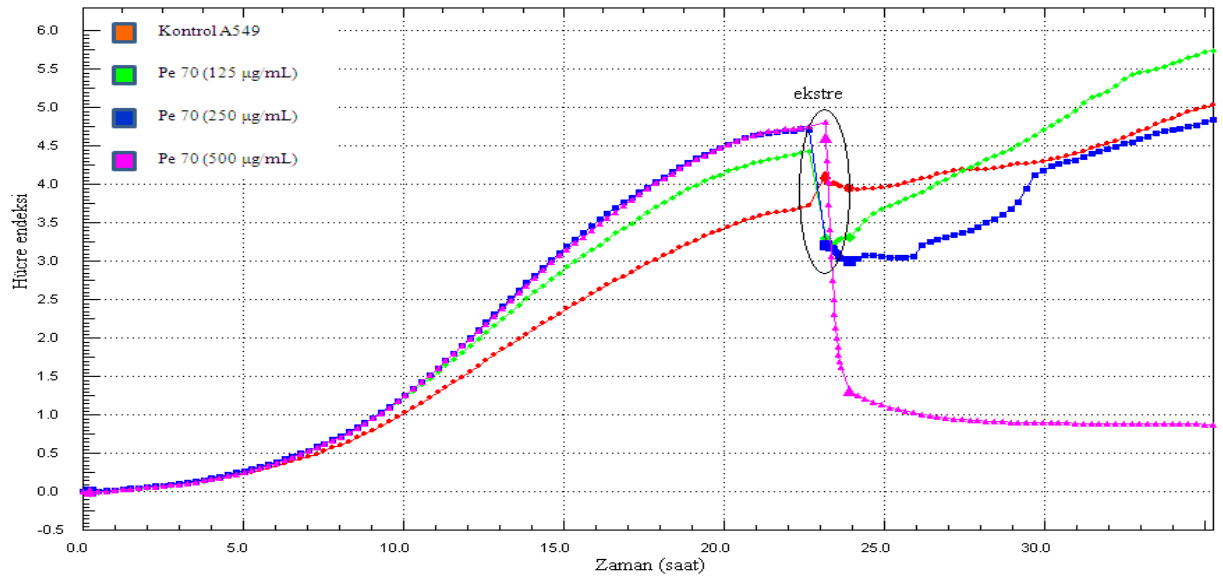
A549 hücrelerinde %11'lik etanol ekstresi



Şekil 4.12. *P. endlicherianum* %11'lik etanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri

%11'lik etanol ekstresi 125, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonda Şekil 4.12'de görüldüğü üzere kontrole göre hücre canlılığını azaltmamıştır. Bu sonuçlar SRB canlılık testi ile doğrulanmaktadır.

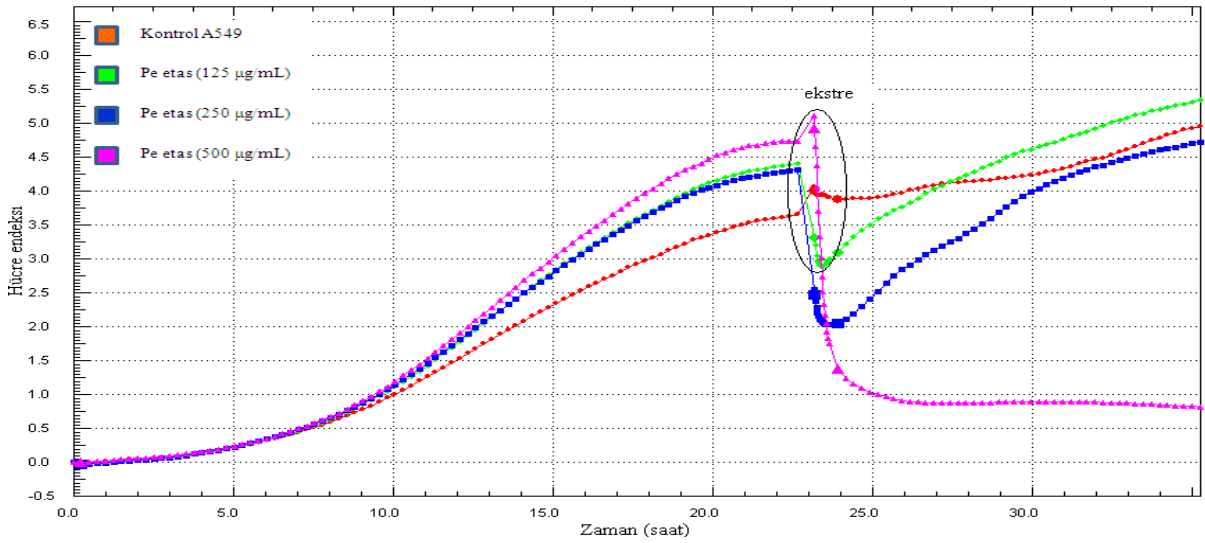
A549 hücrelerinde %70'lik metanol ekstresi



Şekil 4.13. *P. endlicherianum* %70'lik metanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri

125, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda uygulanan %70'lik metanol ekstresi Şekil 4.13'de görüldüğü üzere akut etki göstererek canlılığı azaltmışlardır. 125 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ekstre uygulanan kuyucuklarda canlılık kontrole göre iki saat içinde artışa geçmiştir. 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ekstre uygulanan kuyucukda kontrole göre canlılıkta azalma devam ederek hücre endeksi 0,5'e düşmüştür.

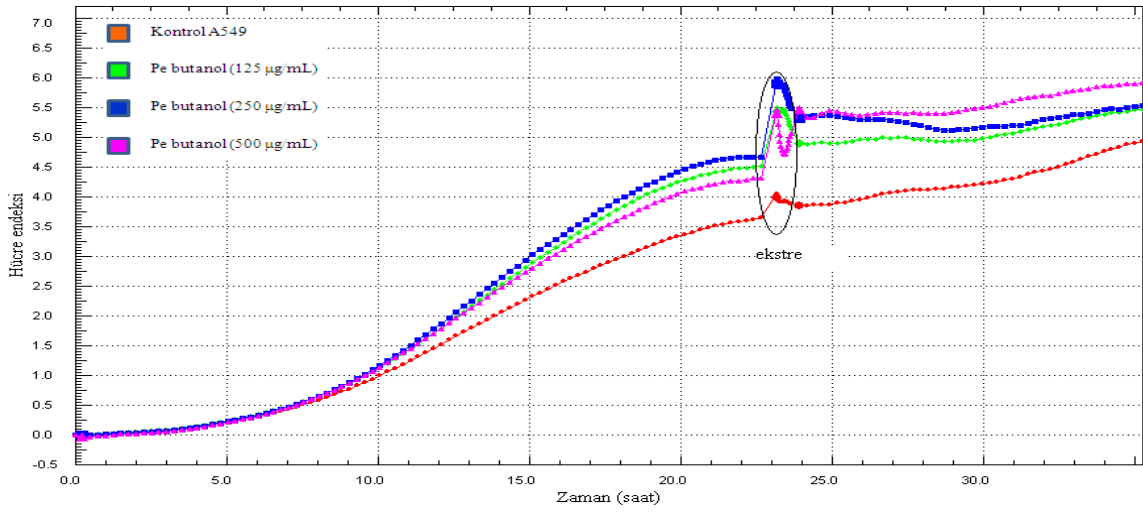
A549 hücrelerinde etil asetat ekstresi



Şekil 4.14. *P. endlicherianum* etil asetat ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri

Şekil 4.14'de etil asetat ekstresinin A549 hücrelerine uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri mevcuttur. Etil asetat ekstresi %70'lik metanol ekstresi ile benzer etki göstermiştir. 125 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hücre endeksi metanol ekstresine göre daha düşüktür. 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ekstre uygulanan kuyucuk da kontrole göre canlılıkta azalma devam ederek hücre endeksi 0,5'e düşmüştür. Her iki ekstre GZHA canlılık testi ve SRB testi benzer sonuçlar vererek birbirini doğrulamıştır.

A549 hücrelerinde butanol ekstresi

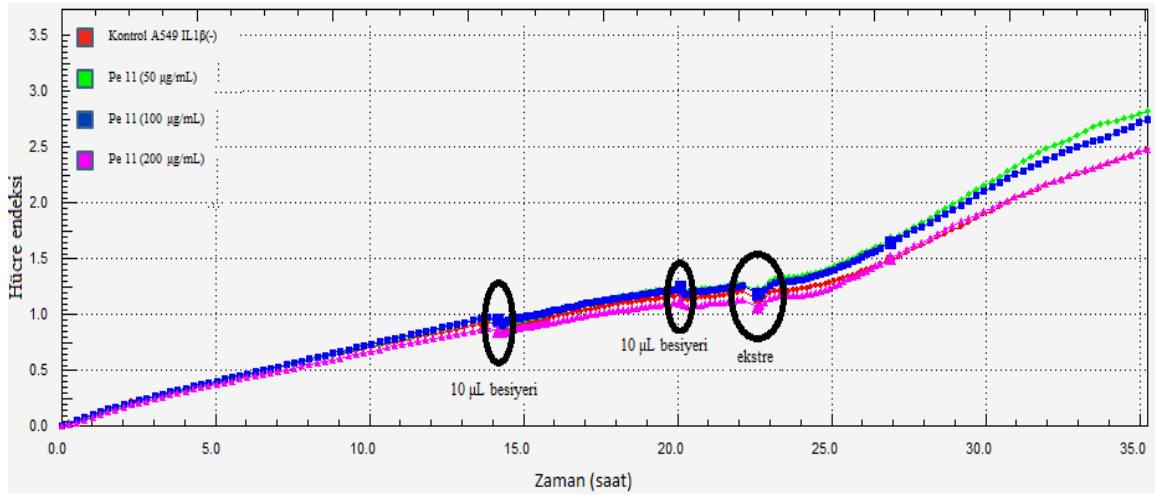


Şekil 4.15. *P. endlicherianum* butanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri

%11'lik etanol ekstresi 125, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonda Şekil 4.15'de görüldüğü üzere kontrole göre hücre canlılığını azaltmamıştır. Bu sonuçlar SRB canlılık testi ile de doğrulanmaktadır.

A549 IL-1β (-) ve IL-1β (+) hücrelerinde %11'lik etanol ekstresi

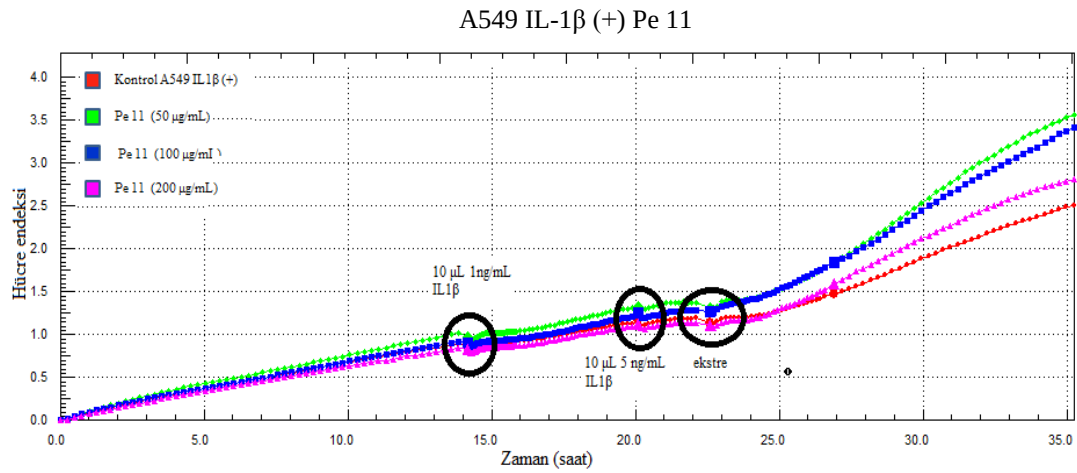
A549 IL-1β (-) Pe 11



Şekil 4.16. IL-1β (-) grupta *P. endlicherianum* %11'lik etanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri.

Şekil 4.16'da görüldüğü üzere 6250 hücre uygulanan kuyucuklarda hücre endeksi yaklaşık 14 saat sonra 1'e ulaşmıştır. Hücre endeksi 1'e ulaştıktan sonra 10 µL %2 FBS

içeren besiyeri eklenmiş ve 6 saat sonra tekrar 10 µL %2 FBS içeren besiyeri eklenmiştir. 22. saatte ekstre farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200 µg/mL) 10µL hacminde uygulanmıştır. Ekstre uygulamasından sonra 12 saat A549 IL-1β (-) hücrelerinin büyüme profili incelenmiştir. 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonda uygulanan ekstreler kontrole göre hücre endeksinde artışa neden olurken 200 µg/mL konsantrasyondaki ekstre kontrole göre hücre endeksini azaltmıştır.

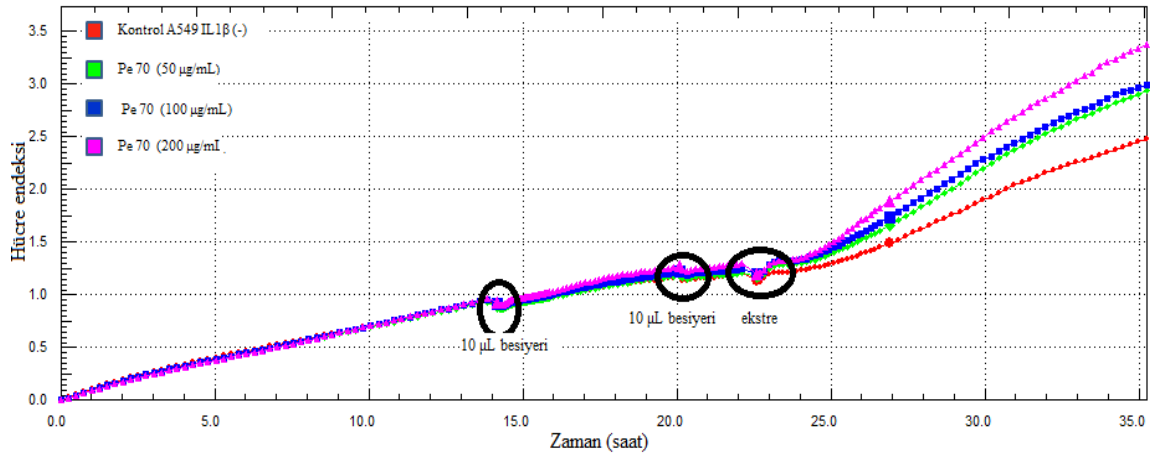


Şekil 4.17. IL-1β (+) grupta, *P. endlicherianum* %11'lik etanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri.

IL-1β, 14. saatte 1 ng/mL ve 20. saatte 5 ng/mL konsantrasyonda 10 µL hacminde uygulanarak enflamasyon oluşturulmuştur. Şekil 4.17'de görüldüğü gibi 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonda uygulanan ekstreler 200 µg/mL konsantrasyonda uygulanan ekstreye göre hücre endeksini kontrole göre daha fazla artırmışlardır.

A549 IL-1 β (-) ve IL-1 β (+) hücrelerinde %70'lik metanol ekstresi

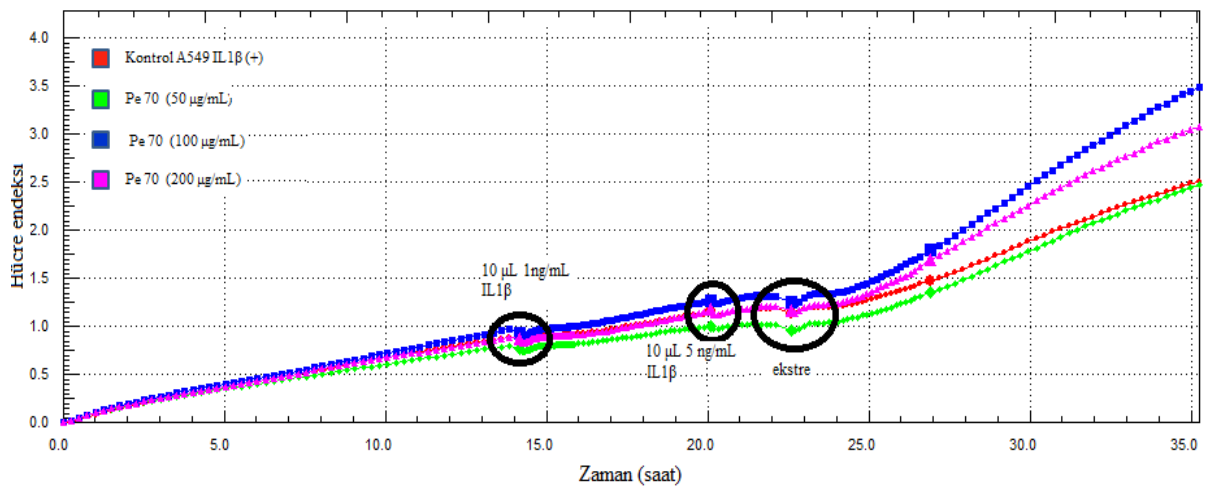
A549 IL-1 β (-) Pe70



Şekil 4.18. IL-1 β (-) grupta, *P. endlicherianum* %70'lik metanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri.

P. endlicherianum %70'lik metanol ekstresi 50,100 ve 200 µg/mL konsantrasyonda 22. saatte uygulanmıştır. Konsantrasyona bağlı olarak ekstreler hücre endeksini kontrole göre artırmışlardır. Şekil 4.18'de de görüldüğü gibi 200 µg/mL konsantrasyonda hücre endeksi 3,4'e yaklaşmışken 50 ve 100 µg/mL uygulanan kuyularda endeks 3, kontrolde ise 2,5'dir.

A549 IL-1 β (+) Pe70



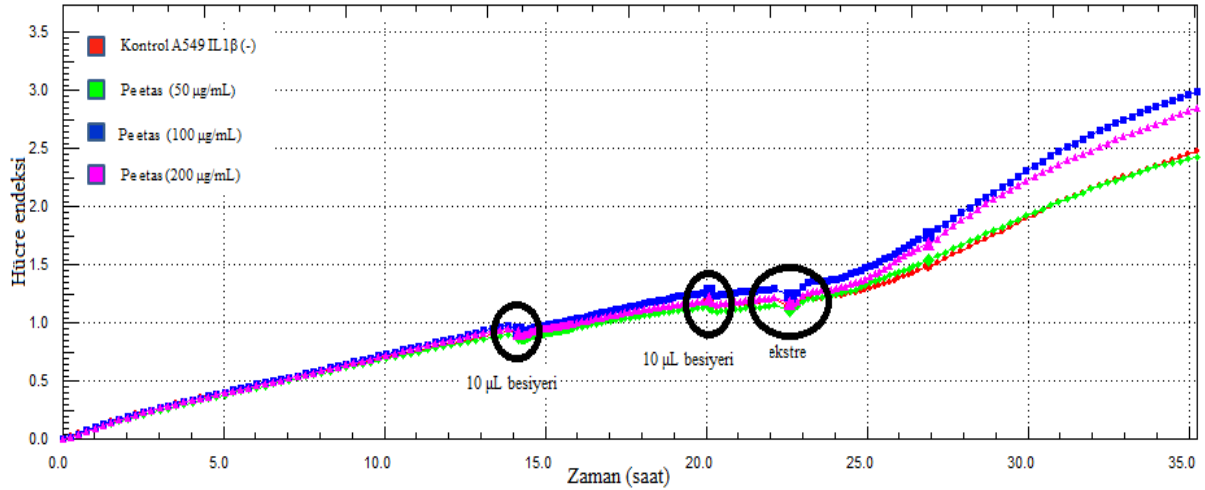
Şekil 4.19. IL-1 β (+) grupta, *P. endlicherianum* %70'lik metanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri

IL-1 β ile 14. ve 20. saatte oluşturulan enflamasyon sonrasında 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonda uygulanan % 70'lik metanol ekstresinin A 549 hücrelerinin büyüme profiline etkisi 12 saat boyunca incelenmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi 100 ve 200

$\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda uygulanan ekstreler hücre endeksini kontrole göre artırırken, 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda uygulanan ekstre kontrole göre endekste anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

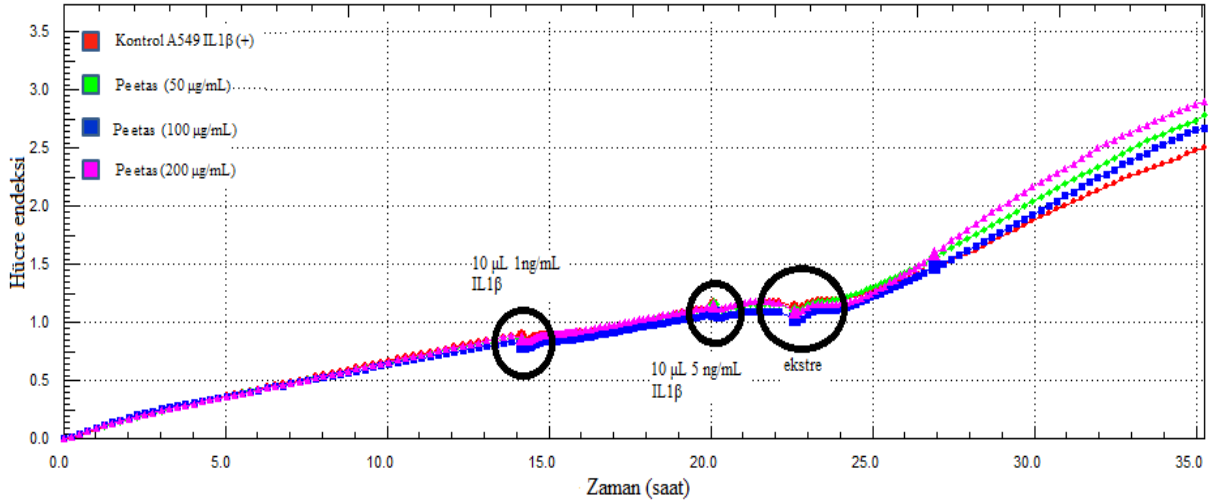
A549 IL-1 β (-) ve IL1 β (+) hücrelerinde etil asetat ekstresi

A549 IL-1 β (-) Pe etas



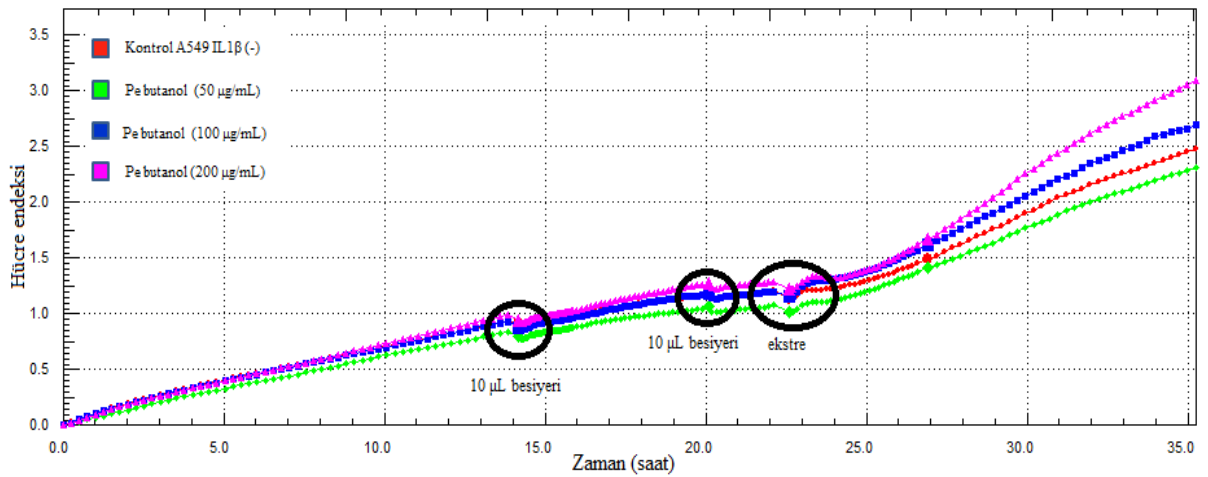
Şekil 4.20. IL-1 β (-) grupta, *P. endlicherianum* etil asetat ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri

IL-1 β uygulanmayan kuyucuklarda etil asetat ekstresinin 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları kontrole göre hücre endeksini artırmış ve endeksi yaklaşık 3 civarına getirmiştir. Şekil 4.20’de görüldüğü üzere 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda uygulanan ekstre ise kontrole göre bir farklılık göstermemiştir ve endeks 12. saatin sonunda 2,5’dir.

A549 IL1 β (+) Pe etas

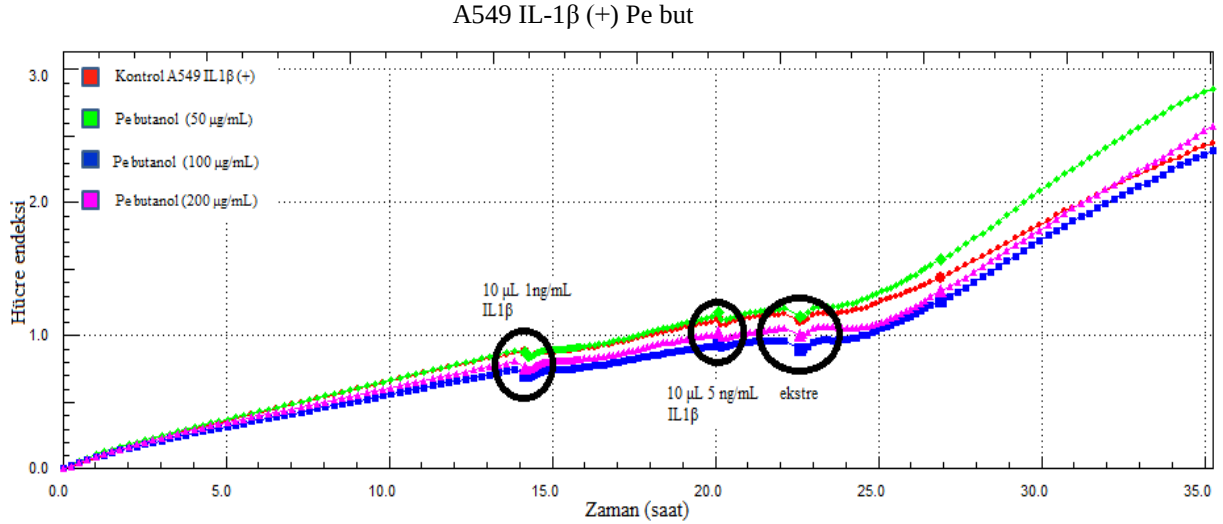
Şekil 4.21. IL-1 β (+) grupta, *P. endlicherianum* etil asetat ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri

IL-1 β uygulanan A549 hücrelerinde etil asetat ekstresinin uygulanmasından sonraki hücre endeksi verileri Şekil 4.21’de verilmiştir. Etil asetat ekstresi 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda kontrole göre hücre endeksini artırmıştır. 200 µg/mL konsantrasyonda hücre endeksi diğer konsantrasyonlara göre daha fazla artış göstermiştir.

