



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HYPERİCUM CALYCİNUM L.
BİTKİSİNİN İN VİTRO
ANTIENFLAMATUVAR ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SÜMEYYE ÇAPA

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ İREM ATAY BALKAN**

**FARMAKOGNOZİ ANA BİLİM DALI
FARMAKOGNOZİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ARALIK/2022**

İTHAF

“Annem ve babam’a ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca değerli bilgi, deneyim ve güler yüzlü sabrı ile bana destek olan öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İrem ATAY BALKAN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bitkimin teşhisinde ve botanik açıdan incelenmesinde yardımcı olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Çağla KIZILARSLAN HANÇER hocama,

Tezimin aktivite çalışmalarında laboratuvar desteği sağlayan Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Başkanı Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yusuf TUTAR hocama,

Ayrıca Prof. Dr. Dilek TELCİ TEMELTAŞ hocama (Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı) bilimsel yönlendirmelerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında akademik tecrübelerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Şükran ÖZDATLI KURTULUŞ hocama, dostlukları ve bilgi birikimleri ile her zaman yanımda olan arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Duygu MISIRLI ve Öğr. Gör. Dr. Fatih HACIMUSTAFAOĞLU'na teşekkür ederim.

Beni her zaman maddi ve manevi destekleriyle motive eden, varlıklarıyla huzur bulduğum kıymetli annem ve babam Emine-İbrahim ÇAPA ve biricik kardeşim Hasan Baki ÇAPA'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce desteklenmiştir. Proje Numarası: 2021/071.

Ecz. Sümeyye ÇAPA

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. BOTANİK ÖZELLİKLER	4
2.1.1. Hypericaceae.....	5
2.1.2. <i>Hypericum</i> L. Cinsi.....	5
2.1.3. <i>H. calycinum</i> L.....	5
2.2. ETNOBOTANİK BİLGİLER.....	7
2.2.1. <i>H. calycinum</i> Bitkisinin Geleneksel Kullanımı	7
2.2.2. <i>Hypericum</i> Türlerinin Romatizmal Hastalıklara Karşı Geleneksel Kullanımı ..	7
2.3. BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI.....	9
2.3.1. <i>H. calycinum</i> Bitkisi Üzerinde Gerçekleştirilen Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	9
2.3.1.1. Antiaging ve antitirozinaz aktivite çalışmaları.....	10
2.3.1.2. Antioksidan aktivite çalışmaları.....	11
2.3.1.3. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları.....	12
2.3.1.4. Antidepresan aktivite çalışmaları.....	14
2.3.2. <i>Hypericum</i> Türleri Üzerinde Yapılan Antienflamatuvar Aktivite Çalışmaları..	14
2.3.2.1. <i>İn vitro</i> çalışmalar.....	14
2.3.2.2. <i>İn vivo</i> çalışmalar	16
2.3.2.3. Klinik çalışmalar	18
2.4. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR	19
2.4.1. Fenolik Asitler	20
2.4.2. Flavonoidler	21

2.4.3. Floroglusinoller.....	24
2.4.4. Diğer Bileşikler.....	25
2.5. ENFLAMASYON VE ENFLAMATUVAR MEDİYATÖRLER	25
2.5.1. Enflamasyon	25
2.5.2. Nitrik Oksit.	25
2.5.3. Prostaglandin E ₂	26
2.5.4. Sitokinler.....	27
2.5.5. Makrofaj Hücreleri.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. GEREÇLER.....	28
3.1.1. Bitki Materyali.....	28
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Solventler.....	28
3.1.3. Ekipmanlar.....	29
3.1.4. Kitler	30
3.1.5. Cihazlar.....	30
3.2. YÖNTEMLER.....	31
3.2.1. Fitokimyasal Yöntemler	31
3.2.1.1. Ekstre hazırlanması	31
3.2.1.2. Sıvı-Sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile ekstrenin fraksiyonlanması	31
3.2.1.3. Kromatografik yöntemler.....	32
3.2.1.4. Toplam fenolik madde miktar tayini.....	36
3.2.1.5. Toplam flavanoit madde miktar tayini.	37
3.2.2. Aktivite Çalışmaları.....	37
3.2.2.1. Hücre ve hücre kültürü.....	37
3.2.2.2. Hücre pasajı ve sayımı	37
3.2.2.3. Hücre hattının kriyoprezervasyonu	38
3.2.2.4. Kriyoprezervasyon sonrası hücre çözülmesi.....	38
3.2.2.5. WST-1 hücre canlılığı testi	38
3.2.2.6. Griess testi	39
3.2.2.7. PGE ₂ ve sitokinlerin (TNF- α ve IL-6) seviyelerinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi.....	39
3.2.2.8. 15-LOX inhibitör tarama testi	42
3.2.2.9. İstatiksel analiz	42
4. BULGULAR.....	43

4.1. BİYOLOJİK AKTİVİTE BULGULARI.....	43
4.1.1. Altekstrelerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	43
4.1.2. Altekstrelerin NO Üretimi Üzerindeki Etkileri	48
4.1.3. Altekstrelerin Sitokinlerin Üretimi Üzerindeki Etkileri	52
4.1.4. Altekstrelerin PGE ₂ Üretimi Üzerindeki Etkileri	58
4.1.5. Ekstre, Altekstre ve Fraksiyonların 15-LOX Enzim İnhibitörü Etkileri	60
4.2. FİTOKİMYASAL BULGULAR.....	63
4.2.1. YBSK ile Fenolik Bileşik Analizi	63
4.2.2. GK/KS ile Yağ Asidi Analizi.....	67
4.2.3. Toplam Flavanoit ve Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini	68
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR.....	79
EK.....	85

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi pompa programı.....	34
Tablo 3.2: Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin YBSK bilgileri	35
Tablo 4.1: <i>H. calycinum</i> altekstrelerinin (<i>n</i> -hekzan, CH ₂ Cl ₂ , EtOAc, <i>n</i> -BuOH) NO seviyeleri üzerindeki etkileri.....	50
Tablo 4.2: <i>H. calycinum</i> bitkisinin altekstrelerinin (<i>n</i> -hekzan, CH ₂ Cl ₂ , EtOAc ve <i>n</i> -BuOH) TNF- α ve IL-6 seviyeleri üzerindeki etkileri.....	54
Tablo 4.3: <i>H. calycinum</i> bitkisinin altekstrelerinin (<i>n</i> -hekzan, CH ₂ Cl ₂) PGE ₂ seviyeleri üzerindeki etkileri	59
Tablo 4.4: <i>H. calycinum</i> bitkisinin ekstre ve altekstrelerinin 15-LOX inhibitörü etkileri..	61
Tablo 4.5: <i>H. calycinum</i> bitkisinin <i>n</i> -BuOH altekstresinin çeşitli konsantrasyonlarının 15-LOX inhibitörü etkileri	62
Tablo 4.6: <i>H. calycinum</i> bitkisinin <i>n</i> -BuOH altekstresinden elde edilen fraksiyonların 15-LOX inhibitörü etkileri	62
Tablo 4.7: <i>H. calycinum</i> bitkisinin EtOAc altekstresinde tespit edilen fenolik asitler	63
Tablo 4.8: <i>H. calycinum</i> bitkisinin <i>n</i> -BuOH altekstresinde tespit edilen fenolik asitler	65
Tablo 4.9: <i>H. calycinum</i> bitkisinin <i>n</i> -hekzan altekstresinin GK/KS ile belirlenen yağ asidi bileşenleri ve bağıl yüzde değerleri	68
Tablo 4.10: <i>H. calycinum</i> bitkisinin ekstre, altekstre ve fraksiyonların toplam fenolik ve toplam flavanoit madde miktarları.....	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: <i>Hypericum calycinum</i> bitkisinin görseli	4
Şekil 2.2: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen fenolik asitler-1.....	20
Şekil 2.3: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen fenolik asitler-2.....	20
Şekil 2.4: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen fenolik asitler-3.....	20
Şekil 2.5: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen flavonoidler	21
Şekil 2.6: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen flavan-3-oller	21
Şekil 2.7: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen biflavonlar.....	22
Şekil 2.8: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen lavandülillenmiş flavanonlar-1	22
Şekil 2.9: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen lavandülillenmiş flavanonlar-2	23
Şekil 2.10: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen lavandülillenmiş flavanonlar-3.....	24
Şekil 2.11: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen açılfloroglusinoller	24
Şekil 2.12: <i>H. calycinum</i> bitkisinde tespit edilen diğer bileşikler	25
Şekil 3.1: <i>H. calycinum</i> MeOH ekstresinin hazırlanması ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemiyle fraksiyonlanması.....	32
Şekil 3.2: Standart olarak kullanılan 15 Fenolik bileşiğin 254 nm'deki YBSK kromatogramı	35
Şekil 4.1: <i>H. calycinum</i> altekstrelerinin [<i>n</i> -hekzan (A), CH ₂ Cl ₂ (B), EtOAc (C), <i>n</i> -BuOH (D)] Raw 264.7 makrofaj hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	47
Şekil 4.2: Standart inhibitör olarak kullanılan moleküllerin (L-NIL, NS-398, deksametazon) Raw 264.7 makrofaj hücre canlılığı üzerindeki etkileri.	48
Şekil 4.3: <i>H. calycinum</i> altekstrelerinin [<i>n</i> -hekzan (A), CH ₂ Cl ₂ (B), EtOAc (C) ve <i>n</i> -BuOH (D)] Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO seviyeleri üzerindeki etkileri.....	52
Şekil 4.4: <i>H. calycinum</i> altekstrelerinin [<i>n</i> -hekzan (A), CH ₂ Cl ₂ (B), EtOAc (C), <i>n</i> -BuOH(D)] Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin TNF- α seviyeleri üzerindeki etkileri.....	56

Şekil 4.5: <i>H. calycinum</i> altekstrelerinin [<i>n</i> -hekzan (A), CH ₂ Cl ₂ (B)] Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin IL-6 seviyeleri üzerindeki etkileri	57
Şekil 4.6: Deksametazon'un Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin IL-6 seviyeleri üzerindeki etkisi.....	58
Şekil 4.7: <i>H. calycinum</i> altekstrelerinin [<i>n</i> -hekzan (A), CH ₂ Cl ₂ (B)] Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin PGE ₂ seviyeleri üzerindeki etkileri	60
Şekil 4.8: <i>H. calycinum</i> EtOAc altekstresinde 254 nm'de rutin ve kersetinin varlığını gösteren kromatogram	64
Şekil 4.9: <i>H. calycinum</i> EtOAc altekstresinde 325 nm'de klorojenik asit varlığını gösteren kromatogram.....	64
Şekil 4.10: <i>H. calycinum</i> EtOAc altekstresinde 248 nm'de kafeik asit varlığını gösteren kromatogram.....	65
Şekil 4.11: <i>H. calycinum</i> EtOAc altekstresinde 336 nm'de apigenin-7-glukozit varlığını gösteren kromatogram	65
Şekil 4.12: <i>H. calycinum</i> <i>n</i> -BuOH altekstresinde 271 nm'de gallik asit varlığını gösteren kromatogram.....	66
Şekil 4.13: <i>H. calycinum</i> <i>n</i> -BuOH altekstresinde 325 nm'de klorojenik asit varlığını gösteren kromatogram.....	66
Şekil 4.14: <i>H. calycinum</i> <i>n</i> -BuOH altekstresinde 248 nm'de kafeik asit varlığını gösteren kromatogram.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

15-LOX	: 15-lipoksijenaz
COX-1	: Siklooksijenaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
EGCG	: Epigallokateşin gallat
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	: Fetal Bovine Serum
GAE	: Gallik Asite Eşdeğer
IL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KE	: Kersetine Eşdeğer
KK	: Kolon Kromatografisi
LPS	: Lipopolisakkarit
NDGA	: Nordihidroguaiaretik asit
NO	: Nitrik Oksit
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
YBSK	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

***HYPERICUM CALYCINUM* L. BİTKİSİNİN *İN VİTRO* ANTİENFLAMATUVAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Amaç: *Hypericum* türleri geleneksel olarak romatizmal hastalıklarda kullanılmaktadır. Buna rağmen, literatürde *H. calycinum* üzerinde az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu nedenle bitkinin bazı enflamatuvar parametreler üzerindeki etkilerinin *in vitro* yöntemlerle araştırılması ve fitokimyasal içeriğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: *H. calycinum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından metanol ekstresi ve bu ekstreden sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemiyle altekstreler (*n*-hekzan, diklorometan, etil asetat, *n*-butanol, kalan su) hazırlanmıştır. Altekstrelerin toksik olmayan konsantrasyonları WST-1 yöntemi ile belirlendikten sonra; lipopolisakkarit ile uyarılmış Raw 264.7 hücrelerinin nitrik oksit (NO) seviyeleri üzerindeki etkileri Griess, sitokinler (TNF- α /IL-6) ve PGE₂ seviyeleri üzerindeki etkileri ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca, 15-LOX enzim inhibitörü etkiler ile toplam fenolik/flavanoit madde miktarları değerlendirilmiştir. Fenolik bileşikler ve yağ asidi bileşenleri sırasıyla yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Bitkinin *n*-hekzan altekstresi (100 μ g/mL) NO, TNF- α , IL-6 seviyelerini sırasıyla %95,11, %63,50, %93,90 oranında azaltmıştır. Bitkinin diklorometan altekstresi (50 μ g/mL), NO (%48,23), IL-6 seviyelerini (%74,44) azaltmıştır. İki altekstre de PGE₂ üretimini %40'ın üzerinde azaltmıştır. Bitkinin *n*-BuOH altekstresi 15-LOX enzimini (100 μ g/mL, %28,87) inhibe etmiştir. Bitkinin EtOAc ve *n*-BuOH altekstreleri (100 μ g/mL) NO seviyelerini %31,66 ve %37,34 azaltmıştır. En yüksek toplam fenolik (333,49 $\pm$ 4,78 mg GAE/g ekstre) ve flavanoit (101,30 $\pm$ 7,94 mg KE/g ekstre) miktarı EtOAc altekstresinde belirlenmiştir. Altekstrelerde (EtOAc, *n*-BuOH) klorojenik asit tespit edilmiştir. Bitkinin *n*-hekzan altekstresinde majör miktarda α -linolenik asit tespit edilmiştir.

Sonuç: *H. calycinum* bitkisinin *in vitro* antienflamatuvar etkileri ve kimyasal bileşenleri ortaya konmuştur. Özellikle, *n*-hekzan ve diklorometan altekstreleri ileride gerçekleştirilecek çalışmalar için aday olabilir.

Anahtar Kelimeler: Antienflamatuvar Etki, Hypericaceae, *Hypericum calycinum*, Nitrik Oksit, Sitokinler



INVESTIGATION OF *IN VITRO* ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF *HYPERICUM CALYGINUM* L.

ABSTRACT

Aim: *Hypericum* species are traditionally used against rheumatismal diseases. However, there are only few studies on *H. calycinum* in literature. Hence, it is aimed to investigate the effects of this plant on some inflammatory parameters by *in vitro* methods and to evaluate its phytochemical content.

Materials and Methods: Methanol extract was prepared from aerial parts of *H. calycinum*. Subextracts (*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol, remaining-water) were prepared by liquid-liquid extraction. After non-toxic concentrations of subextracts were determined by WST-1; effects on nitric oxide (NO) levels of lipopolysaccharide stimulated Raw 264.7 cells were determined by Griess, effects on cytokines (TNF- α /IL-6) and PGE₂ levels were determined by ELISA. 15-LOX enzyme inhibitory effects, total phenolic/flavonoid contents were also evaluated. The phenolic compounds and fatty acid components were determined by high pressure liquid chromatography and gas chromatography mass spectrometry respectively.

Results: The *n*-hexane subextract (100 μ g/mL) decreased NO, TNF- α , IL-6 levels by 95.11%, 63.50%, 93.90%. The dichloromethane subextract (50 μ g/mL) decreased NO (48.23%) IL-6 (74.44%) levels. Both subextracts reduced PGE₂ levels more than 40%. The *n*-BuOH subextract inhibited 15-LOX enzyme (100 μ g/mL, 28.87%). The EtOAc and *n*-BuOH subextracts (100 μ g/mL) reduced NO levels by 31.66% and 37.34%. Highest total phenolic (333.49 $\pm$ 4.78 mg GAE/g extract) and flavonoid (101.30 $\pm$ 7.94 mg QE/g extract) contents were found in EtOAc subextract. Chlorogenic acid was determined in subextracts (EtOAc, *n*-BuOH). The major component of *n*-hexane subextract was α -linolenic acid.

Conclusion: The *in vitro* anti-inflammatory effects of *H. calycinum*, and its phytochemical components were revealed. Particularly, *n*-hexane and dichloromethane subextracts might be candidates for future studies.

Key Words: Anti-inflammatory Effect, Cytokines, Hypericaceae, *Hypericum calycinum*, Nitric Oxide



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enflamasyon; fiziksel, kimyasal veya biyolojik olarak karşılaşılan stres etkenlerine karşı bağışıklık sisteminin gösterdiği fizyolojik yanıtıdır. Enflamasyon akut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır (1). Akut enflamasyon, vücudun enflamatuvar uyaranlara karşı kısa sürede geliştirdiği ilk yanıtıdır ve ağrı, ısı artışı, kızarıklık, şişlik ve fonksiyon kaybı gibi semptomlarla karakterize edilir. Kronik enflamasyon ise vücudun enflamatuvar uyaranlara uzun süreli maruz kalması sonucunda hasarlı bölgedeki hücrelerin progresif olarak değişerek enflamasyona cevap vermesidir. Kronik enflamasyon ileri boyutta doku hasarı, organ yetmezliği ve ölümle sonuçlanabilmektedir. Kronik enflamasyon, halk arasında yaygın görülen romatoid artrit, astım, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığın patogeneğinde önemli role sahiptir (2–5). Enflamatuvar hastalıkların tedavisinde steroid olmayan antienflamatuvar ilaçlar, steroid yapıda antienflamatuvar ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaç molekülleri, hem tedavi sürecini uzun tutarak tedavi maliyetlerini yükselmekte hem de ciddi yan etkiler göstermektedir. Bu nedenlerle daha etkili ve güvenilir antienflamatuvar ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (6–8).

Enflamasyonun patogeneğinde çeşitli mediyatörler bulunmaktadır. Nitrik oksit (NO), prostaglandinler (PG), lökotrienler gibi mediyatörler; sitokinler [interlökin (IL-1, IL-6), TNF- α], lipoksijenazlar (LOX), siklooksijenazlar (COX-1 ve COX-2), indüklenebilir NO sentaz (iNOS) veya fosfolipazlar gibi enzimler enflamasyonda önemli rol oynar (9–11).

Prostaglandinler ve lökotrienler lipid kökenli otakoitlerdir ve 'eikozanoitler' olarak isimlendirilmektedir. PGE₂, akut enflamasyonun oluşumunda rol alan bir faktördür (2). Vasküler düz kas hücrelerini gevşeterek dolaşımı hızlandırır ve ödem oluşumuna zemin sağlar. Ayrıca nöronları etkileyerek sistemik enflamasyon yanıtlarıyla ateş, yorgunluk ve ağrıya yüksek duyarlılık gibi semptomların oluşumuna neden olur (12,13). NO, parakrin ve otokrin sinyal molekülü olarak birçok fizyolojik ve patolojik durumlarda rol almaktadır. Bu molekül, vazodilatasyon, kan basıncı kontrolü ve hücreler arası iletişim gibi çeşitli mekanizmalarda yer almaktadır (14,15). Ülseratif kolit, romatoid artrit, sedef ve osteoartrit gibi enflamatuvar hastalıklarda NO seviyesi artmaktadır (16). Sitokinler;

enfeksiyon, bağıışıklık, iltihaplanma, embriyonik gelişim, rejenerasyon, obezite, yaşlanma ve travma gibi birçok temel sürecin düzenleyicisidirler. Tüm vücut hücrelerinde üretildikleri gibi özellikle makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilmektedirler (17). Lipoksijenazlar lökotrien, lipoksin, eoksinlerin ve hepoksinlerin sentezinde yer alır (18). LOX ürünlerinin (5-LOX, 8-LOX, 12-LOX ve 15-LOX) astım, enflamasyon gibi durumlara neden olmasının yanında bazı insan kanser türlerinin gelişiminde rol aldığı tespit edilmiştir (19).

Hypericum L. cinsi ölkemiz için önemli türleri içermektedir ve Anadolu'da 48'i endemik olan 106 takson olduğu bilinmektedir (20–23). *Hypericum calycinum* türünün *H. perforatum*, *H. empetrifolium*, *H. scabrum*, *H. triquetrifolium*, *H. tedrapetum* ile birlikte *Hypericum* cinsinin Türkiye'deki en yaygın türlerinden olduğu bildirilmiştir (24). *Hypericum* türleri halk arasında geleneksel olarak idrar yolu enfeksiyonları, ülser, gastrit, nevralji gibi rahatsızlıkların yanı sıra romatoit artrit ve hemoroit gibi enflamatuvar hastalıklarda kullanılmaktadır (25–30). Literatürde, *H. calycinum* üzerindeki çalışmalar gözden geçirildiğinde ise, geleneksel kullanılışı, biyolojik aktiviteleri ve fitokimyasal içeriği açısından incelendiği az sayıda çalışmaya rastlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, *H. calycinum* bitkisinin antienflamatuvar etkilerinin *in vitro* olarak araştırılmasıyla bitkinin biyolojik aktivitelerinin açıklanmasına katkıda bulunulmasını sağlamaktır. Bitkinin aktif ekstrelerinin kimyasal içeriklerinin belirlenmesi ile bitkinin kimyasal bileşiminin açıklanmasına da katkıda bulunulması hedeflenmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında, *H. calycinum* toprak üstü kısımlarından metanol (MeOH) ekstresi ve çeşitli polaritelerdeki çözücüler [*n*-hekzan, diklorometan (CH₂Cl₂), etil asetat (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)] kullanılarak, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle (*n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, k-H₂O) altekstreleri hazırlanmıştır. Bitkinin altekstrelerinin antienflamatuvar aktivitelerinin araştırılması için LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücreleri kullanılmıştır. Altekstrelerin, Raw 264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki toksik olmayan konsantrasyonları WST-1 yöntemiyle; NO üretimi üzerindeki etkileri Griess yöntemiyle; sitokinler (TNF- α , IL-6) ve PGE₂ üzerindeki etkileri ise Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA, enzim bağılı immünosorbent testi) yöntemiyle belirlenmiştir. Ekstre ve altekstreler, 15-LOX enzim inhibitörü etkileri açısından 15-LOX enzim inhibitörü tarama testi kiti kullanılarak değerlendirilmiştir. Bitkinin aktif altekstrelerinin kimyasal bileşimlerinin belirlenebilmesi amacıyla toplam

fenolik ve flavonoit madde miktar tayinleri sırasıyla Folin-Ciocalteu ve alüminyum klorür yöntemleriyle belirlenmiştir. Ekstrelerin (EtOAc ve *n*-BuOH) fenolik bileşikleri, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) yöntemiyle belirlenmiştir. Bitkinin *n*-hekzan altekstresinin yağ asitlerinin belirlenmesi için ise gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GK/KS) yöntemi kullanılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. BOTANİK ÖZELLİKLER

Bu bölümde Hypericaceae familyası, *Hypericum* L. cinsi ve *H. calycinum* L. bitkisinin botanik özelliklerinden bahsedilmiştir.



Şekil 2.1: *Hypericum calycinum* bitkisinin görseli

2.1.1. Hypericaceae

Hypericaceae familyasına ait bitkiler genellikle çalimsı veya otsu şekilde bulunurlar. Bitki, uçucu yağ içeren yarı saydam veya amber sarısı glandlara sahiptir. Bazı türleri, hiperisin içeren kırmızı veya siyah renkli glandlara sahiptir. Yapraklar tam ve karşılıklı olup nadiren halka şeklinde dizilime sahiptir. Yaprak şekilleri ovoit ve elongat olsa da bazı türlerde lanseolat yapraklar da görülür. Sepaller 5 adet olup tomurcukta imbrikat dizilişlidir. Petaller 5 adet, serbest ve sarı renkli; stamenler 3-5 demet şeklinde veya serbest dizilimde bulunabilir. Ovaryum üst durumlu pariyetal [veya aksillar (yanal)] plasentasyon gösterir. Tohumlar endosperm içermez (20,31).

2.1.2. *Hypericum* L. Cinsi

Hypericaceae familyasına ait *Hypericum* L. cinsinin dünyada yaklaşık 482 kadar türü olduğu bilinmektedir. Anadolu'da, *Hypericum* cinsine ait 48'i endemik olan 106 takson olduğu bilinmektedir (21,22). *Hypericum* türleri ülkemizde kantaron, binbirdelik otu, kılıç otu, yara otu, kan otu, kamanıça, koyun kıran, tutsan, boyalık otu, pırpır otu, püren, çıtçı otu, çayotu gibi isimlerle bilinmektedir (32–34).

Hypericum türleri genelde tüysüz, yarı şeffaf glandlara sahip tek yıllık otsular veya çalılardır. Çiçekler yıldız şeklinde ve çift eşeylidir. Yapraklar perfoliat, tam veya glandular siliat dentikulattır. Laminadaki salgı kanalları sıktan seyreğe doğru dizilime sahip olabilir veya salgı kanalları olmayabilir. Sepaller 4-5 adet, petaller ise 5 adet veya daha fazla olup genellikle sarı renkli ve nadiren nektarlıdır. Anterlerde siyah salgı organı vardır. Meyveler, septisit kapsuladır. Kapsül çenetleri nadiren keseli şekle sahip, kabarcık şeklinde, sarı renktedir. Tohumlar 0,3-1,5 mm uzunluğunda, silindirik-ellipsoit şekilli, sarı-kahverengidir (20).

2.1.3. *H. calycinum* L.

H. calycinum Anadolu'da koyunkıran, kuzukıran, saatçiçeği, tavukyumurtlamaz, yabangülü, sicimotu, iri çanaklı kantaron otu gibi isimlerle bilinmektedir (24,35).

H. calycinum, n=10 kromozoma sahip ağaçlık ve çalılık bölgelerde bulunan her dem yeşil bir bitkidir (20,31). Bu tür, yaklaşık 20-60 cm boylarında, dik gövdelidir. Sürünücü, tüysüz yapıya sahiptir. Genellikle oblong-eliptik, bazen de ovat şekle sahip olan yaprakları, 4,5-9,5 cm büyüklüğündedir. Glandlar yüzeyde miktarca az ve küçük

boyutludur. Sepal ve petaller marjinde bulunur. Sepallerin boyutu 1-2 cm arasında değişkenlik göstermektedir ve damarlanma mevcuttur. Asimetrik olan petaller ise 2,5- 4,5 cm boyutunda belirgindir. Kırmızı renkli stamenler dikkat çekerken, siyah glandlar nadiren görünür veya hiç görünmezler. Meyveleri 20 mm, oval kapsül şeklindedir (20). Genellikle Mayıs-Ağustos ayları arası çiçeklenme zamanları olmasına rağmen bazı dönemler Ekim ayına kadar çiçeklendikleri görülebilir. İstanbul çevresi ve Anadolu'nun kuzeyinde, Karadeniz Bölgesi'nin ağaçlık ve çalılık yüksek rakımlı bölgelerinde yetişmektedir (20).

Tür anahtarı Davis'e göre aşağıdaki gibi verilmiştir (20). Bu tayin anahtarında öncelikle türler gruplara (A-G) ayrılmıştır. Tayin anahtarında *H. calycinum*'un da yer aldığı A grubuna ait kısım aşağıdaki gibidir:

1.Geniş yapraklı çalılar veya yaprakları perfoliat 7-12 cm otsular; siyah glandlar tamamen yoktur veya nadiren görülür, sepal ve petaller marjinde bulunur.....**Grup A**

1.Sert yapraklı alçak çalılar veya normal çalılar, yapraklar nadiren 4-5 cm kadar perfoliat

1. Yapraklar ve çalılar serbest; siyah veya kırmızımsı glandlar yok

2. Sepal ve petal fasikülleri çiçek açtıktan sonra yaprak döken; sepaller bütün

3. Stilus 5; anterler kırmızı, çiçekler genellikle tek.....**1. calycinum**

4. Stiluslar ovaryumdan uzun; sepaller yaprak döken; meyveler kapsül.....

.....**2. hircinum**

4. Stilus ovaryumdan kısa; sepaller kalıcı; meyveler bakka.....

.....**3. androsaemum**

2. Sepal ve petal fasikülleri çiçek açtıktan sonra kalıcıdır; sepaller bazı zamanlar marjinde sarı glandlı (*Sect. Inodorum*).....**4. xylosteifolium**

1. Yapraklar perfoliat; çok yıllık bitki; sepaller ve petaller marjinde kırmızı glandlı (*Sect. Bupleuroides*).....**5. bupleuroides**

Çiçeklenme zamanı: Mayıs-Ağustos (36,37).

Habitat: Gölgecik orman alanları ve dağlık ılıman bölgeler (38).

Türkiye'de yayılımı: İstanbul çevresi ve Karadeniz Bölgesi'nde ağaçlık ve çalılık alanlarda 30-1200 m'de görülebilir (20).

Türkçe isimler: Koyunkıran, kantaron (35), saatçiçeği, tavukyumurtlamaz, yabangülü, sicim otu (24), inmek otu, kırtış otu (39), hayırsız otu (40).

Diğer dillerdeki isimler: Pyin-nyar-lin-kar (Birmanca) (41)

2.2. ETNOBOTANİK BİLGİLER

Bu bölüm *H. calycinum* bitkisinin geleneksel kullanımı ile *Hypericum* türlerinin romatizmal hastalıklara karşı geleneksel kullanımı hakkında bilgiler içermektedir.

2.2.1. *H. calycinum* Bitkisinin Geleneksel Kullanımı

Yapılan literatür çalışması neticesinde, *H. calycinum* bitkisinin geleneksel kullanılışı hakkında az sayıda çalışmaya ulaşılmıştır. *H. calycinum* bitkisinin, tıbbi kullanımının yanında süs bitkisi olarak kullanıldığı ayrıca kumaş boyamada sarı renk elde edilmesi amacıyla kaynatılarak kullanıldığı gösterilmiştir (32,42,43).

Yalova çevresinde yapılan bir çalışmada halk arasında bu bitkinin çiçeklerinin dekoksionunun, nefes darlığı tedavisinde dahilen kullanıldığı bildirilmiş olup ayrıca bitkinin toprak üstü kısımlarının dekoksionunun, kumaş boyamada mor ve lila renklerini elde etmek için kullanıldığı tespit edilmiştir (24).

Balıkesir çevresinde gerçekleştirilen bir çalışmada, *H. calycinum* yaprak ve çiçeklerinin doğrudan hastaya sarılarak veya kaynar suda demlenerek mide ağrısı, egzama ve iç organ hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (39).

Win ve arkadaşlarının (2012) *H. calycinum* bitkisi üzerinde gerçekleştirdikleri fitokimyasal bir çalışmada, bitkinin Myammar geleneksel tıbbında sıtma tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (41).

Pytlakowska ve arkadaşlarının (2012) bazı bitkilerin mineral ve iz element analizlerini gerçekleştirdikleri bir çalışmada, *H. calycinum* bitkisinin Polonya’da, astrenjan ve iltihap azaltıcı etkilerinin yanı sıra uykusuzluk, menopoz bozuklukları, adet öncesi sendrom, zona, siyatik, fibrozis, sinirsel gerginlik, orta derecede depresyon gibi hastalıklarda kullanımı olduğu bildirilmiştir (44).

2.2.2. *Hypericum* Türlerinin Romatizmal Hastalıklara Karşı Geleneksel Kullanımı

Yapılan literatür taraması neticesinde *Hypericum* türlerinin Anadolu’da halk arasında romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir (45,46).

Balıkesir’de, *H. perforatum* bitkisinin çiçekli dallarından elde edilen dekoksasyonun bir gece bekletildikten sonra hemoroit tedavisinde sabahları aç karnına tüketildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada bitkinin çiçekli dallarından elde edilen dekoksasyonun romatizma tedavisinde dahilen kullanıldığı da bildirilmiştir (45). Çatalca’da toprak üstü kısımları zeytinyağında ezilip bekletilerek romatizma ağrılarında, harici olarak kullanılmaktadır (46). Çanakkale’de yapılan bir çalışmada, çiçekli dallarından elde edilen infüzyonun dahilen romatizma tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (47). Kazdağları çevresinde yapılan bir çalışmada, bitkinin çiçekli dallarının zeytinyağı içerisinde bekletilmesiyle elde edilen maseratın dahilen romatizma tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir (48). Kırklareli’nde yapılan bir başka çalışmada, bitkinin çiçekli dallarının zeytinyağı içerisinde bekletilmesiyle hazırlanan maseratın romatizma tedavisinde ve yumuşak doku zedelenmesinden kaynaklı kas ve eklem ağrılarının tedavisinde haricen kullanıldığı bildirilmiştir (49). Akdeniz bölgesinin güneyinde (Hatay, İçel, Isparta) yapılan bir çalışmada, bitkinin yapraklarının zeytinyağı içerisinde bekletilmesiyle elde edilen maseratının romatizma tedavisinde haricen uygulandığı tespit edilmiştir (50). Manisa’da yapılan bir etnobotanik çalışmada, bitkinin çiçekli dallarının yağda bekletilerek hazırlanan ekstresinin dahilen kahvaltı öncesi hemoroit tedavisinde tüketildiği bildirilmiştir (51).

Türkiye’nin Doğu Anadolu Bölgesi’nde gerçekleştirilen bir çalışmada *H. montbretii*, *H. perforatum*, *H. scabrum* bitkilerinin toprak üstü kısımlarının dekoksasyon şeklinde hazırlanarak hemoroit tedavisinde dahilen kullanıldığı bildirilmiştir (52).

Nevşehir ve yöresinde gerçekleştirilen bir çalışmada, *H. scabrum* meyvelerinin infüzyon şeklinde hazırlanarak hemoroit tedavisinde dahilen kullanıldığı bildirilmiştir (53). Aksaray’ın Nizip bölgesinde yapılan bir çalışmada ise bitkinin çiçekli dallarının kaynatılmasıyla elde edilen çayın hemoroit tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir (54).

Sezik ve arkadaşlarının Anadolu’da (Ankara, Kayseri, Karaman, Konya, Niğde) yürütmüş oldukları etnobotanik çalışma neticesinde; *H. lydium* ve *H. scabrum* bitkilerinin çiçekleri dekoksasyon şeklinde hazırlanarak hemoroit tedavisinde çay olarak tüketildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada *H. perforatum* bitkisinin tamamı dekoksasyon şeklinde hazırlanarak hemoroit tedavisinde 6-12 ay süre ile çay olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (27).

Bosna Hersek'te *H. perforatum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan yağ maserasyonu hemoroit tedavisinde haricen kullanılmaktadır (55).

Litvanya bölgesinde yapılan bir etnobotanik çalışmada, *H. perforatum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından yapılan merhem haricen hemoroit tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (56).

Sırbistan'ın güneybatısında yapılan bir çalışmada, *H. perforatum* bitkisinin toprak üstü kısımlarının infüzyon ve yağ maserasyonunun haricen hemoroit tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (57). Sırbistan'ın Kopaonik dağı etrafında yapılan bir başka çalışmada da, bitkinin toprak üstü kısımlarından yağ maserasyonu hazırlanarak haricen hemoroit tedavisinde kullandığı tespit edilmiştir (58).

İtalya'nın güneyinde yapılan etnobotanik bir çalışmada, *H. perforatum* toprak üstü kısımlarından yağ içerisinde bekletilerek hazırlanan maserasyonun hayvanlarda romatizma tedavisinde masaj yapılarak kullanıldığı bildirilmiştir (59).

Etiyopya'da yapılan bir çalışmada, *H. quartinianum* bitkisinin ezilmiş yaprakları suyla karıştırılarak dahilen hemoroit tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir (60).

Çin'de yapılan bir başka çalışmada, *H. acmosepalum* bitkisinin kök ve saplarından hazırlanan dekoksasyonun dahilen artrit tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (61).

2.3. BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Bu bölüm iki kısımdan oluşmaktadır. İlk kısım, *H. calycinum* bitkisinin üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmaları hakkında bilgiler içermektedir. İkinci kısım ise *Hypericum* türleri üzerinde gerçekleştirilmiş olan antienflamatuvar aktivite çalışmaları hakkında bilgiler içermektedir.

2.3.1. *H. calycinum* Bitkisi Üzerinde Gerçekleştirilen Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bu kısımda *H. calycinum* bitkisi üzerinde gerçekleştirilen biyolojik aktivite çalışmaları derlenmiştir. Literatür değerlendirildiğinde bitkinin çeşitli enzim inhibitörü etkilerinin (hyalüronidaz ve kolajenaz) yanı sıra antioksidan, antimikrobiyal ve antidepresan etkileri ile ilgili çalışmaların bulunduğu tespit edilmiştir (62–70).

2.3.1.1. Antiaging ve antitirozinaz aktivite çalışmaları: *Hypericum* türlerinin (*H. calycinum*, *H. perforatum* ve *H. confertum*) yaşlanma karşıtı etkilerini ve cilt beyazlatma özelliklerini araştırmak için kolajenaz, elastaz, hyalüronidaz ve tirozinaz enzimlerine karşı enzim inhibisyon aktivitesi çalışılmıştır. Bu türlerinin MeOH ekstralarının anti-kolajenaz, anti-elastaz ve anti-hyalüronidaz aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak doğal kolajenaz inhibitörü polifenolik bir bileşik olan epigallokateşin gallat (EGCG) kullanılmıştır. *H. calycinum* MeOH ekstresi (IC_{50} : $51,24 \pm 1,33 \mu\text{g/mL}$), *H. perforatum* ve *H. confertum* bitkilerinin MeOH ekstralarından (sırasıyla IC_{50} : $61,53 \pm 0,40 \mu\text{g/mL}$, IC_{50} : $63,01 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$) yüksek kolajenaz inhibitörü etki göstermiştir. Bu çalışmada standart olarak kullanılan EGCG (IC_{50} : $43,47 \pm 1,82 \mu\text{g/mL}$)’nin göstermiş olduğu antikolajenaz etkinin *H. calycinum*’dan daha etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada bitkilerin elastaz inhibitörü etkisi de incelenmiştir. *H. calycinum* bitkisinin (IC_{50} : $55,77 \pm 1,32 \mu\text{g/mL}$) elastaz inhibitörü aktivitesinin çalışmadaki diğer bitkilerden (*H. perforatum* ve *H. confertum* sırasıyla IC_{50} : $64,76 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$ ve IC_{50} : $61,67 \pm 0,76 \mu\text{g/mL}$) ve standarttan (EGCG ise IC_{50} : $70,47 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$) daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Yazarlar, *Hypericum* türlerinin sahip olduğu zengin fenolik içeriklerinden dolayı anti-elastaz inhibisyon etkilerinin olduğunu bildirmiştir. Çalışmada aynı zamanda bitkilerin MeOH ekstralarının hyalüronidaz inhibitör etkileri değerlendirildiğinde *H. calycinum* ekstresinin (IC_{50} : $22,17 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$), standart olarak kullanılan tannik asite (IC_{50} değeri ise $30,49 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) kıyasla önemli derecede hyalüronidaz inhibisyonu gösterdiği bildirilmiştir. *H. confertum* bitkisi ise $36,55 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ IC_{50} değerinde hyalüronidaz inhibisyonu göstermiştir. Sonuç olarak *H. calycinum* ekstresinin, tannik asit ve diğer iki ekstreye (*H. perforatum* ve *H. confertum*) oranla yüksek antihyalüronidaz aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmada tirozinaz inhibisyon aktivitesi de incelenmiştir. *H. perforatum* ($\%48,22 \pm \%0,38$ inhibisyon) ve *H. confertum* ($\%49,92 \pm \%0,21$ inhibisyon) bitkilerinin MeOH ekstraları ($200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon), tirozinaz enzimi üzerinde kojik asite ($200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon) kıyasla orta derecede inhibitör etki göstermiştir. *H. calycinum* bitkisinin MeOH ekstresi ($200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon) ise ($\%54,30 \pm \%0,49$ inhibisyon) çalışmadaki diğer bitki ekstralarından yüksek bir inhibisyon değeri göstermiştir. Bilinen bir tirozinaz enzim inhibitörü olan kojik asitin ($200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda $\%95,05 \pm \%0,37$ inhibisyon) bu üç ekstreten daha etkili olduğu bildirilmiştir (62).

2.3.1.2. Antioksidan aktivite çalışmaları: Kırmızıbekmez ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada (2009), *H. calycinum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen bileşikler antioksidan etkileri bakımından 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali (DPPH) ve NO yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Çalışmada klorojenik asit, butil klorojenat, yedi adet flavanoit (kersetin, kersitrin, hiperozit, izokersitrin, mikelianin, rutin ve I3, II8-biapigenin) ve iki adet flavanol (kateşin ve epikateşin) elde edilmiştir. Bu bileşikler içerisinde kateşin ve epikateşinin DPPH aktivitesi (sırasıyla, IC₅₀: 4,2 ve 4,7 µm) ile NO süpürme aktivitesi (sırasıyla, IC₅₀: 190 ve 170 µm) diğer bileşiklere ve standart olarak çalışılan askorbik asite (DPPH aktivitesi IC₅₀: 2,4 µm ve NO süpürme aktivitesi IC₅₀: 100 µm) kıyasla anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir. Bir diğer flavanol türevi olan rutin bileşiğinin de yüksek DPPH aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (IC₅₀: 9,8 µm). Çalışmanın sonucunda, elde edilen bileşiklerden kateşin ve epikateşinin *in vivo* çalışmalar için uygun adaylar oldukları bildirilmiştir (63).

H. perforatum ve *H. calycinum* bitkilerinin toprak üstü kısımlarının sulu-etanolü ekstraktlarının 0,5 mg/mL konsantrasyonda antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, *H. perforatum* ve *H. calycinum* bitkileri sırasıyla %20,7 ve %24,5 demir iyonlarını şelatlama kapasitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiş ve *H. calycinum* türünün toplam fenolik madde miktarının (313,94 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g) *H. perforatum* türünden daha yüksek olduğu (308,83 mg GAE/100 g) bildirilmiştir (23).

İtalya'nın Sicilya adasında yetişen 11 farklı *Hypericum* türünün (*H. perforatum*, *H. calycinum*, *H. aegypticum*, *H. androsaemum*, *H. patulum*, *H. perforatum*, *H. pubescens*, *H. tetrapterum*, *H. hircinum*, *H. hirsutum*, *H. montanum*) antioksidan aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada *Hypericum* türlerinin antioksidan etkisi DPPH ve oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) yöntemleriyle araştırılmış, Folin-Ciocalteu reaktifi ile ise toplam fenolik madde miktar tayini gerçekleştirilmiştir. DPPH sonuçlarına göre en etkili türler, sırasıyla *H. androsaemum* (3,50 mmol troloks eşdeğeri (TE) ± 1,14 g), *H. hirsutum* (3,14 mmol TE ± 0,84 g), *H. perforatum* (2,72 mmol TE ± 0,60 g) ve *H. calycinum* (2,66 mmol TE ± 0,83 g) olarak belirtilmiştir. ORAC sonuçlarına göre ise *H. perforatum* (1,03 mmol TE ± 0,19 g) bitkisi en yüksek aktiviteyi gösterirken onu sırasıyla *H. perforatum* (0,89 mmol TE ± 0,03 g) ve *H. calycinum* (0,80 mmol TE ± 0,02 g) bitkilerinin takip ettiği bildirilmiştir.

En yüksek fenol içeren türler, sırasıyla *H. perforatum* (322,74 µg GAE ± 35,74 mg), *H. androsaemum* (316,07 µg GAE ± 65,34 mg), *H. tetrapterum* (290,70 µg GAE ± 17,44 mg) ve *H. calycinum* (286,06 µg GAE ± 31,87 mg) olarak bildirilmiştir (64).

2.3.1.3. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları:

2.3.1.3.a. Antibakteriyel aktivite çalışmaları: Hoş ve Tunç'un gerçekleştirdiği bir çalışmada (2016), *H. calycinum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan MeOH ve aseton ekstraktlarının *Streptococcus mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans* ve *Staphylococcus epidermis* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi *in vitro* olarak çalışılmıştır. *H. calycinum* bitkisinin antibakteriyel aktivitesini belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak müstahzar antibiyotik disklerinin [Klindamisin (10 µg), Tetrasiklin (10 µg) ve Amoksisilin-Klavulanik asit (30 µg)] kullanıldığı belirtilmiştir. Çalışma sonucunda *H. calycinum* çiçeklerinden elde edilen MeOH ekstraktlarının (400 µg/10 µL, 800 µg/10 µL, 1600 µg/10 µL, 3200 µg/10 µL konsantrasyonlarda) çalışmadaki tüm bakteriler üzerine inhibitör etki gösterdiği; en yüksek antibakteriyel aktivitenin ise konsantrasyona bağlı olarak (inhibisyon çapları sırasıyla 11 mm, 11,6 mm, 12,9 mm, 13mm) *S. mutans*'a karşı gözlemlendiği tespit edilmiştir (65).

H. calycinum bitkisinin EtOH ve MeOH ekstraktlarının kullanıldığı bir çalışmada sekiz patojen (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Escherichia coli* 35218, *E. coli* 25922, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteri üzerinde bu ekstraktların antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bitkinin EtOH ekstresi, *E. coli* 35218, *E. coli* 25922 ve *B. subtilis* üzerinde aktivite göstermezken, *B. cereus*'a karşı yüksek (MİK: 41,67 µg/mL) aktivite göstermiştir. Diğer taraftan, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus* bakterilerine karşı ise antibakteriyel (MİK: 31,25 µg/mL) aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bitkinin MeOH ekstresi ise, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı aktivite göstermemiştir. *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* 35218, *E. coli* 25922, *P. vulgaris* bakterilerine karşı ise (MİK: 31,25 µg/mL) aktivite göstermiştir (66).

Hypericum türlerinin (*H. androsaemum*, *H. calycinum*, *H. foliosum*, *H. hircinum*, *H. grandifolium*, *H. perforatum*, *H. perfoliatum*, *H. undulatum*, *H. humifusum*, *H.*

linarifolium, *H. canariense*, *H. tomentosum*, *H. pubescens*, *H. glandulosum*, *H. elodes*) antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 15 farklı türün MeOH ekstraktları hazırlanarak antibakteriyel [2 Gram (-), 2 Gram (+) suş ve 4 non-tüberküloz *Mycobacterium* türü] etkileri incelenmiştir. Çalışmada referans olarak H₃₇Rv suşu, ilaca dirençli *M. tuberculosis* ve ilaca dirençli klinik izolatlar kullanılmıştır. *M. tuberculosis* H₃₇Rv suşuna karşı en aktif ekstraktların *H. elodes* ve *H. hircinum* MeOH ekstraktları olduğu belirlenmiştir ve minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri sırasıyla 25 ve 50 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bazı ekstraktların H₃₇Rv'nin dirençli varyantlarına karşı taraması yapılmış ve *H. foliosum*, *H. hircinum*, *H. grandifolium*, *H. humifusum* ve *H. elodes* MeOH ekstraktlarının 25 ila 50 µg/mL arasında değişen MİK değerleri ile güçlü aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. *H. humifusum*, *H. foliosum* ve *H. grandifolium* bitkileri H₃₇Rv referans suşuna karşı zayıf aktivite göstermelerine rağmen, dirençli referans suşlara ve klinik izolatlara karşı güçlü aktivite göstermiştir (MİK 200 µg/mL'lik). *S. aureus* sıkça karşılaşılan, güçlü Gram (+) bakterilerdendir. *H. perfoliatum*, *H. elodes*, *H. glandulosum*, *H. canariense*, *H. grandifolium*, *H. foliosum*, *H. hircinum*, *H. humifusum* ve *H. calycinum* MeOH ekstraktları, *S. aureus*'a karşı (MİK 6-25 µg/mL) güçlü bir antimikrobiyal etki göstermişlerdir. *S. faecium*'a karşı ise *H. androsaemum*, *H. foliosum*, *H. grandifolium*, *H. canariense* ve *H. glandulosum* önemli miktarda (MİK 12,5-50 µg/mL) aktivite göstermiştir (67).

M. tuberculosis, *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı yapılan bir çalışmada *H. calycinum*'un yapraklarından elde edilen EtOH ekstresinin *M. tuberculosis*'e karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (68).

2.3.1.3.b. Antifungal aktivite çalışmaları: Bitkinin antifungal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, *H. calycinum*'un toprak üstü kısımlarından oda sıcaklığında petrol eteri ekstresi hazırlanmıştır. Bitkinin petrol eteri ekstresinin içerdiği bileşenlerin biyolojik aktivitesinin daha detaylı incelenmesi için damlacık karşı akım kromatografisi yöntemiyle elde edilen tüm fraksiyonların ince tabaka kromatografisi (İTK) biyoanaliz yöntemiyle *Cladosporium cucumerinum*'a karşı etkinlikleri incelenmiştir. Sikloheksadienon türevleri bu testlerde herhangi bir antifungal aktivite göstermezken, geç elüsyon fraksiyonların *C. cucumerinum* büyümesini engelleyen bir bileşik içerdiği tespit edilmiştir. Düşük basınçlı sıvı kromatografisi (DBSK) ve ana aktif fraksiyonun jel filtrasyon kromatografisi ile yeni floroglusinol türevi

bir fungusit elde edilmiştir. Bu yeni floroglusinol türevi, *Plasmodium falciparum*'un dirençli bir K1 suşuna karşı test edilmiş ve 0,88 g/mL'lik bir IC₅₀ değeri tespit edilmiştir. Bu çalışma neticesinde *in vitro* olarak antimalaryal etkili bir floroglusinol türevi bulunduğu bildirilmiştir (69).

2.3.1.4. Antidepresan aktivite çalışmaları: *H. perforatum* ve *H. calycinum*'un toprak üstü kısımlarının EtOH ekstraktlarının, antidepresan ve merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri; yüzme süresi, lokomotor aktivite, kuyruk hareketi ve delikli tahta yöntemleri gibi çeşitli davranış modelleri kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak, *H. perforatum* ve *H. calycinum*'dan elde edilen ekstraktların hayvan modellerindeki etkilerinin karşılaştırılması için kullanılan antidepresan ilaçlar, desipramin ve trimipramin kadar etkili oldukları belirtilmiştir. Ayrıca *H. calycinum*'un antidepresan etkisinin *H. perforatum* kadar güçlü olabileceği ve depresyonda terapötik amaçlar için kullanılabileceği bildirilmiştir (70).

2.3.2. *Hypericum* Türleri Üzerinde Yapılan Antienflamatuvar Aktivite Çalışmaları

2.3.2.1. *In vitro* çalışmalar: *H. perforatum* bitkisinin köklerinden izole edilen üç ksantonun antienflamatuvar etkisinin araştırıldığı *in vitro* bir çalışmada, bileşiklerin COX-1, COX-2 enzimleri ve 5-LOX enzimi katalizli lökotrien B₄ (LTB₄) oluşumu üzerindeki aktiviteleri test edilmiştir. İzole edilen üç ksanton içinden aktivitesi yüksek olan 1,6-dihidroksi-5-metoksi-4',5'-dihidro-4',4',5'-trimetilfurano-(2',3':3,4)-ksanton, 50 µg/mL konsantrasyonda LTB₄ oluşumu üzerinde en yüksek (%98,46 ± 0,59) inhibisyonu göstermiştir. Aynı konsantrasyonda COX-1'e karşı hafif (%18,41 ± 6,50) ve COX-2'ye karşı orta derecede (%36,15 ± 4,68) inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir (71).

H. perforatum bitkisinin çeşitli (aseton, %50 EtOH, %96 EtOH) ekstraktları ve bazı bileşikleri (rutin, kersetin, izokersitrin, hiperisin, psödohiperisin) kullanılarak 12-LOX enzimi üzerindeki aktivitelerinin incelendiği bir çalışmaya göre en yüksek inhibitör etki flavanoid türevi olan hiperozit (IC₅₀: 5,768×10⁻⁶ M) bileşiğinde gözlemlenmiştir. Ayrıca bitkinin %0,05, %0,10, %0,15 konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlarının de aktivitesi incelenmiştir. Aseton ekstresinde, uygulanan konsantrasyonlarda (%0,05, %0,10, %0,15)

sırasıyla %59,38, %75,76 ve %82,22 oranında inhibisyon saptanmıştır. Yüzde %96 EtOH ekstresi %0,05, %0,10, %0,15 konsantrasyonlarda sırasıyla %58,45, %73,32 ve %95,40 oranında inhibitör etki göstermiştir. EtOH ekstresi (%50) uygulanan konsantrasyonlarda (%0,05, %0,10, %0,15) 12-LOX enzimine karşı sırasıyla %62,31, %85,68 ve %92,27 oranında inhibitör etki göstermiştir. (72).