A549 IL-1 β (-) ve IL-1 β (+) hücrelerinde butanol ekstresiA549 IL1 β (-) Pe but

Şekil 4.22. IL-1 β (-) grupta, *P. endlicherianum* butanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri

Şekil 4.22'de görüldüğü üzere butanol ekstresi IL-1 β (-) grupta 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kontrole göre hücre endeksini artırmış, 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kontrole göre azaltmıştır.



Şekil 4.23. IL-1 β (+) grupta, *P. endlicherianum* butanol ekstresinin uygulanmasından sonraki ilk 12 saatlik hücre endeksi verileri

Şekil 4.23'de görüldüğü üzere IL-1 β (+) grupta butanol ekstresinin düşük konsantrasyonu kontrole göre hücre endeksini artırırken, 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ uygulanan ekstreler hücre endeksinde kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermemişlerdir.

Tablo 4.5. IL-1 β (-) grupta A549 hücrelerinde ekstrele ve kontrole ait hücre endeksi verileri

Kontrol: 2,52855			
Ekstreler	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
Pe 11	2,7707	2,6914	2,4244
Pe 70	2,8794	2,9351	3,3015
Pe etas	2,3759	2,9310	2,7858
Pe but	2,2624	2,6345	3,0275

Tablo 4.6. IL-1 β (+) grupta A549 hücrelerinde ekstrele ve kontrole ait hücre endeksi verileri

Kontrol: 2,72588			
Ekstreler	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
Pe 11	3,4804	3,3382	2,7441
Pe 70	2,4184	3,4060	3,0060
Pe etas	2,7291	2,6210	2,8363
Pe but	2,8600	2,3949	2,5758

Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da görüldüğü gibi her iki grupta da ekstreler kontrole göre hücre endeksinde düşüşe neden olmamıştır. %11'lik etanol ekstresi hariç diğer ekstrelerde hücre endeksinde doza göre artış varken, %11'lik etanol ekstresinde artan dozlarda hücre endeksi azalmıştır.

4.3. A549 VE RAW 264.7 HÜCRELERİNDE BİKİNKONİKASİT YÖNTEMİ İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

Bikinkonikasıit yöntemine göre her örnek için protein miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.7. A549 hücre lizatlarında protein miktarları

Örnek	Protein miktarı	Örnek	Protein miktarı
IL-1 β (-)	(μ g/mL)	IL-1 β (+)	(μ g/mL)
Kontrol	12,04	Kontrol	17,42
Pe 11 50 μ g/mL	18,50	Pe 11 50 μ g/mL	20,03
Pe 11 100 μ g/mL	14,86	Pe 11 100 μ g/mL	15,03
Pe 11 200 μ g/mL	17,79	Pe 11 200 μ g/mL	12,04
Pe 70 50 μ g/mL	14,91	Pe 70 50 μ g/mL	15,46
Pe 70 100 μ g/mL	20,03	Pe 70 100 μ g/mL	16,11
Pe 70 200 μ g/mL	20,95	Pe 70 200 μ g/mL	14,21
Pe etas 50 μ g/mL	13,67	Pe etas 50 μ g/mL	14,16
Pe etas 100 μ g/mL	15,35	Pe etas 100 μ g/mL	15,13
Pe etas 200 μ g/mL	16,11	Pe etas 200 μ g/mL	16,17
Pe 11 50 μ g/mL	12,58	Pe 11 50 μ g/mL	16,93
Pe 11 100 μ g/mL	12,15	Pe 11 100 μ g/mL	16,38
Pe 11 200 μ g/mL	12,47	Pe 11 200 μ g/mL	15,29

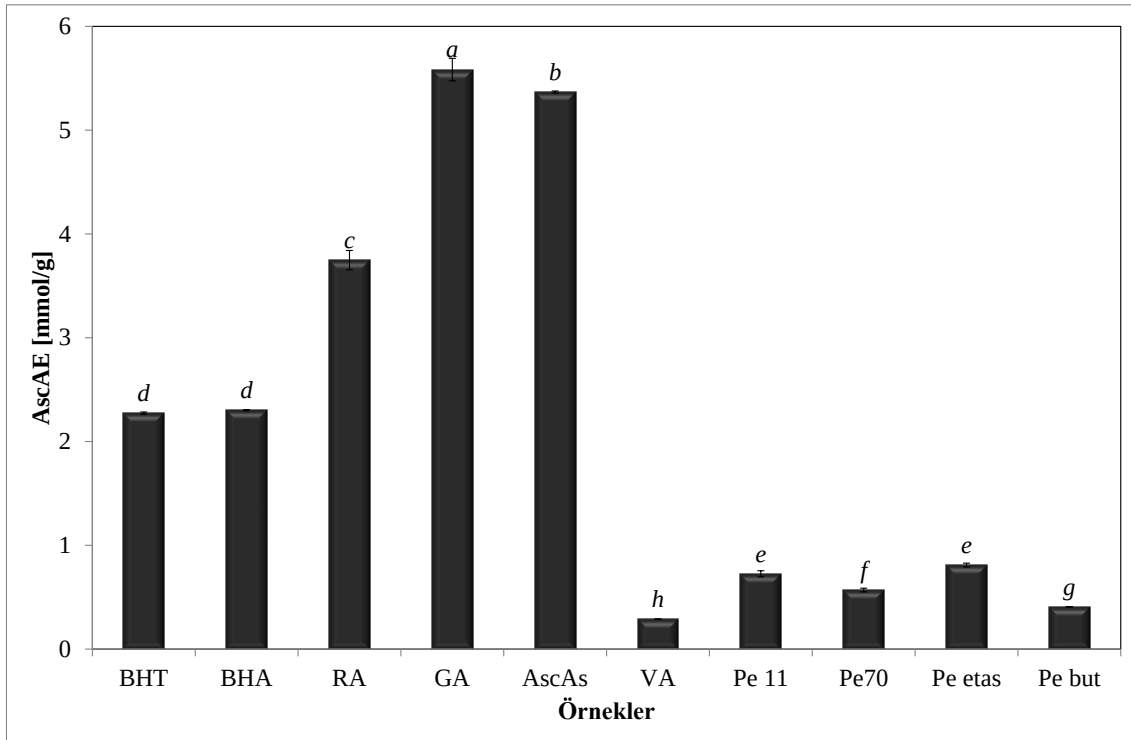
Tablo 4.8. RAW 264.7 hücre lizatlarında protein miktarları

Örnek	Protein miktarı	Örnek	Protein miktarı
LPS (-)	(μ g/mL)	LPS (+)	(μ g/mL)
Kontrol	9,32	Kontrol	12,04
Pe 11	12,25	Pe 11	27,64
Pe 70	27,47	Pe 70	11,55
Pe etas	12,85	Pe etas	17,8
Pe but	10,68	Pe but	13,07
Aposinin	10,62	Aposinin	7,58

4.4. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

4.4.1. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi

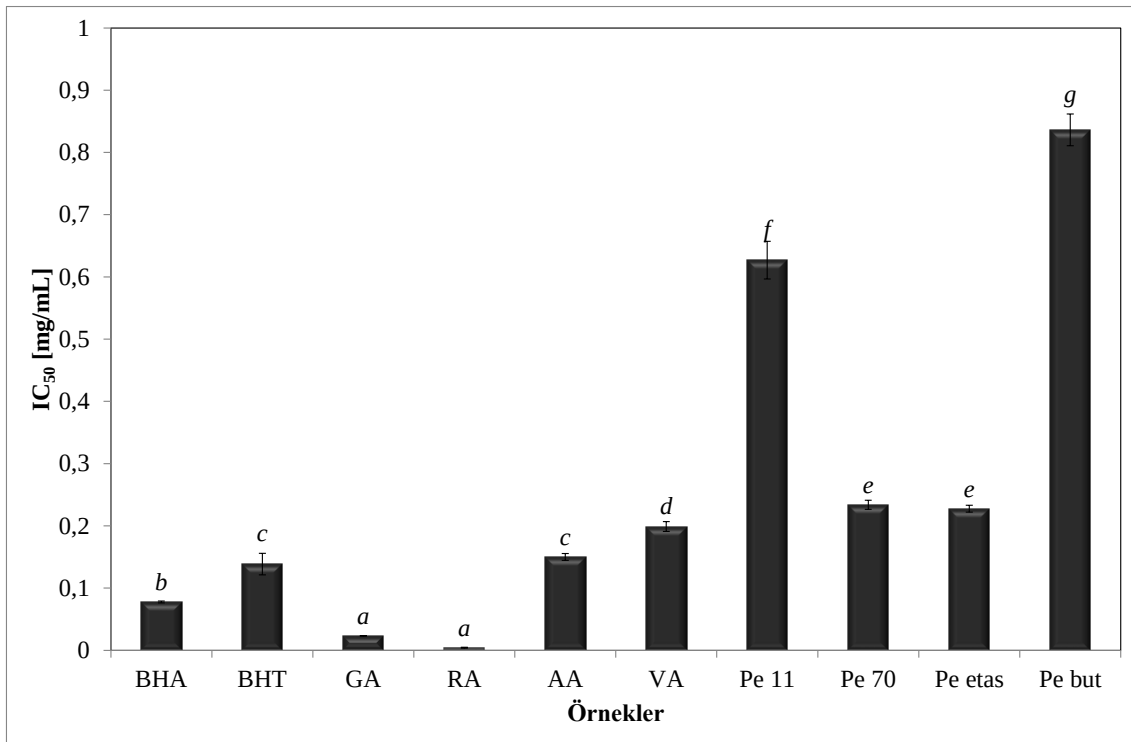
Maddelerin indirgeme güçleri ile antioksidan aktivite arasında genellikle doğrusal bir bağlantı vardır. Bu nedenle indirgeme kapasitesinin belirlenmesi o maddenin antioksidan aktivitesi hakkında bilgi verebilir. Bu amaçla *P. endlicherianum* türünden elde edilen ekstrelerin ve standartların demiri indirgeme kapasiteleri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.24’de verilmiştir. Burada verilen sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Yüksek değer yüksek aktiviteyi gösterir. *P. endlicherianum*’un köklerinden elde edilen ekstrelerin hiçbirisinin demir(III) ü indirgeme gücü pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA ve gallik asit kadar yüksek bulunamamıştır (Şekil 4.24). Etil asetat ve % 11’lik etanol ekstrelerinin demir(III)’ü demir(II)’ye indirgeme güçleri en yüksek olarak bulunmuştur. Vanilik asit ekstrelerden daha düşük bir aktiviteye sahipken aposininin aktivitesi 10 mg/mL’den büyük olduğu için askorbik asite eşdeğer aktivitesi hesaplanmamıştır.



Şekil 4.24. *P. endlicherianum* ekstrelerinin ve standartların demir(III)’ü demir(II)’ye indirgeme kapasiteleri. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-h) arası aynı harflerle belirtilmiş barlar $p>0,05$ ’den farklı değildir.)

4.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Vücuttan zararlı ve hastalık yapıcı radikallerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla örneklerin antiradikal etkilerinin ölçülmesinde azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH[•] radikali kullanılmıştır. Bütün ekstreler DPPH[•] radikalini fizyolojik pH'da konsantrasyona bağlı olarak süpürmüşlerdir. IC₅₀ değerleri, radikalin %50'sini süpürebilecek gerekli konsantrasyon olarak tanımlanır. Küçük değer yüksek aktiviteyi gösterir. Ekstrelerin IC₅₀ değerleri hazırlanan doğrusal olmayan eğriler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.25'de verilmiştir.



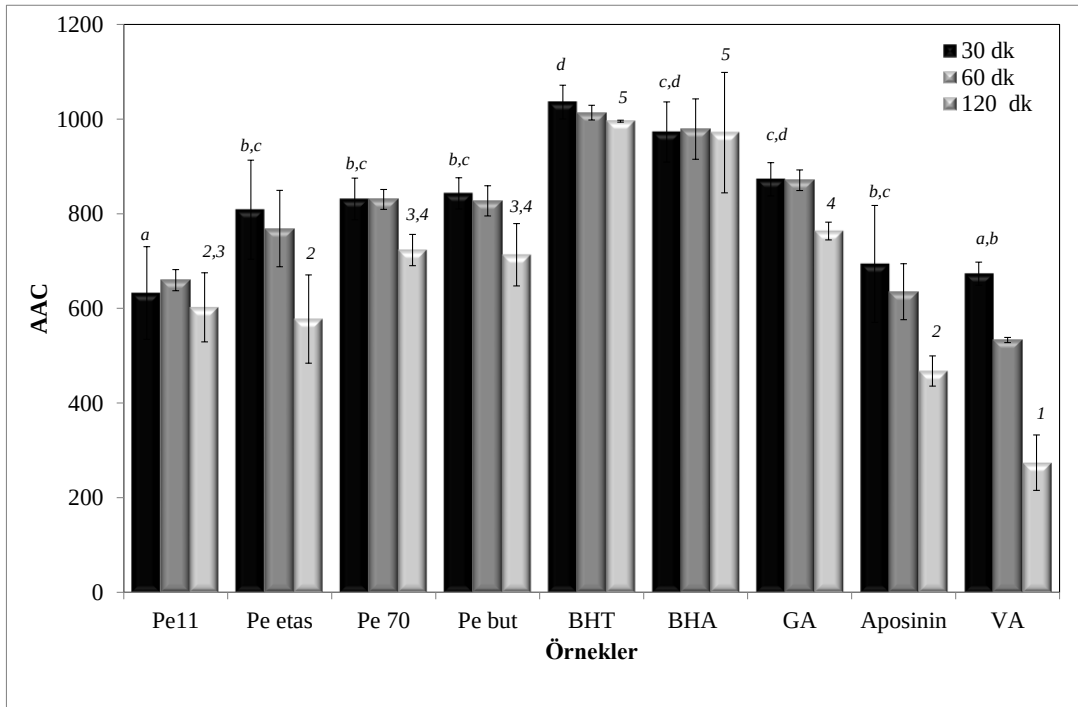
Şekil 4.25. *P. endlicherianum* ekstrelerinin ve standartların DPPH[•] radikali süpürücü etkileri. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-h) arası aynı harflerle belirtilmiş barlar $p>0,05$ ' den farklı değildir.)

P. endlicherianum ekstreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda ekstrelerin fizyolojik pH'da süpürücü etki gösterdikleri belirlenmiştir. Şekil 4.30'a göre *P. endlicherianum*'un %70'lik metanol ve etil asetat ekstreleri diğerlerinden daha aktif bulunmuştur. Ancak bitkiden elde edilen hiçbir ekstrenin kullanılan pozitif kontroller kadar etkili süpürücü etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Ekstrelerinin DPPH[•] radikal süpürücü aktiviteleri şöyle sıralanabilir: %70'lik metanol = etil asetat > % 11'lik

etanol > butanol. Ekstrelerin bileşiminde bulunan vanilik asitin IC₅₀ değeri (0.199 mg/mL) ekstrelerden daha düşük bulunurken, aposininin aktivitesi 10 mg/mL'den büyük olduğu için IC₅₀ değeri hesaplanamıştır.

4.4.3. β -Karoten/Linoleik Asit Birlikte Oksidasyonu İnhibe Edici Etki Tayini

Gıda lipitleri ve hücre membranları oksidatif ajanlarla kolaylıkla okside olabilen doymamış yağ asitleri, linoleik ve araşidonik asitleri içerirler. Bu nedenle doymamış yağ asitleri üzerinden yapılan oksidasyon deneyleri önem taşımaktadır. β - karoten/linoleik asit soldurma deneyi özellikle hücre duvarındaki ve gıdalardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun tanımlanmasında sıklıkla kullanılır. *P. endlicherianum* ekstrelerinin β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu engelleme dereceleri Şekil 4.26'da verilmiştir. Şekil 4.31'de görülebileceği gibi elde edilen ekstreler belli oranlarda inhibitör aktivite göstermiştir. %70'lik metanol, butanol ve etil asetat ekstreleri BHT, BHA ve gallik asit standartlarına yakın etkili olarak aktivite gösterirken %11'lik etanol ekstresi daha düşük aktivite göstermiştir. Ekstrelerin aktivitesi zamana bağlı olarak değişim göstermemiştir. Aposinin ve vanilik asit ekstrelerden daha düşük aktivite göstermişlerdir.



Şekil 4.26. *P. endlicherianum* ekstre ve standartların β -karoten-linoleik asit peroksidasyonuna etkileri. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir.(a-d), (1-3) arası aynı harflerle ve rakamlarla belirtilmiş barlar $p>0,05$ ' den farklı değildir.)

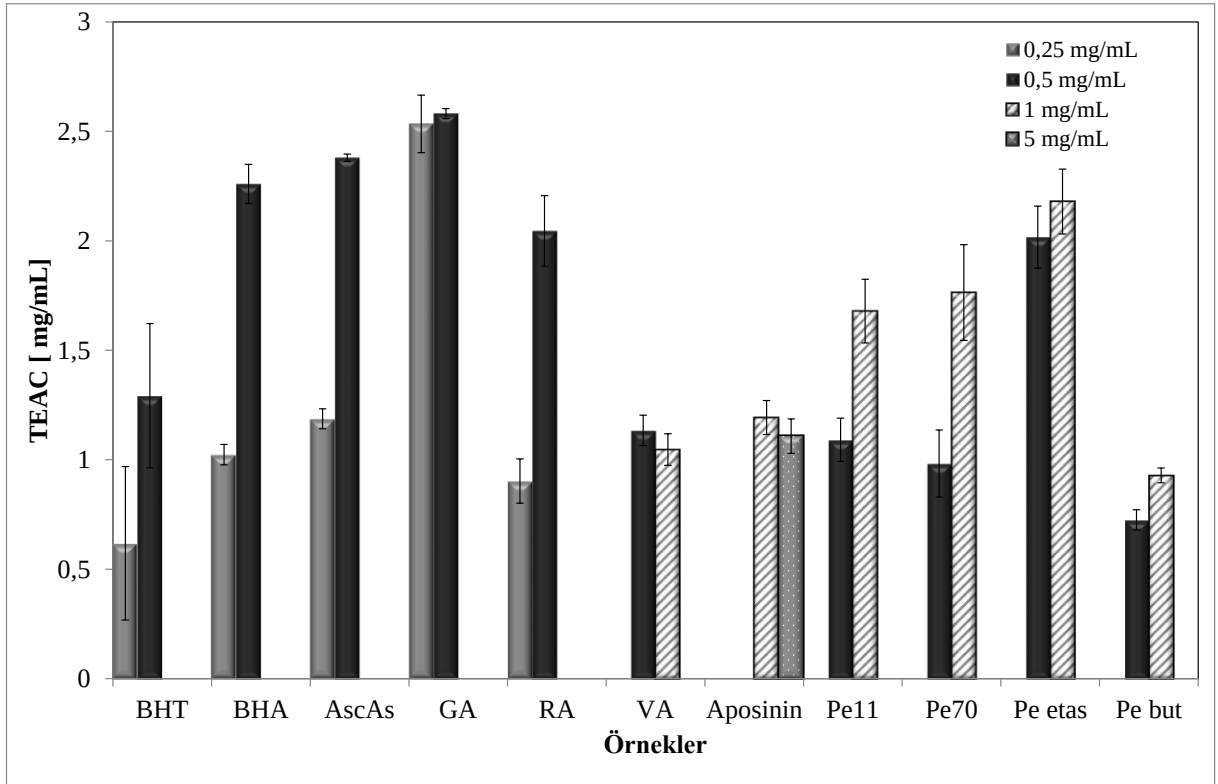


Şekil 4.27. *P. endlicherianum* ekstre ve standartların β -karoten-linoleik asit peroksidasyonuna etkileri

4.4.4. 2,2'- azino-bis (3- etilbenztiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS⁺•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Bu yöntem mavi/yeşil renkli bir bileşik olan ABTS⁺• radikali katyonu tarafından antioksidatif maddelerin miktarının spektroskopik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile flavonoidler, hidroksisinnamik asitler, karotenoidler gibi hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar ölçülebilmektedir.

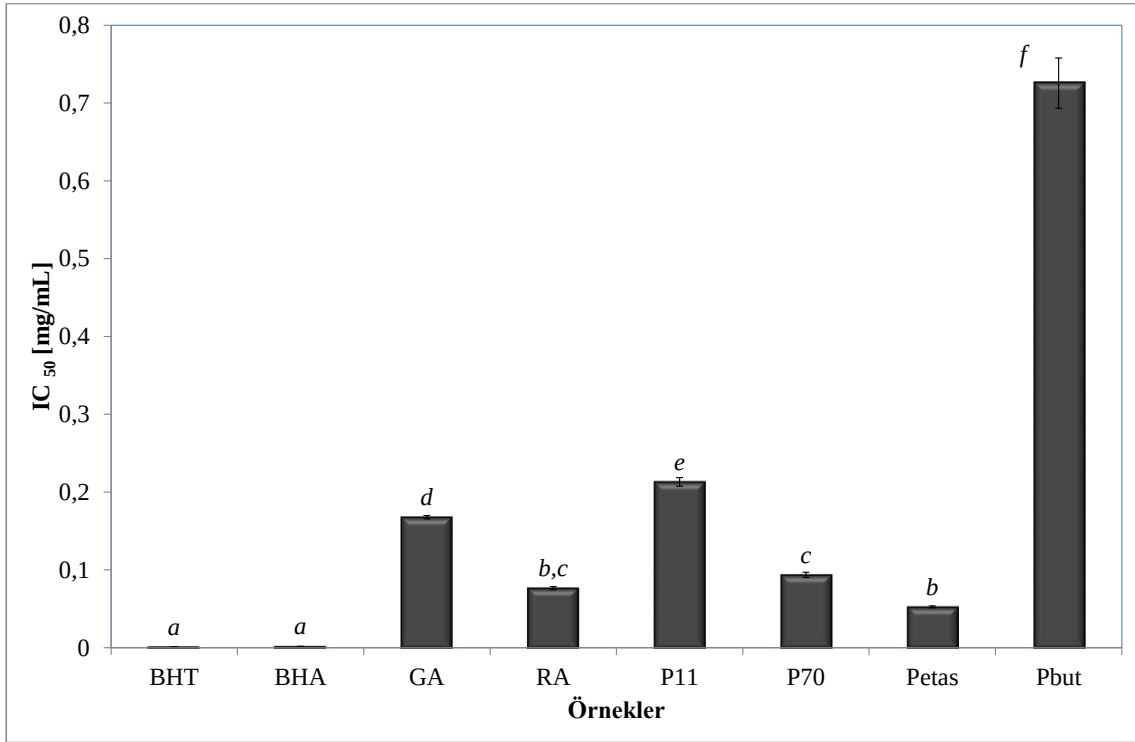
Tüm ekstrelerin ABTS⁺• radikalini süpürücü etkileri değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.28'de verilmiştir. En yüksek aktivite etil asetat ekstresinde gözlenirken, en düşük aktivitenin butanol ekstresinde olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerin pozitif kontrollerin hiçbirisi kadar yüksek aktivite gösteremediği belirlenmiştir. Ekstrelerle aynı konsantrasyonda vanilik asit daha düşük aktivite gösterirken, aposinin ekstrelerden daha yüksek konsantrasyonda ekstrelere göre daha az aktivite göstermiştir.



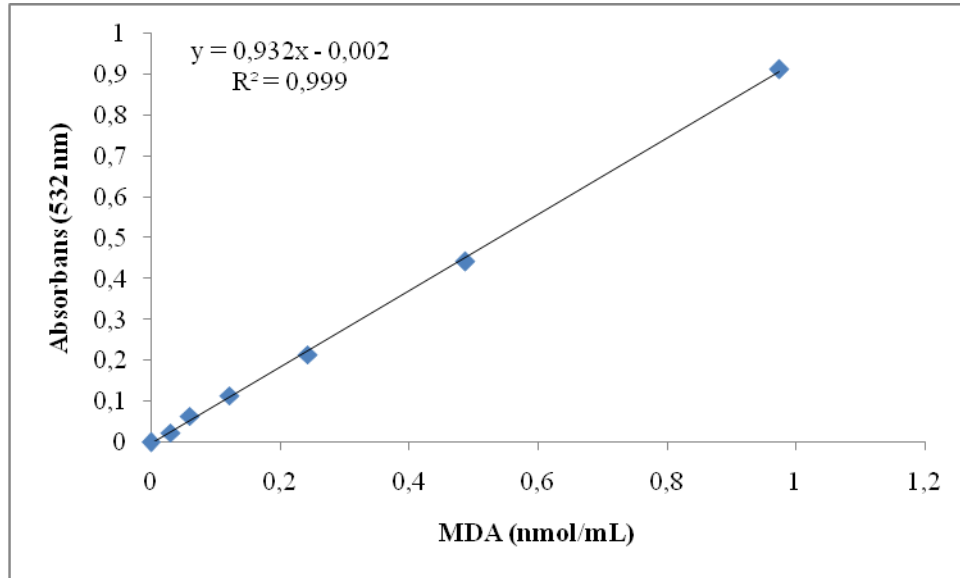
Şekil 4.28. *P. endlicherianum* ekstralarının ve standartların ABTS⁺ radikalini süpürücü etkileri.