H. empetrifolium bitkisinin meyvelerinin CH₂Cl₂ ekstresinden elde edilen iki floroglusinol türevinin [(3-geranil-1-(20-metilpropanol) floroglusinol, 3-geranil-1-(20-metilbutanol) floroglusinol)] antienflamatuvar etkisinin araştırıldığı *in vitro* çalışmada, COX-1, COX-2 enzimleri ve 5-LOX enzimi tarafından katalizlenen LTB₄ oluşumuna karşı aktivite test edilmiştir. İzole edilen 3-geranil-1-(20-metilpropanol) floroglusinol, COX-1, COX-2 ve LTB₄'e karşı sırasıyla 6 µM, 29 µM, 9 µM ve 2,2 µM IC₅₀ değerlerini göstermiştir. İzole edilen 3-geranil-1-(20-metilbutanol) floroglusinol, LTB₄ oluşumu üzerinde 5,8 µM IC₅₀ ve COX-1 enzimine karşı 26,2 µM IC₅₀ değeri göstermiştir (73).

Berköz ve arkadaşları (2018), *H. perforatum* bitkisinin içerdiği bileşiklerden olan hiperisin ve hiperforinin antienflamatuvar etkisini *in vitro* olarak test etmiştir. Bu çalışmada, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerine çeşitli konsantrasyonlarda (25, 50, 75 ve 100 nM) hiperforin ve hiperisin (2,5, 5, 7,5 ve 10 nM) uygulanmıştır. LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinde, PGE₂ ve NO üretimi ile COX-2 ve iNOS gen ekspresyonu ölçülerek hiperforin ve hiperisinin antienflamatuvar etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucuna göre hiperforin ve hiperisinin, Raw 264.7 makrofajlarında NO üretiminin yanı sıra iNOS ve COX-2 gen ekspresyonlarını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, hiperforin (75 ve 100 nM) ve hiperisinin (7,5 ve 10 µM) uygulandıkları en yüksek iki konsantrasyonda LPS ile uyarılmış hücrelerin PGE₂ üretimini (hiperforin sırasıyla %31,24 ve %56,72, hiperisin sırasıyla %38,53 ve %53,37), istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı tespit edilmiştir (74).

H. calabricum bitkisinin EtOAc ekstresinin antienflamatuvar aktivitesi, Raw 264.7 makrofaj hücreleri kullanılarak *in vitro* olarak incelenmiştir. EtOAc fraksiyonunun, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerindeki etkisi, Griess testi ile belirlenmiştir. Çalışmada, bitkinin EtOAc ekstresinin konsantrasyona bağlı şekilde, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimini önemli ölçüde (IC₅₀: 102 µg/mL) inhibe ettiği bildirilmiştir (75).

H. perforatum türü üzerinde çalışan Hammer ve arkadaşları (2008), Raw 264.7 makrofaj hücreleri ile bir antienflamatuvar aktivite çalışması yürütmüştür. Bitkinin EtOH ekstresi uygulandığı 10 µg/mL konsantrasyonda LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin canlılığında ciddi azalma meydana getirmemiştir. Bu ekstrenin PGE₂ üretimini %46 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu ana ekstreden üç fraksiyon (1A: EtOH, 1B: hekzan, 1C: kloroform) elde edilmiştir. Aktivite gösteren kloroform ekstresinden (10 µg/mL, %36 PGE₂ inhibisyonu) yeni alt fraksiyonlar (2A, 2B, 2C, 2D) elde edilmiştir. Alt fraksiyonlardan 2C (10 µg/mL, %44 PGE₂ inhibisyonu) aktivite göstermiştir. Bu alt fraksiyondan elde edilen yeni fraksiyonlardan (3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F) 3A (10 µg/mL, %22 PGE₂ inhibisyonu) aktivite göstermiştir. Bu alt fraksiyondan da yeni alt fraksiyonlar (4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F, 4G) elde edilmiştir. Yeni alt fraksiyonlardan 4F (%58 PGE₂ inhibisyonu) aktif çıkmıştır. Fraksiyon 3A'da klorojenik asit (%0,1), amentoflavon (%0,08), kersetin (%0,08) ve psödohiperisin (%0,03) bileşenlerinin en yüksek konsantrasyonları görülmüştür. Elde edilen 4 alt fraksiyonun kombinasyonu %34 oranında PGE₂ üretimini inhibe etmiştir. Çalışmaya göre, 3A fraksiyonunun, PGE₂ üretimi üzerinde gösterdiği inhibisyon değeri ile yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (76).

Farklı *Hypericum* türlerinin (*H. gentianoides*, *H. perforatum*) EtOH ekstrelerinin antienflamatuvar aktiviteleri, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Ekstrelerin, hücrelerin NO ve PGE₂ üretimi üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir. Enflamatuvar parametreler (NO, PGE₂) üzerinde, *H. perforatum* EtOH ekstresi 30 µg/mL konsantrasyonda (NO %14,6, PGE₂ %1,9), fraksiyonlardan psödohiperisin ise 0,08 µM konsantrasyonda (NO %21,6, PGE₂ %3,5) antienflamatuvar aktivite göstermiştir (77).

2.3.2.2. *In vivo* çalışmalar: İspanya'nın Tenerife bölgesinden toplanan *H. canariense* ve *H. glandulosum* türlerinden elde edilen infüzyon, MeOH ekstresi ve bu ekstrenin fraksiyonlarının antienflamatuvar etkileri incelenmiştir. Çalışmada, Swiss erkek fareler üzerinde, tetradekanoilforbol asetat (TPA) ile oluşturulan kulak ödemi modeli kullanılmıştır. Bitkilerin infüzyonlarının ve *H. canariense* MeOH ekstresinin su fraksiyonunun ödem üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir. *H. canarinse* MeOH ekstresi ve *H. glandulosum* *n*-BuOH fraksiyonu, uygulandıkları 1 mg/kulak konsantrasyonda, kulak ödemi üzerindeki (sırasıyla %76,38 ve %75,47) inhibisyon

etkilerinin, deksametazonun 0,1 mg/kulak konsantrasyonda gösterdiği inhibisyon (%83,12) etkisine yakın olduğu tespit edilmiştir (78).

Raziq ve arkadaşlarının (2015) *H. oblongifolium* bitkisi üzerinde yürüttükleri bir çalışmada, karagenin kaynaklı pençe ödemi testi kullanılmıştır. Karagenin kaynaklı pençe ödemi oluşturulan farelere (BALB/c) bitkinin MeOH ekstresi, günlük 100 mg/kg, 200 mg/kg ve 300 mg/kg konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Çalışma süresince hayvanlar saat başı kontrol edilmiştir. Yapılan kontrollerde, farelerde ödem miktarının [1. saat (%10, %13,5, %21,4), 2. Saat (%21, %30,8, % 38,3), 3. saat (%30,6, %50,6, %66,2) ve 4. saat (%28,8, %43,6, %54,1)] azaldığı tespit edilmiştir (79).

H. reflexum bitkisinin MeOH ekstresi ve fraksiyonlarının antienflamatuvar etkisi, Swiss fareleri üzerinde asetik asite bağlı kıvrınma testi, formalin kaynaklı pençe ödemi ve TPA kaynaklı kulak ödemi gibi modeller kullanılarak araştırılmıştır. Bitkinin MeOH ekstresi (1000 mg/kg p.o) ve kloroform fraksiyonunun (500 mg/kg p.o), formalin kaynaklı pençe ödemi üzerinde, sırasıyla %28,84 ve %63,74 oranında inhibisyon sağladığı tespit edilmiştir. Asetik asite bağlı kıvrınmaya karşı, bitkinin infüzyonu (2500 mg/kg p.o) %40,24 oranında antienflamatuvar etki göstermiştir [İbuprofen (50 mg/kg p.o) %64,63]. Bitkinin MeOH ekstresinin (1,00 mg/kulak) TPA kaynaklı kulak ödemi %69,64 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir [Deksametazon (0,10 mg/kulak) %86,02] (80).

H. triquetrifolium bitkisinin, karagenin kaynaklı pençe ödemi oluşturulan sıçanlar üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya göre, bitkinin MeOH ekstresinin ödem üzerinde antienflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. Karagenin enjeksiyonundan (%1'lik 0,1 mL) 30 dk önce, kontrol grubu sıçanlarına (Wistar erkek sıçan) subkutan olarak %0,4 dimetilsülfoksit (DMSO), deney grubu sıçanlarına ise 25,50 ve 60 mg/kg dozlarda MeOH ekstresi uygulanmıştır. Arka ayak hacmi, karagenin enjeksiyonundan önce ve sonra, 6 saat boyunca, her saat başı olmak üzere ölçülmüştür. Bitkinin MeOH ekstresinin, doza bağlı olarak karagenin enjeksiyonundan sonraki 2, 3, 4, 5 ve 6. saatlerde sıçanlardaki ödem üzerinde inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (81).

Trovato ve arkadaşları (2001) tarafından, *H. empetrifolium* MeOH ekstresinin antienflamatuvar etkisi, karagenin kaynaklı pençe ödemi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada, erkek Wistar sıçanları üç gruba ayrılmıştır. İlk gruba, karageninden bir saat önce, intraperitoneal yolla 100 mg/kg MeOH ekstresi enjekte

edilmiştir. İkinci gruba (kontrol grubu), sadece taşıyıcı verilmiştir. Üçüncü gruba ise, 5 mg/ kg indometazin oral olarak verilmiştir. Daha sonra 1, 2 ve 3. saatlerde ödem oluşumu takip edilmiştir. MeOH ekstresinin, saat başı ödem oluşumunu sırasıyla %51,52, %70,90 ve %77,40 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. İndometazinin ise ödemi sırasıyla %16,44, %32,89 ve %65,05 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, bitkinin MeOH ekstresinin uygulanan dozlarda indometazinden (5 mg/ kg) daha yüksek ödem azaltıcı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (82).

Savikin ve arkadaşları (2007), *Hypericum* türlerinin (*H. barbatum*, *H. hirsutum*, *H. androsaemum*, *H. richerii*, *H. perforatum* ve kültür ortamında yetişmiş *H. perforatum*) EtOH ekstrelerini kullanarak, karagenin kaynaklı pençe ödemi oluşturulmuş sıçanlar (Wistar) üzerinde antienflamatuvar aktivite üzerine incelemelerde bulunmuşlardır. Deney grubu sıçanlarına 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda MeOH ekstresi, oral olarak uygulanmıştır. Referans grubu sıçanlarına 1, 2, 4 ve 8 mg/kg dozlarda DMSO içerisinde seyreltilmiş indometazin, oral yolla uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise, 1 mL/kg oral yoldan DMSO verilmiştir. Karagenin solüsyonu (0,1 mL içerisinde %0,5'lik), ekstre ve indometazin uygulanan farelere bir saat sonra oral yolla uygulanmıştır. Sıçanlar, ödem oluşuktan sonra sakrifiye edilmiş ve ödem oluşan arka ayakları ekstirpe edilerek tartılmıştır. *H. hirsutum*, *H. perforatum* ve kültür ortamında yetişmiş *H. perforatum*, benzer antienflamatuvar etki göstermiştir [sırasıyla ortalama etkili dozlar (ED₅₀): 46,75 mg/kg, 47,55 mg/kg, 50,86 mg/kg]. *H. barbatum* ve kültür ortamında yetişmiş *H. perforatum* ise, farklı derecelerde antienflamatuvar etki göstermiştir (sırasıyla ED₅₀: 90,15 mg/kg ve 50,86 mg/kg). Bitkilerin indometazine (ED₅₀: 2,48 mg/kg) kıyasla yaklaşık 20 kat daha düşük antienflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (83).

2.3.2.3. Klinik çalışmalar: Meinke ve arkadaşlarının (2012), *H. perforatum* bitkisi ile gerçekleştirdikleri klinik bir çalışmada bitki ekstresi içeren bir krem formülasyonunun, ışığa karşı koruyuculuğu, 22 (4 erkek ve 18 kadın, 19 ve 59 yaş arası) gönüllü üzerinde incelenmiştir. Çalışmada kullanılan materyalin, hiperforin bileşiğince zengin olması ve hiperisin içermemesine dikkat edildiği bildirilmiştir. Gönüllüler, cilt tipleri II-III olan, sigara içmeyen, kadın ve erkekler arasından seçilmiştir. Gönüllülerin sırt bölgesi iki bölüme ayrılmıştır. Bir bölüme taşıyıcı uygulanmış, diğer bölüme ise verum krem (%1,5 *H. perforatum* ekstresi içeren) uygulanmış veya uygulama yapmadan boş bırakılmıştır. Otuz dakika sonra, test bölgelerinin bir tarafı, 1,5 minimal eritemli UVB

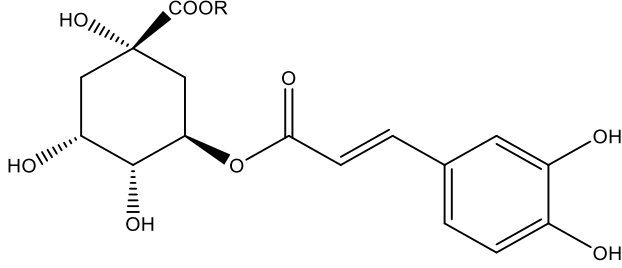
dozu ile ışınlanmış; diğer bölge ise ışınlanmamıştır. Tüm test bölgelerinde eritem, 48 saat sonra fotometrik olarak ölçülmüştür. Çalışma sonucuna göre, verum kreminin, taşıyıcı uygulanmış ve boş bırakılmış cilde kıyasla, cilt eritemini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca kremin, ışınlama yapılmayan test bölgelerinde tahrişe neden olmadığı da bildirilmiştir (84).

Samadi ve arkadaşlarının (2010) gerçekleştirdiği bir klinik çalışmada, *H. perforatum*'un sezaryen yaralarında doku iyileşmesi ve hipertrofik nedbe dokusu oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmaya 144 adet sezaryen operasyonu geçirmiş kadın dahil edilmiştir. Çalışma üç grup halinde gerçekleştirilmiştir (ilaç uygulanan, plasebo ve kontrol grubu). Deneklerin yara bölgelerine 16 gün boyunca günde 3 defa *H. perforatum* içeren merhem ve plasebo merhemi topikal olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Onuncu günde REEDA skalasına göre; 40. Günde ise Vancouver yara skalasına göre ölçümler yapılmıştır. Onuncu ve 40. Günde yapılan ölçümlerde, hem yara iyileşmesi hem de skar oluşumu bakımından *H. perforatum* grubunun anlamlı derecede daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (85).

2.4. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

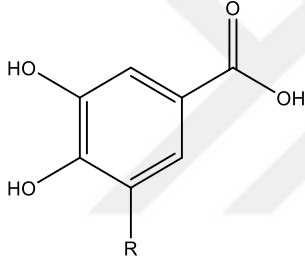
Literatür taraması neticesinde bitkinin fenolik asitler (klorojenik asit, butil klorojenat, gallik asit, protokateşik asit, *p*-kumarik asit), flavanoitler (kersetin, kersitrin, hiperozit, izokersitrin, rutin), biflavonlar, lavandulil flavanonlar, flavan-3-oller (kateşin, epikateşin), açılfloroglusinoller (hiperforin, adhiperforin) ve sikloheksadienon türevlerini içerdiği görülmüştür (41,62,63,64,86). Literatür taraması sonuçları Şekil 2.2 ve Şekil 2.12 arasında özetlenmiştir.

2.4.1. Fenolik Asitler



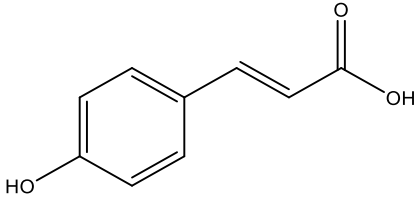
Bileşik adı	R	Bulunduğu Kısım	Kaynak
Klorojenik asit	H	Toprak üstü	(62,63)
Butil klorojenat	<i>n</i> -Butil		

Şekil 2.2: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen fenolik asitler-1



Bileşik adı	R	Bulunduğu Kısım	Kaynak
Gallik asit	OH	Toprak üstü	(62)
Protokateşik asit	H		

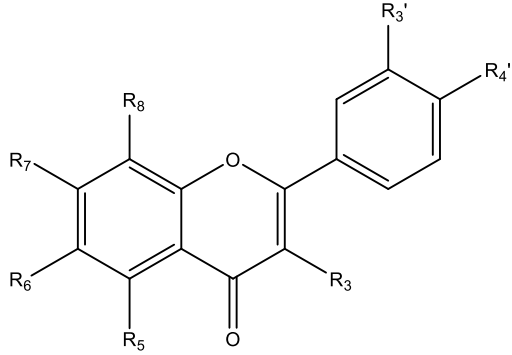
Şekil 2.3: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen fenolik asitler-2



Bileşik adı	Bulunduğu Kısım	Kaynak
<i>p</i> -kumarik asit	Toprak üstü	(62)

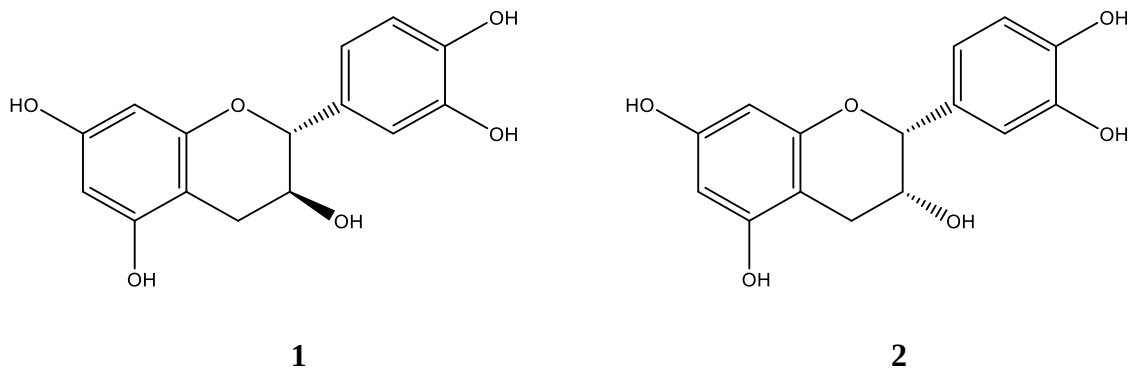
Şekil 2.4: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen fenolik asitler-3

2.4.2. Flavonoitler



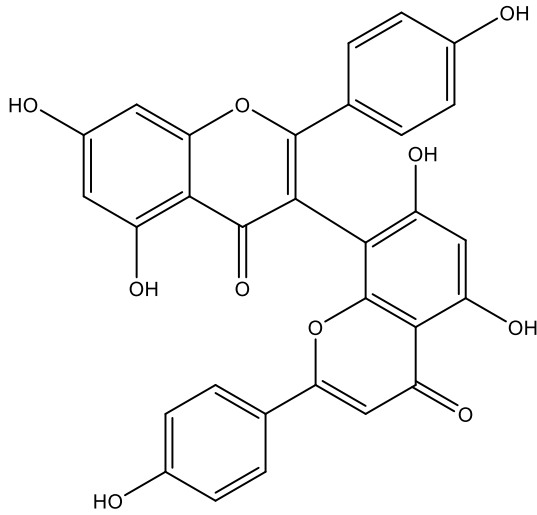
Bileşik adı	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₃ '	R ₄ '	Bulunduğu kısım	Kaynak
Kersetin-3-O-rutinozit (rutin)	O-Ramnoglukoz	OH	H	OH	H	OH	OH	Toprak üstü	(62,63)
Kersetin-3-O-galaktozit (hiperozit)	O-Galaktoz	OH	H	OH	H	OH	OH		
Kersetin-3-O-glukozit (izokersitrin)	O-Glukoz	OH	H	OH	H	OH	OH		
Kersetin-3-O-ramnozit (kersitrin)	O-Ramnoz	OH	H	OH	H	OH	OH		
Kersetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH		

Şekil 2.5: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen flavonoitler



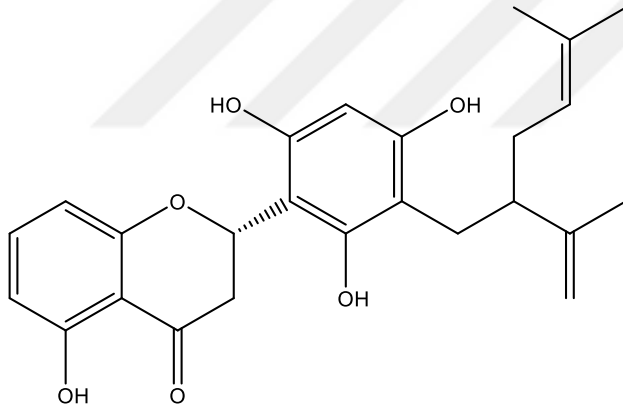
Bileşik adı	Bulunduğu Kısım	Kaynak
(+)-Kateşin (1)	Toprak üstü	(63,64)
(-)-Epikateşin (2)		

Şekil 2.6: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen flavan-3-oller



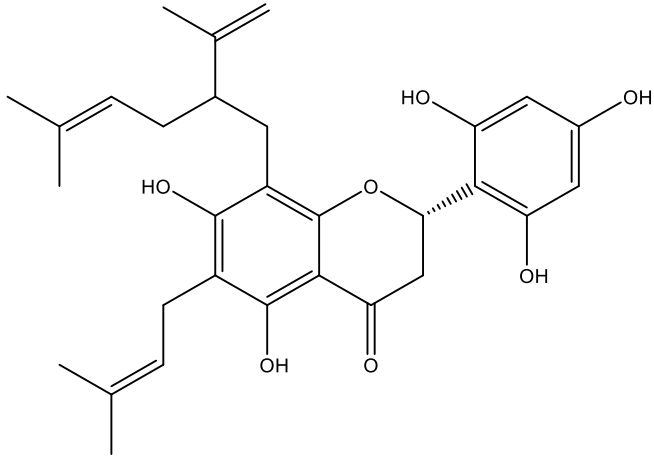
Bileşik adı	Bulunduğu Kısım	Kaynak
I3, II8-biapigenin	Toprak üstü	(63,64)

Şekil 2.7: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen biflavonlar

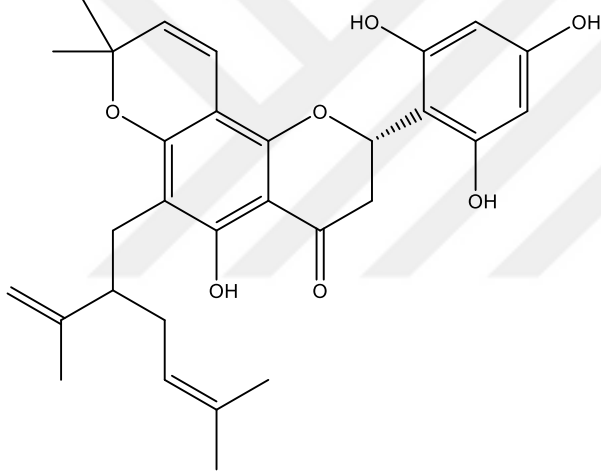


Bileşik adı	Bulunduğu Kısım	Kaynak
Calycinigin A	Gövde	(41)

Şekil 2.8: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen lavandülillenmiş flavanonlar-1



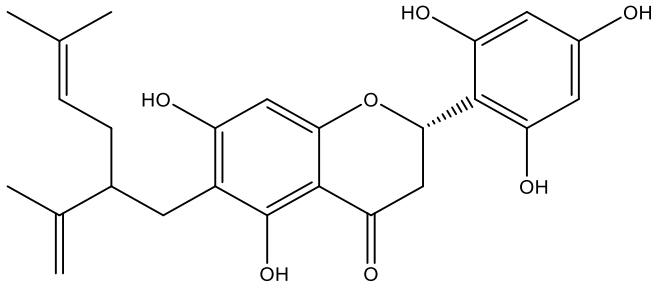
1



2

Bileşik adı	Bulunduğu Kısım	Kaynak
Exiguaflavanon J (1)	Gövde	(41)
Exiguaflavanon I (2)		

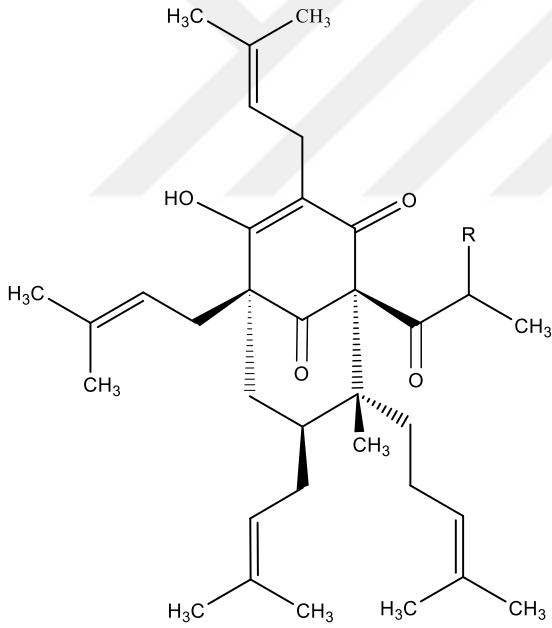
Şekil 2.9: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen lavandülillenmiş flavanonlar-2



Bileşik adı	Bulunduğu Kısım	Kaynak
Exiguaflavanon C	Gövde	(41)

Şekil 2.10: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen lavandülillenmiş flavanonlar-3

2.4.3. Floroglusinoller



Bileşik adı	R	Bulunduğu Kısım	Kaynak
Hiperforin	H	Toprak üstü	(64)
Adhiperforin	CH ₃		

Şekil 2.11: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen açılfloroglusinoller

2.4.4. Diğer Bileşikler

Bileşik adı	Bulunduğu Kısım	Kaynak
Chinesin II	Toprak üstü	(86)
Hypercalin A		
Hypercalin B		
Hypercalin C		
3,5-dihidroksi-4- {[1R*,2S*,5S*]-2-hidroksi-2-metil-5-(1-metilenil)siklopentil]metil}-6,6-bis-(3-metilbut-2-enil)-2-(2-metilpropanoil)sikloheksa-2,4-dien-1-one.		

Şekil 2.12: *H. calycinum* bitkisinde tespit edilen diğer bileşikler

2.5. ENFLAMASYON VE ENFLAMATUVAR MEDİYATÖRLER

2.5.1 Enflamasyon

Enflamasyon; fiziksel, kimyasal veya biyolojik olarak karşılaşılan stres etkenlerine karşı bağışıklık sisteminin gösterdiği fizyolojik yanıtıdır (1). Kızarıklık (eritema), ödem, ağrı ve ateş en sık karşılaşılan enflamasyon belirtilerindendir (87). Vücudun enflamasyona verdiği yanıtın hızına ve yeterliliğine bakılarak akut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır (1). Akut enflamasyon, vücudun enflamasyon uyaranlarına verdiği ilk yanıtıdır ve kısa sürelidir. Ağrı, ısı artışı, kızarıklık, şişlik ve fonksiyon kaybı ile karakterizedir. Uyaran ortadan kaldırıldığı andan itibaren enflamasyon da sonlanır. Kronik enflamasyon ise vücudun enflamatuvar uyaranlara uzun süreli maruz kalması sonucunda hasarlı bölgedeki hücrelerin progresif olarak değişerek enflamasyona cevap vermesidir. Kronik enflamasyon makrofaj, lenfosit ve plazma hücreleri ile karakterizedir. Kronik enflamasyon kontrol altına alınamadığında doku hasarı, organ yetmezliği ve ölüm meydana gelebilmektedir. Kronik enflamasyon, halk arasında yaygın görülen romatoid artrit, astım, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar, kanser ve yaşlanma gibi birçok hastalığın patojenezinde önemli role sahiptir (2–5).

2.5.2. Nitrik Oksit

Nitrit oksit (NO), parakrin ve otokrin sinyal molekülü olarak birçok fizyolojik ve patolojik durumlarda rol almaktadır. Bu molekül, vazodilatasyon, kan basıncı kontrolü ve

hücrel sinir iletimi gibi çeşitli mekanizmalarda yer almaktadır (14,15). NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-arjinin'den sentezlenir. Bu sentezde NOS enzim grubunun üç izoformu bulunmaktadır. Bunlar endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenbilir NOS (iNOS)'tur. nNOS ve eNOS, nöronlarda ve endotel hücrelerde yapısal olarak eksprese edilir. Yapısal NOS hücre içi ve hücreler arası haberleşmede rol almaktadır. iNOS ise yapısal olmamakla birlikte, sitokinler ve bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) tarafından indüklendikten sonra makrofajlar ve diğer çekirdekli hücreler tarafından eksprese edilir (14,88). iNOS'un, bazı sitokinler (TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ) ve bağışıklık hücreleri üzerinde önemli etkileri vardır. Lökosit ve trombositlerin lenfosit oluşumunu inhibe eden NO ayrıca fagositlerin antioksidan üretimini de inhibe ederek antienflamatuvar etki göstermektedir. Diğer taraftan, NO vazodilatasyonu artırır ve enflamasyon semptomlarının (ödem, kızarıklık, ateş) oluşumunu sağlar (89). Birçok hastalık NO'nin işlevindeki veya sentezindeki bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Ülseratif kolit, romatoid artrit, sedef ve osteoartrit gibi enflamatuvar hastalıklarda NO seviyesi artmaktadır (16).

2.5.3. Prostaglandin E₂

Prostaglandinler ve lökotrienler lipit kökenli otakoitlerdir ve 'eikozanoitler' olarak isimlendirilmektedir. Eikazanoitler, araşidonik asidin hücre membranındaki fosfolipitlerden, fosfolipaz A₂ (PLA₂) enzimi yardımıyla oluşmaktadır. Araşidonik asit, siklooksijenazlar (COX-1 veya COX-2) ile metabolize edilerek PGG₂ ve PGH₂'ye daha sonra prostaglandin E sentetaz (PGES) tarafından PGE₂'ye dönüştürülür (12,90). PGE₂, akut enflamasyonun oluşumunda rol alan bir faktördür (2). Vasküler düz kas hücrelerini gevşeterek dolaşımı hızlandırır ve ödem oluşumuna zemin sağlar. Ayrıca nöronları etkileyerek sistemik enflamasyon yanıtlarıyla ateş, yorgunluk ve ağrıya yüksek duyarlılık gibi semptomların oluşumuna neden olur (12,13). Prostanoitler (PGE₂ ve PGI₂), lipit kökenli otakoitlerle birlikte oluşturdukları sinerjik etki ile enflamasyonlu bölgelerde kılcal damarlarda kan akışını hızlandırdığı kapillar permeabiliteyi artırarak enflamasyona katkıda bulunur. PLA₂ enzimi üzerine inhibitör etki gösteren glukokortikoidler, hem COX hem de LOX ürünlerinin sentezini de azaltırlar ve güçlü antienflamatuvar etkiye sahiptirler (91).

2.5.4. Sitokinler

Sitokinler; enfeksiyon, bağışıklık, iltihaplanma, embriyonik gelişim, rejenerasyon, obezite, yaşlanma ve travma gibi birçok temel sürecin düzenleyicileridir. Asıl olarak makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilen sitokinler, enflamasyonu indükleyen (proenflamatuvar; TNF- α , IL-1, sekonder yardımcı proenflamatuvar; IL-6, IL-8) sitokinler veya azaltan (antienflamatuvar; IL-4, IL-10 ve IL-13) sitokinler olarak sınıflandırılırlar (17). Antienflamatuvar sitokinler, enflamasyonun ileri aşamasında salgılanır ve enflamasyon yanıtının kontrolünde görev alırlar. TNF- α , makrofaj ve T hücreleri tarafından salgılanır ve IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin salınımını uyarır. TNF ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler romatoid artrit, astım, Crohn hastalığı, psöriatik artrit, ankilozan spondilit, kalp yetmezliği, akut miyokard enfarktüsüne neden olan dislipidemi gibi patolojik durumlarda rol oynamaktadır (2,92). IL-6, kronik enflamatuvar hastalıklar, otoimmün hastalıklar, kolon kanseri, peritonit ve astım gibi hastalıklarda önemli bir role sahiptir. (17,93).

2.5.5. Makrofaj Hücreleri

Makrofaj hücreleri tüm organlarda ve bağ dokularda bulunan immun sistem hücreleridir. Makrofajlar LPS ile uyarılarak, çeşitli enflamatuvar mediyatörler (NO) ve sitokinler (TNF, IL-1, IL-6) ile birlikte, enflamasyonun başlatılmasında, sürdürülmesinde ve sonlandırılmasında önemli role sahiptir. Bir başka önemli özelliği ise fagositoz yapabilmesidir. Raw 264.7 makrofaj hücre hattı, enflamasyon üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda sıklıkla bir model olarak kullanılmaktadır (87,94–96).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Bitki Materyali

H. calycinum çiçekli toprak üstü kısımları Haziran 2021’de İstanbul, Beykoz’dan (Türkiye) toplanmıştır. Tür tayini, Dr. Öğr. Üyesi Çağla KIZILARSLAN HANÇER (Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir. Herbaryum örneği İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu’da (ISTE) saklanmaktadır (ISTE no: 117502). Çalışmada, bitkinin gölgede kurutulmuş çiçekli toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Bitki toplama üzerine gerekli arazi çalışma izin belgesi ilgili kurumdan (Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Müdürlüğü) alınmıştır (EK).

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Solventler

- Alüminyum klorür ($AlCl_3$) (Merck, 8.01081)
- Aseton (C_3H_6O) (Merck, 1.00014)
- Asetonitril (ACN) (Merck, 1.00030)
- Deksametazon (DEKSA) (Sigma Aldrich, D4902)
- Diklorometan (Merck, 1.06050)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck, 1.02952), DMSO steril (Genaxxon bioscience, M6325.0100)
- Dulbecco'nun Modifiye Eagles Besiyeri (DMEM) (Gibco-Invitrogen, 41966-029)
- Etil Asetat (EtOAc) (Merck, 1.00789)
- Etanol (EtOH) (Isolab, 920.026)
- Fetal Sığır Serum (FBS) (Gibco-Invitrogen, 16000044)
- Folin-Ciocalteu reaktifi (Carlo Erba, E463562)
- Formik asit ($HCOOH$) (Merck, 1.09535)

- Fosfat tamponlu salin (PBS 10X), (Gibco-Invitrogen, 14190136)
- Gallik Asit (Sigma Aldrich, G7384)
- Glasiyal asetik asit (gAA) (Isolab, 901.013)
- Griess reaktifi (Sigma Aldrich, G4410)
- Kersetin (Sigma Aldrich, Q4951)
- Kloroform (CHCl₃) (Isolab, 910.054)
- Lipopolisakkarit *Escherichia coli*’den elde edilen 0111: B4 (LPS) (Sigma Aldrich, L4391)
- L-N6- (1-iminoetil)-lisin dihidroklorit (L-NIL) (Cayman, 80310)
- Metanol (MeOH) (Merck, 1.13351)
- N-[2-(Sikloheksiloksi)-4-nitrofenol] metansülfonamit (NS-398) (Sigma Aldrich, N194)
- *n*-butanol (*n*-BuOH) (Merck, 1.00988)
- *n*-hekzan (Merck, 1.04369)
- Poliamit (Sorbtech, 26530-025)
- Potasyum Asetat (C₂H₃KO₂) (Carlo Erba, 358907)
- Potasyum Klorür (Isolab, 960.036)
- Slikajel 60 F₂₅₄ Alüminyum plaka (Merck, 1.107571000)
- Sodyum Karbonat Anhidrit (Na₂CO₃) (Isolab, 969.026)
- Sodyum Nitrit (NaNO₂) (Isolab, 969.123)
- Sülfürik Asit (H₂SO₄) (Isolab, 970.023)
- Tripsin Çözeltisi 10X (PAN biotech, 4251184105517)
- Vanilin (Sigma Aldrich, V1104)

3.1.3. Ekipmanlar

- Ayırma Hunisi (1000 mL) (Isolab, Almanya)
- Beher (50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL), Erlenmayer (100 mL, 200mL, 500 mL) (Isotherm, Türkiye)
- Kriyovialler (TPP, İsviçre)
- Mikro Pipetler (2,5-1000 µL) (Onilab, ABD)

- Pipet Uçları (10, 200, 1000 µL), Santrifüj Tüpleri (15 mL, 50 mL), Steril Hücre Kültürü Şişesi T-75 ve 96 Kuyucuklu Hücre Kültürü Plakaları, Steril Şırınga Filtresi 0,22 µm, İTK Sprey Kiti (Isolab, Almanya)
- Serolojik Pipet Steril (TPP, İsviçre)
- YBSK kolonu Fenil hekzil 4.6 x 150 mm, 3 µm (UP) (GL Sciences InterSustain, Japonya)

3.1.4. Kitler

- 15-LOX Enzim İnhibitörü Tarama Test Kiti (Cayman Chemical Company, 760700)
- IL-6 ELISA Kiti (R&D, M6000B)
- PGE₂ ELISA Kiti (ENZO, ADI-900-001; ELK Biotechnology, ELK8699)
- TNF-α ELISA Kiti (R&D, MTA00B)
- WST-1 Reaktifi (Roche Diagnostics, 11 644 807 001)

3.1.5. Cihazlar

- +4 Buzdolabı (KGN76AI32N, Bosch, Türkiye)
- -80°C Dondurucu (UF V 500, BINDER, Almanya)
- CO₂ İnkübatör (ICO150med, Memmert, Almanya)
- Elektrikli Isıtıcı (RT2 4922.76 NOK- 6203.12 NOK, Thermo Scientific, ABD)
- ELISA Plak Okuyucu (Multiskan Go, Thermo Scientific, Finlandiya; AMR-100, Allsheng, Çin)
- Etüv (ON-22G, Jeio Tech, Kore)
- Hassas Terazî (Pioneer PA224C, Ohaus, ABD; ATX224, Shimadzu, Japonya)
- İnvert Mikroskop (AE21E, Motic, Çin)
- Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (BSC-1300IIA2, Biobase, Çin)
- Liyofilizatör (Cooling Trap HC3055, HyperCool, Kore)
- Mikropılaka Çalkalayıcı (Titramax 100, Heidolph, Almanya)
- Otoklav (Hiclave HV-85 L, Hirayama, Japonya)
- Rotavapor (Hei-Vap, Heidolph, Almanya)
- Santrifüj (NF 800 R, Nüve, Türkiye)
- Sıvı Azot Tankı (Cryomaster 600, Antech, Çin)

- Su Banyosu (SWB15D, Stuart, İngiltere)
- Ultrasonik Banyo (S60H, Elma-Elmasonic, Almanya)
- UV Lambası (UVP UVGL-58, Analytikjena, ABD)
- Vorteks (ZX3, Velp, İtalya)
- YBSK (Nexera-i LC-2040C 3D Plus, Shimadzu, Japonya)

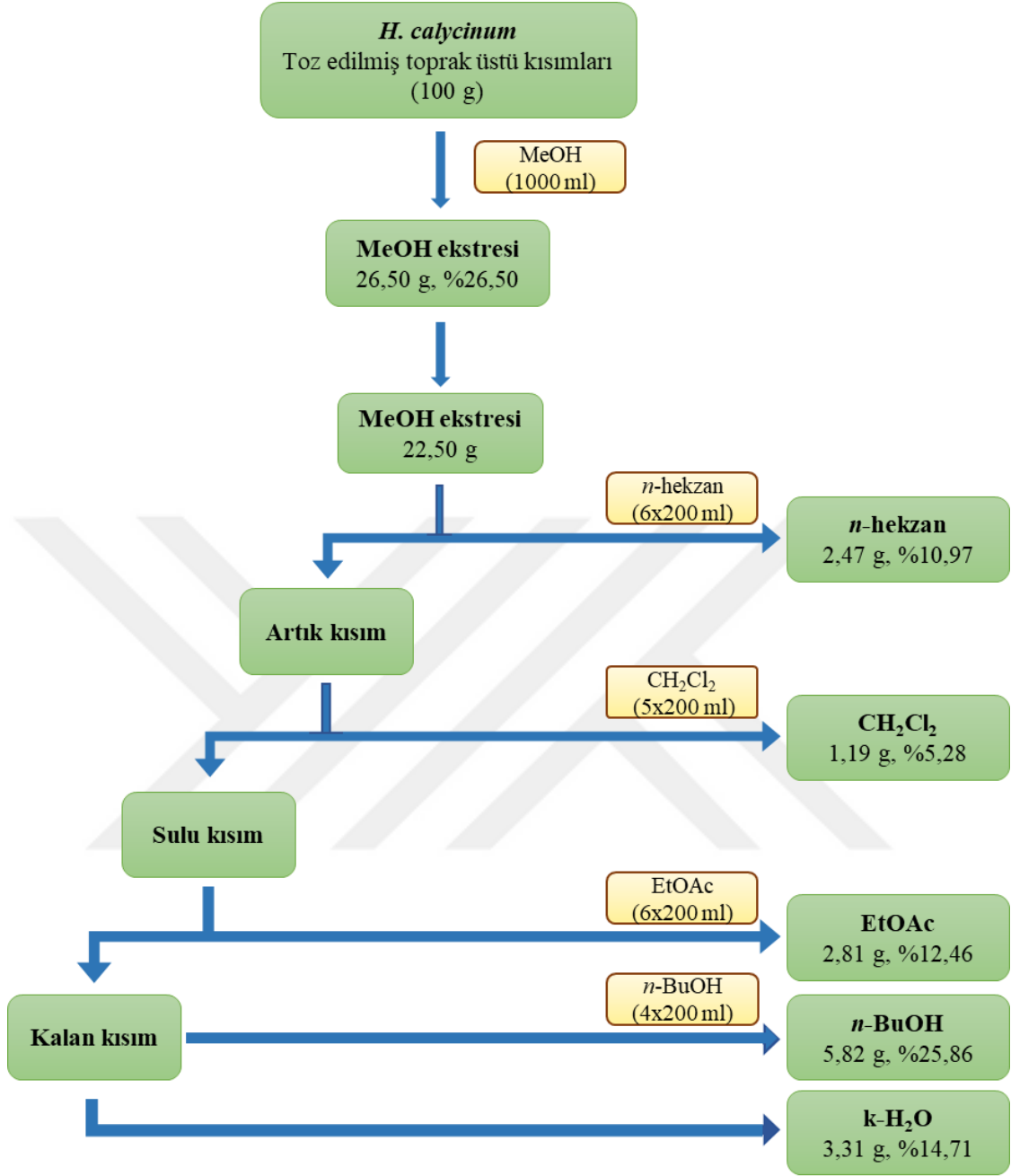
3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Fitokimyasal Yöntemler

Bitkinin toprak üstü kısımlarından öncelikle MeOH ekstresi hazırlanmıştır. Ardından sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak altekstreler hazırlanmıştır.

3.2.1.1. Ekstre hazırlanması: Kurutulmuş çiçekli toprak üstü kısımlar toz hale getirilerek 100 g tartılmış ve 1000 mL MeOH içerisinde, 40 °C su banyosunda 24 saat boyunca ara ara çalkalanarak ekstre edilmiştir. Ekstre, filtre kâğıdı ile süzölmüş ve çözücü 40 °C'de rotavaporda kuruluğa kadar uçurularak MeOH ekstresi elde edilmiştir (MeOH 26,5 g, verim %26,5). Gerekğinde ekstraksiyon tekrarlanarak ekstre miktarı artırılmıştır.

3.2.1.2. Sıvı-Sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile ekstrenin fraksiyonlanması: Bitkinin MeOH ekstresi (22,50 g), %10 oranında distile H₂O içeren 200 mL MeOH içerisinde çözülmüş ve ayırma hunisine aktarılmıştır. Takiben, *n*-hekzan (6 x 200 mL) kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile ekstre fraksiyonlanarak *n*-hekzan altekstresi elde edilmiştir. Kalan kısımdan MeOH uzaklaştırılıp, su ile seyreltildikten sonra sırasıyla CH₂Cl₂ (5 x 200 mL), EtOAc (6 x 200 mL) ve su ile doyurulmuş *n*-BuOH (4 x 200 mL) ile işlem tekrarlanmıştır. Sonuç olarak sırasıyla *n*-hekzan (*n*-hekzan 2,47 g, %10,97 verim), CH₂Cl₂ (CH₂Cl₂ 1,19 g, %5,28 verim), EtOAc (EtOAc 2,81 g %12,46 verim), *n*-BuOH (*n*-BuOH 5,82 g, %25,86 verim) ve k-H₂O (k-H₂O 3,31 g, %14,71 verim) altekstreleri elde edilmiştir. Organik çözücüler 40 °C'de rotavaporda kuruluğa kadar uçurulmuştur. EtOAc, *n*-BuOH ve k-H₂O altekstreleri liyofilize edilmiştir. Gerekğinde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri tekrarlanarak altekstre miktarları artırılmıştır.



Şekil 3.1: *H. calycinum* MeOH ekstresinin hazırlanması ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemiyle fraksiyonlanması

3.2.1.3. Kromatografik yöntemler: Çalışmamızda, *H. calycinum* bitkisinden elde edilen ekstre ve altekstrelerdeki bileşiklerin belirlenmesi ve kantitatif analizlerinin yapılabilmesi için İTK, açık kolon kromatografisi (AKK), YBSK ve GK/KS yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.1.3.a. İnce tabaka kromatografisi (İTK): Ekstre, altekstre ve kolon kromatografisi yöntemlerinden elde edilen fraksiyonların ön incelemesinin yapılması amacıyla İTK yöntemi kullanılmıştır. Numuneler uygun çözücülerde çözüldükten sonra plağın alt kısmının yaklaşık 1,5 cm yukarisından ve 1 cm aralıklarla bir cam pastör pipeti yardımı ile tatbik edilmiştir. Kromatografi tankına konulan plaklar 8-9 cm mesafe boyunca sürüklenmiştir. Numuneler önceden kaplanmış 0.20 mm kalınlığında silika jel 60 F₂₅₄ alüminyum plakalar kullanılarak (Sigma Aldrich, Almanya) çeşitli çözücü sistemleriyle [CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (70:30:3, 61:32:7), EtOAc:CH₂Cl₂:HCOOH:gAA:dH₂O (100:25:10:10:11), hekzan:EtOAc (9:1, 7:3, 2:3, 1:1), hekzan:aseton:AA (70:30:0,5), hekzan:EtOAc:AA (65:35:75), CHCl₃:MeOH:kH₂O (70:30:3, 80:20:1), CH₂Cl₂:MeOH (95:5)] incelenmiştir. Kromatogramlar, 254 ve 366 nm dalga boylarında (Analytikjena UV lambası) UV lambası altında görüntülenmiştir. Vanilin-H₂SO₄ (%1) ile derivatizasyondan sonra 105 °C derece etüv içerisinde ısıtılmış ve ardından tekrar çıplak gözle ve UV ışığı altında bileşiklerin görülmesi sağlanmıştır.

3.2.1.3.b. *H. calycinum* *n*-BuOH altekstresinin poliamit kolon kromatografisi yöntemiyle fraksiyonlanması:

Kolon boyutu: 2 x 40 cm

Sabit faz: Poliamit (Kolon kromatografisi için poliamit-Sorbetch, partikül boyutu: 50-160 µm)

Prosedür: 9,41 gr *n*-BuOH altekstresi 9 mL distile su içerisinde çözülmüştür. 37,5 gr poliamit içeren kolona uygulanmıştır. Poliamit kolonda H₂O/MeOH karışımı (% 0-100) ile elüsyon yapılmıştır. Kolon kromatografisi sonucunda 61 tane fraksiyon erlenmayerler yardımıyla toplanmıştır. İTK ile fraksiyonlar incelenerek 10 fraksiyon altında birleştirilmiştir: [*n*-BuOH (Fr. 2-12)] (5,522 gr), [*n*-BuOH (Fr. 13-18)] (0,1725 gr), [*n*-BuOH (Fr. 19-28)] (0,1883 gr), [*n*-BuOH (Fr. 29-36)] (0,1808 gr), [*n*-BuOH (Fr. 37)] (0,0202 gr), [*n*-BuOH (Fr. 38-41)] (0,0554 gr), [*n*-BuOH (Fr. 42)] (0,0130 gr), [*n*-BuOH (Fr 43-51)] (0,1817 gr), [*n*-BuOH (Fr. 52-55)] (0,0424 gr), [*n*-BuOH (Fr. 56-61)] (0,0444 gr).

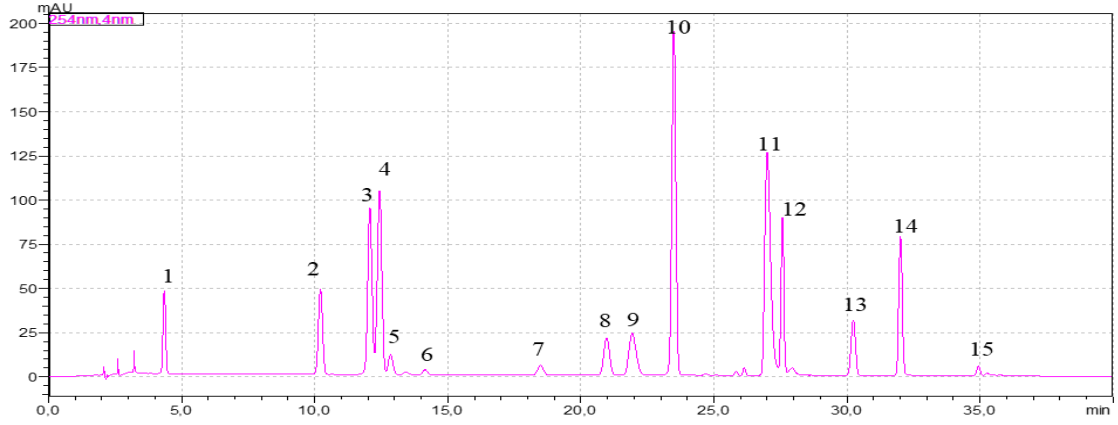
3.2.1.3.c. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK): Kantitatif analiz için YBSK cihazı (Shimadzu Nexera-I LC-2040C 3D Plus) kullanılmıştır. DAD dedektör ile 254 nm'de tarama yapılmıştır. Ayrım için fenil hekzil 4.6 x 150 mm, 3 µm (UP) (GL Sciences InterSustain, Japonya) ters faz dolgu maddeli kolon kullanılmıştır. Hareketli faz

olarak %0,1 HCOOH/deiyonize su (Çözücü A) ve asetonitril (ACN) (Çözücü B) (Merck, HPLC grade) ile Tablo 3.1'deki pompa programı kullanılmıştır. Analiz boyunca mobil faz akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Numune ve standartlar cihaza 10 µL olarak enjekte edilip kolon sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmıştır.

Tablo 3.1: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi pompa programı

Adımlar	Akış hızı (mL/dk)	Zaman (dakika)	% Çözücü B (ACN)	% Çözücü A (%0,1 HCOOH/deiyonize su)
1	1.00	0,01	5	95
2	1.00	7	9,50	90,50
3	1.00	20	17	83
4	1.00	35	40	60
5	1.00	40	0	100
6	1.00	40,01	Stop	

Yukarıda Tablo 3.1'de verilen metot uygulanarak 15 adet fenolik bileşik taranmıştır. Her bir fenolik bileşiğin maksimum absorbans verdiği dalga boyu belirlenmiştir. Hepsi maksimum dalga boylarında taranıp, standart grafikleri çizilmiştir. Daha sonra bitki ekstraktları 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanarak cihaza verilmiştir (97).



Şekil 3.2: Standart olarak kullanılan 15 Fenolik bileşiğin 254 nm'deki YBSK kromatogramı

Tablo 3.2: Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin YBSK bilgileri

	Fenolik Bileşik İsmi	Alıkonma Zamanı (dk)	Birim	Dalga Boyu (nm)
1	Gallik asit	4,352	mg/L	271
2	4-hidroksibenzoik asit	10,217	mg/L	254
3	Klorojenik asit	12,073	mg/L	325
4	Vanilik asit	12,437	mg/L	260
5	Kafeik asit	12,850	mg/L	248
6	Epikateşin	14,150	mg/L	277
7	<i>p</i> -kumarik asit	18,486	mg/L	308
8	Ferulik asit	20,971	mg/L	322
9	Salisilik asit	21,929	mg/L	235
10	Rutin	23,494	mg/L	254
11	Kikoric asit	27,011	mg/L	327
12	Apigenin-7-glukozit	27,574	mg/L	336
13	Sinamik asit	30,234	mg/L	276
14	Kersetin	32,008	mg/L	254
15	Naringenin	34,939	mg/L	288

3.2.1.3.d. Gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GK/KS): Bitkinin *n*-hekzan altekstresinin yağ asitleri bileşenlerinin tanımlanması ve bağıl yüzdelерinin belirlenmesi için GK/KS yöntemi kullanılmıştır. Yağ asidi analizleri, Anadolu Üniversitesi (Eskişehir, Türkiye), Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (AÜBİBAM) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu sistemde (Agilent 7890B), Alev İyonlaşma Dedektörü (FID) ve Agilent HP-Innowax (60 m x 0,25 mm iç çap x 0,25 µm) film kalınlığında kolon kullanılmıştır. GK şartları ise; dedektör sıcaklığı ve enjeksiyon sıcaklığı 250 °C olarak ayarlanmıştır. Seperasyon için toplam 100 dk ve sıcaklık kademeli olarak dakikada 4 °C artışla 60 °C'de 10 dk, dakikada 1 °C artışla 220 °C'de 10 dk, 240 °C'de 20 dk çalışılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum (0,7 mL/dk) kullanılmıştır.