4.4.5. Askorbat –Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu

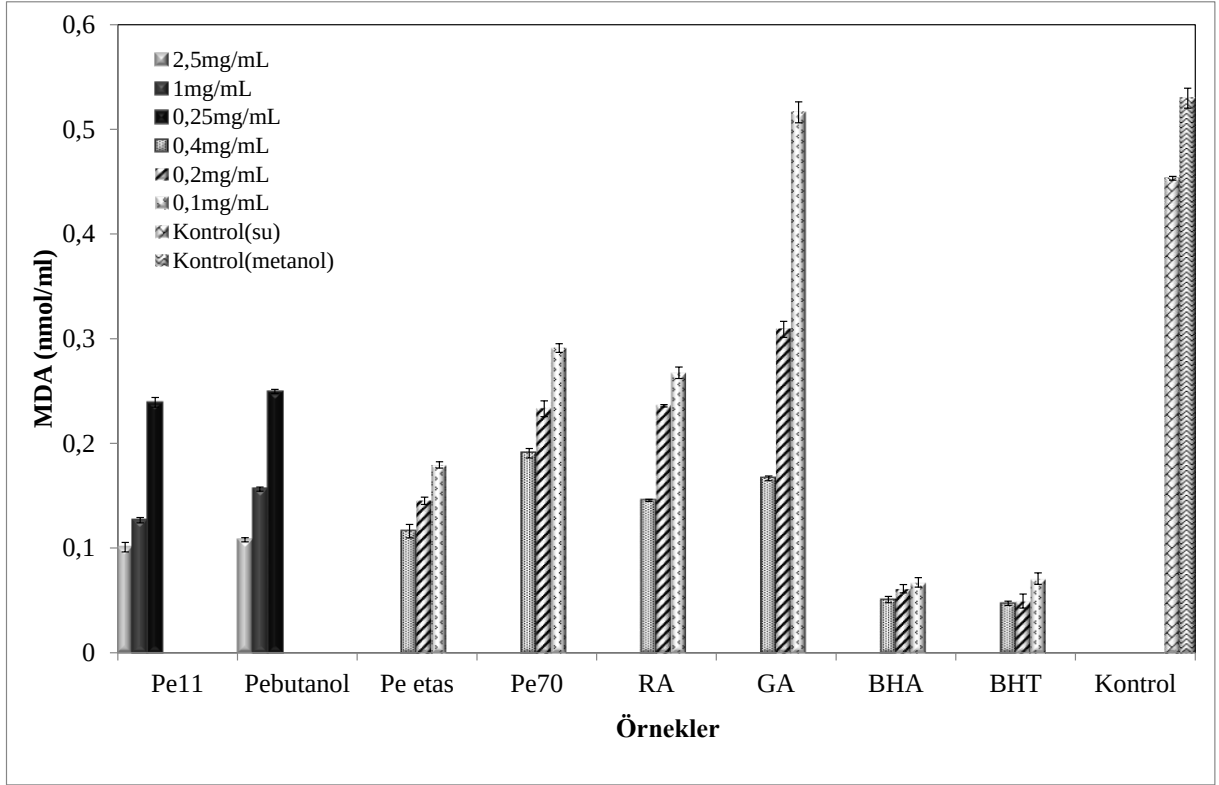
Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin fosfolipitler biyolojik olarak önemli moleküllerdir ve hidroksil radikali kaynaklı bozulmaya açıktırlar. Ayrıca lipidlerin oksidatif bozulması yağlarca zengin ürünlerin acılaşmasının da temelini oluşturur. Bu nedenle bu oksidatif hasarı engelleyici yeni doğal maddelerin bulunması önem kazanmıştır. Sığır beyini kaynaklı fosfolipit lipozomlarının askorbat-Fe(III)-katalizli hidroksil radikali bozunmasında hidroksil radikalini süpürücü etki esasına göre fizyolojik pH da TBA-reaktif bileşiklerin formasyonunun inhibisyonu ölçülür. Şekil 4.29'da görüldüğü gibi etil asetat ekstresi standart olarak kullanılan rozmarinik asit ve gallik asitten daha fazla aktivite göstermiştir. %70'lik metanol ekstresi ise gallik asitten daha aktif bulunmuştur. Ekstrelerin bileşiminde bulunan aposinin diğer standartlar ve ekstralar kadar aktif bulunmazken vanilik asit azalan konsantrasyonlarda peroksidasyonu tetiklemiştir. Butanol ekstresinin diğer ekstralara göre daha az aktif olduğu bulunmuştur (IC₅₀ 0,73 mg/mL). Aposininin IC₅₀ değeri 3,68 mg/mL'dir. Vanilik asitin aktivitesi 5mg/mL'den büyük olduğu için IC₅₀ değeri hesaplanmamıştır.



Şekil 4.29. *P. endlicherianum* ekstralarının ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-f) arası aynı harflerle belirtilmiş barlar $p > 0,05$ ' den farklı değildir.)



Şekil 4.30. 1,1,3,3 tetrametoksipropan'a ait standart eğri.

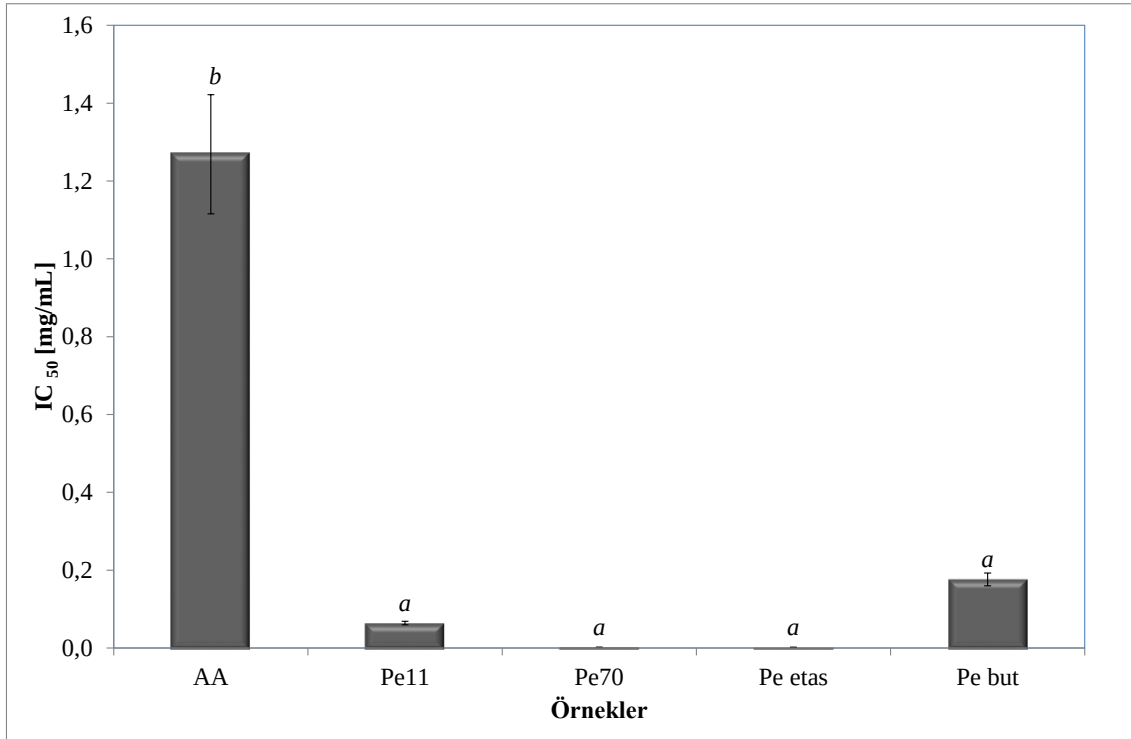


Şekil 4.31. *P. endlicherianum* ekstralarının ve standartların Askorbat –Fe (III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun inhibisyonu deneyinde MDA miktarına olan etkisi.

Şekil 4.31'de görüldüğü üzere bütün ekstraller doza bağlı olarak MDA miktarını kontrole göre düşürmüşlerdir. En aktif ekstraller olan etil asetat ve %70'lik metanol ekstralleri aynı konsantrasyonlarda rozmarinik asitle benzer aktivite gösterirken, gallik asitten daha aktif, BHT ve BHA 'ya göre ise daha az aktiftirler. %11'lik etanol ve butanol ekstralleri aynı konsantrasyonlarda aposinin ve vanilik asitten daha aktiftirler.

4.4.6. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-deoksiriboz Bozulması

Deneyin esası Fenton reaksiyonu ile üretilen hidroksil radikalının deoksiriboza atak etmesi ve parçalaması sonucu oluşan bozunma ürünlerinin düşük pH ve sıcaklık etkisiyle TBA ile reaksiyona girerek pembe renk oluşturmaya dayanır. Ekstrelerin DNA hasarını koruma gücü Şekil 4.32'de görüldüğü gibi askorbik asitten daha fazla bulunmuştur. Vanilik asit ve aposininin aktivitesi 5 mg/mL 'den büyük bulunmuştur.



Şekil 4.32. *P. endlicherianum* ekstralarının ve askorbik asitin spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması inhibisyonu. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-b) arası aynı harflerle belirtilmiş barlar $p>0,05$ ' den farklı değildir.)

4.4.7. Spesifik Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-deoksiriboz Bozulması

Ekstrelerin spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını engelleme güçleri spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması bölümündeki gibi yapılmış olup, prosedürde EDTA yerine tampon çözelti kullanılmıştır. EDTA ile şelat yapmayan hidroksil radikali deoksiriboza daha hızlı atak ederek bozunma ürünlerinin oluşumuna sebep olup TBA ile reaksiyona girerek kromojen oluşturur. Ekstreler, aposinin ve vanilik asit spesifik olmayan hidroksil radikali bozunması deneyinde kullanılan konsantrasyonlarda çalışılmış fakat spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını engelleyememişlerdir.

4.4.8. Demir(II) Şelat Aktivite

İki değerlikli geçiş metal iyonları oksidatif prosesin katalizlenmesi, hidroksil radikallerinin formasyonu ve Fenton kimyası gibi hidroperoksit dekompozisyon reaksiyonları gibi önemli rol oynarlar (158). Bu prosesler demirin şelasyonu ve deaktivasyonu ile sonlandırılabilir. Bu nedenle, ekstraların demir(II) iyonlarının

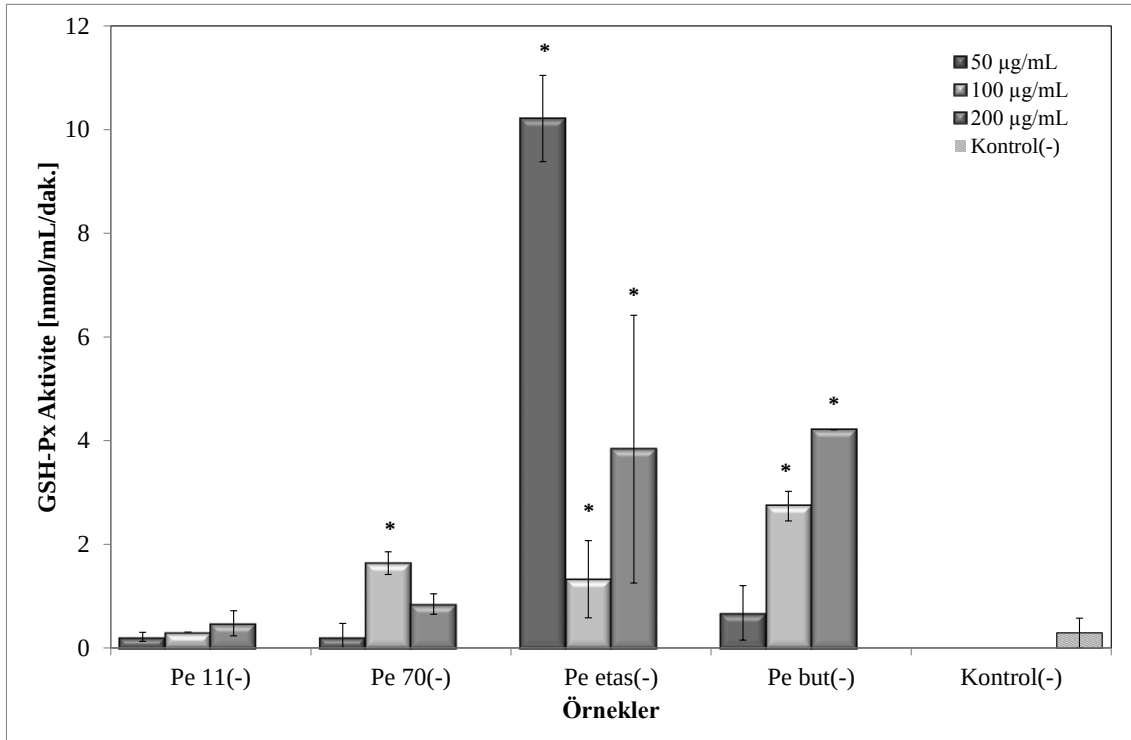
şelasyonuna etkileri incelendi. Ekstrelerin aktivitesi 10 mg/mL' den büyük bulunmuştur.

4.4.9. A549 ve RAW 264.7 Hücrelerinde Antioksidan Aktivite Tayini

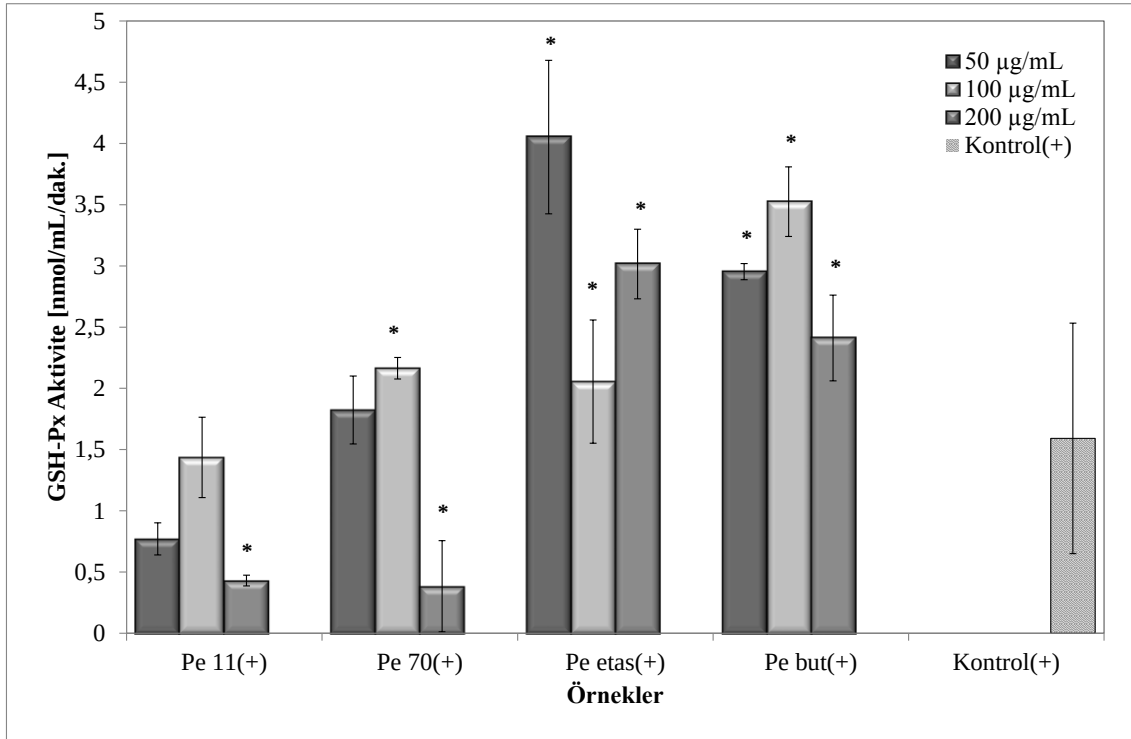
4.4.9.1. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi:

GPx aktivite tayininde, H_2O_2 varlığında indirgenmiş glutasyon (GSH) GPx tarafından okside glutatyon (GSSG) oksitlenir ve oksitlenen GSSG'nin glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Kullanılan NADPH miktarı absorbandsdaki azalış şeklinde 340 nm dalga boyunda izlendi.

IL-1(β) uygulanmayan bütün gruplarda Şekil 4.33'de görüldüğü üzere GPx aktivitesi konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. En düşük aktiviteye sahip ekstre %11'lik etanol ekstresi iken etil asetat ve butanol ekstresi benzer aktivite göstermiştir.

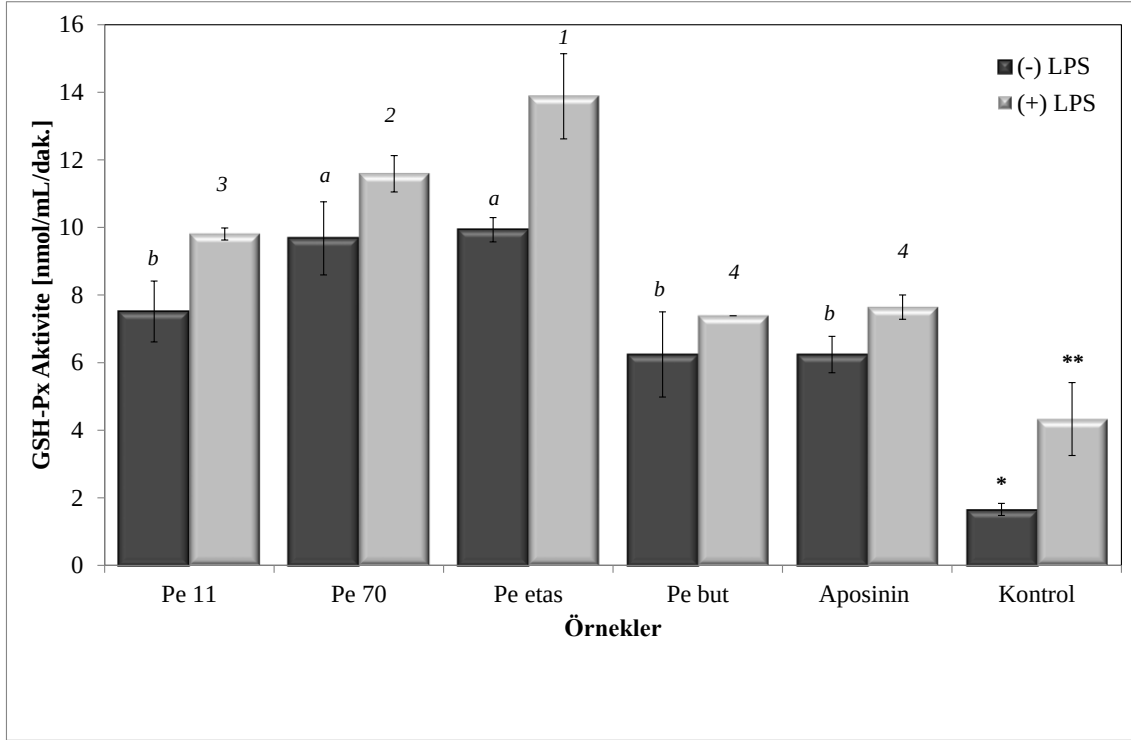


Şekil 4.33. *P. endlicherianum* ekstrelerinin IL1- β uygulanmayan A549 hücrelerinde glutasyon peroksidaz aktivitesi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir, $p < 0,05$)



Şekil 4.34. *P. endlicherianum* ekstrelerinin IL-1 β uygulanan A549 hücrelerinde glutatyon peroksidaz aktivitesi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir, $p < 0,05$)

IL-1(β) uygulanan kontrol grubunda Şekil 4.34'de görüldüğü üzere GPx'de belirgin bir artış olmuştur. Butanol ve etil asetat ekstrelerinin düşük dozları IL-1(β) uygulanan hücrelerde GPx aktivitesini belirgin oranda artırırken, %11'lik etanol ekstresinin yüksek konsantrasyonları GPx'i kontrolün altına düşürmüştür, etil asetat ekstresinin yüksek konsantrasyonları kontrolün altına düşürmemiştir. %70'lik metanol ekstresinin GPx aktivitesi 50 ve 100 mg/mL konsantrasyonlarda kontrole yakınken, 200 mg/mL konsantrasyonda kontrole göre belirgin bir düşüş göstermiştir. Butanol ekstresinin bütün konsantrasyonları GPx aktivitesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır.

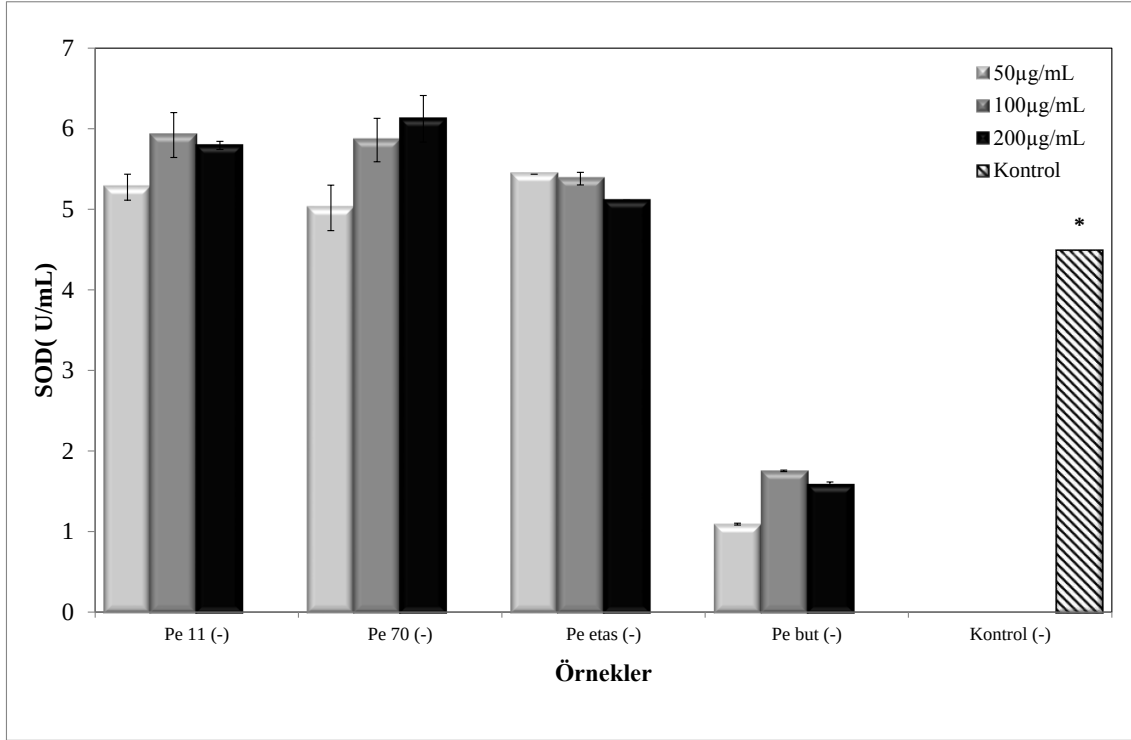


Şekil 4.35. *P. endlicherianum* ekstrelerinin LPS(-) ve LPS(+) RAW 264.7 hücrelerinde Glutasyon peroksidaz aktivitesi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-b), (1-4), (*,**) arası aynı harflerle, rakamlarla ve işaretlerle belirtilmiş barlar $p > 0,05$ ' den farklı değildir.)

LPS uygulanmayan kuyucuklarda bütün ekstreler 25µg/mL konsantrasyonda Şekil 4.35'de görüldüğü üzere GPx aktivitesini kontrole göre artırmışlardır. LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda da uygulanmayan kuyucuğa göre GPx'de anlamlı artış vardır. LPS uygulaması yapılan bütün kuyucuklarda ekstreler kontrole göre GPx aktivitesinde artış göstermişlerdir. En aktif ekstre etil asetat ekstresidir.

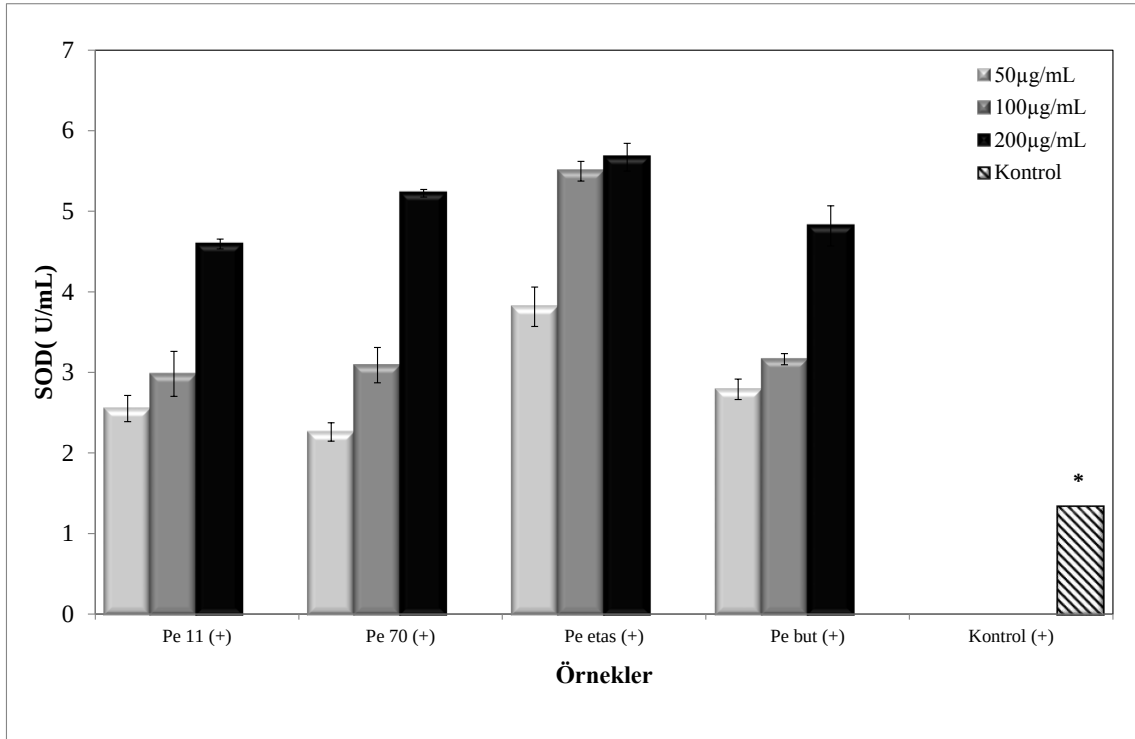
4.4.9.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi:

Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle süperoksit radikali üretilmekte ve oluşan süperoksit radikali, I.N.T. (Io-donitrotetrazolyum) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturmakta ve bu renk şiddeti 505 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Ortamdaki CuZn-SOD aktivitesine bağlı olarak bu reaksiyon önlenmekte ve % inhibisyon hesaplanmaktadır. SOD aktivitesi A549 hücrelerinin süpernatant ve lizatlarında, RAW 264.7 hücresi süpernatantlarında incelendi.



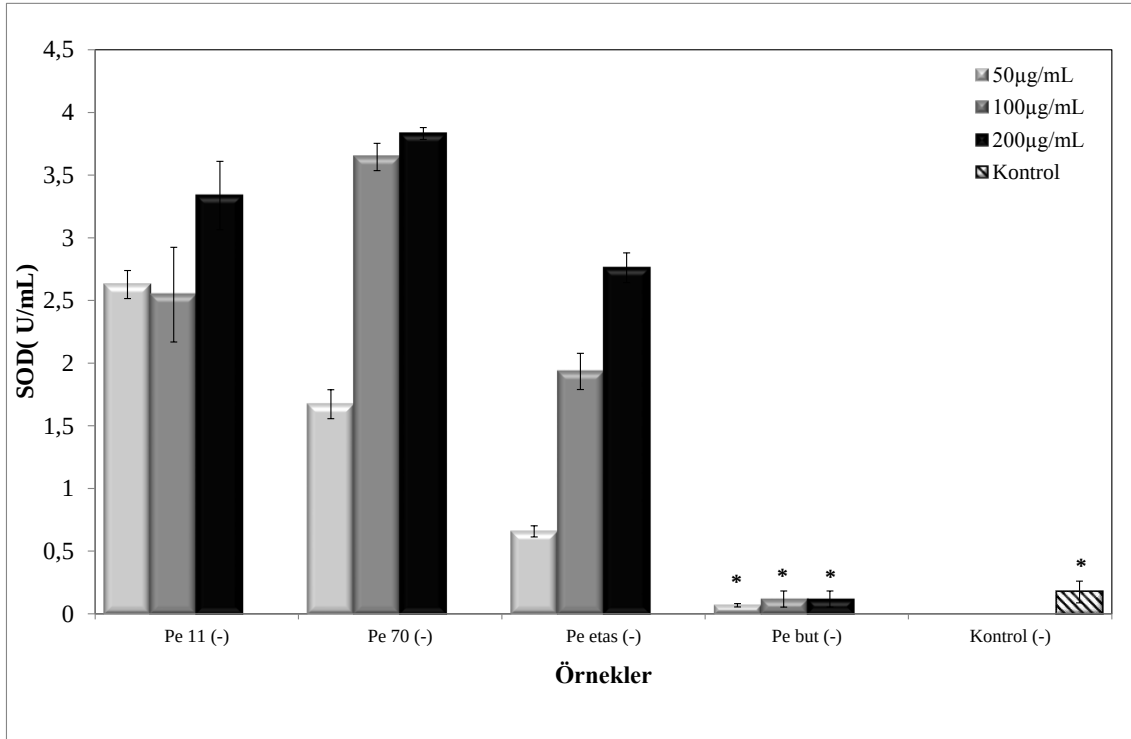
Şekil 4.36. *P. endlicherianum* ekstralarının IL-1 β uygulanmayan A549 hücre süpernatantlarında SOD aktivitesi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir, $p < 0,05$)

IL-1 β uygulanmayan A549 hücre süpernatantlarında sitozolik SOD aktivitesinde Şekil 4.36'da görüldüğü üzere %11'lik etanol ve %70'lik metanol ekstresi kontrole göre konsantrasyon arttıkça SOD aktivitesini anlamlı şekilde artırmışlardır. Etil asetat ekstresi ise konsantrasyon arttıkça SOD aktivitesini azaltmış, 200 μ g/mL konsantrasyonda SOD miktarı kontrolle yaklaşık aynı seviyelerde bulunmuştur. Butanol ekstresi kontrole göre SOD miktarında düşüşe neden olmuştur.