Kütle Ayırıcı Dedektör Sistemde (Agilent 7890B GC 5977B) ise Agilent HP-Innowax 60 m x 0,25 mm iç çap x 0,25 µm film kalınlığında kolon kullanılmış olup enjeksiyon sıcaklığı 250 °C'ye ayarlanmıştır. Kütle ayırıcı sistem dedektörü kullanılmış olup iyonizasyon modu (EI) ve elektron enerjisi 70 eV'dir. İyon kaynağı 230 °C'ye ayarlanmıştır. 35-450 kütle/yük (m/z) arasında tarama yapılmıştır. Seperasyon için toplam 100 dk ve sıcaklık kademeli olarak dakikada 4 °C artışla 60 °C'de 10 dk, dakikada 1 °C artışla 220 °C'de 10 dk, 240 °C'de 20 dk çalışılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum (0,7 mL/dk) kullanılmıştır. Piklerin tanımlanmasında Wiley 9-Nist 11 Mass Spectral Database programı kullanılmıştır.

3.2.1.4. Toplam fenolik madde miktar tayini: Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarının hesaplanması için öncelikle 500 µg/mL konsantrasyonda DMSO içerisinde GA stok çözeltisi hazırlanıp (2,5 mg GA 5 mL DMSO'da çözölmüştür) bu stok çözeltisinden (7,8125 µg/mL, 15,625 µg/mL, 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL konsantrasyonlarında) seri dilüsyon yöntemi kullanılarak kalibrasyon standartları hazırlanmıştır. Ekstreler 1 mg/mL konsantrasyonda DMSO içerisinde hazırlanmıştır. Kör kuyucuklarına sadece reaktifler (Folin-ciocalteu ve Na₂CO₃) eklenmiştir. Numunelerin 20 µL olarak eklendiğı kuyucukların üzerine 100 µL %10 Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Ardından örnekler çalkalanıp 5 dk oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 80 µL %7,5 Na₂CO₃ eklenip çalkalanarak tüm kuyucuklardaki örneklerin homojen olmaları sağlanmıştır. Ardından 30 dk oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 765 nm dalga boyunda köre karşı ölçüm yapılip, tüm ölçümler üç

tekrarlı olarak çalışılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden hesaplanmış ve mg GAE/g ekstre olacak şekilde sunulmuştur (98–101).

3.2.1.5. Toplam flavanoit madde miktar tayini: Hazırlanan ekstrelerin toplam flavanoit içerikleri kersetine eşdeğer (KE) olarak $AlCl_3$ reaktifi ile belirlenmiştir. Kersetin (2,5 mg), %95 EtOH (5 mL) içerisinde çözülerek 500 $\mu g/mL$ konsantrasyonda stok solüsyonu hazırlanmıştır. Stok çözeltisinden (7,8125 $\mu g/mL$, 15,625 $\mu g/mL$, 31,25 $\mu g/mL$, 62,5 $\mu g/mL$, 125 $\mu g/mL$, 250 $\mu g/mL$, 500 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarında) seri dilüsyon yapılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Ekstreler, %95 EtOH içerisinde 2 mg/mL konsantrasyon olacak şekilde hazırlanmıştır. Kör kuyucuklarına sadece reaktifler (%10 $AlCl_3$ ve 1 M $C_2H_3KO_2$) eklenmiştir. 25 μL numune eklenen kuyucukların üzerine 75 μL %95 EtOH eklenmiştir. Ardından tüm kuyucuklara önce 5 μl %10 $AlCl_3$ 1 dk sonra 5 μL 1 M $C_2H_3KO_2$ ve son olarak da 140 μL deiyonize su eklenmiştir. Mikroplaka çalkalanıp ardından 30 dk boyunca, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. 415 nm dalga boyunda köre karşı ölçüm yapıp tüm ölçümler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Sonuçlar mg KE/g ekstre biçiminde sunulmuştur (102–105).

3.2.2. Aktivite Çalışmaları

Bu bölüm *in vitro* enflamatuvar parametreler üzerine aktivite çalışmalarını içermektedir.

3.2.2.1. Hücre ve hücre kültürü: Raw 264.7 makrofaj hücreleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC TIB-71) elde edilmiştir. Raw 264.7 hücre hattı, 1978'de W. C. Raschke tarafından BALB/c farelerinden türetilen makrofaj benzeri, Abelson lösemi virüsü ile transforme edilmiş bir hücre hattıdır. Hücreler, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş bir atmosferde 37 °C'de %10 fetal sığır serumu, 4 mM L-glutamin, 100 IU / mL penisilin ve 100 μg / mL streptomisin ilave edilmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Dulbecco'nun Modifiye Eagles Besiyeri) besiyerinde büyütülmüştür.

3.2.2.2. Hücre pasajı ve sayımı: Hücreler yaklaşık %70 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır. DMEM besiyeri uzaklaştırılmış ardından hücreler bir kez oda sıcaklığındaki 1X Phosphate Buffered Saline (PBS, fosfat tamponlu salin) (pH 7,4) ile yıkanmıştır. Hücreler daha sonra 2X Tripsin çözeltisi [%0,1 (a/h)] eklenerek 37 °C'de 3 dakika boyunca %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş ortamda inkübasyona bırakılarak hücrelerin bulunduğu ortamdan ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra tripsin çözeltisini

deaktive etmek için %10 fetal bovine serum (FBS, fetal sığır serumu) içeren DMEM besiyeri eklenmiştir. Ayrılan hücreleri içeren besiyeri bir flakona alınıp 5 dakika boyunca, 1200 rpm'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatantları atılan hücreler, besiyerinde süspande edilerek doku kültürü şişelerine (T75) ekilmiştir. Hücreler invert mikroskopta hemositometre kullanılarak sayılmıştır.

3.2.2.3. Hücre hattının kriyoprezervasyonu: Hücreler yukarıda tarif edildiği gibi tripsinize edilerek santrifüjlenmiştir. Süpernatant boşaltıldıktan sonra, hücre peleti donma ortamında süspande edilmiştir (%10 DMSO içeren FBS). Hücreler daha sonra 1 mL'lik alikotlar halinde kriyoviyallere aktarılmış ve yavaşça (-80 °C'de) dondurulmuştur. Daha sonra uzun süreli depolama için sıvı azot tankına aktarılmıştır.

3.2.2.4. Kriyoprezervasyon sonrası hücre çözülmesi: Hücreler, sıvı azottan uzaklaştırılarak 37 °C'de hızla çözülmüştür. Çözülen hücre süspansiyonu, steril bir santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 5 mL serum takviyeli besiyeri ilave edilmiştir. Ardından, hücreler 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüjlenmiştir. Hücre peletine zarar gelmeyecek şekilde süpernatant boşaltılmış ve besiyerinde süspande edilen hücreler, hücre kültürü şişelerine aktarılmıştır. 37 °C'de 12-24 saatlik inkübasyonun ardından, besiyeri taze besiyeriyle değiştirilmiştir.

3.2.2.5. WST-1 hücre canlılığı testi: Altekstrelerin Raw 264.7 makrofaj hücreleri üzerine toksik etki göstermeyen konsantrasyonları, WST-1 reaktifi kullanılarak (Roche Diagnostics; 11 644 807 001) ölçülmüştür. WST-1 testi, hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan pratik bir yöntemdir. Tetrazolyum bazlı tuz halde bir boya olan WST-1, süksinat tetrazolyum redüktaz enzimiyle suda çözülebilen ve spektrofotometrik ölçümlerle doğrudan nicelleştirilebilen, mor bir formazan tuzuna dönüşür. Raw 264.7 makrofaj hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş (22,500 hücre/kuyucuk) ve hücrelerin bağlanması için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Öncelikle hücrelere yalnızca ekstreler uygulanmıştır. Bunun için hücreler ekstrelerin çeşitli konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyona bırakılmış ardından hücre canlılığı aşağıda belirtilen biçimde değerlendirilmiştir. İkinci olarak, ekstrelerin LPS (1 µg/mL) ile beraber uygulandığındaki hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bunun için Raw 264.7 makrofaj hücreleri çeşitli konsantrasyonlardaki ekstreler ile bir saat ön inkübasyona bırakılmış ve ardından 1 µg/mL LPS ile, toplamda 24 saat olacak biçimde

37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklar PBS ile yıkanarak süpernatant boşaltılmış ve her kuyucuğa WST-1 reaktifi [%5 (h/h)] eklenmiştir. Ardından hücreler, 37 °C'de 60 dakika daha inkübe edilmiştir. Absorbans değerleri, bir spektrofotometre kullanılarak 450 ve 620 nm dalga boylarında okunmuştur. Tüm ekstratlar DMSO içinde çözölmüş ve DMEM ile uygun konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Bu költür ortamında DMSO'nun nihai konsantrasyonu %0,1'den (h/h) fazla değildir. Taşıyıcı kontrol grubu olarak %0,1 DMSO (h/h) içeren besiyeri grubu kullanılmıştır. Tüm ölçömler en az üç tekrarlı yapılmıştır.

3.2.2.6. Griess testi: Altekstrelerin (*n*-hekzan, CH₂Cl₂, *n*-BuOH, EtOAc), LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimi üzerindeki etkileri Griess testiyle belirlenmiştir. Költür ortamında biriken nitrit, Griess reaksiyonuna dayanarak NO üretiminin bir göstergesi olarak ölçölmüştür. Besiyeri (%10 FBS içeren) içindeki Raw 264.7 makrofaj hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir (22,500 hücre/kuyucuk). Hücrelerin bağlanması için 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklara çeşitli konsantrasyonlarda ekstratlar ilave edilmiştir. Bir saatlik ön inkübasyondan sonra hücreler, 1 µg/mL LPS ile uyarılmış ve plakalar toplam 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 50 µL hücre besiyeri üzerine 50 µL Griess reaktifi (Sigma Aldrich, G4410) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Absorbanslar, bir mikroparka okuyucu kullanılarak 540 nm'de okunmuştur. Numunelerdeki nitrit miktarı, NaNO₂ standart eğrisinden yola çıkılarak hesaplanmıştır. Tüm ölçömler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.2.2.7. PGE₂ ve sitokinlerin (TNF- α ve IL-6) seviyelerinin ELISA yöntemiyle ölçölmesi: Raw 264.7 makrofaj hücreleri 96 kuyucuklu hücre költürü plakasına ekilmiş (22,500 hücre/ kuyucuk) ve bağlanmaları için 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası ekstratlar, toksik olmayan konsantrasyonlarda eklenmiştir ve bir saat ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler, 1 µg/mL LPS ile uyarılmış ve toplamda 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süpernatantlar, inkübasyon sonrası buz üzerinde çalışılarak mikrosantrifüj tüpleri içersine alikotlanmıştır. Taşıyıcı kontrol grubu olarak %0,1 DMSO (h/h) içeren besiyeri grubu kullanılmıştır.

Raw 264.7 hücrelerin, TNF- α üretimi üzerindeki etkilerini belirlemek için TNF- α sandviç ELISA kiti (R&D; MTA00B) kullanılmıştır. Toplanan süpernatantlardaki TNF- α miktarları, ilgili ELISA kitinin üreticisi tarafından sağlanan protokole uygun olarak belirlenmiştir. Buna göre, her bir kuyucuğa 50 μ L seyreltme ajanı eklenmiştir. Kuyucuk başına 50 μ L standart, kontrol veya numune eklenmiş ve 1 dakika boyunca plaka çerçevesine hafifçe vurularak içeriğin karışması sağlanmıştır. Plaka, kapatıcı ile örtülmüş ve oda sıcaklığında antijenin bağlanması için 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklar aspire edilmiş ve yıkama tamponu (400 μ L) kullanılarak toplam beş kez yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi ile birlikte bağlanmayan antijenler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüm kuyucuklara dedeksiyon antikoru olan, 100 μ L Fare TNF- α konjugatı eklenmiştir. Plaka, antijen ve antikorun bağlanması için üstü kapalı şekilde, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir ve ardından yıkama basamağı tekrarlanmıştır. Tüm kuyucuklara 100 μ L substrat solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 100 μ L durdurma solüsyonu eklenmiştir. Durdurma solüsyonu eklendiğinde renk maviden sarıya dönmüştür. Mikroplaka okuyucu kullanarak plakadaki her kuyucuğun optik yoğunluğu, 30 dakika içinde 450 nm ve 540 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Örnekler iki tekrarlı olarak ölçülmüş ve 4 parametrelili lojistik (4PL) modeli ile hesaplanmıştır.

Raw 264.7 hücrelerinin IL-6 üretimi üzerindeki etkilerini belirlemek için IL-6 sandviç ELISA kiti (R&D; M6000B) kullanılmıştır. Toplanan süpernatantlardaki IL-6 miktarları, ilgili ELISA kitinin üreticisi tarafından sağlanan protokole göre belirlenmiştir. Buna göre, her bir kuyucuğa 50 μ L seyreltme ajanı eklenmiştir. Kuyucuk başına 50 μ L standart, kontrol veya numune eklenmiş ve 1 dakika boyunca plaka çerçevesine hafifçe vurularak içeriğin karışması sağlanmıştır. Plaka, kapatıcı ile örtülmüş ve oda sıcaklığında antijenin bağlanması için 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklar aspire edilmiş ve yıkama tamponu (400 μ L) ile birlikte toplam beş kez yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi ile birlikte bağlanmayan antijenler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüm kuyucuklara dedeksiyon antikoru olan, 100 μ L Fare IL-6 konjugatı eklenmiştir. Plaka, antijen ve antikorun bağlanması için üstü kapalı şekilde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir ve ardından yıkama basamağı tekrarlanmıştır. Tüm kuyucuklara 100 μ L substrat solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 100 μ L durdurma solüsyonu eklenmiştir. Durdurma solüsyonu eklendiğinde renk maviden sarıya dönmüştür. Mikroplaka okuyucu kullanarak

her kuyucuğun optik yoğunluğu 30 dakika içinde 450 nm ve 540 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Örnekler iki tekrarlı olarak ölçülmüş ve 4PL modeli ile hesaplanmıştır.

Raw 264.7 hücrelerin PGE₂ üretimi üzerindeki etkilerini belirlemek için PGE₂ sandviç ELISA kiti (ENZO 900-001) kullanılmıştır. Toplanan süpernatantlardaki PGE₂ miktarları, ilgili ELISA kiti üreticisinin sağladığı protokole göre belirlenmiştir. Buna göre, NSB (non spesifik bağlanma) ve Bo (0 pg/mL standart kuyucuğu) kuyucuklarına 100 µL hücre besiyeri ve 50 µL deney tamponu eklenmiştir. Standart ve numune kuyucuklarına ise 100 µL standart ve numune eklenmiştir. Toplam aktivite (TA) ve kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µL mavi konjugat eklenmiş ve ardından TA, kör, NSB kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µL sarı konjugat eklenmiştir. Plaka, kapatıcı ile örtülerek mikropilaka çalkalayıcıda 500 rpm'de oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklar aspire edilerek yıkama tamponu (400 µL) ile birlikte toplam üç kez yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası TA kuyucuklarına 5 µL mavi konjugat, kalan tüm kuyucuklara ise 200 µL pNpp substrat solüsyonu eklenmiştir. Örnekler, mikropilaka çalkalayıcısına koymadan, 45 dakika, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. Mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğu 5 dakika içinde 405 nm ve 570 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Raw 264.7 hücrelerin PGE₂ üretimi üzerindeki etkilerini belirlemek için başka bir ELISA kiti (ELK 8699) daha kullanılmıştır. Toplanan süpernatantlardaki PGE₂ miktarları, ilgili ELISA kiti üreticisinin sağladığı protokole göre belirlenmiştir. Buna göre, kör kuyucuklarına standart seyreltme tamponu eklenmiştir. Standart ve numune kuyucuklarına ise 50 µL standart ve numune eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µL Biotinylated konjugatı (1x) eklenmiştir. Plaka hafifçe çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak bir saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklar aspire edilerek yıkama tamponu (200 µL) ile birlikte toplam üç kez yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası tüm kuyucuklara 100 µL Streptavidin-HRP (1x) eklenmiştir. Plaka ağzı kapalı şekilde tekrar bir saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve ardından yıkama basamağı tekrarlanmıştır. Yıkama sonrası tüm kuyucuklara 90 µL substrat solüsyonu eklenmiş ve 20 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. Mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğu 5 dakika içinde 450 nm ve 540 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Her iki prosedürdeki örnekler iki tekrarlı olarak ölçülmüş ve 4PL modeli ile hesaplanmıştır.

3.2.2.8. 15-LOX inhibitör tarama testi: *H. calycinum* bitkisinden elde edilen ekstre, altekstre ve fraksiyonların, 15-LOX enzimine karşı inhibitör etkisini belirlemek için 15-LOX (Cayman Chemical Company, 760700, Ann Arbor, MI,) enzim inhibitörü tarama testi kullanılmıştır. İnhibitör kuyucuklarına, tampon çözeltisi ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki ekstreler (10 µL) ve tampon çözeltisi ile hazırlanan 15-LOX standardı (90 µL) eklenmiştir. İnhibitör kuyucuklarının homojenizasyonu için mikrolaka hafifçe çalkalanmış ve ardından oda sıcaklığında, karanlıkta, 5 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası reaksiyonun başlaması için tüm kuyucuklara 10 µL araşidonik asit eklenip 10 dk boyunca çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Enzim katalizini durdurmak için tüm kuyucuklara, 100 µL kromojen eklenip 5 dk boyunca çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bir mikrolaka okuyucu 490 nm dalga boyunda, köre karşı ölçüm yapılmıştır. Tampon çözeltisi kör, 15-LOX enzimi ve çözücü karışımı ise %100 başlangıç aktivitesi olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak ise nordihidroguairetik asit (NDGA) kullanılmıştır.

3.2.2.9. İstatiksel analiz: İstatiksel analiz için en az üç defa tekrarlanan deneylerin sonuçları ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. Tüm deney gruplarında, elde edilen sonuçlar Shapiro-Wilk normalite testi ile normal dağılım analizine tabi tutulmuştur. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren gruplar, t testi; normal dağılım göstermeyen gruplar ise non parametrik Mann Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Sitokinler (IL-6, TNF- α) ve PGE₂ için yapılan ELISA deneylerinden ve NO analizinden elde edilen sonuçlar LPS grubu sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. WST-1 analizinden elde edilen sonuçlar ise, sadece besiyeri ile inkübe edilen kontrol grubu sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca, LPS uygulanmamış kontrol gruplarının sonuçları (sadece besiyeri, taşıyıcı) yalnızca LPS uygulanan gruplarla karşılaştırılmıştır. Tüm analizler GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel olarak önemli farklar * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ olarak tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada bulgular iki bölüm altında toplanmıştır: biyolojik aktivite çalışmaları ve fitokimyasal çalışmalara ait bulgular. İlk bölüm, ekstre ve altekstreler üzerinde gerçekleştirilen biyolojik aktivite çalışmalarının sonuçlarına ait verileri içermektedir. İkinci bölüm ise, altekstrelerin kimyasal bileşimlerinin YBSK ve GK/KS yöntemleri ile analizine ait veriler ile ekstre ve altekstrelerin toplam fenolik ve flavanoit içeriklerinin belirlenmesine ait verileri içermektedir.

4.1. BİYOLOJİK AKTİVİTE BULGULARI

Bu bölüm, altekstreler üzerinde yapılan *in vitro* antienflamatuvar aktivite çalışmalarından elde edilen bulguları içermektedir. *H. calycinum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan *n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc ve *n*-BuOH altekstrelerinin Raw 264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki toksik olmayan konsantrasyonları, WST-1 testi ile belirlenmiştir. Altekstrelerin toksik olmayan konsantrasyonlarının LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimi üzerindeki etkileri, Griess testi ile belirlenirken, PGE₂ ve bazı sitokinler (TNF- α ve IL-6) üzerindeki etkileri ise ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. Ekstre ve altekstrelerin 15-LOX enzim inhibitörü etkileri, 15-LOX inhibitör tarama testi ile tespit edilmiştir.

4.1.1. Altekstrelerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Altekstrelerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri, hem LPS ile uyarılmamış Raw 264.7 makrofaj hücreleri, hem de LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücreleri kullanılarak belirlenmiştir. Hücreler, altekstreler (*n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH) ve standart inhibitörler (L-NIL, NS-398 ve deksametazon) ile çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilmiştir. Öncelikle, Raw 264.7 makrofaj hücreleri yalnızca ekstrelerin çeşitli konsantrasyonları uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmış, hücre canlılığı WST-1 testi ile belirlenmiştir. İkinci aşamada ise LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücreleri kullanılmıştır. Bu aşamada öncelikle, Raw 264.7 makrofaj hücreleri çeşitli konsantrasyonlardaki ekstreler ile bir saat ön inkübasyona bırakılmış ve ardından 1 μ g/mL LPS eklenerek toplamda 24 saat olacak biçimde inkübasyona bırakılmıştır. Hücre canlılığı WST-1 testi ile belirlenmiştir. Altekstrelerin hücre canlılığında %20'den daha

fazla bir azalmaya neden olmayan konsantrasyonları antienflamatuvar aktivite deneylerinde kullanılmıştır.

H. calycinum *n*-hekzan altekstresinin, Şekil 4.1 (A)'da gösterildiği gibi 6 µg/mL, 12 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda uygulandığında, Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin canlılığında sadece besiyeri uygulanan kontrol grubuna göre önemli bir azalma meydana getirmediği görülmüştür. Bu altekstrenin uygulandığı konsantrasyonlarda, Raw 264.7 makrofajlarının hücre canlılığı sırasıyla $96,89 \pm 2,13$, $98,44 \pm 2,21$, $101,04 \pm 1,90$, $101,99 \pm 2,47$, $104,93 \pm 1,19$ ve $120,17 \pm 2,43$ olarak tespit edilmiştir. Altekstre, hücrelere LPS (1µg/mL) ile beraber uygulandığında ise hücre canlılığı sırasıyla $114,15 \pm 3,23$, $109,12 \pm 4,16$, $115,55 \pm 1,80$, $105,33 \pm 3,74$, $113,11 \pm 5,82$, $120,31 \pm 9,34$ olarak tespit edilmiştir.

Bitkinin CH₂Cl₂ altekstresi, Şekil 4.1 (B)'de gösterildiği gibi Raw 264.7 makrofaj hücrelerine 6 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 75 µg/mL konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Bu altekstre belirtilen konsantrasyonlarda uygulandığında sadece besiyeri uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla hücre canlılığı $104,29 \pm 2,88$, $99,69 \pm 8,17$, $96,18 \pm 5,45$, $92,61 \pm 4,16$, $86,53 \pm 6,54$ ve $57,45 \pm 4,59$ olarak tespit edilmiştir. Bu ekstrenin uygulandığı en yüksek konsantrasyonda (75 µg/mL) hücre canlılığının %80'den daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle LPS ile uyarılan hücreler üzerinde yalnızca 50 µg/mL konsantrasyona kadar olan konsantrasyonlar değerlendirilmiştir. Altekstre (6, 12,5, 25, 50 µg/mL), hücrelere LPS (1µg/mL) ile beraber uygulandığında hücre canlılığı sırasıyla $90,78 \pm 4,34$, $96,73 \pm 2,31$, $89,18 \pm 4,85$, $91,11 \pm 3,49$ olarak tespit edilmiştir.

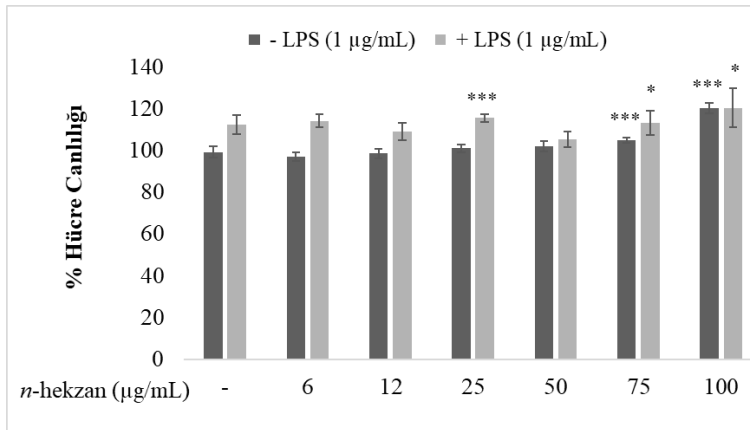
EtOAc altekstresi, Şekil 4.1 (C)'de gösterildiği gibi 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Bu altekstre belirtilen konsantrasyonlarda uygulandığında sadece besiyeri uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla hücre canlılığı $90,49 \pm 6,10$, $88,74 \pm 5,42$, $91,93 \pm 5,62$ ve $113,62 \pm 4,91$ olarak tespit edilmiştir. Altekstre aynı konsantrasyonlarda hücrelere LPS (1µg/mL) ile beraber uygulandığında hücre canlılığı sırasıyla $96,28 \pm 9,04$, $94,01 \pm 10,28$, $93,11 \pm 12,88$ ve $103,04 \pm 6,92$ olarak tespit edilmiştir.

Bitkinin *n*-BuOH altekstresi, [Şekil 4.1 (D)] Raw 264.7 makrofaj hücrelerine 25, 50, 75 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda (sırasıyla $106,35 \pm 1,34$, $106,51 \pm 0,87$,

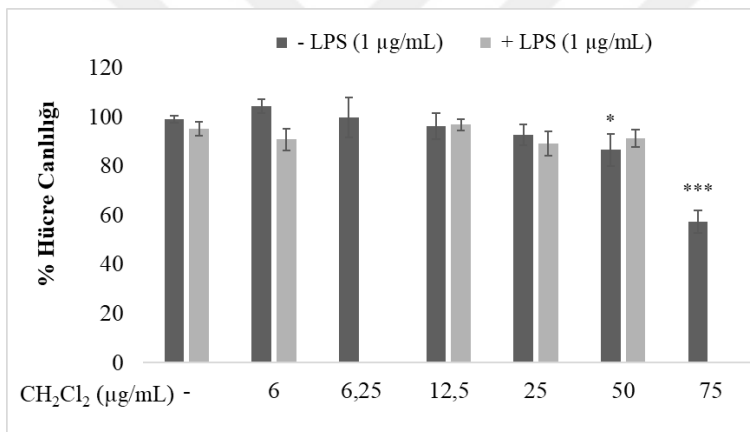
%109,15 $\pm$ 1,25 ve %108,50 $\pm$ 4,10) uygulandığında sadece besiyeri uygulanan kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında önemli bir azalmaya neden olmamıştır. Altekstre (25, 50, 75 ve 100 μ g/mL), hücrelere LPS (1 μ g/mL) ile beraber uygulandığında (%119,82 $\pm$ 2,96, %119,03 $\pm$ 2,15, %120,61 $\pm$ 0,73, %128,88 $\pm$ 9,44) yine hücre canlılığı üzerinde önemli bir azalmaya neden olmamıştır.