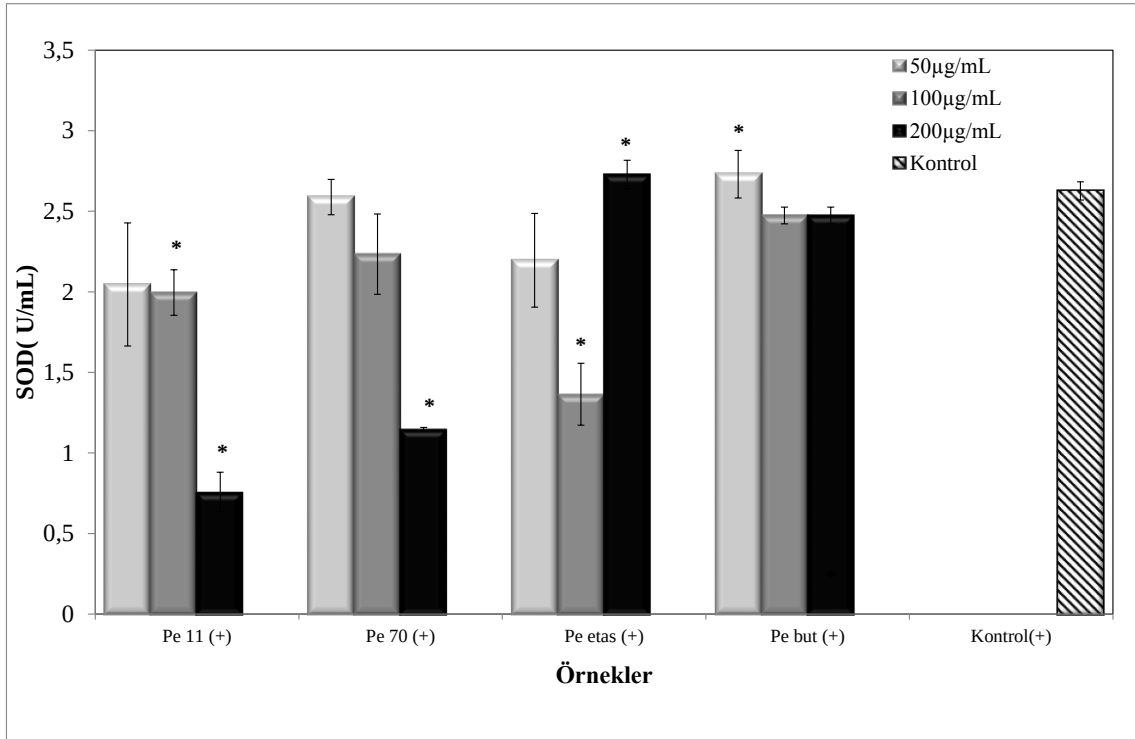
Şekil 4.37. *P. endlicherianum* ekstrelerinin IL-1 β uygulanan A549 hücre süpernatantlarında SOD aktivitesi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir, $p < 0,05$)

IL-1 β uygulanan A549 hücre süpernatantlarında sitozolik SOD aktivitesinde Şekil 4.37'de görüldüğü üzere bütün ekstreler konsantrasyon artışına orantılı olarak SOD miktarını kontrole göre anlamlı şekilde artırmışlardır. %11'lik etanol ve butanol ekstreleri benzer aktivite gösterirken etil asetat ekstresi kontrole göre SOD enzimini en çok artıran ekstre olmuştur.



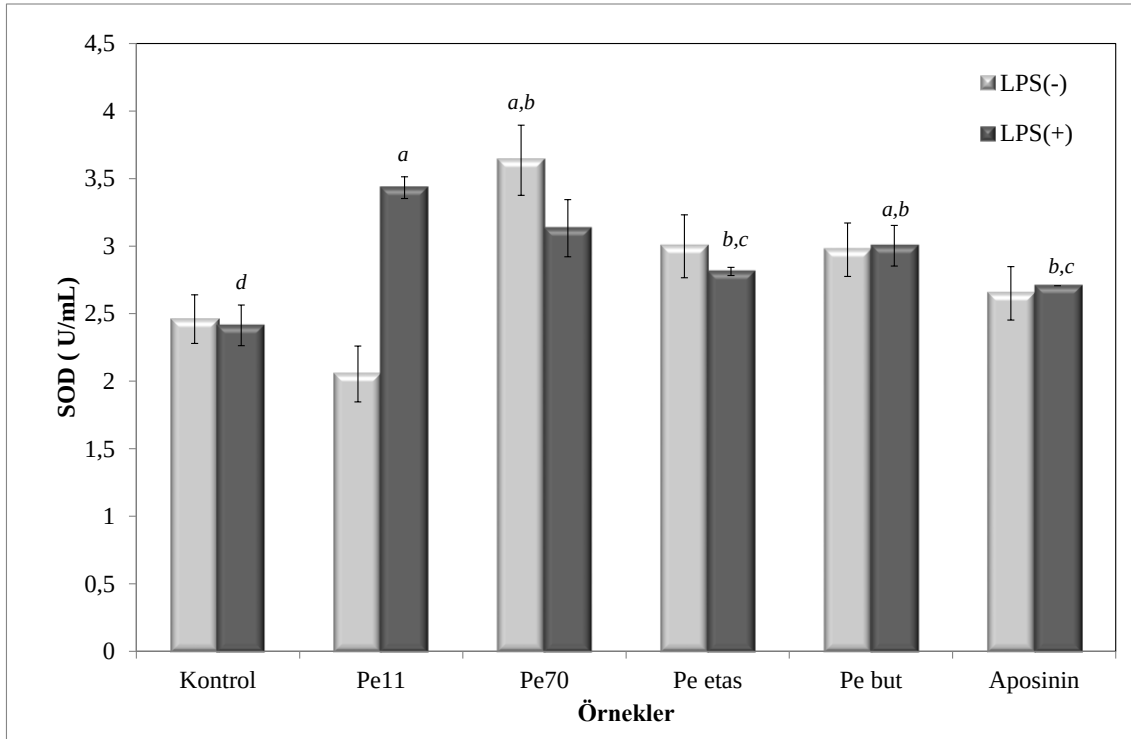
Şekil 4.38. *P. endlicherianum* ekstralarının IL-1 β uygulanmayan A549 hücre lizatlarında SOD aktivitesi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir, $p < 0,05$)

IL-1 β uygulanmayan A549 hücre lizatlarında mitokondriyal SOD aktivitesinde Şekil 4.38'de görüldüğü üzere butanol ekstresi kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermezken %11'lik etanol, %70'lik metanol ve etil asetat ekstraları doza bağlı SOD miktarını artırmışlardır. %70'lik metanol ekstresi 200 μ g/mL konsantrasyonda SOD miktarını en çok arttıran ekstre olarak bulunmuştur.



Şekil 4.39. *P. endlicherianum* ekstrelerinin IL-1 β uygulanan A549 hücre lizatlarında SOD aktivitesi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir, $p < 0,05$)

IL-1 β uygulanan A549 hücrelizatlarında mitokondriyal SOD aktivitesinde Şekil 4.39'da görüldüğü üzere %11'lik etanol, %70'lik metanol ekstreleri konsantrasyon arttıkça SOD aktivitesini azaltmışlardır. Etil asetat ekstrelerinin 100 μ g/mL konsantrasyonda SOD miktarını kontrole göre azaltmış, 200 μ g/mL konsantrasyonda artırmıştır. Butanol ekstresi bütün konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir.



Şekil 4.40. *P. endlicherianum* ekstrelerinin LPS(-) ve LPS(+) RAW 264.7 hücrelerinde SOD aktivitesi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-d), arası aynı harflerle, belirtilmiş barlar $p>0,05$ ' den farklı değildir.)

RAW 264.7 hücrelerinde LPS uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin kontrol gruplarının SOD seviyesinde Şekil 4.40'da görüldüğü üzere anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. %11'lik etanol ekstesi LPS(-) grupta kontrole göre SOD seviyesinde düşüş gösterirken, %70'lik metanol ekstresi artış göstermiştir. LPS(+) grupta bütün ekstreler kontrole göre anlamlı artış göstermiştir.

4.5. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE

4.5.1. Disk Difüzyon

Tablo 4.9. *P. endlicherianum* ekstrelerinin disk difüzyon değerleri

Patojenler	Pe 11	Pe 70	Pe etas	Pe but	Eritromisin	Nistatin
<i>P. vulgaris</i> TSA	9	13	11	D.E	15	-
<i>B. cereus</i> ATCC 7064	10	11	16	13	15	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 3699	10	D.E	20	D.E	28	-
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	D.E	D.E	14	D.E	14	-
<i>S. typhimimum</i> CCM 5445	10	D.E	12	D.E	14	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	14	12	10	23	-
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	12	D.E	12	10	14	-
<i>E. coli</i> ATCC 11230	D.E	13	19	10	16	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	D.E	12	14	D.E	15	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	9	10	18	D.E	29	-
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	D.E	D.E	11	D.E	-	24
<i>C. tropicalis</i> (İZOLAT)	D.E	D.E	9	D.E	-	18
<i>C. glabrata</i> RSKK 0419	D.E	11	16	D.E	-	21

Tablo 4.9'da belirtilen mikroorganizmalara karşı 1 mg/mL konsantrasyonda en aktif ekstre etil asetat ekstresi iken en düşük aktiviteyi butanol ekstresi göstermiştir.

4.5.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerleri (µg/mL)

Tablo 4.10. *P. endlicherianum* ekstrelerinin MİK değerleri (µg/mL)

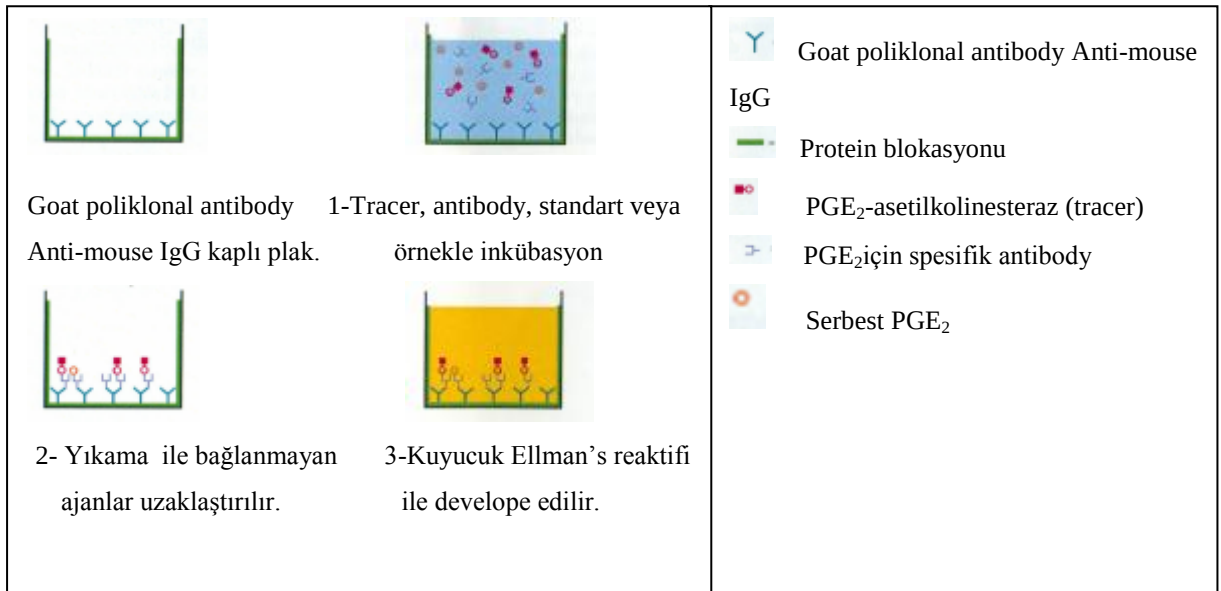
SUŞLAR	MİK (µg. mL ⁻¹)			
	Pe etas	Pe 70	Pe 11	Pe but
<i>P. vulgaris</i> TSA	1000	2000	2000	2000
<i>B. cereus</i> ATCC 7064	1000	2000	4000	2000
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	1000	2000	4000	2000
<i>S. typhimimum</i> CCM 5445	500	1000	1000	1000
<i>S. epidermidis</i> ATCC 3699	250	1000	1000	1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2000	4000	4000	4000
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	250	1000	2000	4000
<i>E. coli</i> ATCC 11230	1000	1000	2000	2000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1000	2000	4000	4000
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	750	750	1000	1000
<i>C. glabrata</i> RSKK 0419	500	1000	2000	4000
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	1000	4000	8000	8000
<i>C. tropicalis</i> (İZOLAT)	2000	4000	8000	8000

Yapılan minimum inhibisyon konsantrasyonu çalışmasında en düşük MİK değeri Tablo 4.10'da görüldüğü üzere etil asetat ekstresine aittir. Aktivite etil asetat > % 70'lik metanol > % 11'lik etanol > butanol ekstreleri şeklindedir.

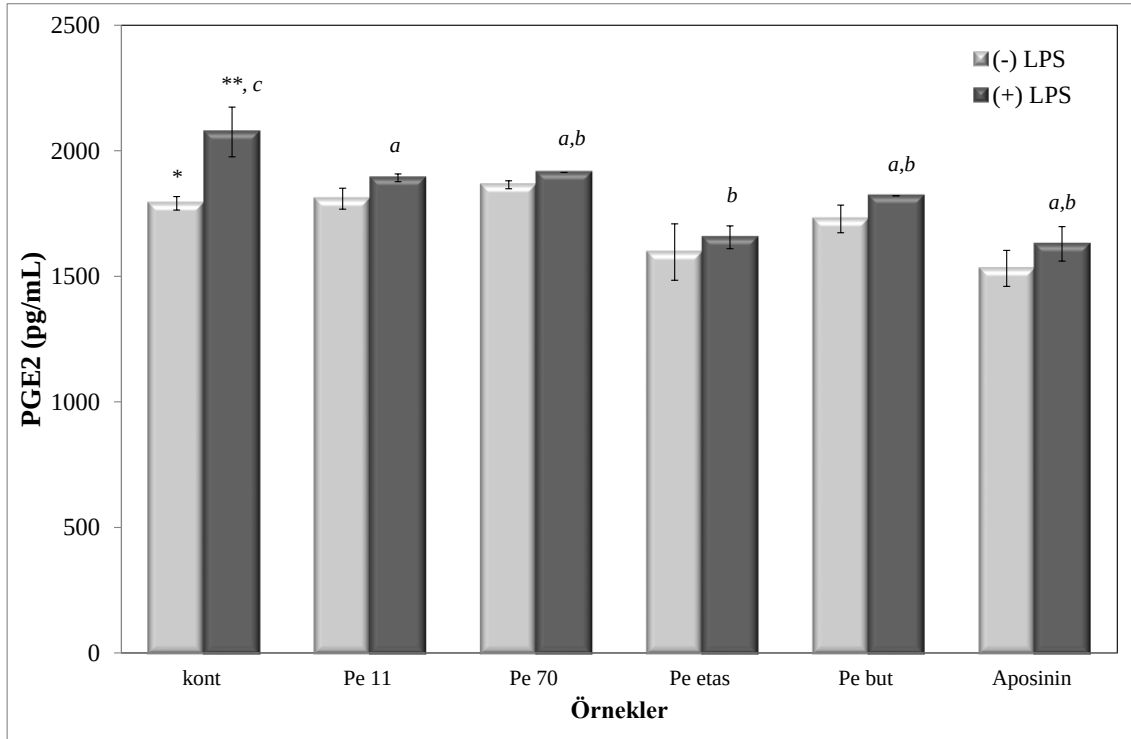
4.6. İMMÜN SİSTEM ÜZERİNE AKTİVİTE

4.6.1. Prostaglandin E₂ Sitokin Seviyesinin Ölçümü

Reaksiyon sınırlı miktarda PGE₂ monoklonal antibody için PGE₂ ve PGE₂-asetilkolinesteraz konjugatı (PGE₂ Tracer) arasındaki kompetisyona dayalıdır. PGE₂ tracerin konsantrasyonu sabitken PGE₂'nin konsantrasyonu değişkenlik gösterir. PGE₂ monoklonal antibodyye bağlanabilme kapasitesi olan PGE₂ tracerin miktarı, kuyucuktaki PGE₂ miktarı ile ters orantılıdır. Antibody- PGE₂ kompleksi daha önceden kuyucuklara kaplanmış olan goat poliklonal antimouse IgG'ye bağlanır. Plak bağlanmayan ajanlardan uzaklaştırılmak için yıkanır ve asetilkolinesteraz için substrat içeren Ellmann's reaktifi eklenir. Bu reaksiyonun ürünü 412 nm'de absorbans veren sarı renk oluşturur ve böylece kuyucuğa bağlanan PGE₂ tracer'ın miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür ve ters orantılı miktara sahip olan PGE₂'nin konsantrasyonu bulunmuş olur.



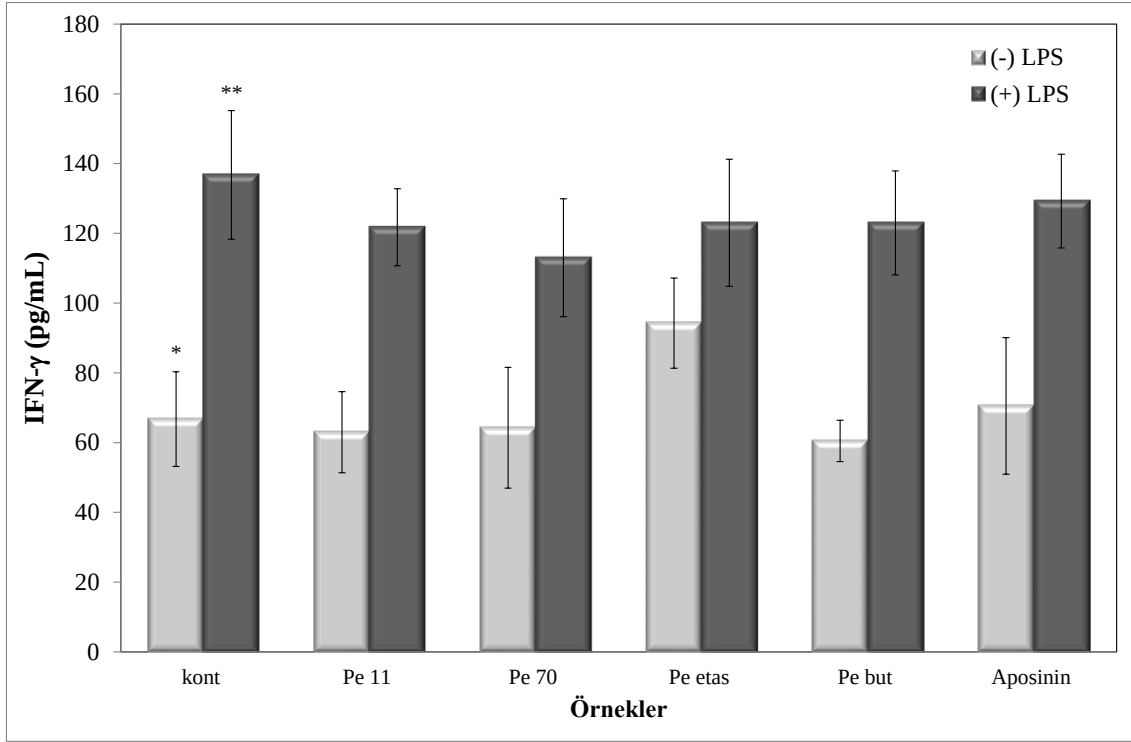
Şekil 4.41. PGE₂ kit ölçüm prensibi



Şekil 4.42. *P. endlicherianum* ekstrelerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde PGE₂ miktarına olan etkisi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-c), (*,**) arası aynı harflerle ve işaretlerle belirtilmiş barlar $p>0,05$ ' den farklı değildir.)

LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda uygulanmayan kuyucuğa göre Şekil 4.42'de görüldüğü üzere PGE₂'de artış olmuştur. LPS ve ekstrelerin uygulandığı kuyucuklarda LPS uygulanmayan kuyucuklara göre PGE₂ miktarı artarken, kontrol kuyucuğuna göre artış olmamıştır. Ekstreler arasında etil asetat ekstresi PGE₂ miktarını diğer ekstrelerle göre daha fazla azaltmıştır. Aposinin ise %70'lik metanol ve butanol ekstreleriyle benzer aktivite göstermiştir.

4.6.2. İnterferon γ Sitokin Seviyesinin Ölçümü

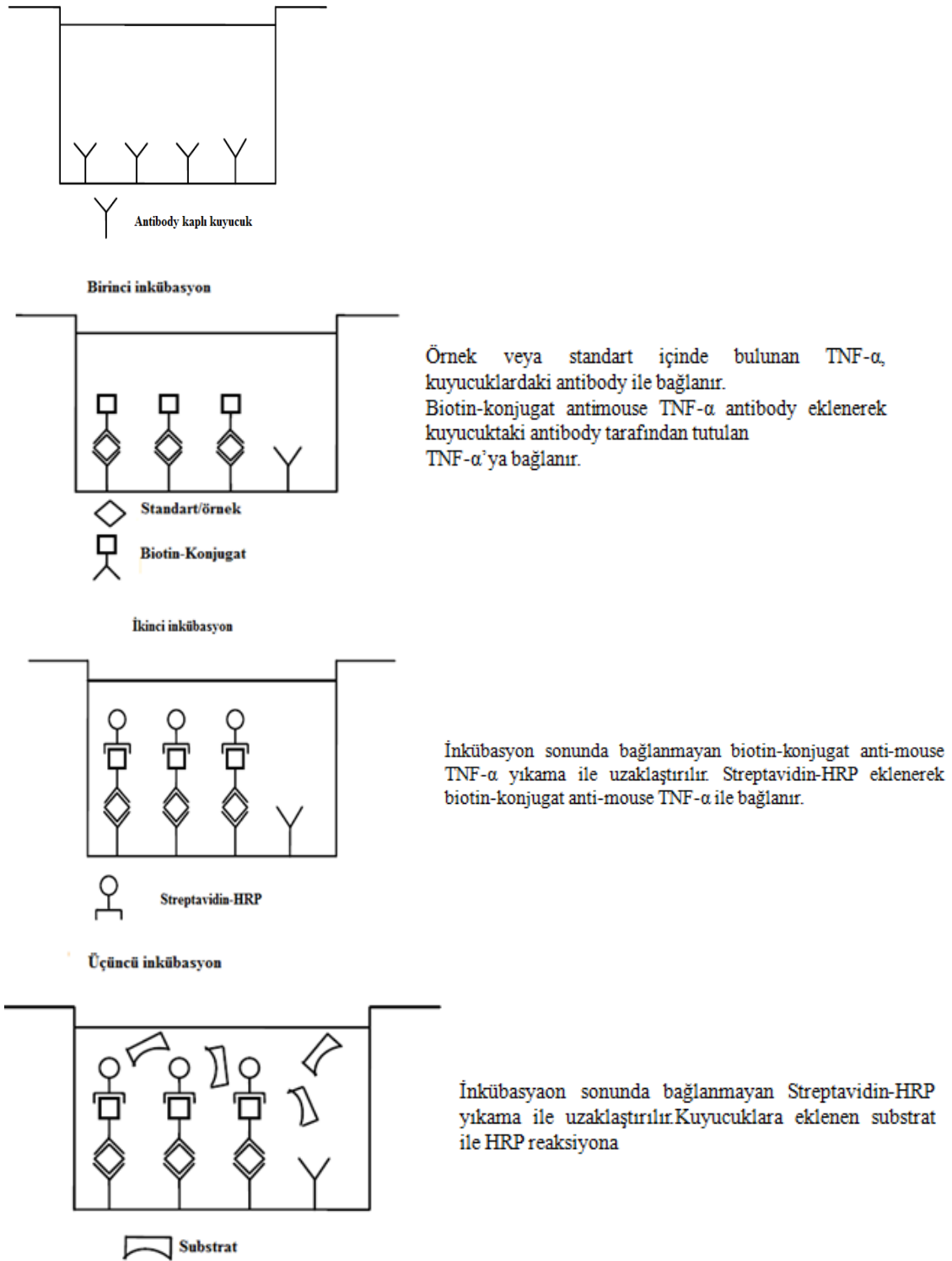


Şekil 4.43. *P. endlicherianum* ekstrlerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde İnterferon γ miktarına olan etkisi. (Ortalama değerler olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir, $p < 0,05$)

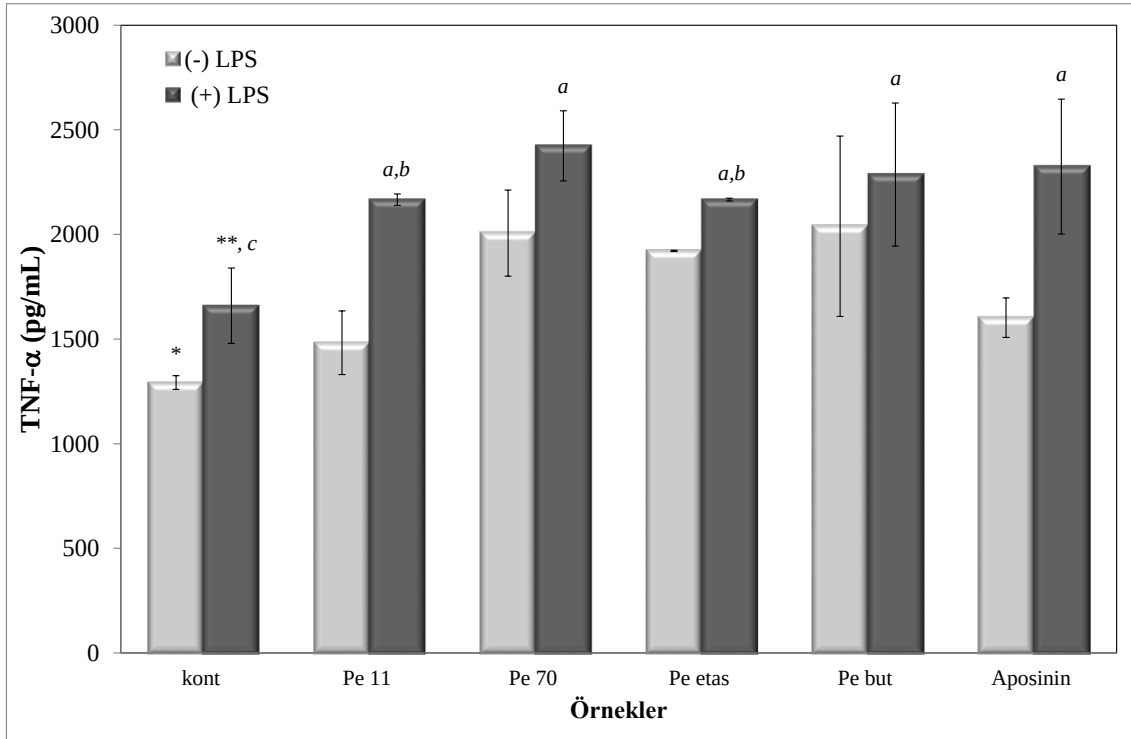
LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda uygulanmayan kuyucuğa göre Şekil 4.43'de görüldüğü üzere IFN- γ da artış olmuştur. LPS ve ekstrlerinin uygulandığı kuyucuklarda LPS uygulanmayan kuyucuklara göre IFN- γ miktarı artarken, kontrol kuyucuğuna göre artış olmamıştır. Bütün ekstrleri LPS uygulanan kontrol kuyucuğuna göre IFN- γ miktarını anlamlı şekilde artırmamış veya azaltmamışlardır. Aposinin ise ekstrlerle benzer aktivite göstermiştir.

4.6.3. TNF- α Sitokin Seviyesinin Ölçümü

Ekstrelerin hücrelere uygulandıktan sonra TNF- α sitokin düzeyi üzerindeki etkileri kit prosedürüne göre analiz edildi. Kit prosedüründe uygulanan basamaklar ve bu basamaklarda gerçekleşen işlemler Şekil 4.44'de gösterilmiştir.



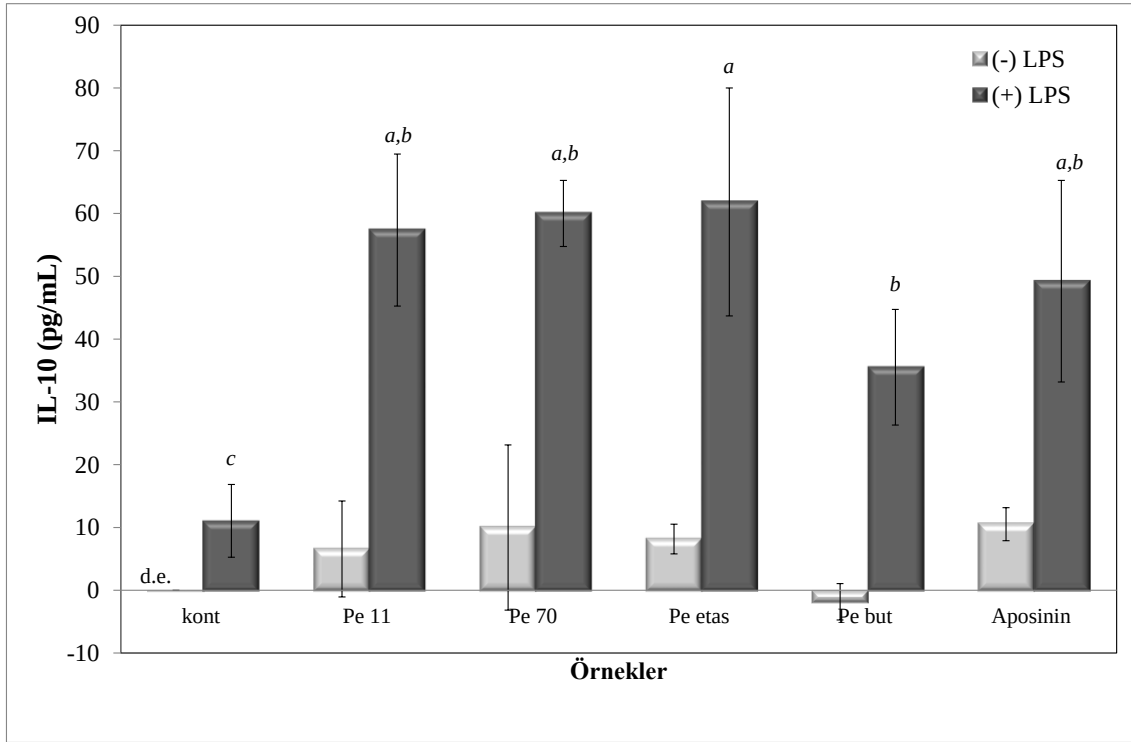
Şekil 4.44. TNF- α kit ölçüm prensibi



Şekil 4.45. *P. endlicherianum* ekstrelerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde TNF- α miktarına olan etkisi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-c), (*,**) arası aynı harflerle ve işaretlerle belirtilmiş barlar $p>0,05$ ' den farklı değildir.)

LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda uygulanmayan kuyucuğa göre Şekil 4.45'de görüldüğü üzere TNF- α 'da artış olmuştur. LPS uygulanan ve uygulanmayan bütün kuyucuklarda ekstreler ve aposinin TNF- α miktarını anlamlı şekilde artırmıştır. % 70'lik metanol, butanol ekstreleri ve aposinin diğer ekstrelerle göre TNF- α miktarını daha çok artırmışlardır.

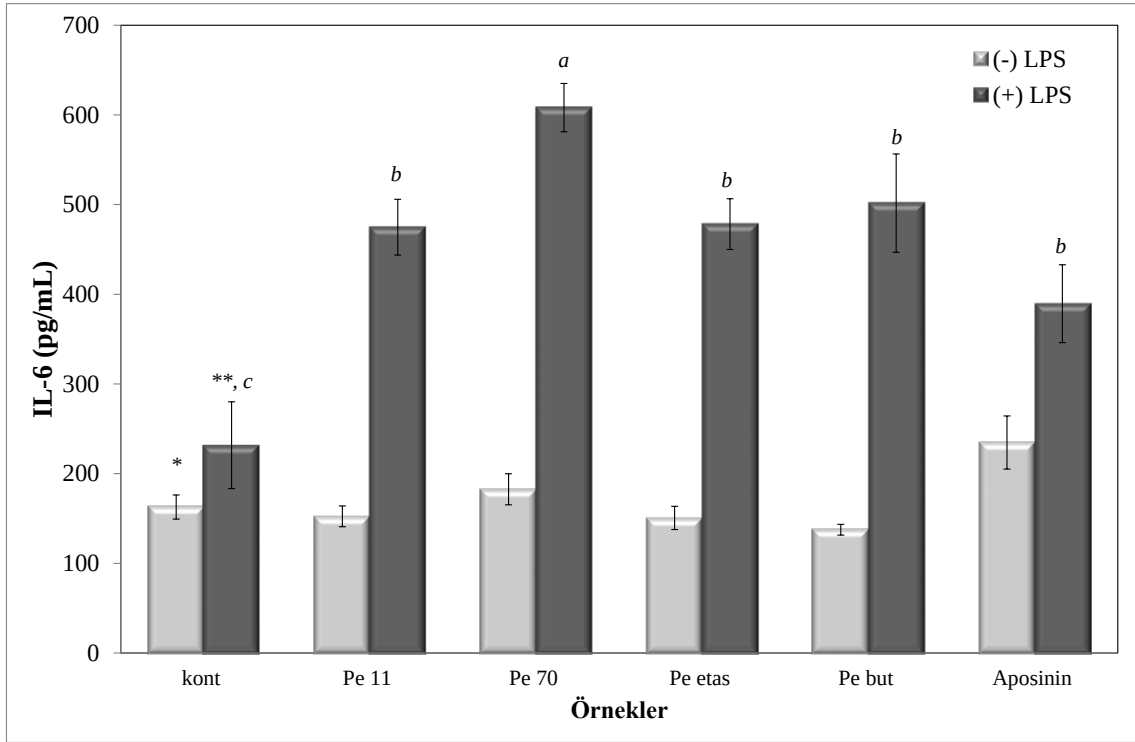
4.6.4. İnterlökin-10 (IL-10) Sitokin Seviyesinin Ölçümü



Şekil 4.46. *P. endlicherianum* ekstrelerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde IL-10 miktarına olan etkisi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-c), (*,**) arası aynı harflerle ve işaretlerle belirtilmiş barlar $p>0,05$ 'ten farklı değildir.)

LPS uygulanmayan kontrol kuyucuğunda ve ekstre içeren kuyucuklarda Şekil 4.46'da görüldüğü üzere IL-10 seviyesi anlamlı miktarda ölçülememiştir. LPS uygulanan ekstre içeren kuyucuklarda IL-10 seviyesi kontrole göre anlamlı artış göstermiştir. IL-10 miktarını en çok artıran etil asetat ekstresi olmuştur. %11'lik etanol, %70'lik metanol, butanol ekstreleri ve aposinin benzer aktivite göstermişlerdir.

4.6.5. İnterlökkin-6 (IL-6) Sitokin Seviyesinin Ölçümü



Şekil 4.47. *P. endlicherianum* ekstrelerinin LPS uygulanan ve uygulanmayan RAW 264.7 hücrelerinde IL-6 miktarına olan etkisi. (Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-c), (*,**) arası aynı harflerle ve işaretlerle belirtilmiş barlar $p>0,05$ ' den farklı değildir.)

LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda uygulanmayan kuyucuğa göre şekil 4.47'de görüldüğü gibi IL-6 seviyesinde artış olmuştur. LPS uygulanmayan ekstre içeren kuyucuklarda IL-6 seviyesinde kontrole göre belirgin bir farklılık yok iken LPS uygulanan ve ekstre içeren kuyucuklar IL-6 seviyesinde belirgin artış göstermişlerdir. En anlamlı artışı %70'lik metanol ekstresi gösterirken, %11'lik etanol, etil asetat, butanol ekstreleri ve aposinin benzer aktivite göstermişlerdir.

4.6.6. İnterlökkin-1 β (IL-1 β) Sitokin Seviyesinin Ölçümü

Kit prosedürüne göre yapılan çalışma sonucu anlamlı sonuçlar bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA SONUÇ

Bu tez kapsamında araştırma konumuz olan *P. endlicherianum* Fenzl. türünün *in vitro* antioksidan, immünmodülatör ve antimikrobiyal etkileri ile bu etkiden sorumlu bileşikleri kantitatif ve kalitatif olarak incelenmiştir.

Geleneksel olarak Afrika kıtasında kullanılan ve daha sonra köklerinden hazırlanmış standardize ekstresi tentür formunda ilaç haline getirilen *P. sidoides* tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de Sağlık Bakanlığı izinli bir ilaçtır. Ülkemizde *Pelargonium* türlerinden *P. endlicherianum* ve *P. quercetorum* yetişmektedir. Bu tezin amacı ise *P. sidoides*'den geliştirilmiş ilaç benzeri bir potansiyel ilacın ülkemizde yetişen *Pelargonium* türlerinin köklerinden elde edilip edilmemesinin araştırılması olmuştur. Sağlık Bakanlığı'nın izniyle UMCA® ticari adı ile Abdi İbrahim İlaç Sanayi tarafından ithal edilen ilacın içeriğinde *P. sidoides* % 11'lik etanol ekstresi bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmada *P. endlicherianum*'un % 11'lik etanol ekstresi kullanılmıştır. Ayrıca genel bir ekstraksiyon çözücüsü olarak da % 70'lik metanol ekstresi kullanılmıştır. Çalışmamızda etken maddelerin fraksiyonlanması amacıyla % 70'lik metanol ekstresi etil asetat ve butanol ile apolar ve polar fraksiyonlara ayrılmıştır. Çalışmada iki ana ekstrenin ve iki fraksiyonun antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri ile immün sistem üzerine etkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

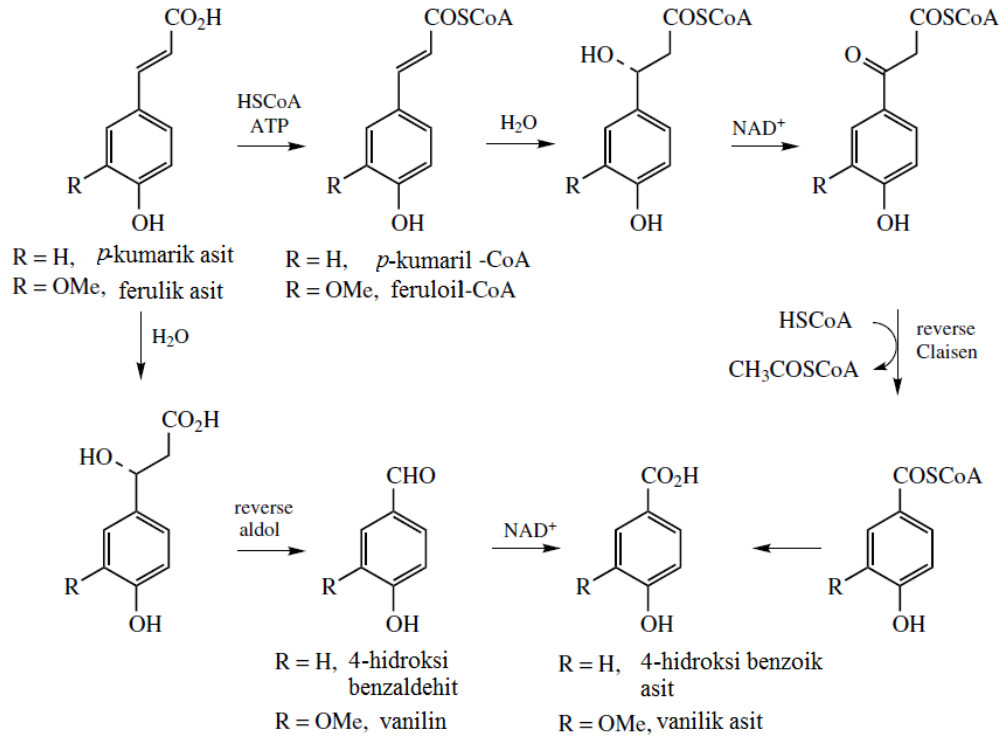
P. endlicherianum'un toprak altı kısımlarından hazırlanan ekstrelerin verimleri % 11'lik etanol ekstresi için % 7,57 ve % 70'lik metanol ekstresi için % 21,37 olup etil asetat ve

butanol fraksiyonlarının verimleri ise sırasıyla % 16,60 ve % 20,50'dir. Bitkinin toplam fenol ve toplam flavonoit miktarı spektrofotometrik yöntemle hesaplanmış ve en yüksek miktar etil asetat ekstresinde (sırasıyla, $305,91 \pm 10,52 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$, $82,16 \pm 0,68 \text{ mg}_{\text{RE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$) bulunmuştur. Toplam flavonol miktarı en yüksek olan ekstre ise % 70'lik metanol ($34,75 \pm 1,61 \text{ mg}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$) ekstresidir (Tablo 4.1).

Ekstrelerin kimyasal bileşimleri YBSK/KS/KS ve YBSK analizleri ile belirlenmiştir. Kütle analizleri sonucu tespit edilen maddelerin standartları temin edilerek kantitatif analizleri ters faz kromatografisi ile yapılmıştır. Bu analizler sonucunda etil asetat, % 70'lik metanol ve % 11'lik etanol ekstralarında tanımlanan aposinin (1-(4-Hidroksi-3-metoksifenil) etanon) ana madde olarak tespit edilmiştir. Ayrıca ekstralarda benzoik asit türevlerinden; gallik asit, 3,5-dihidroksi benzoik asit ve vanilik asit, hidroksisinnamik asit türevlerinden; ferulik asit ve kafeik asit, flavonoit türevlerinden kersetin, tanen türevlerinden ise 1,2,3,4,6-pentagalloyl glukozun varlığı tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Literatürde *P. sidoides* ve *P. reniforme*'nin çeşitli fenolik ve polifenolik bileşikler taşıdığı, köklerinin ise 6,7,8-trihidroksikumarin ve 8-hidroksi-5,6,7-trimetoksikumarin içerdiği belirtilmiştir. Yapısal olarak kumarinle ilişkilendirilen umkalin ana bileşik olarak tespit edilmiştir. Skopoletin, 7-hidroksi-5,6-dimetoksikumarin ve 7-hidroksi-5,6-dimetoksikumarinin 7-metil eter ve 7-glukozit türevi, *P. reniforme* de dahil olmak üzere *P. betulinum*, *P. capitatum*, *P. cucullatum*, *P. hirtum*, *P. luridum*, *P. moreanum*, *P. myrrifolium*, *P. radula*, *P. salmoneum*, *P. sidaefolium*, *P. triste* ve *P. zonale* türlerinde tanımlanmıştır (38). *P. inquinans* türünde aktif bileşik 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glukoz olarak belirlenmiştir (50). Literatürde *P. endlicherianum* ile yapılmış kimyasal bileşim analizi yoktur. Bu tez kapsamında yapılan kompozisyon analizleri sonucunda bitkinin köklerinde kumarin türevi bileşikler belirlenmemiştir.

Asetovanillon olarak da bilinen aposinin, vanilin ve vanilinin oksitlenmiş formu olan vanilik asit türevi bir bileşiktir. Aposinin ilk olarak *Apocynum cannabinum* köklerinden izole edilmiştir (159). Aposinin bitkilerdeki muhtemel sentez yolağı 4-hidroksibenzoik asit türevi olan vanilin ve vanilik asit üzerinden gerçekleşmektedir. 4-hidroksibenzoik asit türevleri şikimik asit yolağında doğrudan veya sinamik asit türevlerinin çifte bağlarının ayrılması ve yan zincirden iki karbon eksilmesi ile de oluşurlar. Şekil 5.1'de

görüldüğü üzere *p*-kumarik asit, vanilik asitin oluşumunda 4-hidroksibenzoik asit ve ferulik asitin prekürsörüdür (160).



Şekil 5.1. Vanilin ve vanilik asit biyosentez yolağı (160).

Ekstrelerin bileşiminde benzoik asit türevlerinin ve ferulik asitin bulunması aposininin prekürsörleri olduğunu düşündürmektedir.

YBSK analizinde aposininle birlikte gelen 1,2,3,4,6-pentagalloil glukoz (PGG), glukoz ve gallik asit içerir. *Paeonia* türlerinde PGG'nin bir asetofenon türevi olan paeonol (1-(2-hidroksi-4-metoksifenil) etanon) ile birlikte tespit edilmesi bizim sonuçlarımızı da doğrulamaktadır (157). Paeonol ve aposinin birbirlerinin sinonimi olan maddelerdir. Bizim analizlerimizde de hem aposinin hem de PGG ekstrlerimizde tespit edilmiştir. Ayrıca *Picrorhiza kurroa* kökleri ile yapılan bir çalışmada aposinin ve türevleri, vanilik asit, ferulik asit ve PGG birlikte teşhis edilmişlerdir (161). Bu da bu bileşiklerin biyosentetik yollarının ortak olduğunu düşündürmektedir. Tez kapsamında çalışılan *P. endlicherianum* köklerinde de bu bileşikler birlikte teşhis edilmiştir.

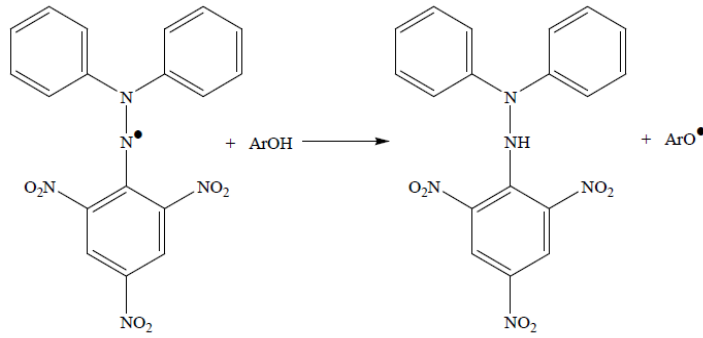
Ekstrelerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasitesi hidrojen verme kapasiteleri olarak değerlendirilir. İndirgeme kapasitesi radikal zincir reaksiyonlarının başlangıç safhasında oldukça önemlidir (142). Literatürde, sulu ekstrlerin demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme kapasiteleri ile antioksidan aktiviteleri arasında yüksek

korelasyon bulunmasına rağmen, bunun her zaman doğru olmadığı kayıtlıdır (143, 162, 163). Bu yöntem hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayini için uygundur (164). Ayrıca yapılan çalışmalarda bitki ekstralarında indirgeme gücü ile antioksidan aktivite arasında doğrudan korelasyon olduğunu gösterilmiştir (165). Çalışmamızda ekstraların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü spektrofotometrik yöntemle test edilmiştir. Sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmış (AscAE) ve bu değerler kullanılmıştır. AscAE değeri büyüdükçe aktivite de artmaktadır. *P. endlicherianum* ekstralarının indirgeme kapasiteleri 0,41-0,81 mmol/g AscAE arasındadır ve en aktif ekstre olarak etil asetat ekstresi (0,81 mmol/g AscAE) bulunmuştur (Şekil 4.24). Fenolik asitler ve flavonoidler doğal antioksidanlar olarak bilinirler. Fenolik asitler, özellikle hidroksisinnamatlar, antioksidan aktivitelerini hidrojen vererek gösterirler (163, 166). Bu tez kapsamında incelenen ekstraların içerisinde tanenler ve fenolik asitler tanımlanmıştır. En yüksek elektron verici ekstre olarak tespit edilen etil asetat ekstresinin kimyasal bileşiminin fenolik maddelerce de zengin olduğu belirlenmiştir. Tanenlerin artan konsantrasyonlarda demir(III)'ü indirgeme güçlerinin arttığı gösterilmiştir (167).

Fenolik asitler ve flavonoidler polar çözücülerde çözünürler ve polar sistemlerde güçlü aktivite gösterirler. Demir(III)'ü indirgeme reaksiyonu ve DPPH• radikal süpürücü etki testleri polar ortamlarda yapılmaktadır. Bu nedenle bu bileşiklerce zengin fraksiyonlar bu deney sistemlerinde etkili olarak bulunmuşlardır. Etil asetat ekstresinin bileşiminde diğer ekstrele göre daha fazla miktarda bulunan 1,2,3,4,6-penta-O-galloil-β-D-glukoz (PGG)'un yapılan çalışmalarda demir indirgeyici aktivitesi IC₅₀ 4.6±0.2 µM değeriyle askorbik asite (IC₅₀ 48±0.5 µM) göre daha güçlü bulunmuştur (168).

Tez kapsamında incelenen sonuçlarda indirgeme kapasitesi ile ABTS•⁺ radikalini süpürücü etkileri arasında korelasyon bulunmuştur ($y=2,697x-0,487$; $R^2 = 0,723$). Yapılan bir çalışmada *P. endlicherianum* köklerinden hazırlanan % 70'lik metanol ekstresinin indirgeyici gücünün % 11'lik etanol ekstresinden daha fazla olduğu gösterilmiştir (67). Başka bir çalışmada *P. reniforme*'nin kök ve yaprak kısımları ile hazırlanan metanol ve su ekstralarının indirgeyici gücü konsantrasyona bağlı artış gösterirken standart olarak kullanılan BHT kadar etkili bulunmamıştır (55). *P. purpureum*'un ise plazma, kalp ve akciğer doku homojenatlarında demir indirgeme kapasitesi ölçülmüş ve ekstrenin etkili olduğu belirtilmiştir (57).

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikali, 517 nm’de maksimum absorbands veren stabil bir radikaldır. Antioksidan özellikli maddeler tarafından elektron ve hidrojen atom transferi ile DPPH[•] radikalinin hidrazin türevlerine indirgendiğinde absorbands düşer (Şekil 5.2.) (99).



DPPH[•] (antioksidant, örn. fenolik) (DPPH-H) (antioksidant serbest radikali)

Şekil 5.2. DPPH[•] radikali ile antioksidan arasındaki reaksiyon

Ekstrelerin azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH[•] radikalini süpürme kapasiteleri fizyolojik pH da incelenmiş ve sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak (mg/mL) verilmiştir. IC₅₀ değeri azaldıkça aktivite artmaktadır. *P. endlicherianum* ekstrelerinin IC₅₀ değerleri 0,23–0,84 mg/mL arasında değişmektedir (Şekil 4.25). *P. endlicherianum* bitkisinden elde edilen %70’lik metanol ve etil asetat ekstrelerinin DPPH[•] radikalini süpürücü etkisi (IC₅₀ 0,23 mg/mL) diğer ekstrelerle göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Ekstrelerin ana bileşeni olan aposininin DPPH[•] radikalini süpürücü etkisi 10 mg/mL’den büyük bulunmuştur ve ekstrelerdeki aktivitenin aposininden kaynaklanmadığı anlaşılmıştır. Ekstrelerin bileşiminde bulunan diğer bir bileşik olan vanilik asitin ise IC₅₀ değeri 0,199 mg/mL olup etil asetat ve %70’lik metanol ekstresinden daha aktiftir. Standart olarak kullanılan ve aynı zamanda ekstrelerin bileşiminde de bulunan gallik asitin IC₅₀ değeri ise 0,023 mg/mL olarak belirlenmiş olup radikal süpürücü etkisi BHA, BHT ve askorbik asitten daha yüksek bulunmuştur. En yüksek aktivite gösteren %70’lik metanol ve etil asetat ekstrelerinin bileşimlerinin tanen türevleri bakımından zengin olması nedeniyle etkiden sorumlu olarak bu bileşikler belirlenmiştir. Ekstrelerin DPPH[•] radikalini süpürücü etkisi ile lipid peroksidasyonunu engelleyici etkisi arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ($y=0,260x-0,064$; $R^2=0,91$). Etil asetat ekstresinin bileşiminde bulunan 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloil- β -D-glukoz (PGG), glukozun pentahidroksi gallik asit

esteri olup gallotanenlerin ve elajitanenlerin genel prekürsörüdür. Yapısal olarak etkili bir radikal süpürücü de *orto*-dihidroksi grup (kateşol yapısı) elektron verici olarak radikallerin hedefi haline gelmektedir. PGG'de *orto*-dihidroksi grupları içeren kateşol yapısının ve beş galloil grubun varlığı antioksidan aktivitesinin yüksek olmasını kesinleştirmektedir. Etil asetat ekstresinde PGG miktarının diğer ekstrele göre daha fazla olması bu ekstrelerin DPPH• radikalini süpürücü etkisinin yüksek olmasını kanıtlamaktadır. Yapılan çalışmalarda PGG' un DPPH• radikalini süpürücü aktivite tayininde IC₅₀ değerinin 1,14 µg/mL olması bileşiğin potent bir antioksidan olduğunu göstermektedir (50).