Deneylerde taşıyıcı olarak kullanılan %0,1 DMSO içeren besiyeri, hücre canlılığını sadece besiyeri içeren kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde etkilememiştir [Şekil 4.1 (A-D), Şekil 4.2]. Bilinen bir sitokin inhibitörü olarak kullanılan deksametazonun, 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarında hücre canlılığı sırasıyla %80,14 $\pm$ 2,99 ve %80,92 $\pm$ 4,74 olarak tespit edilmiştir. LPS ile beraber uygulandığında (5 μ M ve 10 μ M) hücre canlılığı sırasıyla %138,93 $\pm$ 9,77 ve %134,12 $\pm$ 5,06 olarak tespit edilmiştir. Bilinen bir NO inhibitörü olan L-NIL, 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda uygulandığında hücre canlılığı sırasıyla %89,00 $\pm$ 7,21 ve %89,47 $\pm$ 4,86 olarak tespit edilmiştir. LPS ile birlikte (5 μ M ve 10 μ M) uygulandığında hücre canlılığı sırasıyla %83,47 $\pm$ 13,67 ve %98,43 $\pm$ 8,61 olarak tespit edilmiştir. Aynı konsantrasyonlarda çalışılan bir PGE₂ inhibitörü olan NS-398 ise, hücre canlılığı sırasıyla %97,79 $\pm$ 1,36 ve %98,68 $\pm$ 1,33 olarak tespit edilmiştir. LPS ile birlikte (5 μ M ve 10 μ M) uygulandığında ise, hücre canlılığı %113,50 $\pm$ 6,81, %106,93 $\pm$ 9,04 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

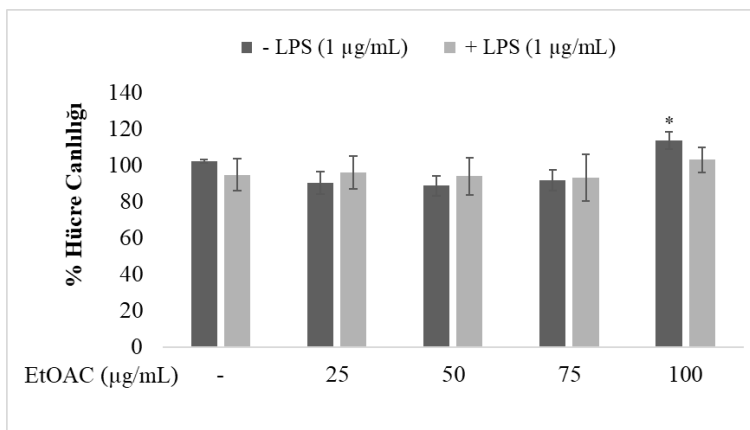
(A)



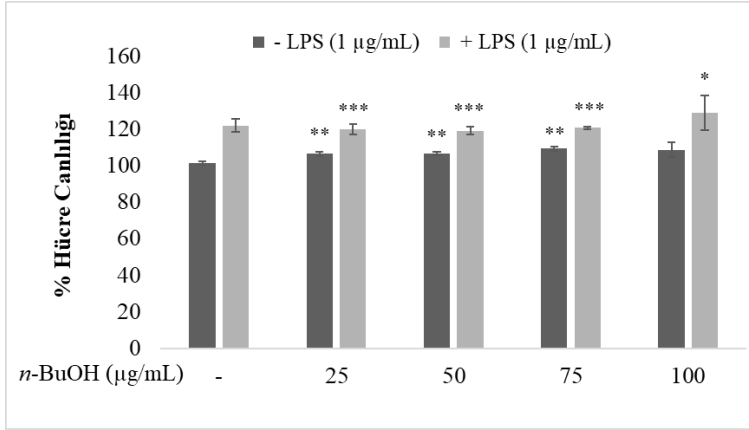
(B)



(C)

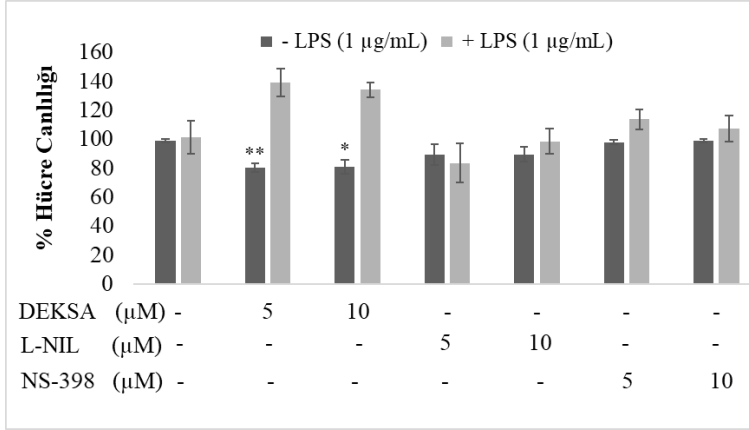


(D)



Şekil 4.1: *H. calycinum* altekstrelerinin [*n*-hekzan (A), CH₂Cl₂ (B), EtOAc (C), *n*-BuOH (D)] Raw 264.7 makrofaj hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Raw 264.7 makrofaj hücreleri altekstreler ile 24 saat inkübasyona bırakılmış veya altekstreler ile 1 saat ön inkübasyonun ardından LPS (1 µg/mL) ile uyarılarak toplamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücre canlılığı WST-1 testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar yalnızca besiyeri uygulanan kontrol grubuna kıyasla belirtilmektedir. Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar $\pm$ SEM şeklinde ifade edilmiştir. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ yalnızca besiyeri uygulanan gruba kıyasla anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.2: Standart inhibitör olarak kullanılan moleküllerin (L-NIL, NS-398, deksametazon) Raw 264.7 makrofaj hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Raw 264.7 makrofaj hücreleri moleküller ile 24 saat inkübasyona bırakılmış veya moleküller ile 1 saat ön inkübasyonun ardından LPS (1 µg/mL) ile uyarılarak toplamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücre canlılığı WST-1 testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar yalnızca besiyeri uygulanan kontrol grubuna kıyasla belirtilmektedir. Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar $\pm$ SEM şeklinde ifade edilmiştir. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ yalnızca besiyeri uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.1.2. Altekstrelerin NO Üretimi Üzerindeki Etkileri

Altekstrelerin NO üretimi üzerindeki etkileri LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücreleri kullanılarak belirlenmiştir. Hücreler altekstereleler (*n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAC, *n*-BuOH) veya bilinen bir NO inhibitörü olan L-NIL'in toksik olmayan konsantrasyonlarında bir saat ön inkübasyona bırakılmış ve ardından 1 µg/mL LPS ile toplamda 24 saat olacak biçimde uyarılmıştır. Süpernatantlardaki NO seviyeleri Griess testi ile belirlenmiştir.

Altekstrelerin içerisinde en yüksek etkili ekstrenin *n*-hekzan altekstresi olduğu tespit edilmiştir. Bu altekstre, Şekil 4.3 (A)'de gösterildiği gibi 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda uygulandığında LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %50,11 $\pm$ 3,70, %79,90 $\pm$ 2,54 ve %95,11 $\pm$ 0,74 oranında inhibe etmiştir. Uygulandığı en yüksek konsantrasyonlarda *n*-hekzan altekstresi, bilinen bir NO inhibitörü olan L-NIL'dan daha yüksek inhibitör etki göstermiştir. Bu molekül 5 µM konsantrasyonda uygulandığında %52,32 $\pm$ 1,77 inhibisyona neden olmuştur.

Ekstreler arasında ikinci en yüksek etkili altekstrenin ise, CH₂Cl₂ altekstresi olduğu tespit edilmiştir. CH₂Cl₂ altekstresi, Şekil 4.3 (B)'de gösterildiği gibi 12,5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda uygulandığında LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla $8,08 \pm 1,56$, $26,19 \pm 1,10$ ve $48,23 \pm 2,43$ oranında inhibe etmiştir.

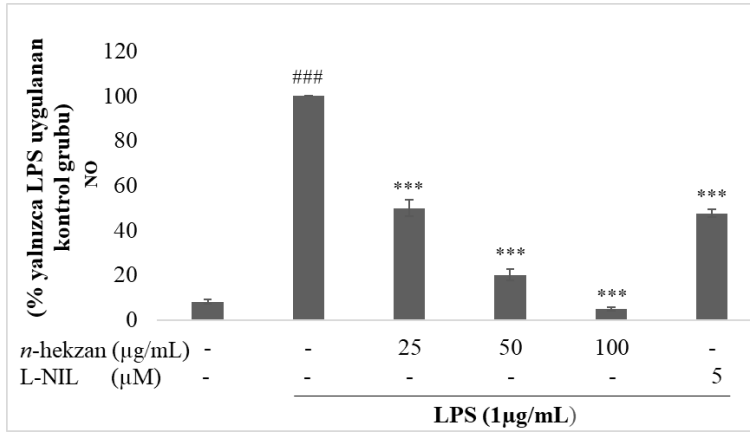
Bitkinin *n*-BuOH ve EtOAc altekstreleri uygulandıkları en yüksek konsantrasyonlarda %40'ın altında inhibisyona sebep olmuştur. Bitkinin üçüncü en yüksek etkili altekstresi olan *n*-BuOH altekstresi, Şekil 4.3 (D)'de gösterildiği gibi 50 µg/mL, 75 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda uygulandığında NO üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla $22,17 \pm 2,51$, $25,97 \pm 2,12$ ve $37,34 \pm 5,00$ oranında inhibe etmiştir. Dördüncü sırada EtOAc altekstresi ise, Şekil 4.3 (C)'de gösterildiği gibi 100 µg/ml konsantrasyonda LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla $31,66 \pm 3,05$ oranında inhibe etmiştir. Uygulandıkları konsantrasyonlarda EtOAc altekstresi ve *n*-BuOH altekstresi, bilinen bir NO inhibitörü olan L-NIL'dan daha az inhibitör etki göstermiştir. Bu molekül, Şekil 4.3 (A)'de gösterildiği gibi 5 µM konsantrasyonda uygulandığında $52,32 \pm 1,77$ inhibisyona neden olmuştur.

Tablo 4.1: *H. calycinum* altekstrelerinin (*n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH) NO seviyeleri üzerindeki etkileri

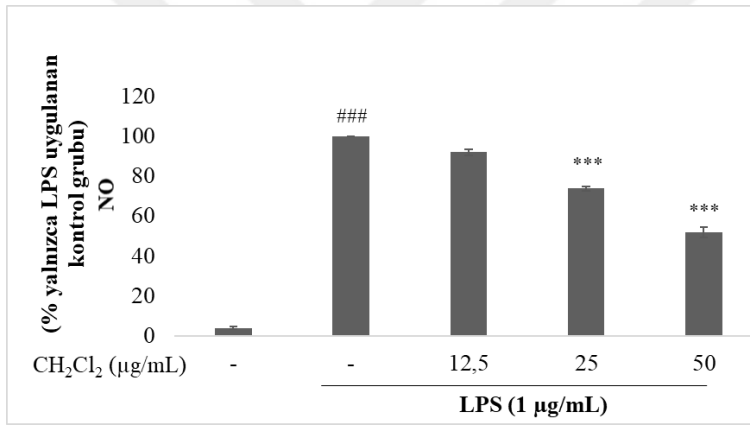
Ekstreler	Konsantrasyonlar	Birim	% NO inhibisyonu*
<i>n</i>-hekzan	25	µg/mL	%50,11
	50	µg/mL	%79,90
	100	µg/mL	%95,11
CH₂Cl₂	12,5	µg/mL	%8, 08
	25	µg/mL	%26,19
	50	µg/mL	%48,23
EtOAc	100	µg/mL	%31,66
<i>n</i>-BuOH	50	µg/mL	%22,17
	75	µg/mL	%25, 97
	100	µg/mL	%37,34
L-NIL	5	µM	%52,32

*Sonuçlar yalnızca LPS uygulanan kontrol grubu %100 kabul edilerek buna kıyasla belirtilmiştir.

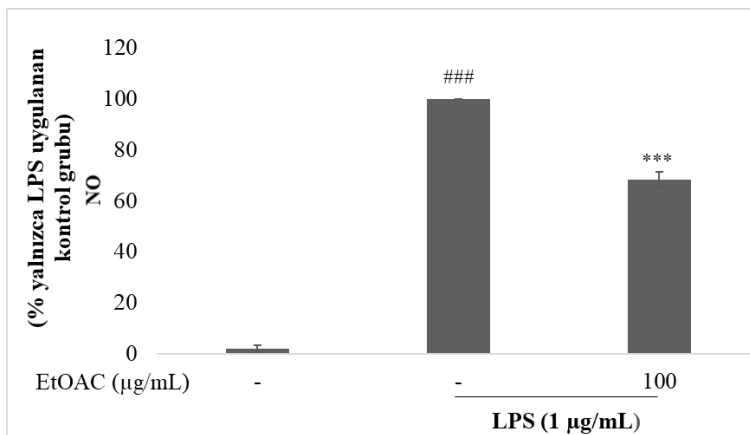
(A)



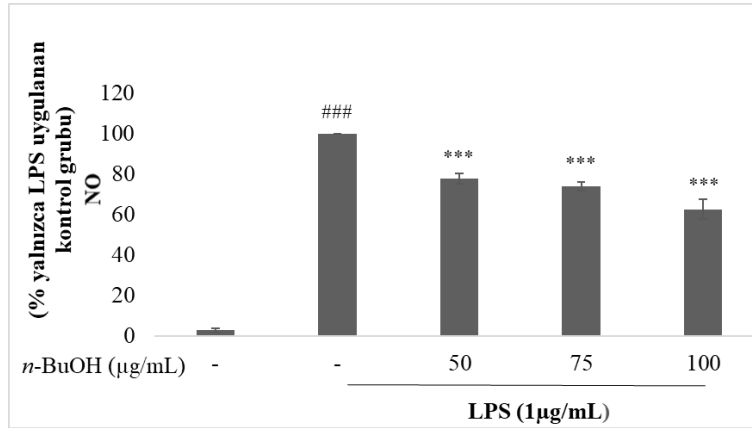
(B)



(C)



(D)



Şekil 4.3: *H. calycinum* altekstrelerinin [*n*-hekzan (A), CH₂Cl₂ (B), EtOAc (C) ve *n*-BuOH (D)] Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO seviyeleri üzerindeki etkileri

Raw 264.7 makrofaj hücreleri altekstreler ile 1 saat ön inkübasyonun ardından LPS (1 µg/mL) ile uyarılarak toplamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süpernatantlardaki NO seviyeleri Griess testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla belirlenmektedir. Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar $\pm$ SEM şeklinde ifade edilmiştir. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla ve # $p \leq 0,05$ ## $p \leq 0,01$ ### $p \leq 0,001$ LPS uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.1.3. Altekstrelerin Sitokinlerin Üretimi Üzerindeki Etkileri

Altekstrelerin, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin bazı sitokinleri (TNF- α , IL-6) üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bunun için hücreler altekstrelerle 1 saat ön inkübasyona bırakılmış ardından toplamda 24 saat olacak biçimde 1 µg/mL LPS ile uyarılmıştır. Süpernatantlardaki sitokin miktarları ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te gösterildiği gibi yalnızca LPS ile uyarılmış kontrol grubu LPS ile uyarılmamış taşıyıcı kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek sitokin seviyeleri göstermektedir.

Bitkinin *n*-hekzan altekstresinin, Şekil 4.4 (A)'da gösterildiği gibi 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda uygulandığında, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin TNF- α üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %9,68, %24,62 ve %63,5 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. CH₂Cl₂ altekstresinin, Şekil 4.4 (B)'de gösterildiği gibi 50 µg/mL konsantrasyonda

uygulandığında, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin TNF- α üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla %31,84 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. EtOAc ve *n*-BuOH altekstreleri, Şekil 4.4 (C) ve Şekil 4.4 (D)'de gösterildiği gibi sırasıyla 100 μ g/mL ve 75 μ g/mL konsantrasyonda uygulandığında, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin TNF- α üretimi üzerinde önemli bir inhibitör etki göstermemiştir. Bilinen bir sitokin inhibitörü olan deksametazonun, 10 μ M konsantrasyonda uygulandığında TNF- α üretimini, yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla, %56,08'ini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Buna göre en yüksek etkiye sahip olduğu tespit edilen *n*-hekzan altekstresinin 100 μ g/mL konsantrasyonda uygulandığında, deksametazondan (10 μ M) daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Bitkinin *n*-hekzan ve CH₂Cl₂ altekstreleri, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO ve TNF- α üretimleri üzerinde yüksek inhibitör etki göstermiştir. Bu nedenle bu ekstrelerin, hücrelerin IL-6 üretimi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Bitkinin *n*-hekzan altekstresinin 25 μ g/mL, 50 μ g/mL ve 100 μ g/mL konsantrasyonlarda uygulandığında LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin IL-6 üretimini, yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %15,30, %58,63 ve %93,90 oranında inhibe ettiği Şekil 4.5 (A)'da gösterildiği gibi, tespit edilmiştir. CH₂Cl₂ altekstresi, 12,5 μ g/mL, 25 μ g/mL ve 50 μ g/mL konsantrasyonlarda uygulandığında, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin IL-6 üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla Şekil 4.5 (B)'de gösterildiği gibi sırasıyla %32,49, %24,47 ve %74,44 oranında inhibe etmiştir. Bilinen bir sitokin inhibitörü olan deksametazon, 5 μ M konsantrasyonda uygulandığında LPS ile uyarılmış Raw 264.7 hücrelerinin IL-6 üretimini %86,26 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.6). Altekstreler arasında yüksek inhibitör etkiye sahip olduğu tespit edilen *n*-hekzan altekstresinin, 100 μ g/mL konsantrasyonda uygulandığında, deksametazondan (5 μ M) daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.2: *H. calycinum* bitkisinin altekstrelerinin (*n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc ve *n*-BuOH) TNF- α ve IL-6 seviyeleri üzerindeki etkileri

Ekstreler	Konsantrasyonlar	Birim	TNF- α % inhibisyon*	IL-6 % inhibisyon*
<i>n</i>-hekzan	25	$\mu\text{g/mL}$	%9,68	%15,30
	50	$\mu\text{g/mL}$	%24,62	%58,63
	100	$\mu\text{g/mL}$	%63,5	%93,90
CH₂Cl₂	12,5	$\mu\text{g/mL}$	*****	%32,49
	25	$\mu\text{g/mL}$	*****	%24,47
	50	$\mu\text{g/mL}$	%31,84	%74,44
EtOAc	100	$\mu\text{g/mL}$	T.E***	*****
<i>n</i>-BuOH	75	$\mu\text{g/mL}$	T.E***	*****
DEKSA**	5	μM	*****	%86,26
	10	μM	%56,08	*****

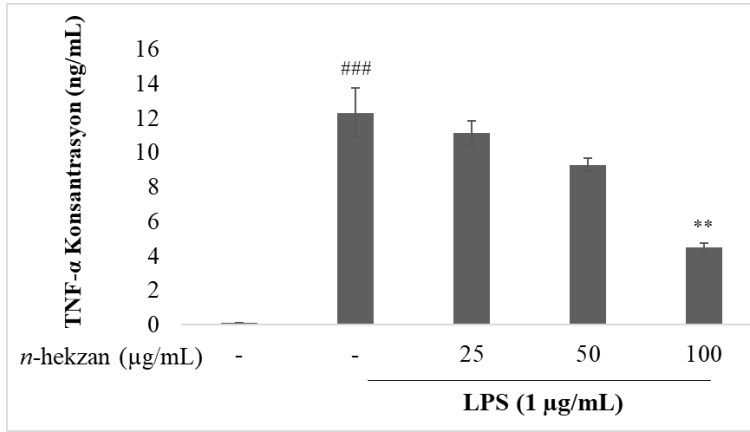
*Sonuçlar yalnızca LPS uygulanan kontrol %100 kabul edilerek buna kıyasla hesaplanmıştır.

**DEKSA: Deksametazon

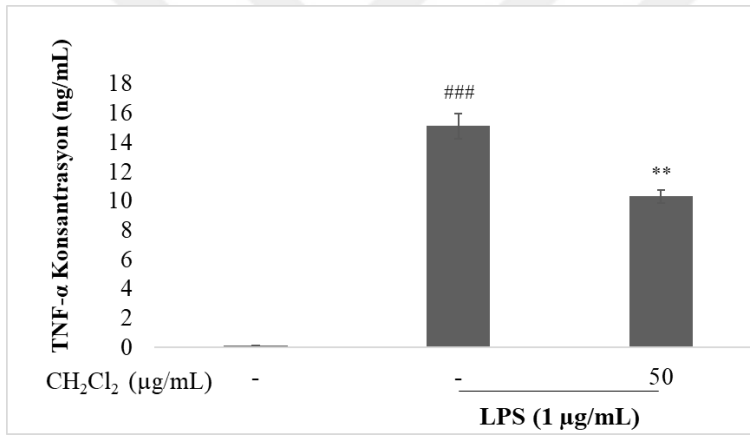
*** T.E: Tespit edilemedi

***** - : Test edilmedi

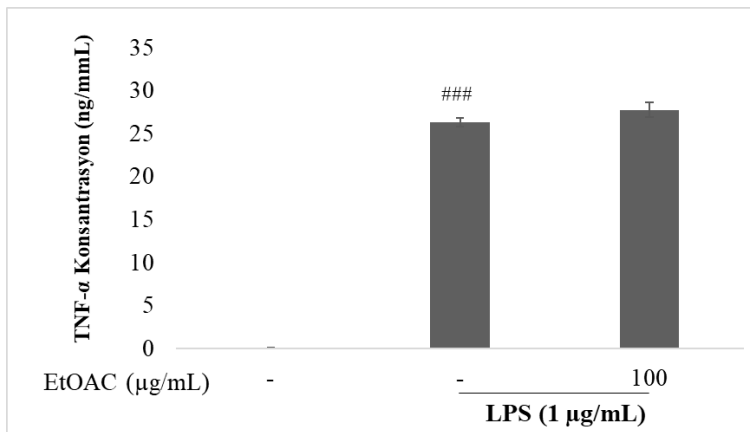
(A)



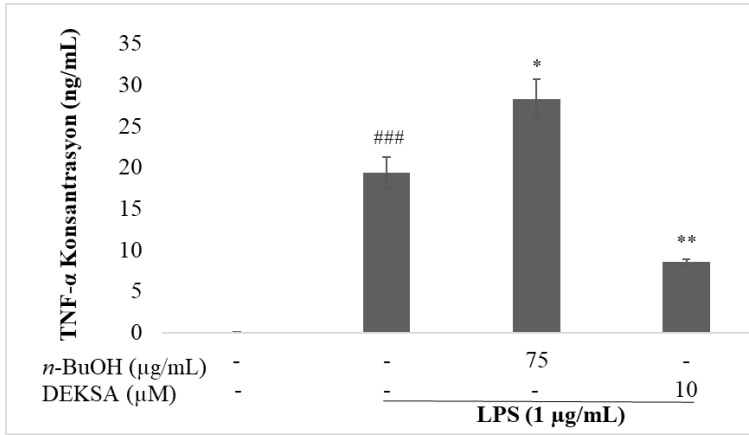
(B)



(C)



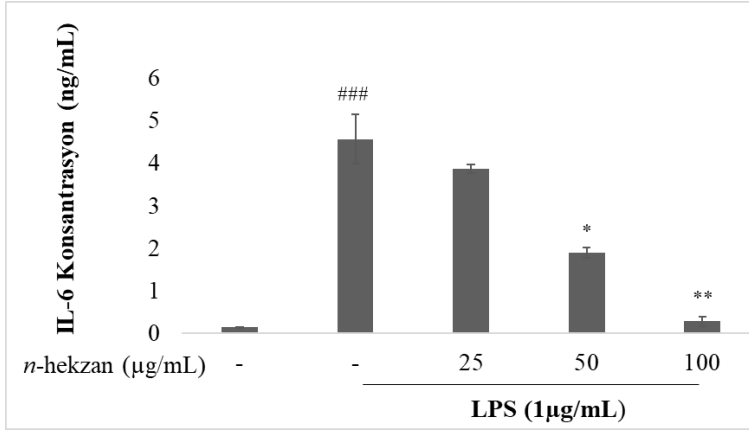
(D)



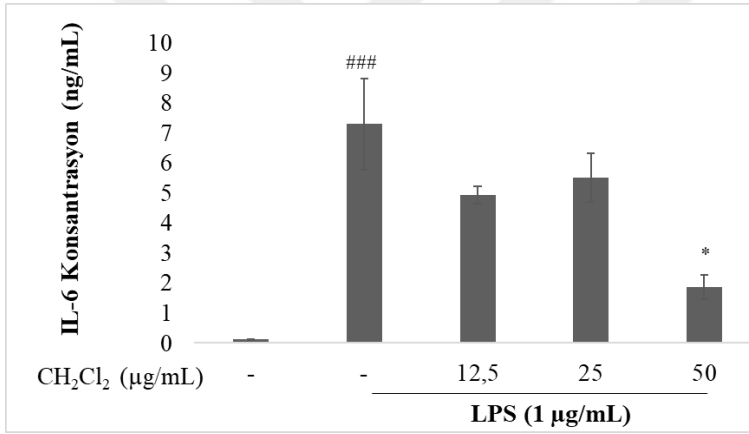
Şekil 4.4: *H. calycinum* altekstrelerinin [*n*-hekzan (A), CH₂Cl₂ (B), EtOAc (C), *n*-BuOH(D)] Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin TNF- α seviyeleri üzerindeki etkileri

Raw 264.7 makrofaj hücreleri altekstreler ile 1 saat ön inkübasyona bırakılmış ardından LPS (1 µg/mL) ile uyarılarak toplamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar $\pm$ SEM şeklinde ifade edilmiştir. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla ve # $p \leq 0,05$ ## $p \leq 0,01$ ### $p \leq 0,001$ LPS uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. DEKSA: Dekametazon

(A)

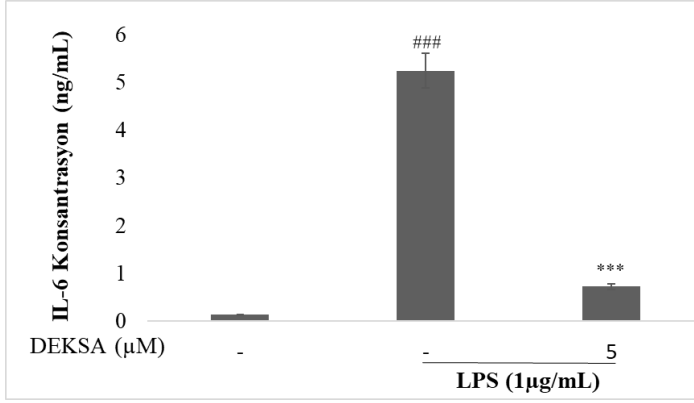


(B)



Şekil 4.5: *H. calycinum* altekstrelerinin [*n*-hekzan (A), CH₂Cl₂ (B)] Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin IL-6 seviyeleri üzerindeki etkileri

Raw 264.7 makrofaj hücreleri altekstreler ile 1 saat ön inkübasyonun ardından LPS (1 µg/mL) ile uyarılarak toplamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar $\pm$ SEM şeklinde ifade edilmiştir. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna ve # $p \leq 0,05$ ### $p \leq 0,01$ #### $p \leq 0,001$ LPS uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.6: Dekametazon'un Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin IL-6 seviyeleri üzerindeki etkisi

Raw 264.7 makrofaj hücreleri altekstreler ile 1 saat ön inkübasyona bırakılmış ardından LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) ile uyarılarak toplamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve $\pm$ SEM şeklinde ifade edilmiştir. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna ve # $p \leq 0,05$ ## $p \leq 0,01$ ### $p \leq 0,001$ LPS uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. DEKSA: Dekametazon

4.1.4. Altekstrelerin PGE₂ Üretimi Üzerindeki Etkileri

Altekstrelerin, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin PGE₂ üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bunun için hücreler altekstrelerle 1 saat ön inkübasyona bırakılmış ardından toplamda 24 saat olacak biçimde 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS ile uyarılmıştır. Süpernatantlardaki PGE₂ miktarı ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Bazı enflamatuvar parametreler (NO, TNF- α , IL-6) üzerinde yüksek inhibitör etki gösteren altekstrelerin (*n*-hekzan ve CH₂Cl₂) PGE₂ üretimi üzerindeki etkileri de incelenmiştir.