P. endlicherianum ile daha önce yapılan yüksek lisans tez çalışmasında da % 70'lik metanol ekstresinin IC₅₀ değeri % 11'lik etanol ekstresinden daha düşük bulunmuştur (67). Farklı bir çalışmada ise *P. endlicherianum* türünün toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin DPPH radikalini süpürücü etkisi $7,43 \pm 0,47$ µg/mL, standart olarak kullanılan askorbik asit ise $3,80 \pm 0,17$ µg/mL bulunmuştur. Bu sonuçlara göre bitkinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarının radikal süpürücü aktivitesinin olduğu görülmektedir (66). *P. inquinans* türünün yaprakları ile hazırlanan metanol, etil asetat, butanol, *n*-hekzan ve su ekstreleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikalini güçlü süpürücü etki göstermişlerdir. Etil asetat ekstresi ve bu ekstreten izole edilen 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloil- β -D-glukoz (PGG) daha aktif bulunmuştur (50). Bu bizim sonuçlarımızla da uyum göstermektedir. *P. betulinum* ve *P. crispum* türlerinin (yaprak, yaprak sapı ve gövde) aseton ekstrelesiyile yapılmış olan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikali süpürücü etki tayini deneyinde, IC₅₀ değeri $4,72 \pm 0,14$ µg/mL olan askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmış ve ekstrelerin IC₅₀ değerleri sırasıyla $4,13 \pm 0,14$ µg/mL ve $4,49 \pm 0,18$ µg/mL şeklinde bulunmuştur. Bu iki türde askorbik asit kadar antioksidan aktivite göstermiştir (28).

Hücre membranlarında bulunan lipitler, linoleik asit ve araşidonik asit gibi oksidasyona oldukça müsait doymamış yağ asitleri bakımından zengindirler (169, 170). Bu nedenle, bu tez kapsamında incelenen ekstrelerin antioksidan etkileri taranırken lipitlerin oksidasyonuna ait deney ortamlarının kullanılması önemlidir. Bu amaçla en çok kullanılan deney modellerinden birisi β -karoten-linoleik asit soldurma testidir. Linoleik asitin diallilik metilen gruplarından hidrojen eksilmesiyle peroksil serbest radikalleri oluşarak doymamış β -karoteni oksitler. Ekstrelerin bileşiminde bulunan antioksidan

yapılar β -karotenin hidroperoksit tarafından oksidasyonunu minimize ederler. β -karotenin degradasyon hızı ekstrelerin antioksidan kapasitesine bağlıdır (171). *P. endlicherianum* ekstrelerinde oksidasyonu engelleyici etki zamana bağlı olarak incelenmiş ve zamana bağlı bir değişim gözlenmiştir. % 70'lik metanol ve butanol ekstreleri hemen hemen benzer aktivite göstermiş olup, etil asetat ve % 11'lik etanol ekstrelerinden daha aktiftirler (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27). *P. endlicherianum* ile yapılan farklı bir tez çalışmasında ise kloroform ekstresi ve % 11'lik etanol ekstresi diğer ekstrelerden daha aktif bulunmuştur (67). *P. endlicherianum* toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin β -karoten-linoleik asit beyazlama testinde % inhibisyonu $72,6 \pm 2,96$ iken BHT $96,6 \pm 1,29$ % inhibisyon göstermiştir (66). *P. radula*'nın yapraklarından farklı yöntemlerle hazırlanan su ve etanol ekstreleri standart olarak kullanılan BHA ile benzer aktivite göstermiştir (52).

En çok kullanılan antioksidan yöntemlerinden biri olan $ABTS^{\bullet+}$ / TEAC yöntemi 660, 734 ve 820 nm'de maksimum olan karakteristik uzun dalga boylu absorpsiyon spektrumu gösteren $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonunun absorbansının antioksidan tarafından inhibisyonuna dayanmaktadır (172). Yöntemde hidrojen peroksit ile metmiyoglobinin aktivasyonu sonucu ferrilmiyoglobin oluşur. Bu bileşik daha sonra 2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit) (ABTS) $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonunun oluşmasına neden olmaktadır. Ekstre, $ABTS^{\bullet+}$ radikalleri oluşumundan önce eklenir ve antioksidan kapasitesine göre $ABTS^{\bullet+}$ radikallerinin oluşumunu azaltır (146, 173). Bu çalışmada ise ekstrelerin ve vanilik asitin $ABTS^{\bullet+}$ radikalini süpürücü etkileri 0,50 ve 1 mg/mL dozlarda incelenmiştir. Standartlar 0,25 ve 0,5 mg/mL, aposinin ise 1 ve 5 mg/mL konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Bütün ekstreler 1 mg/mL dozda en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Hiçbir ekstre pozitif standart olarak kullanılan BHT, BHA, gallik asit, rozmarinik asit kadar aktivite gösterememiştir (Şekil 4.28). Bu deneyde de fenolik asitler ve tanen içeriği yüksek olan ekstreler yüksek aktivite göstermiş olup literatürle de uyum göstermektedir. Vanilik asit 0,5 mg/mL konsantrasyonda % 11'lik etanol, % 70'lik metanol ve etil asetat ekstreleriyle benzer aktivite gösterirken, 1 mg/mL konsantrasyonda aktivitede düşüş olmuştur. Aposinin ekstrelerden daha yüksek konsantrasyonda çalışılmış, vanilik asit ve ekstrelerden daha az aktif bulunmuştur. Vanilin ve analoglarının antioksidan aktivitesinin incelendiği bir çalışmada vanilik asitin DPPH radikalini süpürücü etkisi bulunurken aposininin aktivitesinin olmadığı belirtilmiştir, aynı çalışmada $ABTS^{\bullet+}$ radikalini süpürücü etkide vanilil alkol ve vanilik

asitin antioksidan aktivite gösterdiğini, aposinin ve vanilinin 120 dakika boyunca reaksiyon hızının yavaş olduğu belirtilmiştir. 1 mol aposinin 2,5 mol ABTS^{•+} radikalini süpürmüştür. Aposininin oksitlenebilir bir hidroksil grubunun bir ekivalen radikalden daha fazlasını süpürebilmesi radikal ile katım reaksiyonuna bağlıdır ve oksitlenebilir dimer yapısı protokateşik esterlerin toplam radikal süpürücü etkisinin devam etmesini sağlar (174). Bu literatürde bulunan sonuçların, tez kapsamında yapılan aposinin ve vanilik asitin DPPH^{•+} ve ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkileri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ekstrelerin ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkileri ile toplam fenol içeriği arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ($y=0,007x-0,359$; $R^2=0,94$). Farklı bir çalışmada *P. reniforme* köklerinin ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkisi yönünden aktif bulunduğu belirtilmiştir (175). *P. reniforme*'nin yaprak ve köklerinden hazırlanan metanol ekstreleri 0,025-0,5 mg/mL konsantrasyonlarda BHT'den daha aktif bulunurken su ekstrelerinin aktivitesi BHT'den daha düşük bulunmuştur (55).

Lipit peroksidasyonu reaktif oksijen türlerinin birikmiş etkisi olup biyolojik sistemlerin bozulmasına yol açan zincir bir reaksiyondur. Reaktif serbest radikaller, doymamış yağ asitinin metilen grubundan allilik hidrojen atomu çıkarılması ile reaksiyonu başlatırlar. Bağların yeniden düzenlenmesi ile devam eden reaksiyon sonucu stabil dien konjugatlar oluşur (176). Bu çalışmada demir(III) ve askorbik asit varlığında fosfolipit esaslı lipozomlar, hızla hidroksil radikal kaynaklı peroksidasyona tabi tutulmuş ve malondialdehit ve benzer aldehitlerin teşekkülü sağlanmıştır. Oluşan bu reaktif aldehitler 2-tiyobarbitürik asit ile reaksiyona sokularak oluşan pembe renk 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Oluşan renk şiddeti reaktif aldehit miktarı ile doğru orantılı olması nedeniyle lipit peroksidasyon miktarı ve dolayısıyla test maddelerinin antioksidan etkileri de bu şekilde tayin edilmiştir.

P. endlicherianum'dan elde edilen ekstreler 2-tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin (TBARS) oluşumunu engelleyerek güçlü antioksidan etki göstermişlerdir. Ekstrelerden etil asetat ekstresi, en aktif (IC₅₀ 0,05 mg/mL) ekstre olarak tespit edilmiştir. Butanol ekstresi ise en yüksek IC₅₀ değerine sahiptir. Etil asetat ekstresinin bileşiminde tanenler ve fenolik asitler yüksek oranda bulunmaktadır. Aposinin ve vanilik asitin IC₅₀ değeri ekstreler göre oldukça yüksek bulunmuştur (Şekil 4.29). Pentagalloil glukozun lipit peroksidasyonuna olan etkisinin, fare göz lensinde ksantin-ksantin oksidazla oluşturulan hasar sonrası katarakt oluşumunu engellemesi üzerinden değerlendirildiği bir çalışmada

katarakt oluşumunu güçlü bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir (177). 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloil- β -D-glukoz H_2O_2 ile indüklenen hamster akciğer fibroblast hücrelerinde sadece H_2O_2 ile indüklenen gruba göre belirgin aktivite göstermiştir (178). Bu sonuçlara göre, etil asetat ve % 70'lik metanol ekstresinin yüksek aktivite göstermesi 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloil- β -D-glukoz ile ilişkilendirilmiştir. Ekstreler fosfolipitleri oksidasyona karşı hidroksil radikallerini lipit matriksinin içerisinde reaksiyona girmeden önce tutarak korumuşlardır. Bu nedenle ekstreler lipitçe zengin matriksi bulunan biyolojik membranlarda ve gıda ürünlerinde koruyucu olabilirler.

Ekstrelerin demir(II) şelat aktivitesi 10 mg/mL'den büyük bulunmuştur. Ekstrelerin demir(II) şelat aktivitesini serbest radikal süpürücü aktivitelerin sonuçları ile kıyasladığımızda korelasyon bulunmamaktadır. Bu çelişki antioksidan aktivite deneylerinin mekanizmalarının farklılığına bağlanabilir (179). Ayrıca 3-hidroksi-4-keto veya 5-hidroksi-4-keto grup içeren flavonollerin kuvvetli metal şelasyonu aktivitelerinin olduğu ve metallerle stabil kompleksler oluşturdukları literatürlerde kayıtlıdır (180). Ekstrelerin flavonol yönünden zengin olmayışı metal şelatlayıcı özelliklerinin olmaması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca bulduğumuz sonuçlar 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloil- β -D-glukoz içeren *Rhus typhina* L. yaprak ekstresinin (181), Chua et al. (182) ve Tung et al (183) sonuçları ile uyumludur.

Ekstreler spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozunmasını askorbik asitten daha güçlü bir şekilde engellemişlerdir. % 70'lik metanol ve etil asetat ekstreleri (IC_{50} 0,002 mg/mL) en aktif ekstreler olarak bulunmuştur. Bütün ekstreler standart olarak kullanılan askorbik asitten daha aktif bulunmuştur (Şekil 4.36.). Ayrıca ekstrelerin lipit peroksidasyonunu engelleyici kapasiteleri ile spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozunmasını engelleyici etkileri arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ($y=3,73x+0,43$; $R^2 = 0,975$). Spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozunması deneyinde ekstreler aynı konsantrasyonlarda aktivite gösterememişlerdir. Hidroksil radikali canlılarda biyolojik moleküllere hasar veren en reaktif serbest radikallerden biridir. *in vitro* Fenton reaksiyon sisteminde spesifik olmayan ($Fe^{2+}+H_2O_2+EDTA$) ve spesifik olan ($Fe^{2+}+H_2O_2$) hidroksil radikalının yönlendirilmesiyle $OH^\bullet$ radikali deoksiriboza atak eder ve reaktif tiyobarbitürik asit ürünlerine dönüştürür. Ekstrelerin bileşiminde bulunan fenolik gruplar, spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz

bozunması deneyinde $\text{OH}^\bullet$ radikalini süpürücü etkiden sorumludurlar. Ekstrelerin spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozunmasında aktivite gösterememeleri metal şelatlama kapasitelerinin olmaması ile ilişkilendirilmiştir. Deney ortamında EDTA bulunmaması sebebiyle serbest kalan Fe^{+2} ekstreler tarafından şelatlanamamıştır. Smith ve arkadaşlarına göre deoksiriboz degradasyonunu engelleyen moleküller demir iyonlarını da şelatlayarak daha zayıf ve inaktif hale dönüştürebilirler. Bu da bizim sonuçlarımızı doğrulamaktadır (184).

A549 ve RAW 264.7 hücreleri ile yapılan sitotoksisite çalışmalarında toksik olmayan doz belirlenerek her iki hücrede de ekstrelerin glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri üzerine aktivitesi incelenmiştir (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.). A549 hücreleri proenflamatuvar sitokin olan $\text{IL-1}\beta$ ile indüklenerek ekstrelerin enflamasyon oluşumu ile artan reaktif oksijen türlerine olan etkisi incelenmiştir (185). Literatürde $\text{IL-1}\beta$ 'nın A549 hücrelerinde reaktif oksijen türlerini indüklediği belirtilmiştir (186). Ayrıca yapılan farklı bir çalışmada proenflamatuvar sitokinler olan $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ ve $\text{IL-1}\beta$ 'nın insan retina pigment epitel hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak reaktif oksijen türlerini intraselüler ve ekstraselüler üretimini artırdıkları gösterilmiştir (187).

Yaptığımız çalışmada RAW 264.7 ve A549 hücreleri LPS ve $\text{IL-1}\beta$ ile indüklenerek enflamasyon oluşturulmuş ve ROS türlerinin üretiminin artması hedeflenmiştir. RAW 264.7 hücrelerinin LPS ile 6 saat inkübasyonu GSH-Px ve SOD üretiminde LPS uygulanmayan kontrole göre belirgin artış göstermemiştir. Yapılan çalışmalar makrofajların LPS ile indüksiyonu ile oksidatif stresin $\text{TNF-}\alpha$ veya NO salımı ile arttığını göstermiştir. LPS ile 2 saat inkübasyonun oksidatif sinyali artıramadığını, LPS ile uzun süreli maruziyetin $\text{NF-}\kappa\text{B}$ aktivasyonu ile ROS üretimini tetiklediğini göstermiştir (188). Sonuçlarımıza göre LPS ile RAW 264.7 hücrelerinin 6 saat inkübasyonu oksidatif sinyalin tam olarak tetiklenmediğini düşündürmüştür. Ayrıca farklı bir çalışmada ise LPS ile indüklenen insan monosit hücrelerinde LPS sitozolik Cu/Zn SOD seviyesinde değişikliğe neden olmazken mitokondriyal Mn-SOD seviyesini artırmıştır. Çalışmamızda her iki kontrol grubunda SOD seviyesinde farklılık olmaması bu literatürde bulunan sonuçlarla uyumlu bulunmuştur (189). LPS'nin mitokondriyal Mn-SOD seviyesini artırması $\text{TNF-}\alpha$ ve $\text{IL-1}\beta$ 'nin artması gibi hücrelerin enflamasyon mekanizmasına verdiği cevabın sonucu olarak değerlendirilmiştir.

LPS uygulanmayan grupta % 70'lik metanol ekstresi SOD'u belirgin olarak artırırken % 11'lik etanol ekstresi kontrole göre SOD'u azaltmıştır. LPS uygulanan grupta ise en belirgin artışı % 11'lik etanol ekstresi göstermiştir (Şekil 4.40.). Enflamasyon oluşmuş grupta ekstrelerin SOD seviyesini artırması hücrelerin enflamasyona karşı verdiği cevabı güçlendirdiğini doğrulamıştır. Nitekim ekstreler TNF- α seviyesini de artırarak sonuçlarımızı doğrulamıştır. GSH-Px aktivite deneyinde LPS uygulanan kontrol grubunda uygulanmayan gruba göre GSH-Px miktarında artış varken, ekstreler her iki grupta da kontrole göre GSH-Px miktarını artırmışlardır. En belirgin artışı LPS uygulanan grupta etil asetat ekstresi göstermiştir (Şekil 4.35.). Enflamasyon oluşmuş grupta hücrelerin GSH-Px miktarını artırması enflamasyona karşı cevabın oluştuğunu ve ekstrelerin de bu cevabı tetiklediğini göstermektedir. Ekstrelerin sitokin ölçümleri sonucuna dayanarak ve antioksidan aktivite deneylerinde enflamasyon oluşturulmuş RAW 264.7 hücrelerinin enflamasyona olan cevabını GSH-Px'i ve SOD'u artırarak tetiklemeleri ekstrelerin bu hücre hattında immünmodulator aktiviteye sahip olduğunu düşündürmüştür. Ekstrelerin bileşiminde bulunan aposinin ile yapılan bir çalışmada aposininin fare glia hücrelerinde ve diğer hücre tiplerinde ekstraselüler ortamda nitrikoksitin stabil türevi nitrit birikimini, hücre lizatlarında ise nitrik oksit sentazı artırdığı belirtilmiştir. Bu etkilerin H_2O_2 'nin artan üretimine eşlik ettiğini ve LPS ile inkübasyona benzetilerek aposininin LPS gibi ROS türevlerini artırarak NO sentezini indükledikleri rapor edilmiştir (190). Aposininin bu literatürde proenflamatuvar NO'yu artırması sonuçlarımızla uyumlu bulunmuştur.

IL-1 β 'nın yapılan bir çalışmada Mn-SOD ve GSH-Px'i zaman ve doza bağlı olarak artırdığı gösterilmiştir (191). A549 Hücrelerinin IL-1 β ile inkübasyonu sonucu GSH-Px miktarı IL-1 β uygulanmayan kontrole göre artmıştır. Ekstreler ise IL-1 β uygulanmayan grupta doza bağlı olarak GSH-Px'i artırarak antioksidan aktivite göstermişlerdir. IL-1 β uygulanan grupta ise etil asetat, % 11'lik etanol ekstresi ve butanol ekstresi 50 μ g/mL konsantrasyonda GSH-Px'i kontrole göre daha da çok artırarak hücrenin enflamasyona verdiği cevabı artırmışlardır. % 70'lik metanol ekstresi ve % 11'lik etanol ekstresi 200 μ g/mL konsantrasyonda GSH-Px miktarını kontrole göre belirgin şekilde düşürerek immün cevabı baskılamışlardır. Butanol ekstresi bütün dozlarda GSH-Px miktarını kontrole göre azaltmazken anlamlı bir farklılık da göstermemiştir (Şekil 4.33. ve Şekil 4.34.).

A549 hücrelerinde SOD aktivitesi sitozolik Cu/Zn SOD seviyesinin ve mitokondriyal Mn-SOD seviyesinin ölçülmesi ile değerlendirilmiştir. A549 hücre lisatlarında mitokondriyal Mn-SOD, IL-1 β uygulanmayan kontrol kuyucuğunda oldukça düşük miktarlarda iken butanol ekstresi hariç diğer ekstreleri içeren kuyucuklarda doza bağlı artış göstermiştir. Butanol ekstresinde kontrole göre anlamlı sonuç bulunamamıştır. Bu durum bize enflamasyonun oluşmadığı durumda ekstrelerin antioksidan aktivite gösterdiğini düşündürmüştür. IL-1 β uygulanan grupta kontrol kuyucuğunda Mn-SOD miktarında artış gözlenmesi hücrenin enflamasyona karşı cevap oluşturduğunun bir göstergesidir. % 11'lik etanol , % 70'lik metanol ekstreleri 200 μ g/mL konsantrasyonda ve etil asetat ekstresi 100 μ g/mL konsantrasyonda kontrole göre Mn-SOD miktarını düşürerek hücrenin oluşturduğu cevabı baskılamışlardır (Şekil 4.38. ve Şekil 4.39.). Diğer konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir düşüş veya artış gözlenmemiştir ve ekstreler hücrenin oluşturduğu cevapta anlamlı bir değişikliğe neden olmamışlardır.

IL-1 β uygulanan grupta kontroldeki sitozolik Cu/Zn SOD miktarı IL-1 β uygulanmayan kontrole göre daha düşük bulunmuştur. Enflamasyon oluşan grupta Cu/Zn SOD'un düşük bulunması literatürle uyumlu bulunmuştur. Literatürde enflamasyonla birlikte artan TNF- α 'nın ve IL-1 β 'nın Mn-SOD'un artmasını daha hızlı tetiklediğini Cu/Zn SOD'a ise etki etmediklerini belirtmişlerdir (192). IL-1 β uygulanan grupta ekstreler kontrole göre artan konsantrasyonlarda Cu/Zn SOD miktarını artırarak hücrenin enflamasyona oluşturduğu cevabı artırmıştır. IL-1 β uygulanmayan grupta butanol ekstresi hariç diğer ekstreler Cu/Zn SOD miktarını kontrole göre artırırken butanol ekstresi kontrole göre düşürmüştür (Şekil 4.36. ve Şekil 4.37.). Ekstrelerin enflamasyon oluşturulmamış hücrede SOD miktarını artırması antioksidan özellikleri ile ilişkilendirilmiştir.

Gerçek zamanlı hücre analizi deneyinde enflamasyon oluşturulmuş A549 hücrelerinde hücre endeksi, enflamasyon oluşturulmamış gruba göre daha hızlı artış göstermiştir. Enflamasyon oluşan grupta hücrelerin yüzeye tutunma yeteneğinin artması hücre endeksinin de artmasına sebep olmuş ve ekstrelerin uygulandığı her iki grupta da endekste artış gözlenmesi ekstrelerin proeflamatuvar özelliklerinin olduğunu düşündürmüştür.

İmmün sistem ve reaktif oksijen türleri (ROS) birçok farklı yolla birbiri ile ilişki içindedir. ROS türleri enflamasyonu üç şekilde etkiler. Birincisi metabolik ROS türleri

ve nötrofillerden salınan ROS enflamasyonu tetiklenir, ikincisi ROS aktivitesine bağlı olarak T lenfositler baskılanır ve üçüncüsü ise ROS kaynaklı NOX2 ile T hücrelerinin baskılanmasıdır. Enflamasyonda antioksidan alımının proenflamatuvar ROS üzerine olan etkisi geniş ölçekli olarak araştırılmıştır. Ancak deneysel kanıtlar ROS eksikliğinin influenza virüsünün oluşturduğu enflamasyona yol açmasına neden olduğunu göstermiştir. SOD, katalaz, vitamin E ve flavonoit türevi olan rutin alımının hayvan modellerinde oluşturulan artritte bağ hasarını ve enflamasyonu baskıladığı belirtilmiştir. Fare ve ratlarda enflamasyon modeli oluşturularak alınan deneysel veriler antioksidanların antienflamatuvarlar oldukları hipotezini savunmaktadırlar. Oysaki bu sonuçlar antioksidanlarla yapılan birçok çalışmanın antioksidanların enflamasyonu baskılamadığı sonuçları ile kesin olarak çelişmektedir. Bütün bunlar göz önüne alındığında ROS lokal enflamasyonu tetikleyerek otoimmünitenin gelişmesine yardımcı olurken, antioksidanlar sistemik olarak alındığında otoimmün enflamasyonu azaltmada başarısız oldukları bir çok çalışmada gösterilmiştir (193). Yaptığımız çalışmada antioksidan özellikleri bulunan *P. endlicherianum* ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri ile antienflamatuvar özellikleri birçok literatürde de belirtildiği gibi antioksidanların enflamasyonu baskılamadığı sonucu ile uyumlu bulunmuştur.

Tez kapsamında yapılan antimikrobiyal deneylerde insanlarda hastalık etmeni olan bakteriler ve mantarlara karşı *P. endlicherianum* ekstrelerinin aktivitesi incelenmiştir. Çalışılan bu bakterilere ve mantarlara karşı antimikrobiyal özelliği en fazla olan etil asetat ekstresi olarak bulundu (Tablo 4.9. ve Tablo 4.10.). Ekstrelerin MİK değerlerinin antioksidan aktivitelerde bulunan sonuçlarla uyumlu olması fenolik içeriğin antimikrobiyal aktivitede etkili olduğu sonucunu düşündürmüştür. Bu çalışmada elde edilen antibakteriyel sonuçlar aşağıdaki Tablo 5.1’de özetlenmiştir.

S. epidermidis üzerinde etil asetat ekstresinin güçlü etki göstermesi içerdiği tanen türevi 1,2,3,4,6-penta-O-galloil- β -D-glukoz bileşiğinden dolayı olduğu düşünülmektedir. *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* genellikle enfeksiyon bölgesinde bulunan güçlü patojenlerdir. Flavonoit ve tanenlerin de bulunduğu fenolik yapıdaki bileşiklerin antibakteriyel etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (198).

P. sidoides ve *P. reniforme* kök ekstrelerinin, Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*, *S. pneumoniae* ve β -hemolitik *Streptococcus* 1451, Gram negatif bakterilerden *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* üzerinde agar dilüsyon

metoduyla yapılan bir antimikrobiyal çalışmada metanol ekstralarının (MİK 5000–7500 µg/mL) orta derecede antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilirken, etil asetat, *n*-butanol ve su fraksiyonlarının daha yüksek aktivite (MİK 600–1200 µg/mL) gösterdiği ve ayrıca *P. sidoides* ve *P. reniforme*'nin aktiviteleri arasında belirgin bir fark olmadığı vurgulanmıştır. Aynı çalışmada EPs® 7630'un *S.aureus*'un dirençli suşlarına 3300 µg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonunda etkili olduğu ancak antibiyotiklerle kıyaslandığında etkinin zayıf olduğu yorumlanmıştır (42).

Tablo 5.1. *P. endlicherianum*'un antibakteriyal etkileri

Bakteri	Neden oldukları rahatsızlıklar	Etkili ekstre, MİK değeri
<i>P. vulgaris</i>	Üriner sistem enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, menenjit, organ apseleri, özellikle yenidoğanlarda göbek kordonu enfeksiyonları ve bu enfeksiyonlardan kaynaklanan epidemiler halinde görülebilen sepsis ve menenjit (194)	Etil asetat ekstresi, 1000 µg/mL
<i>B. cereus</i>	Gıda kaynaklı zehirlenmeler (45)	Etil asetat ekstresi, 1000 µg/mL
<i>S. typhimurium</i>	Gastroenterit ile sonuçlanan gıda zehirlenmeleri (196)	Etil asetat ekstresi, 500 µg/mL
<i>S. pyogenes</i>	Boğaz ağrısı, farenjit, selülit gibi piyogenik hastalıklar, kızıl ve toksik şok sendromu gibi toksijenik hastalıklar, ateşli romatizma ve akut glomerülonefrit gibi immünolojik hastalıklar (68)	Etil asetat ekstresi, 1000 µg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	Endokardit, solunum sistemi enfeksiyonları, bakteriyemi, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, kulak enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, üriner enfeksiyonlar, gastrointestinal enfeksiyonlar ile deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi çok çeşitli enfeksiyonlar (68)	Etil asetat ekstresi, 2000 µg/mL
<i>S. aureus</i>	Nozokomiyal enfeksiyonlar (197)	Etil asetat ekstresi, 750 µg/mL
<i>S. epidermidis</i>	Kalp kapağı protezi, kalça protezi, kateter veya şant gibi vücuda takılan yabancı materyaller üzerine yerleşerek sepsis, menenjit ve endokardit gibi ciddi enfeksiyonlara sebep olur (68)	Etil asetat ekstresi, 250 µg/mL
<i>E. coli</i>	Diyare, üriner sistem enfeksiyonu, sepsis ve menenjit (199)	Etil asetat ekstresi, 1000 µg/mL
<i>C. albicans</i>	Oral ve vajinal boşlukların mukozal alanlarında ve sindirim sistemine yerleşebilen ve birçok enfeksiyon (200)	Etil asetat ekstresi, 1000 µg/mL
<i>C. glabrata</i>	İmmün sistemi baskılanmış kişilerde yüzeysel ve yaygın hastalıklar (201)	Etil asetat ekstresi, 1000 µg/mL
<i>C. tropicalis</i>	Kandidoz etmeni olarak ölümcül enfeksiyonlar (202)	Etil asetat ekstresi, 500 µg/mL

Tez kapsamında bulunan sonuçlar daha önce *P. endlicherianum* köklerinden hazırlanan % 11'lik etanol ve % 70'lik metanol ekstresi ile yapılan bir yüksek lisans tezi ile kıyaslandığında aynı mikroorganizmalara karşı farklı MİK değerleri bulunmuştur. Bu mikroorganizmalar *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC25922, *C. albicans*, *C. tropicalis*'dir. Yapılan bu çalışmada mayalarda ekstrelerin inhibisyon oluşturmadığı gözlenmiş ve bakteriler için de bizim sonuçlarımızdan daha yüksek MİK değerleri bulunmuştur (68). Yüksek MİK değerlerinin bulunması çözünürlük probleminden kaynaklandığını düşündürmektedir. *P. sidoides* ve *P. endlicherianum*' un antibakteriyal etkinliğinin karşılaştırıldığı farklı bir tez çalışmasında *P. endlicherianum*'un % 70 Metanol kök ekstresi, % 11'lik etanol ekstresinden ve *P. sidoides*'in % 11'lik etanolik kök ekstresinden daha etkili bulunduğu belirtilirken bulunan MİK değerleri sonuçlarımıza yakın değerlerdir (67). Tez çalışmamızda bulunan aktivite sıralaması da etil asetat >%70'lik metanol >%11'lik etanol >butanol ekstreleri şeklinde olup fenolik içerikle doğru orantılı olarak farklı tezlerde bulunan sonuçlar ile de uyumludur (Tablo 4.9. ve Tablo 4.10.).

P. endlicherianum ekstrelerinin immün sistem üzerine olan aktivitesi LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinin saldıgı antienflamatuvar ve proenflamatuvar sitokinlerinin miktar tayini ile incelenmiştir. Makrofaj hücreleri konak savunmasında birçok görevi olan ve aktive olduğunda TNF- α , IL-1 β , ROS, nitrik oksit ve PGE₂ gibi enflamatuvar ve oksidatif faktörlerin üretimini artıran hücrelerdir (203, 204). LPS gram negatif bakterilerin hücre duvarında bol miktarda bulunan bir komponenttir. Patojenlere karşı geliştirilen akut enflamasyonla birçok hücre tipinde IL-8, diğer enflamatuvar sitokinlerin salımını stimüle eder. Bu stimülasyon TLR yolağının aktivasyonu ile başlar ve gen ekspresyonunu NF- κ B ve AP-1 sinyal yolları aracılığıyla artırır. Bakteriyal LPS'nin enflamasyon modeli olarak yaygın kullanılmasının nedeni TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi enflamatuvar sitokinleri taklit edebilmesindendir. LPS'nin TLR4 reseptörüne bağlanması MyD88 aktivasyonu vasıtasıyla NF- κ B, IL-1R kinaz (IRAK) ve NADPH oksidazı aktive eder (205). LPS ile RAW 264.7 hücresinde enflamasyon oluşturularak immünmodulator veya antienflamatuvar aktivitelerin incelendiği birçok çalışma vardır (84, 206).

Tez kapsamında incelenen sitokinlerden biri olan PGE₂ enflamasyon durumunu ve farklı immün hücrelerinin birçok görevini düzenleyen biyolojik olarak aktif bir

faktördür. Genel olarak aktif enflamasyon aracısı, lokal vazodilatasyon tetikleyicisi, nötrofil, makrofaj ve mast hücrelerinin enflamasyonun ilk aşamalarında aktive edicisi olarak bilinse de asıl olarak IL-10 üretimini tetikler (207). PGE₂ miktarını ölçtüğümüz çalışmada LPS uygulanan kontrol grubunda PGE₂'de artış olmuştur. LPS uygulanmamış ekstre içeren örnekler LPS uygulanmayan kontrol grubu ile aynı seviyelerde iken LPS uygulanan gruplarda ekstreler ve aposinin, PGE₂ miktarında anlamlı bir düşüş gösterememişlerdir (Şekil 4.42). Bu durumda ekstrelerin ve hatta antienflamatuvar olarak bilinen aposininin PGE₂ üzerine antienflamatuvar etki gösteremediği tespit edilmiştir. Çalışmada ekstrelerin ve aposininin doza bağımlı çalışamaması etkinin doza bağımlı değişip değişmediği yönünde fikir sahibi olmamızı engellemiştir. PGE₂'nin enflamasyon durumunda üretimini artırdığı IL-10, proenflamatuvar sitokinlerin negatif düzenleyicisi olan antienflamatuvar bir sitokindir. *in vitro* çalışmalarda IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-12'yi baskıladığı gösterilmiştir (208). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar IL-10'un immünstimulan özelliklerinin de olduğu belirtilmiştir. Bu stimülasyon CD41, CD81, T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler üzerine olup IFN- γ 'nın artması ile sonuçlanmaktadır (209). Çalışmalarımızda bulduğumuz sonuçlara göre LPS'nin uygulanmadığı kontrol, ekstre ve aposinin gruplarında IL-10 miktarı 0-10 pg/mL civarında iken LPS' nin uygulandığı bütün gruplarda IL-10, 35-60 pg/mL konsantrasyon aralığında tayin edilmiştir (Şekil 4.46). Aposinin ise ekstrelerle benzer aktivite sergilemiştir. Ekstrelerin antienflamatuvar sitokin olan IL-10'un salınması üzerine etkileri oldukça düşüktür.

IFN- γ intraselüler patojenlere ve tümör oluşumuna karşı immünite için önemli bir sitokindir (210). IFN- γ 'nın deney sonuçlarımıza göre miktarının az ölçülmesinin sebebi baskın olarak doğal öldürücü hücreler ve doğal öldürücü T hücreleri tarafından üretilmeleri olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca IL-10'un IFN- γ üretimini artırıcı etkisi göz önüne alındığında LPS uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasındaki farklılık IL-10 miktarı ile de doğru orantılı bulunmuştur. LPS uygulanan kontrol grubu IFN- γ 'yı artırırken ekstreler ve aposinin kontrol grubuna göre anlamlı inhibisyon göstermemişlerdir (Şekil 4.43). IL-10'un düşük miktarlarda sadece LPS uygulanan gruplarda ölçülebilmesi ve IFN- γ 'nın da aynı profili sergilemesi sonuçların uyumlu olduğunu göstermektedir.

TNF- α immün düzende yaygın olarak bulunan pleitropik bir sitokindir. Genellikle aktive olmuş makrofajlardan salınan özellikle intraselüler bakterilere karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynayan, doğal ve kazanılmış immünitede proenflamatuvar özellikleri ile bilinen bir sitokin olan TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 salınımını artırır (211). Çalışmamızda LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda TNF- α ' da artış olması enflamasyonun oluştuğunu gösterirken, LPS uygulanmayan ve uygulanan bütün kuyucuklarda ekstreler ve aposinin TNF- α 'yı kontrol gruplarına göre artırmışlardır (Şekil 4.45.). Proenflamatuvar TNF- α 'nın artması ekstrelerin immünmodülatör özelliklerinin olabileceğini düşündürmüştür. Ekstrelerin antienflamatuvar IL-10 miktarını artıramaması proenflamatuvar TNF- α 'nın miktarında artışa neden olmuştur çünkü IL-10, TNF- α 'nın inhibitörüdür (212).

Konak savunma mekanizmasında merkezi rol oynayan IL-6 kazanılmış immün cevabı düzenleyen bir sitokindir (213). IL-6 enflamatuvar hücreleri tetikleyerek B hücrelerinin farklılaşmasını ve akut faz reaktanlarını hepatositler aracılığıyla indükler (214). Deney sonuçlarına göre sadece LPS uygulanan kontrol kuyucuğunda IL-6 seviyesinde artış olmuştur. LPS uygulanmayan ekstre içeren kuyucuklarda IL-6 seviyesi kontrole aynı iken aposinin kontrole göre IL-6 seviyesini artırmıştır. LPS'nin uygulandığı bütün kuyucuklarda ekstreler IL-6'yı kontrolün de üzerine çıkarmıştır (Şekil 4.47.). Proenflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın da TNF- α gibi ekstre uygulanan kuyucuklarda kontrole göre artmış olması ekstrelerin proenflamatuvar özelliklerini desteklemiştir.

Proenflamatuvar sitokin olan IL-1 β enfeksiyon ve hasara yanıt veren güçlü bir araçtır (215). Genellikle monosit, makrofaj ve dendritik hücreler aracılığıyla üretilen IL-1 β , enflamatuvar eikozanoitlerin stimülasyonunu artırarak nötrofilleri indükler (216). Çalışmamızda ticari kitle IL-1 β ölçümü yapılamamıştır. Bunun sebebi olarak da RAW 264.7 hücrelerinin IL-1 β 'nın prekürsörü olan sitoplazmik pro-IL-1 β 'yı olgun IL-1 β 'ya kaspaz-1 aracılığıyla dönüştürememiş olmasıdır (217, 218, 219, 220). RAW 264.7 hücreleri ile IL-1 β 'nın ölçülemediği farklı bir çalışmada IL-1 β 'nın makrofajlar tarafından erken salındığına ve yarı ömrünün kısa olmasına bağlanmıştır (221).

Genel olarak ekstrelerin 25 μ g/mL konsantrasyonda enflamasyon durumunda sitokin seviyelerine olan etkisine bakıldığında proenflamatuvar etki gösterdikleri düşünülmektedir, IL-1 β 'nın ölçülememesi ve doza bağımlı etkinin incelenememesi net bir görüşte bulunmamızı engellemektedir. Literatürlerde antienflamatuvar olarak kayıtlı

olmasına rağmen bu çalışma kapsamında yapılan deneylerde aposininin antienflamatuvar etkinliği görülememiştir. Aposininin farklı hücrelerde NADPH oksidazı inhibe ederek antienflamatuvar aktivite gösterdiği yapılan birçok çalışmada belirtilmesine rağmen aposininin LPS ile enflamasyon oluşturulmuş RAW 264.7 hücresinden salınan sitokinler üzerine olan etkisinin çalışıldığı literatür bulunamamıştır (222, 223).

Literatürde aposininin non fagositik hücreler üzerine olan etkisinin incelendiği çalışmaların sonuçlarında tezat olduğu ancak fagositik hücrelerle yapılan çalışmalarda sonuçların tutarlı olduğu belirtilmiştir. Bu da hücrelerde myeloperoksidaz enziminin varlığına bağlanmıştır. Bu enzim aposinini katalize ederek aktiviteden sorumlu bileşik olan dimerize aposinine dönüştürür. Di-aposininin sentezlenerek aposininle birlikte denendiği periferik kan mononükleer hücrelerinde aposininin TNF- α üzerine belirgin antienflamatuvar etkisi gözlenmezken diaposinin TNF- α miktarını aposinine göre azaltmıştır (224). Çalışmamızda aposininin RAW 264.7 hücreleri tarafından diaposinine dönüştürülemez ihtimali de proenflamatuvar etkinin görülmüş olabileceğini düşündürmüştür. Aposinin ile akciğer enflamasyonu oluşturulmuş farelerde yapılan *in vivo* çalışmada intranazal uygulanan aposinin IL-6, IL-12 ve TNF- α üzerine belirgin etki gösterememiştir (225).

P. sidoides'in IFN- γ + LPS ile indüklenen RAW 264.7 hücrelerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-12 ve IL-18 sitokinlerinin mRNA düzeylerini artırarak proenflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada *P. sidoides* ekstraktları ile birlikte kafeik asit türevleri, hirolize olabilen tanenler ve kondanse tanenlerin de belirgin immünmodulator aktivite gösterdikleri belirtilmiştir (60). Farklı bir çalışmada *P. sidoides*'in komponentlerinden biri olan gallik asidin NO açığa çıkarmada ve IFN benzeri aktivite göstermede, umkalinden daha etkili olduğu bulunmuş ve *P. sidoides*'in aktivitesinin gallik asitten kaynaklanabileceği vurgulanmıştır (226). *P. endlicherianum* ekstraktlarının bileşiminde bulunan gallik asitte minör komponent olmasına rağmen proenflamatuvar etkiden sorumlu bileşik olma ihtimalini düşündürmüştür.

Geleneksel olarak kullanılan polifenolik bileşiklerce zengin olan bitkisel kaynaklı ilaçların antimikrobiyal özellikleri immünmodulator özellikleri ile açıklanabilir. Birçok literatür polifenoliklerin enfeksiyon durumunda faydalı etkilerinin olduğunu

kanıtlamıştır. Diğer taraftan polifenolik bileşiklerin NO sentezini inhibe edici, TNF- α veya IL-1 β gibi sitokinlerin salımını azaltıcı etkileri de vardır. Ancak TNF- α 'nın enflamasyonun erken döneminde salımı antimikrobiyal NO ve türevlerinin üretimine yol açar. TNF- α 'nın fazla üretimi ise septik şok oluşumuna yol açabilecek kadar da önemlidir ki buna bağlı olarak da TNF- α inhibitörlerinin romatoid artrit, septik şok, serebral malarya gibi önemli hastalıkların tedavisinde güçlü terapötik etkileri kanıtlanmıştır. Sitokin üretimi üzerine olan bu promotif etki, makrofaj hücrelerinin bakteriyel komponentle aktivasyonunun hassaslaşmış non-spesifik immün sistem reaksiyonları aracılığı ile daha etkili olabilmesi için özel bir etki olarak değerlendirilebilir (193).

Çalışmada *P. endlicherianum* köklerinden iki ana ekstre ve iki fraksiyon çalışılmıştır. Bu hazırlanan % 11'lik etanol ve % 70'lik metanol ekstreleri aktivite deneyleri sonucunda karşılaştırıldığında % 70'lik metanol ekstresinin tüm deneylerde daha aktif olarak bulunduğu tespit edilmiştir. % 70'lik metanol ekstresinin fraksiyonlanması ile elde edilen etil asetat ve butanol fraksiyonlarında aktivite sonuçları ikiye bölünmüş şekildedir. Etil asetat ekstresi olan apolar fraksiyon antioksidan ve antimikrobiyal deneylerde daha iyi sonuç verirken, butanol fraksiyonu olan polar fraksiyon ise immün sistem üzerindeki modülatör aktivite deneylerinde daha aktif bulunmuştur. Fraksiyonların kimyasal bileşimleri incelendiğinde ise etil asetat fraksiyonunun fenolik asitler ve flavonoidler başta olmak üzere fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu ve butanol fraksiyonunda ise daha çok gallik asit türevi bileşiklerin bulunduğu görülmektedir. Ayrıca butanol fraksiyonunda tanımlanamayan fakat kütle spektrumuna dayanarak vanilik asit nüvesi taşıyan aposinin türevi bir bileşiğin de varlığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bulunan aktivite sonuçları literatür verileri ile de uyum içerisindedir. Çünkü *P. sidoides* ekstresinin immün sistem üzerindeki modülatör aktivitesinin ana bileşik olan umkalinden çok gallik asit türevi bileşiklerden ileri geldiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Ülkemizde yetişen *P. endlicherianum* kökleri üzerinde bu şekildeki kapsamlı bir çalışma ilk kez yapılmıştır. Bu nedenle doğrudan bir karşılaştırma mümkün değildir. Karşılaştırmalarımızın tamamı *P. sidoides* ve diğer türler ile yapılmıştır. Bu tezle immün sistem üzerine potansiyel bir modülatör ilaç olabileceği gösterilen *P. endlicherianum*'un etkili bulunan fraksiyonunda immün sistem üzerindeki modülatör

aktivitesinin doza bağımlı olarak çalışılması ve ekstre standardizasyonu bundan sonraki çalışma konularımız olacaktır.

6.KAYNAKLAR

1. Davis PH, Hedge IC. *Pelargonium* L'Hérit In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis PH (eds), University Press, Edinburgh, 1967a; 2: pp 487-489.
2. Davis PH, Hedge IC. *Erodium* L'Hérit In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis PH (eds), University Press, Edinburgh, 1967b; 2: pp 475
3. Davis PH, Hedge IC. *Geranium* L. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis PH (eds), University Press, Edinburgh; 1967c; 2: pp 451
4. Davis PH, Hedge IC. *Berberis* Steph. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis PH (eds), University Press, Edinburgh; 1967d;2: pp 451
5. Davis PH. *Geranium* L. In: Flora of Turkey and East Aegean Islands, Davis PH (eds), University Press, Edinburgh, 1966;2:pp 441-474
6. Davis PH, Hedge IC. Geraniaceae In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis PH (eds), University Press, Edinburgh; 1967e;2: pp 487-489
7. Lis-Balchin M. Essential oils and 'Aromatherapy': their modern role in healing, J. Roy. Soc. Health 1997; 117: 324-329 .
8. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasotik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ders Kitapları, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1998: 294
9. Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E, Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116, İzmir, 2000: 260-261

10. Lis-Balchin M, *Geranium* and *Pelargonium*, Taylor & Franchis Group, London, UK, 2002: 1-7
11. Davis PH, Mill RR, Kit T. *Pelargonium* L'Hérit In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis PH (eds), University Press, Edinburgh, 1988;10: pp 106
12. Röschenbleck J, Albers F, Müller K, et al. Phlogenetics, charecter evolution and a subgeneric revision of the genus *Pelargonium* (Geraniaceae). *Phytotaxa* 2014; 159: 31-76.
13. Mabberley DJ. The Plant Book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants Utilizing, Cambridge University Press, United Kingdom, 1997, 536
14. Güner A. Türkiye Bitkileri Listesi Damarlı Bitkiler, Nemaş Nurtan Ambalaj ve Matbaacılık San. Ve Tic. Aş, İstanbul, 2012: 520
15. Bakker FT, Culham A, Hettiarachi P, et al. Phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae) based on DNA sequences from three genomes. *Taxon* 2004; 53(1): 17-28.
16. Bakker FT, Culham A, Gibby M. Phylogenetics and diversification in *Pelargonium*, In: Hollingsworth P, Bateman R, Gornall R. (eds), *Molecular Systematics and Plant Evolution*, Chapman & Hall, London, 1999, pp 353-374
17. Helbrugge A, Culham A, Gibby M. 1998. Phylogenetic relationships within *Pelargonium* section *Peristera* (Geraniaceae) inferred from nrDNA and cpDNA sequence comparisons. *Plant Syst Evol* 1998; 211: 273–287.
18. Van der Walt JJA, Albers F, Gibby M, et al. A Biosystematic Study of *Pelargonium* section *Ligularia*: 3. Reappraisal of section *Jenkinsonia*. *S Afr J Bot* 1997; 63: 4-21.
19. Van der Walt JJA, Albers F, Gibby M, et al. A Biosystematic study of *Pelargonium* section *Ligularia*: 1. A new section *Subsucculentia*. *S Afr J Bot* 1995; 61: 331-338.
20. Web_1. (2013). Wild Flowers of Turkey. <http://yabanicicek.com/#a16> (20.02.2014)
21. Web_2. (2015). Türkiye Bitkileri Veri Servisi. <http://www.tubives.com/index.php?sayfa=karsilastir> (20.02.2015)

22. Uce İ, Tunçtürk M. Hakkâri’de Doğal Olarak Yetişen ve Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Yabani Bitkiler. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 2014; 7 (2): 21-25.
23. Web_3.(2014). Cotswold Garden Flowers.
<http://www.cgf.net/plantdetails.aspx?id=9743>. (20.02.2015)
24. Lewu FB, Grierson DS, Afolayan AJ. Morphological diversity among accessions of *Pelargonium sidoides* DC. in the Eastern Cape, South Africa. *Genet. Resour. Crop.*2006; 54: 1-6.
25. Maree JE. Development of a Quality Control Protocol for *Pelargonium sidoides* DC. Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Magister Technologiae, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Science, Tshwane University, Pretoria, 2009: 6-7
26. Kolodziej H. Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabo. *Phytomedicine* 2007; 14 (6): 9-17.
27. European Pharmacopoeia, *Pelargonii radix (Pelargonium sidoides* DC. and/or *P. reniforme* Curt.), Fifth edition, Suppl. 7, Council of Europe, Strasbourg, France 2005: 5091
28. Lalli YY, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, et al. in vitro biological activities of South African *Pelargonium* (Geraniaceae) species. *S Afr J Bot* 2008; 74: 153–157.
29. Unathi M, AlvaroV, Emmanuel S, et al. Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. *J Ethnopharmacol* 2013; 148: 45–55.
30. Mabona U, Van Vuuren SF. Southern African medicinal plants used to treat skin diseases, . *S Afr J Bot* 2013; 87: 175–193.
31. Van Wyk BE. The potential of South African plants in the development of new medicinal products. *S Afr J Bot* 2011; 77: 812–829.
32. Brendlera T, Van Wyk BE. A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae), *J Ethnopharmacol* 2008; 119: 420–433.

33. Van Wyk BE, de Wet H, Van Heerden FR. An ethnobotanical survey of medicinal plants in the southeastern Karoo, South Africa. *S Afr J Bot* 2008; 74: 696–704.
34. Namrita L, Navneet K. Are plants used for skincare in South Africa fully explored? *J Ethnopharmacol* 2014; 153: 61–84.
35. Maher B, Monique SJS, Sami S, et al. Chemical Composition and Biological Activities of Polar Extracts and Essential Oil of Rose-scented Geranium, *Pelargonium graveolens*. *Phytother Res* 2013; 27: 1206–1213.
36. Madikizela B, Ndhlala AR, Finnie JF, Van Staden J. Ethnopharmacological study of plants from Pondoland used against diarrhoea. *J Ethnopharmacol* 2012; 41: 61– 71.
37. Anthony JA, Donald SG, Wilfred OM. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the management of skin disorders among the Xhosa communities of the Amathole District, Eastern Cape, South Africa. *J Ethnopharmacol* 2014; 153: 220–232.
38. Saraswathi J, Venkatesh K, Nirmala B, et al. Phytopharmacological importance of *Pelargonium* species. *J Med Plants Res* 2011; 5(13): 2587-2598.
39. Watt JM, Breyer-Brandwijk MG. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. E. & S. Livingstone ltd, London, 1962: 453-455
40. Web_4. (2014). Plantz Africa.
<http://www.plantzafrica.com/plantnop/pelargobetul.htm> (10.01.2015)
41. Web_5.(2014). Plantz Africa.
<http://www.plantzafrica.com/plantnop/pelargoniumcucull.htm> (10.01.2015)
42. Kolodziej H, Kiderlen AF. *in vitro* evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation EPs® 7630. *Phytomedicine* 2007; 14 (6): 18-26.
43. Jazayeri SB, Amanlou A, Ghanadian N, et al. A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. *DARU* 2014; 22:17

44. Taherpour AA, Maroofi H, Kheradmand K. Chemical composition of the essential oil of *Pelargonium quercetorum* Agnew. of Iran. Nat Prod Res 2007; 21(1): 24–27.
45. Lis-Balchin M, Geranium oil, Int J Aromather 1996; 7: 18-20.
46. Web_ 6. (2014). International Organization for Standardization.
<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:4731:ed-3:v1:en>. (17.12.2014)
47. Lis-Balchin M. Aromatherapy Science, Pharmaceutical press, London, 2006: 196-201
48. Bozan B, Ozek T, Kürkcüoğlu M, Kırimer N, Başer KHC. The analysis of essential oil and headspace volatiles of the flowers of *Pelargonium endlicherianum* used as an anthelmintic in folk medicine. Planta Med 1999; 65(8): 781-782.
49. Jimenez M, Garcia-Carmona, F. Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase. J Sci Food Agric 1999; 79: 1993-2000.
50. Piao X, Piao XL, Kim HY, et al. Antioxidative Activity of Geranium (*Pelargonium inquinans* Ait) and its Active Component, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -Dglucose. Phytother Res 2008; 22, 534–538.
51. Latté KP, Kolodziej H. Anti-oxidant properties of phenolic compounds from *Pelargonium reniforme*. J. Agric. Food Chem 2004; 52: 4899–4902.
52. Petlevski R, Flajs D, Kalodera Z, et al. Composition and antioxidant activity of aqueous and ethanolic *Pelargonium radula* extracts. S Afr J Bot 2013; 85: 17–22.
53. Koutelidakis AE, Argiri K, Serafini M, et al. Green tea, white tea, and *Pelargonium purpureum* increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. Nutrition 2009; 25: 453– 458.
54. Pepeljnjak S, Kalodera Z, Zovko M. Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (Cav.) L'Hérit. Acta Pharm 2005; 55: 431–435.
55. Adewusi EA, Afolayan AJ. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of the roots and leaves of *Pelargonium reniforme* Curtis (Geraniaceae). Afr J Biotechnol 2009, 8 (22): 6425-6433.
56. Wittschier N, Faller G, Hensel A. An extract of *Pelargonium sidoides* (EPs®7630) inhibits in situ adhesion of *Helicobacter pylori* to human stomach, Phytomed 2007; 14: 285–288.