Bitkinin *n*-hekzan altekstresi Şekil 4.6 (A)'da gösterildiği gibi 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda uygulandığında, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin PGE₂ üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla inhibe etmemiştir. Ancak *n*-hekzan altekstresinin, 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda uygulandığında PGE₂ üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla % 55,89 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Uygulandığı en yüksek konsantrasyonda *n*-hekzan altekstresi, bilinen bir PGE₂ inhibitörü olan NS-398'den daha yüksek inhibitör etki göstermiştir. Bu molekül 5 μM konsantrasyonda uygulandığında %36,73 değerinde inhibisyona neden olmuştur.

Bitkinin CH₂Cl₂ altekstresinin, Şekil 4.6 (B)'de gösterildiği gibi 12,5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda uygulandığında, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin PGE₂ üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %13,62, %14,30 ve % 45,69 değerlerinde inhibe tespit edilmiştir. Uygulandığı en yüksek konsantrasyonda (50 µg/mL) CH₂Cl₂ altekstresi, bilinen bir PGE₂ inhibitörü olan NS-398'in 5 µM konsantrasyonundan daha yüksek bir inhibitör etki göstermiştir.

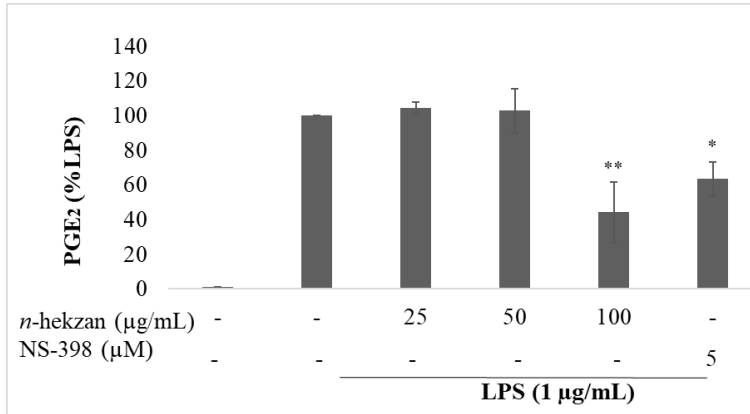
Tablo 4.3: *H. calycinum* bitkisinin altekstrelerinin (*n*-hekzan, CH₂Cl₂) PGE₂ seviyeleri üzerindeki etkileri

Ekstreler	Konsantrasyonlar	Birim	PGE ₂ % inhibisyonu*
<i>n</i>-hekzan	25	µg/mL	T.E**
	50	µg/mL	T.E**
	100	µg/mL	%55,89
CH₂Cl₂	12,5	µg/mL	%13,62
	25	µg/mL	%14,30
	50	µg/mL	%45,69
NS-398	5	µM	%36,73

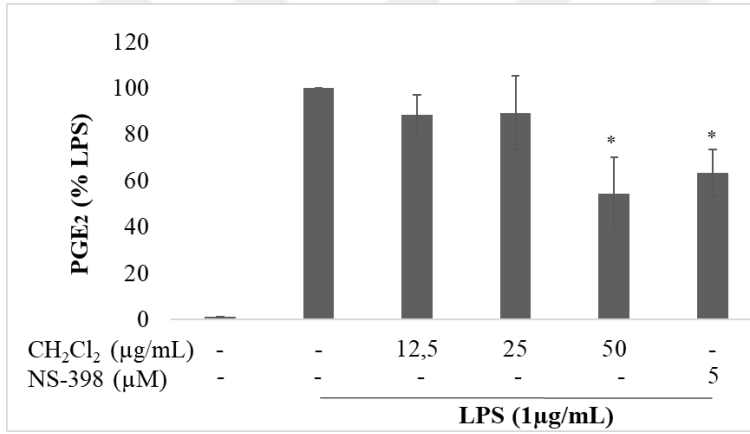
*Sonuçlar yalnızca LPS uygulanan kontrol grubu %100 kabul edilerek buna kıyasla hesaplanmıştır.

** T.E: Tespit edilemedi

(A)



(B)



Şekil 4.7: *H. calycinum* altekstrelerinin [*n*-hekzan (A), CH₂Cl₂ (B)] Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin PGE₂ seviyeleri üzerindeki etkileri

Raw 264.7 makrofaj hücreleri altekstreler ile 1 saat ön inkübasyona bırakılmış ardından LPS (1 µg/mL) ile uyarılarak toplamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla belirtilmektedir. Deneyler üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar $\pm$ SEM şeklinde ifade edilmiştir. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.1.5. Ekstre, Altekstre ve Fraksiyonların 15-LOX Enzim İnhibitörü Etkileri

H. calycinum bitkisinden elde edilen ekstre ve altekstrelerin 15-LOX enzimi üzerindeki inhibitör etkileri 15-LOX inhibitör tarama testi ile araştırılmıştır. İnhibisyon değerleri Tablo 4.4'de gösterilmektedir. *H. calycinum* bitkisinden elde edilen ekstre ve

altekstrelerinin 100 µg/mL konsantrasyonda 15-LOX enzim inhibitörü etkileri incelendiğinde, *n*-BuOH altekstresi %28,87 ve EtOAc altekstresinin %5,56 oranında inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan NDGA'nın (100 µM) 15-LOX aktivitesini tamamen inhibe ettiği görülmüştür. Diğer ekstrelerde MeOH ekstresi, k-H₂O, CH₂Cl₂ ve *n*-hekzan altekstresinde inhibitör etki gözlenmemiştir.

Tablo 4.4: *H. calycinum* bitkisinin ekstre ve altekstrelerinin 15-LOX inhibitörü etkileri

Ekstre Adı	Konsantrasyon	Birim	%15-LOX inhibisyonu
MeOH	100	µg/mL	T.E*
<i>n</i> -hekzan	100	µg/mL	T.E*
CH ₂ Cl ₂	100	µg/mL	T.E*
EtOAc	100	µg/mL	5,56
<i>n</i> -BuOH	100	µg/mL	28,87
k- H ₂ O	100	µg/mL	T.E*
NDGA	100	µM	115,28

*T.E: Tespit edilemedi

Aktif ekstre olarak tespit edilen *n*-BuOH altekstresinin çeşitli konsantrasyonlardaki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 200, 300 ve 400 µg/mL) test tekrarlanmış ve Tablo 4.5’de gösterildiği gibi sırasıyla % 17,37, % 21,29, % 28,29, % 35,85, % 40,34 ve % 51,26 oranında inhibitör etki tespit edilmiştir.

Tablo 4.5: *H. calycinum* bitkisinin *n*-BuOH altekstresinin çeşitli konsantrasyonlarının 15-LOX inhibitörü etkileri

Ekstre Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	%15-LOX inhibisyonu
<i>n</i>-BuOH	25	17,37
	50	21,29
	100	28,29
	200	35,85
	300	40,34
	400	51,26

Aktif ekstre olarak tespit edilen *n*-BuOH altekstresinden elde edilen fraksiyonlar, İTK yöntemi ile benzerler birlikte olacak şekilde birleştirilmiştir ve üç fraksiyon elde edilmiştir [FrA: (2-12), (13-18), (19-28); FrB: (29-36), 37, (38-41); FrC: 42, (43-51), (52-55), (56-61)]. Tablo 4.6’da gösterildiği gibi 100 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla % 79,92, % 6,69, % 0,79 oranında inhibitör etki tespit edilmiştir.

Tablo 4.6: *H. calycinum* bitkisinin *n*-BuOH altekstresinden elde edilen fraksiyonların 15-LOX inhibitörü etkileri

Fraksiyon	Konsantrasyon (µg/mL)	%15-LOX inhibisyonu
FrA	100	79,92
FrB	100	6,69
FrC	100	0,79

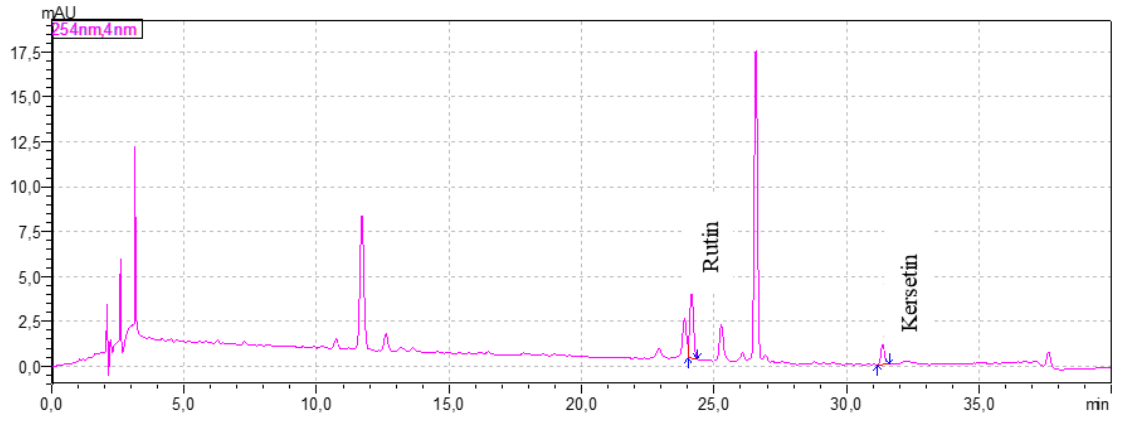
4.2. FİTOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1. YBSK ile Fenolik Bileşik Analizi

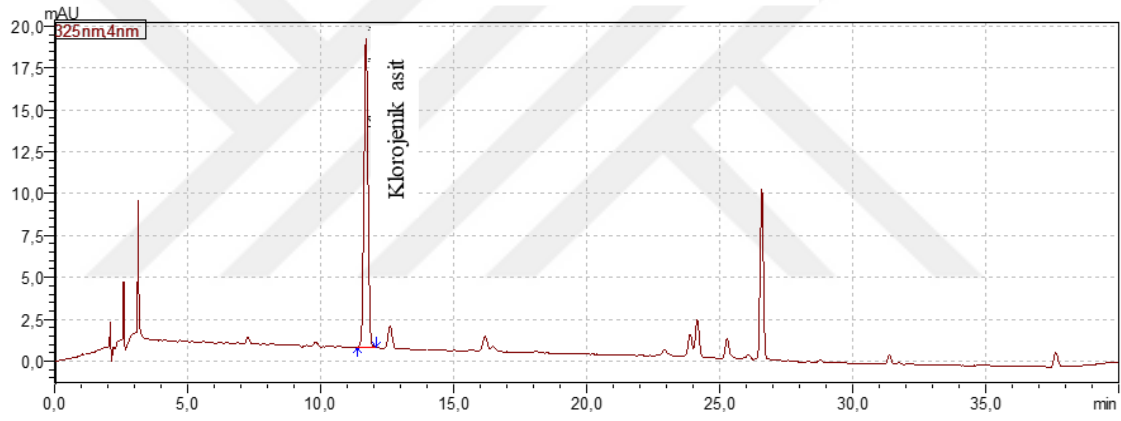
H. calycinum bitkisinin EtOAc ve *n*-BuOH altekstrelerinin fenolik bileşiklerinin kantitatif analizleri, YBSK cihazı ile yapılmıştır. EtOAc altekstresinde, Şekil 4.8’de gösterildiği üzere 254 nm’de rutin (1,785 mg/g EtOAc ekstre) ve kersetin (0,346 mg/g EtOAc ekstre), 325 nm’de (Şekil 4.9) klorojenik asit (5,855 mg/g EtOAc ekstre), 248 nm’de (Şekil 4.10) kafeik asit (0,615 mg/g EtOAc ekstre) ve Şekil 4.11’de gösterildiği gibi 336 nm’de apigenin-7-glukozit (2,171 mg/g EtOAc ekstre) flavonoidleri tespit edilmiştir (Tablo 4.7). Bitkinin *n*-BuOH altekstresinde, 271 nm’de (Şekil 4.12) gallik asit (0,025 mg/g *n*-BuOH ekstre), 325 nm’de (Şekil 4.13) klorojenik asit (2,330 mg/g *n*-BuOH ekstre), 248 nm’de (Şekil 4.14) kafeik asit (0,411 mg/g *n*-BuOH ekstre) fenolik asitleri tespit edilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.7: *H. calycinum* bitkisinin EtOAc altekstresinde tespit edilen fenolik asitler

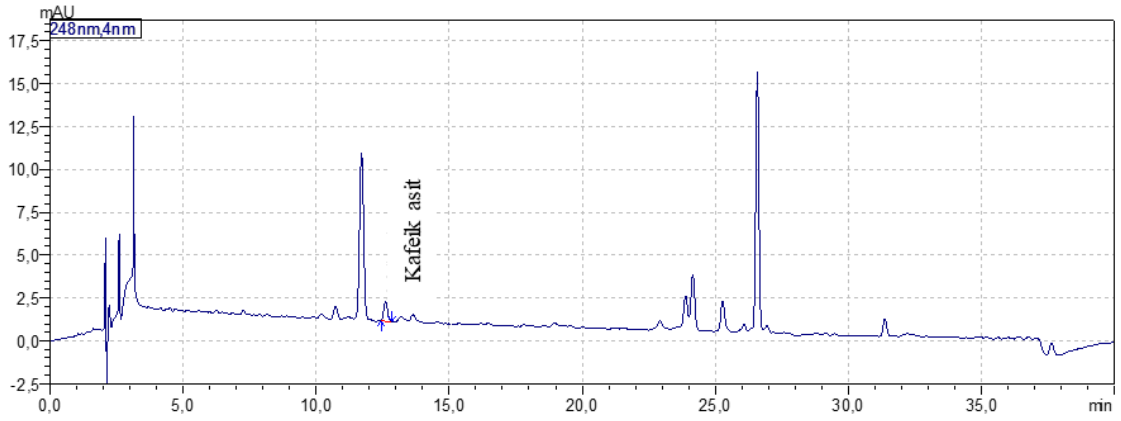
EtOAc	Fenolik Asit İsimleri	mg/g EtOAc ekstre
1	Rutin	1,785
2	Kersetin	0,346
3	Klorojenik asit	5,855
4	Kafeik asit	0,615
5	Apigenin-7-glukozit	2,171



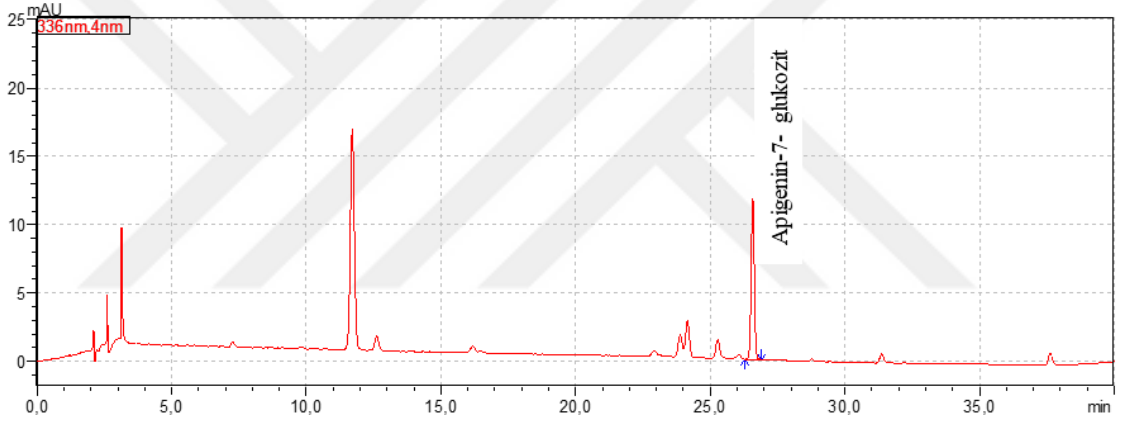
Şekil 4.8: *H. calycinum* EtOAc altekstresinde 254 nm’de rutin ve kersetinin varlığını gösteren kromatogram



Şekil 4.9: *H. calycinum* EtOAc altekstresinde 325 nm’de klorojenik asit varlığını gösteren kromatogram



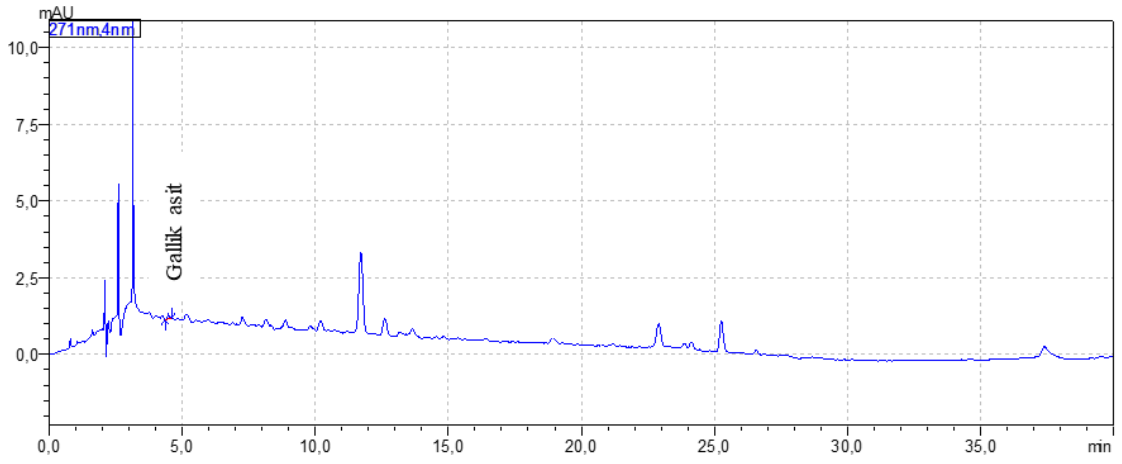
Şekil 4.10: *H. calycinum* EtOAc altekstresinde 248 nm’de kafeik asit varlığını gösteren kromatogram



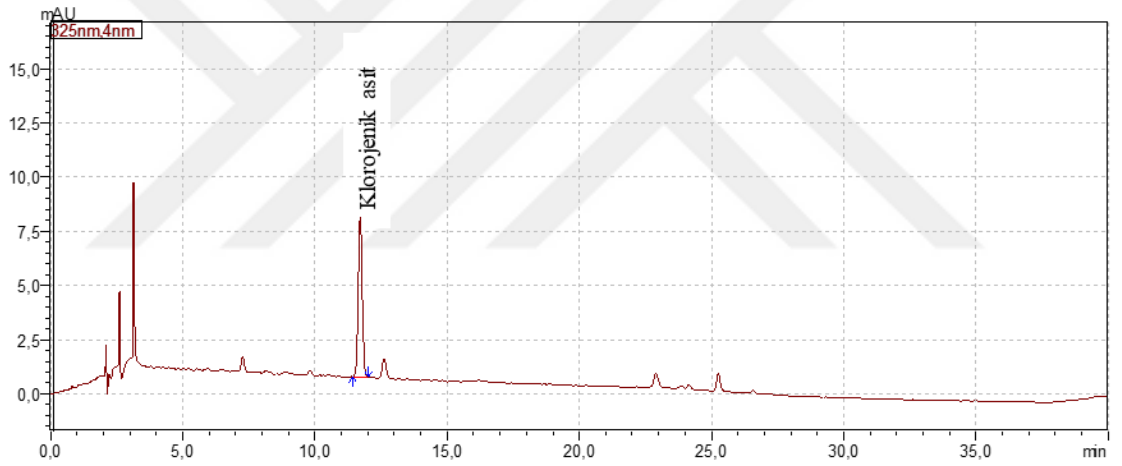
Şekil 4.11: *H. calycinum* EtOAc altekstresinde 336 nm’de apigenin-7-gluko zit varlığını gösteren kromatogram

Tablo 4.8: *H. calycinum* bitkisinin *n*-BuOH altekstresinde tespit edilen fenolik asitler

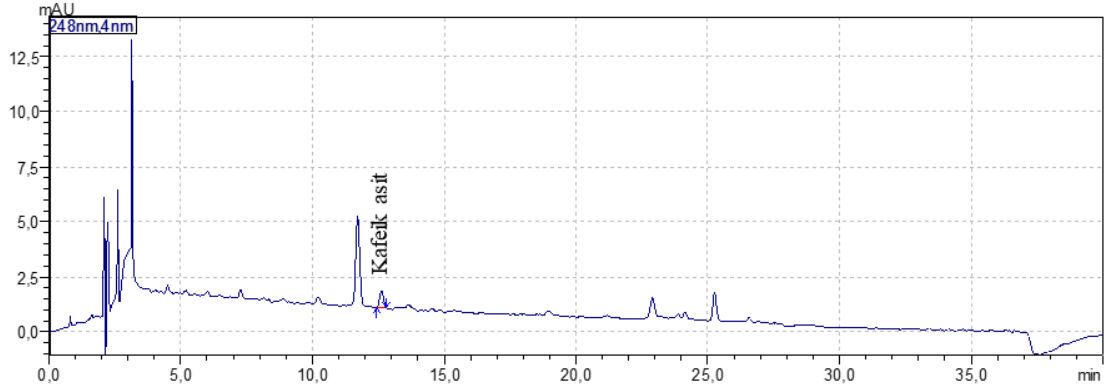
<i>n</i> -BuOH	Fenolik Asit İsmi	mg/g <i>n</i> -BuOH ekstre
1	Gallik asit	0,025
2	Klorojenik asit	2,330
3	Kafeik asit	0,411



Şekil 4.12: *H. calycinum* *n*-BuOH altekstresinde 271 nm’de gallik asit varlığını gösteren kromatogram



Şekil 4.13: *H. calycinum* *n*-BuOH altekstresinde 325 nm’de klorojenik asit varlığını gösteren kromatogram



Şekil 4.14: *H. calycinum* *n*-BuOH altekstresinde 248 nm’de kafeik asit varlığını gösteren kromatogram

4.2.2. GK/KS ile Yağ Asidi Analizi

Bitkinin *n*-hekzan altekstresinin, yağ asidi bileşenlerinin ve bağıl yüzde miktarlarının belirlenmesi için gerçekleştirilen GK/KS analiz bulguları Tablo 4.9 ile gösterilmiştir.

Çalışmamızda yüksek bağıl yüzde miktarlarına sahip olan yağ asitleri sırasıyla α -linolenik asit (%33,2), linoleik asit (%27,4) ve palmitik asit (%23,3) olarak tespit edilmiştir. Düşük bağıl yüzdeye sahip yağ asitleri ise sırasıyla oleik asit (%4,4), stearik asit (%4,1), laurik asit (%2,4), miristik asit (%2,2) ve araşidik asit (%1,9) olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında *n*-hekzan altekstresinin, doymamış yağ asitleri bakımından %65 bağıl yüzdeye sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.9: *H. calycinum* bitkisinin *n*-hekzan altekstresinin GK/KS ile belirlenen yağ asidi bileşenleri ve bağıl yüzde değerleri

	Bileşik*	Bağıl Yüzde (%)
1	Dodekanoik asit (=Laurik asit); (12:0)	2,4
2	Tetradekanoik asit (=Miristik asit); (14:0)	2,2
3	Hekzadekanoik asit (=Palmitik asit); (16:0)	23,3
4	Oktadekanoik asit (=Stearik asit); (18:0)	4,1
5	(Z)-9-Oktadekanoik asit (=Oleik asit); (18:1); ω -9	4,4
6	(Z, Z)-9,12-Oktadekadienoik asit (=Linoleik asit); (18:2); ω -6	27,4
7	(Z, Z, Z)-9,12,15-Oktadekatrienoik asit ($=\alpha$ -Linolenik asit); (18:3); ω -3	33,2
8	Eikosanoik asit (=Araşidik asit); (20:0)	1,9
	Toplam	98,9
	Toplam ω-3	33,2
	Toplam ω-6	27,4
	Toplam ω-9	4,4
	Toplam doymamış yağ asidi	65,0
	Toplam doymuş yağ asidi	33,9

*Bileşime katkı sağlayan bileşenlerden yüzdesi $\geq$ %1 olanlar tabloda gösterilmiştir.

4.2.3. Toplam Flavanoit ve Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

H. calycinum bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen MeOH ekstresinin, *n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH ve k-H₂O altekstrelerinin ve *n*-BuOH altektresine ait fraksiyonların toplam flavanoit ve toplam fenolik madde miktar tayini sırasıyla alüminyum klorür ve Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bulgular Tablo 4.10' da gösterilmiştir.