57. Beil W, Kilian P. EPs 7630, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *Phytomed* 2007; 6: 5-8.
58. Nkami Mativandlela SP. Evaluation of isolats and identified phenolics from *Pelargonium sidoides* against mycobacterium tuberculosis, other bacteria and fungi, Master's Thesis, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Universtiy of Pretoria, Pretoria, 2005: 70
59. Kolodziej H, Kayser O, Radtke OA, et al. Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. *Phytomed* 2003; 10(4): 18–24.
60. Kolodziej H, Burmeister A, Trun W, et al. Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania* major-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Food Bioorg Med Chem* 2005; 13, 6470–6476.
61. Trun W, Kiderlen AF, Kolodziej H. Nitric oxide synthase and cytokines gene expression analyses in *Leishmania*-infected RAW 264.7 cells treated with an extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630). *Phytomed* 2006; 13, 570–575.
62. Conrad A, Hansmann C, Engels I, et al. Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) improves phagocytosis, oxidative burst, and intracellular killing of human peripheral blood phagocytes in vitro. *Phytomed* 2007;14: 46–51.
63. Neugebauer P, Mickenhagen A, Siefer O, Walger MA. New approach to pharmacological effects on ciliary beat frequency in cell cultures exemplary measurements under *Pelargonium sidoides* extract (EPs 7630). *Phytomed* 2005; 12: 46-51.
64. Schnitzler P, Schneider S, Stintzing FC, et al. Efficacy of an aqueous *Pelargonium sidoides* extract against herpesvirus, *Phytomed* 2008; 15: 1108-1116.
65. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl JJr. Investigation of the influence of EPs® 7630, a herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides*, on replication of a broad panel of respiratory viruses. *Phytomed* 2011; 18: 384–386.
66. Tepe B, Sökmen M, Akpulat HA, et al. Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey. *Sideritis libanotica* Labill. subsp. linearis

- (Bentham) Borm. *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn. from Turkish flora. Food Chem 2006; 98: 9–13.
67. Çakal S. *Pelargonium endlicherianum* Fenzl.(Geraniaceae) kök ekstrelerinin UMCA® preparatı ile karşılaştırılmalı araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2009, 15-27
 68. Taşkın OM. *Pelargonium endlicherianum* kök ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2010, 18-20, 33-40
 69. Ozbilge H, Kaya EG, Taskin OM, et al. Antimicrobial activity of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. (Geraniaceae) roots against some microorganisms. J Med Plants Res 2010; 4(24): 2647-2650.
 70. Aztopal N, Cevatemre B, Yilmaztepe A, et al. *Pelargonium quercetorum* Ekstraktı Akciğer Kanseri Tedavisinde Yeni Bir Ümit Olabilir mi? 21. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s 371-372, 3-7 Eylül 2012, İzmir.
 71. Liu ZQ. Chemical Methods To Evalute Antioxidant Ability. Chem Rev 2010; 110(10): 5675-5691.
 72. Koşar M, Göger F, Baser KHC. *in vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. From Turkey. J Agric Food Chem 2008; 56(7): 2369-2374.
 73. Evans R, Mİller CA, Paganga NJ. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 1997; 2: 152-159.
 74. Julio F, Turrens J. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. Physiol 2003; 552(2): 335–344.
 75. Cooper R. Age Reversing Free Radical Fighters Antioxidants, Woodland Publishing, Utah, 1997: 5-11.
 76. Usmar VD, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. FEBS Lett 1995; 369: 131-135.
 77. Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. Food Chem Toxicol 1995; 33: 601-617.
 78. Halliwell B, Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol. 2006; 141(2): 312–322.
 79. Aydın A, Sayal A, Işimer A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 2001; 20: 2-70.

80. McCord J. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 2000; 108: 652-659.
81. Peltoketo A. Oxidation and Its Prevention: *in vitro* Evaluation of the Antioxidant Properties of Natural Phenolic Substances Using The Free Radical DPPH[•] Method, Master's Thesis, University of Helsinki, Division of Pharmacognosy, Helsinki Finland, 2000: 20.
82. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, et al. Biological aspects of reactive nitrogen Species. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 385-400.
83. Cheng A, Wan F, Wang J, et al. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 43–50.
84. Yoon SB, Lee YJ, Park SK, et al. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated, RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2009; 125: 286–290.
85. Lorenzo FG, Alonso BO. Oxidative stress and antioxidant supplementation in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 870-871.
86. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS*. 1990; 15: 129-135.
87. Stocks J, Dormandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *British J Haematol* 1971; 20: 95-111.
88. Stocks J, Dormandy TL, Offerman EL, Moddel CB. The susceptibility to autoxidation of human red cell lipids in health and disease. *British J Haematol* 1972; 23: 713-724.
89. Collier A, Rumley A, Rumley A, et al. Free radical activity and hemostatic factors in niddm patients with and without microalbuminuria. *Diabetes* 1992; 41: 909-913.
90. Morel D, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J. Lipid Res* 1983; 24: 1070-1076.
91. Shahidi F, Naczki M. Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press LLC, Boca Raton, 2004: 397-439
92. Young I, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 2001; 29: 358-362.

93. Larson RA. Naturally occurring antioxidants. Lewis Publishers, New York, 1997:1-15
94. Stadtman ER, Levine RL. Protein Oxidation. Ann New York Acad Sci 2000; 899: 191–208.
95. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease, FASEB J 2003; 17(10): 1195-1214.
96. Rees MD, Kennett EC, Whitelock JM, et al. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. Free Radical BioMed 2008; 44: 1973–2001.
97. Göger F. *Salvia virgata* Jacq. ve *Salvia halophila* Hedge'nin Antioksidan Etkilerinin ve Bileşimlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2006: 98
98. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, J Control Release 2006; 113: 189-207.
99. Bachmayer O. Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Culinary Herbs, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2004: 85
100. Koca N, Karadeniz F. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri, Gıda Mühendisliği Dergisi 2003; 6: 32-37.
101. Cadenas E, Packer L. Handbook of Antioxidants, (2nd ed), Marcel and Dekker Inc, United States of America, 2002, 549-615
102. Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik Gelişim 1998; 11: 342-346.
103. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. Int Immunopharmacol 2001; 1(4): 625–635.
104. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. Clin Microbiol Rev 2009; 22(2): 240–273.
105. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. Science 2010; 327: 291-295.
106. Jin M, Iwamoto T, Yamada K, et al. Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. Biosci Biotechnol Biochem 2011; 75 (7): 1-7.

107. Lewinson W, Jawetz E. İmmünoloji. In: Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji,(5th ed), Dündar İH (ed), Barış Kitabevi/Appleton ve Lange, İstanbul,1998: 327-400
108. Başaran A. Tıbbi Biyoloji (8.baskı), Pelikan Yayıncılık, İstanbul, 2010: 364-371
109. Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmünoloji (1.baskı), Camcıoğlu Y, Deniz G(eds), İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2007:1-83
110. İnci A, Bişkin Z. Review Articles Toll-Like Reseptörler ve Protozoon Enfeksiyonlarındaki Roller, Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2007; 4(2): 121-128.
111. Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012; 4:a006049
112. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. J Clin Invest 1997; 100: 6-10.
113. Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, et al. Neutrophils in the innate immune response. Arch Immunol Ther Exp 2005; 53: 505–517.
114. Lewinson W, Jawetz E. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji (6.baskı), Özgünen T (eds), Güneş Kitabevi, İstanbul 2001: 407
115. Lee YG, Byeona SE, Kima JY, et al. Immunomodulatory effect of *Hibiscus cannabinus* extract on macrophage functions. J Ethnopharmacol 2007; 113: 62–71.
116. Sato M, Sano H, Iwaki D, et al. Direct Binding of Toll-Like Receptor 2 to Zymosan, and Zymosan-Induced NF- κ B Activation and TNF- α Secretion Are Down-Regulated by Lung Collectin Surfactant Protein A1. J Immunol 2003; 171: 417-425.
117. Fuentes AL, Millis L, Sigola LB. Laminarin, a soluble beta-glucan, inhibits macrophage phagocytosis of zymosan but has no effect on lipopolysaccharide mediated augmentation of phagocytosis. Int Immunopharmacol 2011; 11: 1939–1945.
118. Motoyama K, Hashimoto Y, Hirayama F, et al. Inhibitory effects of 2,6-di-O-methyl- α -cyclodextrin on Poly I:C signaling in macrophages. Eur J Pharm Sci 2009; 3 (6): 285–291.
119. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell 2006; 124(4): 783–801.

120. Taira J, Ohmine W, Ogi T, et al. Suppression of nitric oxide production on LPS/IFN- γ -stimulated RAW264.7 macrophages by a novel catechin, pilosanol N, from *Agrimonia pilosa* Ledeb. Bioorg Med Chem Lett 2012; 22: 1766–1769.
121. Özbilge H, Kaya E. Lipopolisakkarit ile uyarılmış makrofajlarda propolisin sitokin salınımı üzerine etkileri. J Clin Exp Invest 2011;2 (4):336-370.
122. Paul WE. Fundamental Immunology (5th ed), Lippincott Williams & Wilkins, China,2003: 672-677
123. Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology, (5th ed) The Immune System in Health and Disease, Author Information New York: Garland Science; 2001, 1055-1106
124. Baykal Y, Karaayvaz M, Kutlu M. İnterlökinler. T Klin J Med Sci 1998; 18: 77-84.
125. Yeşilada E. Makrofaj ve lenfosit kaynaklı sitokin çalışmalarının halk ilaçlarının biyolojik etki değerlendirmesinde rolü. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, s 49-57, 29-31 Mayıs 2002, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir
126. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. İmmünoloji (7.Baskı), 01-8, Çeviri Editörü İmir T, Özkan Matbaacılık, Ankara, 2008:19,87,105,127-235.
127. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P. Moleküler Hücre Biyolojisi (6.Baskı), 94-9, Çeviri Editörü Geçkil H, Özmen M, Yeşilada Ö, Özkan Matbaacılık Ankara, 2011:502-3, 1055-1060.
128. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J Endotoxin Res 2001;7(3): 167-202.
129. Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Tarach J, Ksiazek A. Toll-Like Receptor 4 Gene Polymorphism and Early Onset of Diabetic Retinopathy in Patients with Type 2 Diabetes. Hum Immunol 2009; 70: 121-124.
130. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol 2005; 1: 1-14.
131. Guerrero ATG, Cunha TM, Verri Jr WA, et al. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: Participation of TNF- α , IL-1 β and CXCL1/KC. Eur J Pharmacol 2012; 674: 51–57.

132. Maa P, Liua HT, Weia P, et al. Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF- α in RAW264.7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways. *Carbohydr Polym* 2011; 84: 1391–1398.
133. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventó S RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In *Methods in Enzymology*, Packer L (ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1999; 299: 152-315
134. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999; 64: 555–559.
135. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van-Beeck TA. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. *Food Chem* 2004; 85: 231-237.
136. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 2006; 1: 1112-116.
137. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* 2007; 42: 377–387.
138. Pana T, Khare S, Ackah F et al. *in vitro* cytotoxicity assessment based on KC50 with real-time cell analyzer (RTCA) assay. *Comput Biol Chem* 2013; 47: 113-120.
139. Moe B, Gabos S, Fang Li X. Real-time cell-microelectronic sensing of nanoparticle-induced cytotoxic effects. *Anal Chim Acta* 2013; 789: 83- 90.
140. Demirpolat E. Potansiyel mPGES-1 İnhibitörlerinin Antikanserojen etkilerinin A549 Hücrelerinde Araştırılması, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2014, 46
141. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 1986; 44: 307-315.

142. Dorman HJD, Koşar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant Properties and Composition Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *J Agr Food Chem* 2003; 51: 4563-4569.
143. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-Radical Scavenging Action of Medicinal Herbs from Ghana *Thonningia Sanguinea* on Experimentally Induced Liver Injuries. *Gen Pharmacol* 1999; 32: 661-667.
144. Oomah BD, Mazza G. Flavonoids and Antioxidative Activities in Buckweat. *J Agr Food Chem* 1996; 44: 1746-1750.
145. Velioğlu YS, Mazza G, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agr Food Chem* 1998; 46: 4113-4117.
146. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Bio Med* 1999; 26: 1231-1237.
147. Aruoma GI, Spencer JPE, Warren QD, et al. Characterization of Food Antioxidants, Illustrated Using Commercial Garlic and Ginger Preparations. *Food Chem* 1997; 60: 149-156.
148. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal Biochem* 1971; 40: 450-458.
149. Halliwell B, Gutteridge MG, Aruoma OI. The deoxyribose method: A simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165: 215-219.
150. Walker JM. *The Protein Protocols Handbook* (2nd ed), Humana Press, New Jersey, 1996, 11-14
151. NCCLS (1997). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard M2-A7*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA
152. Chen H, Zhang Q, Wang XM, et al. Qualitative Analysis and Simultaneous Quantification of Phenolic Compounds in the Aerial Parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MSn. *Phytochem Analysis* 2011; 22(3): 247-257.

153. Yang J, Qian D, Guo J, et al. Identification of the major metabolites of hyperoside produced by the human intestinal bacteria using the ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Ethnopharmacol* 2013; 147(1): 174-179.
154. Xiao C, Wu M, Jia P, et al. Metabolomic Analysis Provides Novel Chemotaxonomic Characteristics for Phenotypic Cultivars of Tree Peony. *Anal Methods* 2014; 6: 7854-7864.
155. Ostrowski W, Wojakowska A, Grajzer M, et al. Mass spectrometric behavior of phenolic acids standards and their Analysis in the plant samples with LC/ESI/MS system. *J Chromatogr B Analyt Technol* 2014; 967: 21-27.
156. Li C, Du H, Wang L, et al. Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia* section Moutan) yellow flowers. *J Agric Food Chem* 2009; 57(18): 8496-8503.
157. Xu SJ, Yang L, Zeng X, et al. Characterization of compounds in the Chinese herbal drug Mu-Dan-Pi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 2006; 20(22): 3275-3288.
158. Halliwell B. Antioxidants: The basics – what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 3–20.
159. Finnemore H. The Constituents of Canadian Hemp. Part I. Apocynin. *J. Chem. Soc. Trans* 1908; 93 (2): 1513–1519.
160. Dewick PM. Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach (2.ed), West Sussex, England, 2002, 141.
161. Sah JN, Varshney KV. Chemical constituents of *Picrorhiza* genus: a review. *A JEONP* 2013; 1 (2): 22-37.
162. Koşar M, Dorman HJD, Hiltunen R. Effect of an Acid Treatment on The Phytochemical and Antioxidant Characteristics of Extracts from Selected *Lamiaceae* Species. *Food Chem* 2005; 91: 525-533.

163. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Bio Med* 1996; 20: 933-956.
164. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem* 2005; 53: 4290-302.
165. Walia RH, Harpreet R, Kumar S, et al. Effect of fractionation on *in vitro* antiradical efficacy of acetone extract of *Terminalia chebula*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol* 2014; 8(11): 311-320.
166. Gu L, Weng X. Antioxidant Activity and Components of *Salvia plebeia* R.Br.-A Chinese Herb. *Food Chem* 2001; 73: 299-305.
167. Zhang LL, Lin YM. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. *African J Biotechnol* 2009; 8 (10): 2301-2309.
168. Sancheti S, Sancheti S, Um BH, et al. 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose: A cholinesterase inhibitor from *Terminalia chebula*. *S Afr J Bot* 2010; 76: 285–288.
169. Braca A, Politi M, Sanogo R, et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Wild and Cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) Leaves. *J Agr Food Chem* 2003; 51: 6689-6695.
170. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. Antioxidant Properties of Commercial Soft and Hard Winter Wheats (*Triticum aestivum* L.) and Their Milling Fractions. *J Sci Food Agr* 2006; 86: 477-485.
171. Gaamoune S, Harzallah D, Kada S, et al. The comparison of two tannin extraction methods from *Galium tunetanum* Poiret. and their antioxidant capacities. *Der Pharmacia Lettre* 2014; 6 (1): 114-119.
172. Prior RL, Cao G. In vivo Total Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods, *Free Radical Bio. Med* 1999; 27: 1173–1181.
173. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* 2008; 613: 1–19.
174. Tai A, Sawano T, Yazama F. Antioxidant Properties of Ethyl Vanillin *in vitro* and *in vivo*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75(12): 2346-2350.

175. Adewusi EA, Afolayan AJ. Effect of *Pelargonium reniforme* roots on alcohol-induced liver damage and oxidative stress. *Pharm Biol* 2010; 48(9): 980-987.
176. Badmus JA, Adedosu TO, Fatokı JO, et al. Lipid Peroxidation Inhibition and Antiradical Activities of Some Leaf Fractions of *Mangifera indica*. *Acta Pol Pharm* 2011; 68: 23-29.
177. Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochem* 2005; 66: 2012–2031.
178. Piao MJ, Kang KA, Zhang R, et al. Antioxidant properties of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose from *Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*. *Food Chem* 2009; 115: 412-418.
179. Ho ST, Tung YT, Chen YL, et al. Antioxidant Activities and Phytochemical Study of Leaf Extracts from 18 Indigenous Tree Species in Taiwan. *Evid-Based Compl Alternative Med* 2012, Article ID 215959, doi:10.1155/2012/215959
180. Shahidi F. *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*, AOCS Press, United States of America, 1997, 98
181. Olchowika E, Sciepuka A, Mavlyanovb S, et al. Antioxidant capacities of polyphenols from Sumac (*Rhus typhina* L.) leaves in protection of erythrocytes against oxidative damage. *BioNut* 2012; 2: 99–105.
182. Chua MT, Tung YT, Chang ST. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technol* 2008; 99: 1918–1925.
183. Tung YT, Wu JH, Chang ST. Preliminary studies on the antioxidant activity of ethanolic extracts from the twig of *Acacia confusa* Merr. *Quarterly Journal of Chinese Forestry* 2005; 38: 367–375.
184. Smith C, Halliwell B, Aroma OI. Protection by albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components. *Food Chem Toxicol* 1992; 6: 483-489.
185. Lin CC, Kuo CT, Cheng CY, et al. IL-1 β promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF- κ B-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Signal* 2009; 21: 1652–1662.
186. Min C, Wenjing L, Nanping W, et al. ROS and NF-kappa B but not LXR mediate IL-1 beta signaling for the downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. *AJP-Cell* 2000; 292(4): 1493-1501.

187. Yang D, Elner SG, Bian ZM, et al. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Exp Eye Res* 2007; 85(4): 462-472.
188. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, et al. Role of Oxidants in NF-kB Activation and TNF- α Gene Transcription Induced by Hypoxia and Endotoxin. *J Immunol* 2000; 165:1013-1021.
189. Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, et al. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 1990, 265:2856-2864.
190. Riganti C, Costamagna C, Doublier S, et al. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stres. *Toxicol Appl Pharm* 2008; 228: 277–285.
191. Mathy-Hartert M, Hogg L, Sanchez C, et al. Interleukin-1 β and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008; 16, 756-763.
192. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, et al. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease, *J Pathol* 2003; 201: 7–16.
193. Kelkka T. Reactive Oxygen Species in Inflammation, Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Turku, PhD Thesis, 2013, Turku, Finlandiya, 28-29.
194. Bozkurt H, Güdücüoğlu H, Kurtoglu MG, et al. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Proteus Vulgaris* Suşlarının Antimikrobiyal Ajanlara Duyarlılıkları. *Van Tıp Dergisi* 2005; 12: 145-148.
195. Dufrenne J, Bijwaard M, te Giffel M, et al. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int J Food Microbiol* 1995; 27: 175-183.
196. Rosenberger CM, Scott MG, Gold MR, et al. *Salmonella typhimurium* Infection and Lipopolysaccharide Stimulation Induce Similar Changes in Macrophage Gene Expression. *J Immunol* 2000; 164: 5894-5904.

197. Gülbandılar A. Kütahya Yöresinde Burun Mukozasındaki *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığının ve Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması. DPÜ Fen Bil Derg 2009; 18: 1-6.
198. Li K, Diao Y, Zhang H, et al. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. BMC Compl Alternative Med 2011, 11: 86
199. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004; 2: 123-140.
200. Rosalía GM, Federico DO, García FN, et al. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. Internatl Microbiol 1998; 1: 95–106.
201. Katherine SB, Teresa L, Rogers PD. Coculture of THP-1 human mononuclear cells with *Candida albicans* results in pronounced changes in host gene expression. J Infect Dis 2005; 192: 901–912.
202. Kothavade R, Kura MM, Valand AG, et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. Med Microbiol 2010; 59: 873-880.
203. Han S, Sung KH, Yim D, et al. Activation of Murine Macrophage Cell Line RAW 264.7 BY Korean Propolis. Arch Pharm Res 2002; 25(6): 895- 902.
204. Kuo FC, Tseng YT, Wud SR, et al. Melamine activates NFjB/COX-2/PGE2 pathway and increases NADPH oxidase-dependent ROS production in macrophages and human embryonic kidney cells. Toxicol *in vitro* 2013; 27: 1603–1611.
205. Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, et al. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and Gαi dependent PI-3kinase signalling Ngkelo et al. J Inflamm 2012; 9: 1: doi 10.1186/1476-9255-9-1
206. YanCheng BC, QingMaa X, YeeKwan H, et al. A herbal formula consisting of *Rosae Multiflorae* Fructus and *Lonicerae Japonicae* Flos inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Ethnopharmacol 2014; 153: 922–927.

207. Kalinski P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. J Immunol 2012; 188: 21-28.
208. Murthy PK, Dennis VA, Lasater BL, et al. Interleukin-10 Modulates Proinflammatory Cytokines in the Human Monocytic Cell Line THP-1 Stimulated with *Borrelia burgdorferi* Lipoproteins, Infect Immun 2000; 68(12) 6663–6669.
209. Lauw FN, Pajkrt D, Hack CE, et al Proinflammatory Effects of IL-10 During Human Endotoxemia1. J Immunol 2000; 165:2783-2789.
210. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Adv Immunol 2007; 96: 41–101.
211. Hernandez T, Mayadas T. Immunoregulatory role of TNF α in inflammatory kidney diseases. Kidney Int 2009; 76: 262–276.
212. Armstrong L, Jordan N, Millar A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. Thorax 1996; 51: 143-149.
213. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, et al. Interleukin-6: Structure-function relationships. Protein Sci 1997; 6: 929-955.
214. Jones SA, Horiuchi S, Topley N, et al. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. FASEB J 2001; 15: 43-58.
215. Li L, Fei Z, Ren J, et al. Functional imaging of interleukin 1 beta expression in inflammatory process using bioluminescence imaging in transgenic mice. BMC Immunol 2008; 9: 49 doi:10.1186/1471-2172-9-49
216. Li L, Liu Z, Yang X, et al. Bioluminescence imaging for IL-1 β expression in experimental colitis. J inflamm 2013, 10: 16 doi:10.1186/1476-9255-10-16
217. Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, et al. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica, Science 2008; 320: 674-677.

218. Carta S, Tassi S, Pettinati I, et al. The Rate of Interleukin-1 β Secretion in Different Myeloid Cells Varies with the Extent of Redox Response to Toll-like Receptor Triggering. *J Biol Chem* 2011; 286: 27069–27080.
219. Bell E. Initiation of pro-IL-1 β processing. *Nat Rev Immunol* 2002; 2, 719
220. Pelegrin P, Gutierrez CB, Surprenant A, et al. P2X₇ Receptor Differentially Couples to Distinct Release Pathways for IL-1 β in Mouse Macrophage. *J Immunol* 2008;180: 7147-7157.
221. Li W, Huang Q, Li Y, et al. Induction of Probiotic Strain *Enterococcus faecium* EF1 on the Production of Cytokines, Superoxide Anion and Prostaglandin E2 in a Macrophage Cell Line. *Pak Vet J* 2012; 32(4): 530-534.
222. Kim SY, Moon KA, Jo HY et al. Anti-inflammatory effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in airway inflammation. *Immunol Cell Biol* 2012; 90(4): 441-448.
223. Houser KR, Johnson DK, Ishmael FT. Mechanisms of the Anti-inflammatory Action of Apocynin. *FASEB J* 2011; 25: 945-955.
224. Kanegae MPP, Condino-Neto A, Pedroza LA, et al. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Bioph Res Co* 2010; 393: 551–554.
225. Viačková D, Pekarová M, Crhák T, et al. Redox-sensitive regulation of macrophage-inducible nitric oxide synthase expression in vitro does not correlate with the failure of apocynin to prevent lung inflammation induced by endotoxin. *Immunobiol* 2011; 216(4): 457-465.
226. Kayser O, Kolodziej H, Kiderlen AF. Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. *Phytother Res* 2001; 15(2): 122-126.

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Gökçe Şeker Karatoprak

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 12 Kasım 1982, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 352 207 66 66

Fax: +90 352 437 91 69

email: gskaratoprak@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 38039

Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi	Ankara, 2004
Lise	Nuh Mehmet Küçükçalık Anadolu Lisesi	Kayseri, 2000

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2009- Halen	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Arş . Gör

YABANCI DİL

İngilizce, Almanca

YAYINLAR

1. **Seker Karatoprak G.**, Koşar M, Erturk S. Antiradical Properties of *Alchemilla mollis*. Third International Meeting on Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, İstanbul, Türkiye, 9-12 Haziran 2010, pp 162

2. **Seker Karatoprak G.**, Koşar M. Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* from Turkey. *Planta Medica* 2011;77 (12):1383.
3. Erturk S., **Seker Karatoprak G.**, Koşar M. Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Alchemilla mollis* from Turkey. *Planta Medica* 2011;77 (12):1383-1384.
4. Kosar M., Orakcı E, **Seker Karatoprak G.** Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Viburnum opulus* from Turkey. *Planta Medica* 2011;77 (12): 1382
5. Aycan Yerer M. B., **Seker Karatoprak G.**, Aslan C, et al. The effect of *Salvia virgata* on GSH-Px Activities of HepG2 cells. *Planta Medica* 2011;77 (12):1374
6. Yucel C., **Seker Karatoprak G.**, Aktas Y, Kosar M. Gallic acid-loaded chitosan nanoparticles: A preliminary study. *Current Opinion in Biotechnology* 2011; 22(1): 127
7. **Şeker Karatoprak G.**, Aycan Yerer M. B, Erturk S, Koşar M. The effect of *Salvia virgata* on SOD and TBARS activities of chronic myeloid leukemia cells. *OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS IN BIOLOGY Cell Signaling and Nutrient Gene Interactions*, Torino (Alba), İtalya, 20-23 Haziran 2012, pp:126-126
8. Yucel C., **Seker Karatoprak G.**, Aktas Y, Kosar M. *in vitro* evaluation of quercetin-loaded chitosan nanoparticles.10th International Symposium on Pharmeceutical Sciences,Ankara, Türkiye, 26-29 Haziran 2012, pp 314-314
9. **Şeker Karatoprak G.**, Demirpolat E., Karaduman Z.E., Aycan M.B., Koşar M., "Antiradical Properties And Cytotoxic Activity of Extracts Of *Rumex Hydrolatpathum* Huds", *Natural Products in Cancer Prevention and Therapy Trends in Natural Product Research*, Napoli, İtalya, 25-28 Haziran 2013, pp.81-81
10. Baldemir A., Ertürk İlğün S, **Şeker Karatoprak G.**, Kosar M. Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Alchemilla hirsutiflora* (Buser) Rothm. and *A.mollis* (Buser) Rothm. from Turkey. *Natural Products in Cancer Prevention and Therapy Trends in Natural Product Research*, Napoli, İtalya, 25-28 Haziran 2013, pp 80-80.

11. Dokumaci A.H., **Şeker Karatoprak G.**, Aycan M.B., Koşar M., "*Pelargonium endlicherianum* Kök Ekstrelerinin A 549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi", 21.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Nevşehir, Türkiye, 28 Mayıs - 1 Haziran 2014, ss.46-46.
12. Koşar M., **Şeker Karatoprak G.**, Fırat M. *Pelargonium quercetorum* Agnew. Kök ve Toprak Üstü Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Çalışması, 21.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Nevşehir, Türkiye, 28 Mayıs - 1 Haziran 2014, pp:97
13. **Şeker Karatoprak G.**, Paşeyeva L, Gürbüz P, Koşar M. Türkiye'de Yetişen *Chrysophthalmum* Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, 21.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Nevşehir, Türkiye, 28 Mayıs - 1 Haziran 2014, pp:80
14. Dokumaci A.H., Ünal G. , **Şeker Karatoprak G.**, Aycan M.B., "Investigation of Cytotoxic Effects of *Pelargonium endlicherianum* Extracts And Related Phenolic Compounds: Esculetin and Scopoletin. ", 2nd Anticancer Agent Congress, Muğla, Türkiye, 23-25 Nisan 2014, pp.100-100

DİĞER

Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Nevşehir, Mayıs 2014, Düzenleme Komitesi

Türk Eczacılık Tarihi, Kayseri, Mayıs 2014, Düzenleme Komitesi