H. calycinum ekstre ve altekstrelerinin toplam flavanoit miktarları incelendiğinde, EtOAc altekstresinin (101,30 $\pm$ 7,94 mg KE/g ekstre) en yüksek flavanoit miktarına sahip

olduğu görülmüştür. Diğer ekstrelerin sahip oldukları flavanoit miktarları sırasıyla, MeOH altekstresi ($43,78 \pm 1,62$ mg KE/g ekstre), CH_2Cl_2 altekstresi ($21,77 \pm 1,70$ mg KE/g ekstre), *n*-BuOH ekstresi ($19,77 \pm 0,70$ mg KE/g ekstre) ve k- H_2O altekstresi ($1,94 \pm 0,24$ mg KE/g ekstre) olarak tespit edilmiştir. *H. calycinum* bitkisinin *n*-BuOH altekstresinden elde edilen fraksiyonların toplam flavanoit miktarları, en yüksek miktardan en düşük miktara doğru sırasıyla FrB ($71,71 \pm 2,92$ mg KE/g ekstre), FrC ($47,65 \pm 3,70$ mg KE/g ekstre), FrA ($17,34 \pm 1,69$ mg KE/g ekstre) olarak tespit edilmiştir.

H. calycinum bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan altekstrelerin toplam fenolik madde miktarları incelendiğinde, EtOAc altekstresinin ($333,49 \pm 4,78$ mg GAE/g ekstre) en yüksek toplam fenolik madde miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ardından sırasıyla *n*-BuOH ($294,59 \pm 8,41$ mg GAE/g ekstre), MeOH ($235,96 \pm 10,23$ mg GAE/g ekstre), k- H_2O ($63,45 \pm 3,09$ mg GAE/g ekstre), CH_2Cl_2 ($53,29 \pm 1,96$ mg GAE/g ekstre), *n*-hekzan ($30,13 \pm 1,77$ mg GAE/g ekstre) altekstrelerinin yer aldığı tespit edilmiştir. *H. calycinum* bitkisinin *n*-BuOH altekstresinden elde edilen fraksiyonların toplam fenolik madde miktarları, en yüksek miktardan en düşük miktara doğru sırasıyla FrC ($528,46 \pm 22,89$ mg GAE/g ekstre), FrB ($444,83 \pm 16,97$ mg GAE/g ekstre), FrA ($341,39 \pm 3,81$ mg GAE/g ekstre) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.10: *H. calycinum* bitkisinin ekstre, altekstre ve fraksiyonların toplam fenolik ve toplam flavanoit madde miktarları

Ekstre	Toplam Flavanoit Madde Miktarı* (mg KE/ g ekstre)	Toplam Fenolik Madde Miktarı* (mg GAE/g ekstre)
MeOH	43,78 ± 1,62	235,96 ± 10,23
<i>n</i>-hekzan	-**	30,13 ± 1,77
CH₂Cl₂	21,77 ± 1,70	53,29 ± 1,96
EtOAc	101,30 ± 7,94	333,49 ± 4,78
<i>n</i>-BuOH	19,77 ± 0,70	294,59 ± 8,41
k-H₂O	1,94 ± 0,24	63,45 ± 3,09
FrA	17,34 ± 1,69	341,39 ± 3,81
FrB	71,71 ± 2,92	444,83 ± 16,97
FrC	47,65 ± 3,70	528,46 ± 22,89

* Değerler ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir, n=3

** -: Test edilmedi

5. TARTIŞMA

Hypericum türleri, dünyada yaygın olarak kullanılan ve üzerinde çok sayıda çalışma bulunan bitki türlerinden biridir (79,106–109). *Hypericum* türleri üzerinde antideprasan, antioksidan, antimikrobiyal, yara iyileştirici ve antienflamatuvar çalışmalar bulunmaktadır (30,82,110–113). *H. calycinum* bitkisinin Anadolu’da geleneksel olarak nefes darlığı, mide ağrısı ve egzama tedavilerinde kullanıldığı tespit edilmiştir (24,39). Öte yandan, *H. calycinum* bitkisi üzerinde yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde biyoaktivite ve fitokimyasal içerik çalışmasının oldukça az sayıda olduğu tespit edilmiştir. Literatürde *Hypericum* türlerinin, Anadolu’da geleneksel olarak idrar yolları enfeksiyonları, gastrit, ülser, nevralji gibi rahatsızlıkların yanı sıra hemoroit gibi enflamatuvar hastalıklara karşı kullanıldığı bildirilmiştir (27–30). Bu bilgiler ışığında, *H. calycinum* bitkisinin, *in vitro* antienflamatuvar etkisinin ve kimyasal bileşenlerinin belirlenmesiyle literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır. Böylelikle, üzerinde az sayıda çalışma bulunan ve Anadolu’da önemli bir yayılım gösteren *Hypericum* türü olan *H. calycinum* bitkisinin hem biyolojik aktivitesi hakkında önemli bilgiler elde edilmiş olacak hem de bitki, kimyasal bileşimi açısından incelenmiş olacaktır.

Literatürde farklı *Hypericum* türleri üzerinde gerçekleştirilmiş çok sayıda antienflamatuvar etki çalışması bulunmaktadır (71,72,77). Üzerinde az sayıda çalışma bulunan *H. calycinum* bitkisinin *in vitro* antienflamatuvar aktivitesini belirlemek için, bitkinin altekstrelerinin çeşitli enflamatuvar parametreler (NO, PGE₂, TNF- α , IL-6) üzerindeki etkileri, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle *H. calycinum* çiçekli toprak üstü kısımlarından MeOH ekstresi hazırlanmıştır. Daha sonra elde edilen ekstreten sıvı-sıvı fraksiyonlama tekniği ile artan polaritelerde altekstreler (*n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH ve k-H₂O) elde edilmiştir. Bitkinin altekstrelerinin Raw 264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki toksik olmayan konsantrasyonları WST-1 testi ile belirlenmiştir. Bitkinin antienflamatuvar aktivitesini tespit etmek amacıyla bu altekstrelerin LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimleri üzerindeki etkileri Griess testiyle belirlenmiştir. Ardından altekstrelerin, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin sitokinler (TNF- α , IL-6) ve PGE₂ üretimleri üzerindeki etkileri ELISA yöntemiyle belirlenmiştir.

Ekstrelerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelendiğinde, *n*-hekzan altektresinin uygulandığı konsantrasyonlarda (6 µg/mL, 12 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL ve 100 µg/mL) LPS'le beraber veya LPS uygulanmadan, Raw 264.7 makrofajlarının hücre canlılığını önemli derecede azaltmadığı tespit edilmiştir. Bitkinin CH₂Cl₂ altektresinin ise uygulandığı konsantrasyonlarda (6 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 75 µg/mL) sadece besiyeri uygulanan kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı sırasıyla % 104,29, % 99,69, % 96,18, % 92,61, % 86,53 ve % 57,45 olarak tespit edilmiştir. Bu altektrenin uygulandığı en yüksek konsantrasyonda (75 µg/mL) hücre canlılığını %20'den daha yüksek oranda azaltmasından dolayı LPS ile uyarılan hücreler üzerinde yalnızca 50 µg/mL konsantrasyona kadar olan konsantrasyonlar değerlendirilmiştir. Altektre (6, 12,5, 25, 50 µg/mL), hücrelere LPS (1 µg/mL) ile beraber uygulandığında hücre canlılığı sırasıyla % 90,78, % 96,73, % 89,18, % 91,11 olarak tespit edilmiştir. Bitkinin EtOAc ve *n*-BuOH altektreleri hücrelere 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonda uygulanmıştır. Her iki ekstre de bu konsantrasyonlarda (LPS ile beraber veya LPS eklenmeden) hücre canlılığında önemli bir azalmaya neden olmamıştır. Bitkinin *n*-hekzan, EtOAc ve *n*-BuOH altektreleri, uygulandıkları en yüksek 100 µg/mL konsantrasyona kadar hücre canlılığında önemli bir azalmaya neden olmamıştır. Ancak CH₂Cl₂ altektresi, 75 µg/mL konsantrasyonda uygulandığında hücre canlılığı % 57,45 oranındadır. Bu nedenlerden dolayı deneylerde, *n*-hekzan, EtOC ve *n*-BuOH altektreleri 100 µg/mL konsantrasyona kadar kullanılmış, CH₂Cl₂ ekstresi ise 50 µg/mL konsantrasyona kadar kullanılmıştır.

NO molekülü, akut ve kronik enflamasyonda hem proenflamatuvar hem de antienflamatuvar özelliğe sahiptir. Enflamasyon esnasında NO, vazodilatasyonu artırır ve enflamasyon semptomlarını (ödem, kızarıklık, ateş) oluşturur. Bu durumda iNOS, hem doku koruyucu hem de zarar verici bir etki gösterebilir. NO molekülünün inhibe edilmesi stratejisi ile, aşırı üretiminin zararlı etkilerinin önlenmesi sağlanır (88,114,115). Çalışmamızda, NO üretimi üzerinde en yüksek inhibitör etkiyi *n*-hekzan altektresi göstermiştir. Bitkinin *n*-hekzan altektresi, 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda uygulandığında LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla (sırasıyla %79,90 ve %95,11) önemli derecede inhibe etmiştir. Bu inhibisyon değerinin bilinen bir NO inhibitörü olan L-NIL'ın (5 µM) gösterdiği inhibisyon (%52,32) değerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin CH₂Cl₂ altektresi ikinci en etkili altektresidir. Uygulandığı en yüksek

konsantrasyonda (50 µg/mL) %48,23 inhibisyon göstermiştir. Literatürde, *H. roeperianum* bitkisinden elde edilen aseton ekstresinin LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmaya göre, aseton ekstresinin uygulandığı çeşitli konsantrasyonlarda (2, 10, 30 ve 100 µg/mL) LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimini sırasıyla %29,41, %65,90, %81,04 ve %89,72 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir (116). Bir başka çalışmada, *H. calabricum* bitkisinin EtOAc ekstresinin konsantrasyona bağlı şekilde, LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin NO üretimini önemli ölçüde (IC₅₀: 102 µg/mL) inhibe ettiği bildirilmiştir (75). Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında, daha apolar karakterdeki *n*-hekzan ve CH₂Cl₂ altekstreleri en yüksek etkili ekstreler olarak belirlenmiştir. Nispeten daha polar karakterdeki *n*-BuOH ve EtOAc altekstrelerinde ise daha düşük NO inhibitörü etki gözlemlenmiştir. Özellikle EtOAc alekstresinde 100 µg/ml konsantrasyondaki inhibisyon %31,66 civarındadır.

Sitokinler; hemen hemen tüm hücrelerde üretilirler, ancak önemli ölçüde makrofaj ve T hücrelerinde üretilirler. Proenflamatuvar sitokin olan TNF-α ve IL-1, immün yanıtın başlatılmasını ve sürdürülmesini sağlar (117). TNF-α, proliferatif ve enflamatuvar olaylardan sorumlu sitokindir. Bu molekül ayrıca; astım, Crohn hastalığı, romatoid artrit, nöropatik ağrı, otoimmünite ve kanser gibi bir dizi patolojik durumlarda da rol oynar. Romatoid artritli bölgelerde TNF-α, IL-1'in sentezini uyarmaktadır. Bunun akabinde IL-6 seviyelerinde artışa sebep olarak akut enflamasyonda yer almaktadır (117,118). IL-6 ve IL-8 ise, sekonder yardımcı proenflamatuvar sitokinlerdir. IL-6 akut enflamatuvar yanıtlarda yer alır, fakat proenflamatuvar sitokin olarak aktivitesi devam ettiğinde akut enflamasyon kronik enflamasyona dönüşür. Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, ankilozan spondilit, psöriazis ve Crohn gibi birçok romatizmal hastalıkta kandaki IL-6 seviyeleri yükselmektedir (119).

Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin TNF-α üretimi üzerindeki inhibitör etkilerinin belirlenmesi için bitkinin *n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH altekstreleri ile çalışılmıştır. Ekstrelerin içerisindeki yüksek konsantrasyondaki en yüksek etkiyi *n*-hekzan altekstresi göstermiştir. Bu ekstre 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonda uygulandığında TNF-α seviyelerini, yalnızca LPS uygulanmış kontrol grubuna kıyasla, %24,62 ve %63,50 oranında azaltmıştır. Ekstre en yüksek konsantrasyonda uygulandığında, bilinen bir sitokin inhibitörü olan deksametazonun (10 µM) gösterdiği

inhibisyon (%56,08) değerinden daha yüksek bir değer göstermiştir. Bitkinin CH₂Cl₂ altekstresi ise en yüksek konsantrasyonu olan 50 µg/mL’de % 31,84 inhibisyona sebep olmuştur. Her iki altekstrenin 50 µg/mL konsantrasyondaki etkileri kıyaslandığında CH₂Cl₂ altekstresinin daha etkili olduğu görülmektedir. Daha polar karakterdeki EtOAc ve *n*-BuOH ekstraktları ise TNF-α üzerinde herhangi bir azalmaya neden olmamıştır. Daha önce THP-1 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada *H. triquetrifolium* yapraklarından elde edilen EtOH ekstresinin TNF-α üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Çalışmada, ekstrenin 125 µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda %40 ve %60 inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir (120).

Önceki enflamatuvar parametreler üzerinde önemli derecede inhibitör etki gösteren altekstrelerin (*n*-hekzan ve CH₂Cl₂) bir proenflamatuvar sitokin olan IL-6 seviyeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Her iki ekstrede de önemli derecede IL-6 inhibisyonu tespit edilmiştir. *H. calycinum*, *n*-hekzan altekstresi 100 µg/mL konsantrasyonda uygulandığında, LPS uygulanmış kontrol grubuna kıyasla, IL-6 seviyelerinde %93,90 oranında azalmaya neden olmuştur. Bu oran deksametazonun 5 µM konsantrasyonda uygulandığında gösterdiği orandan (%86,26) daha yüksektir. Bitkinin CH₂Cl₂ altekstresi ise 50 µg/mL konsantrasyonda, LPS ile uyarılmış IL-6 üretimini %74,44 oranında inhibe etmiştir. Bitkinin CH₂Cl₂ altekstresi 50 µg/mL konsantrasyonda, *n*-hekzan altekstresinin aynı konsantrasyonda gösterdiği inhibisyondan (%58,63) daha yüksek bir inhibitör etkiye sahiptir. *H. erectum*, *H. laxum* ve *H. ascyron* türlerinin MeOH ekstraktları üzerinde çalışan Yuk ve arkadaşları, *H. laxum* bitkisinin MeOH ekstresinin Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin IL-6 üretimi üzerindeki etkisini, çeşitli konsantrasyonlarda (10, 20, 40 ve 80 µg/mL) incelemişler ve sırasıyla %17,1, %24,7, %34,6 ve %61,3 oranında inhibisyon tespit etmişlerdir. *H. laxum* bitkisinin MeOH ekstresi, uygulandığı 80 µg/mL konsantrasyonda Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin IL-6 üretimi üzerinde gösterdiği inhibisyon değerinin, 80 µg/mL konsantrasyonda uygulanan *H. ascyron* (%37,6) ve *H. erectum* (%22,6) bitkilerinin Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin IL-6 üretimi üzerinde göstermiş oldukları inhibisyon değerlerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (110).

Çalışmamızda önceki parametreler üzerinde yüksek etki gösteren altekstrelerin LPS ile uyarılmış Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin PGE₂ üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bitkinin *n*-hekzan altekstresi yalnızca 100 µg/mL konsantrasyonda, PGE₂

üretimi üzerinde %55,89 oranında inhibisyon göstermiştir. Diğer taraftan CH₂Cl₂ altekstresinin artan konsantrasyonlarda (12,5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL) PGE₂ seviyelerini yalnızca LPS uygulanan kontrol grubuna kıyasla, sırasıyla %13,62, %14,30 ve % 45,69 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Bitkinin CH₂Cl₂ altekstresinin *n*-hekzan ekstresinin uygulandığı konsantrasyonun yarısı oranında uygulanmasına rağmen gösterdiği inhibitör etki değeri *n*-hekzan altekstresine oldukça yakındır. Bunun yanında *n*-hekzan altekstresi 50 µg/mL konsantrasyonda herhangi bir inhibitör etki göstermemiştir. Literatürde *H. perforatum* türü üzerinde çalışan Hammer ve arkadaşları Raw 264.7 makrofaj hücreleri ile yürüttükleri çalışma neticesinde bitkinin EtOH ekstresinin 20 µg/mL konsantrasyonda PGE₂ üretiminin %43'ünü inhibe ettiğini göstermişlerdir (76).

Bitkinin ekstre (MeOH) ve altekstrelerinin (*n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH ve k-H₂O) 15-LOX enzim inhibitörü etkileri değerlendirildiğinde bitkinin yalnızca *n*-BuOH altekstresi (100 µg/mL) %28,87 oranında inhibisyona neden olmuştur. Bu nedenle bu ekstrenin konsantrasyona bağlı etkileri çalışılmıştır. Altekstre 400 µg/mL konsantrasyona dek çeşitli konsantrasyonlarda çalışılmış ve en yüksek konsantrasyonda %51,26 oranında inhibisyon tespit edilmiştir. Bitkinin, *n*-BuOH altekstresinden elde edilen fraksiyonlar, üç fraksiyon grubu altında toplanmıştır (FrA, FrB, FrC). Bu fraksiyonların 15-LOX enzim inhibitörü etkileri 100 µg/mL konsantrasyonda incelendiğinde sırasıyla FrA %79,92, FrB %6,69, FrC %0,79 oranında inhibisyon tespit edilmiştir.

H. calycinum bitkisinin MeOH ekstresinin, altekstrelerinin (*n*-hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH ve k-H₂O) ve fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavanoit madde miktarları belirlenmiştir. Buna göre; toplam fenolik madde miktarı en yüksek olan altekstre EtOAc altekstresi (333,49 ± 4,78 mg GAE/g ekstre) olarak tespit edilmiştir. Ardından sırasıyla *n*-BuOH (294,59 ± 8,41 mg GAE/g ekstre), MeOH (235,96 ± 10,23 mg GAE/g ekstre), k-H₂O (63,45 ± 3,09 mg GAE/g ekstre), CH₂Cl₂ (53,29 ± 1,96 mg GAE/g ekstre), *n*-hekzan (30,13 ± 1,77 mg GAE/g ekstre) altekstreleri gelmektedir. *H. calycinum* ekstre ve altekstrelerinin toplam flavanoit madde miktarları incelendiğinde EtOAc altekstresinin (101,30 ± 7,94 mg KE/g ekstre) en yüksek flavanoit miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer ekstrelerin sahip oldukları flavanoit miktarları, sırasıyla MeOH altekstresi (43,78 ± 1,62 mg KE/g ekstre), CH₂Cl₂ altekstresi (21,77 ± 1,70 mg

KE/g ekstre), *n*-BuOH ekstresi ($19,77 \pm 0,70$ mg KE/g ekstre) ve *k*-H₂O altekstresi ($1,94 \pm 0,24$ mg KE/g ekstre) olarak tespit edilmiştir. Bitkinin *n*-hekzan altekstresi, enflamatuvar parametreler üzerinde en yüksek aktiviteyi göstermesine rağmen diğer altekstrelerden düşük fenolik madde miktarına sahiptir. Bitkinin CH₂Cl₂ altekstresi de önemli seviyede aktivite gösterirken, hem fenolik hem de flavanoit madde miktarı açısından sırasıyla beşinci ve üçüncü sırada olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin EtOAc altekstresinde sadece NO üretimi üzerinde aktivite tespit edilmiştir. Buna rağmen fenolik ve flavanoit madde miktarları açısından oldukça zengin olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan *n*-BuOH altekstresinde sadece NO üretimi üzerinde aktivite belirlenmiştir. Bitkinin *n*-BuOH altekstresinin fenolik ve flavanoit madde miktarı bakımından sırasıyla ikinci ve dördüncü sırada bir değere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin *n*-BuOH altekstresinden elde edilen fraksiyonların toplam flavanoit miktarları [sırasıyla FrB ($71,71 \pm 2,92$ mg KE/g ekstre), FrC ($47,65 \pm 3,70$ mg KE/g ekstre), FrA ($17,34 \pm 1,69$ mg KE/g ekstre)] ve toplam fenolik madde miktarları [sırasıyla FrC ($528,46 \pm 22,89$ mg GAE/g ekstre), FrB ($444,83 \pm 16,97$ mg GAE/g ekstre), FrA ($341,39 \pm 3,81$ mg GAE/g ekstre)] *n*-BuOH altekstresinden yüksek tespit edilmiştir. Fraksiyonlar arasından en yüksek toplam flavanoit ve fenolik madde miktarına sırasıyla FrB ($71,71 \pm 2,92$ mg KE/g ekstre) ve FrC'nin ($528,46 \pm 22,89$ mg GAE/g ekstre) sahip olduğu belirlenmiştir. Bu fraksiyonların, *n*-BuOH altekstresinin flavanoit ve fenolik madde miktarından (sırasıyla $19,77 \pm 0,70$ mg KE/g ekstre ve $294,59 \pm 8,41$ mg GAE/g ekstre) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *n*-BuOH altekstresinden elde edilen fraksiyonlar arasından FrA (%79,92) fraksiyonunun *n*-BuOH (%28,87) altekstresinden daha yüksek 15-LOX enzim inhibitör etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bitkinin EtOAc ve *n*-BuOH altekstreleri üzerinde kantitatif olarak fenolik asit analizi YBSK yöntemi ile yapılmıştır. Analiz sonucuna göre EtOAc altekstresinde; klorojenik asit (5,855 mg/g ekstre), apigenin-7-glukozit (2,171 mg/g ekstre), rutin (1,785 mg/g ekstre), kafeik asit (0,615 mg/g ekstre), kersetin (0,346 mg/g ekstre) bileşikleri tespit edilmiştir. *n*-BuOH altekstresinde; klorojenik asit (2,330 mg/g ekstre), kafeik asit (0,411 mg/g ekstre) ve gallik asit (0,025 mg/g ekstre) tespit edilmiştir. *Hypericum* türleri üzerinde yapılan bir çalışmada, *H. calycinum* bitkisinin EtOH ekstresinden YBSK yöntemi ile klorojenik asit (7,01 mg/g kuru bitki) ve rutin (0,58 mg/g kuru bitki) tespit edilmiştir (121). Farklı bölgelerden altı farklı *H. perforatum* bitkisi toplanarak yapılan bir çalışmada Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin PGE₂ üretimi ELISA yöntemi ile

belirlenmiş ve antienflamatuvar aktivite çalışılmıştır. Bu çalışmada bitkilerin EtOH ve kloroform ekstreleri farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilmiştir. *H. perforatum* PI 371528 bitkisinin kloroform (12 µg/mL) ve EtOH (65 µg/mL) ekstresi PGE₂ üretimini sırasıyla %80, %93 inhibe ederek en yüksek aktiviteyi göstermiştir. amentoflavon, kersetin ve klorojenik asitin bitkinin antienflamatuvar özelliğinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (122). Çalışmamızda, EtOAc altekstresi uygulandığı en yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) NO üretimini %31,66 oranında inhibe etmiştir. Altekstreler arasında en yüksek toplam fenolik (333,49 ± 4,78 mg GAE/g ekstre) ve flavanoit (101,30 ± 7,94 mg KE/g ekstre) madde miktarına sahiptir. Altekstrenin antienflamatuvar etkisinden, sahip olduğu yüksek miktardaki toplam fenolik ve flavanoit madde içeriği sorumlu olabilir. Bunu yanında bitkinin fenolik içeriği YBSK yöntemiyle incelendiğinde klorojenik asit, rutin, apigenin-7-glukozit, kafeik asit ve kersetin içerdiği tespit edilmiştir. Bitkinin *n*-BuOH altekstresi uygulandığı en yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) NO üretimini %37,34 oranında inhibe etmiştir. Ayrıca uygulandığı 100 µg/mL konsantrasyonda 15-LOX enzimini %28,87 oranında inhibe etmiştir. Altekstreler arasında toplam fenolik (294,59 ± 8,41 mg GAE/g ekstre) madde miktarı açısından ikinci en yüksek içeriğe sahip ekstre olarak belirlenmiştir. Bitkinin *n*-BuOH altekstresinin sahip olduğu toplam fenolik ve flavanoit madde miktarları gösterdiği antienflamatuvar etkiden sorumlu olabilir. Ayrıca altekstrede YBSK yöntemiyle klorojenik asit, kafeik asit ve gallik asit tespit edilmiştir.

Bitkinin *n*-hekzan altekstresinin içerdiği yağ asit miktarları GK/KS yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bitkinin içerdiği doymamış yağ asit miktarınca (%65) zengin olduğu tespit edilmiştir. Bağlı yüzdesi yüksek olan yağ asitleri α-linolenik asit (%33,2), linoleik asit (%27,4) ve palmitik asit (%23,3) olarak tespit edilmiştir. Düşük bağlı yüzdeye sahip yağ asitler ise, sırasıyla oleik asit (%4,4), stearik asit (%4,1), laurik asit (%2,4), miristik asit (%2,2) ve araşidik asit (%1,9) olarak tespit edilmiştir. Buna göre bitkinin *n*-hekzan altekstresinin NO, TNF-α, IL-6 ve PGE₂ üretimleri üzerindeki etkisinin, sahip olduğu majör yağ asitleri (α-linolenik asit, linoleik asit ve palmitik asit) ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde, linoleik asit ve palmitik asitin antienflamatuvar aktivite ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (123,124).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, üzerinde sınırlı sayıda çalışma bulunan *H. calycinum* bitkisinin, antienflamatuvar aktivitesi ve kimyasal bileşimi araştırılmıştır. Bitkinin *n*-hekzan ve CH₂Cl₂ altekstreleri en aktif altekstreler olarak belirlenmiştir. Özellikle *n*-hekzan altekstresi yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) çalışılan tüm enflamatuvar parametreler üzerinde en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Diğer taraftan CH₂Cl₂ altekstresinin, 50 µg/ml konsantrasyonda TNF- α , IL-6 ve PGE₂ seviyeleri üzerinde aynı konsantrasyondaki *n*-hekzan altekstresinden daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu ekstre 75 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığından bu konsantrasyonda enflamatuvar parametreler üzerindeki etkisi çalışılmamıştır. Enflamatuvar parametreler üzerinde yüksek aktiviteye sahip *n*-hekzan altekstresinin yağ asidi analizi yapılmıştır. Bitkinin majör bileşikler α -linolenik asit ve linoleik asit başta olmak üzere %65 oranında toplam doymamış yağ asitlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerden yalnızca *n*-BuOH altekstresi 15-LOX enzimi üzerine inhibitör etki göstermiştir. Ancak bu altekstre, diğer ekstrelerle nazaran NO üretimi üzerinde düşük aktivite (%37,34) göstermiştir. Bitkinin EtOAc altekstresi de NO üretimi üzerinde benzer aktiviteye (%31,66) sahipken TNF- α üzerinde aktivite göstermemiştir. Bu iki altekstrenin NO üretimi üzerinde %30 üzerinde aktiviteye sahip olmasından dolayı YBSK yöntemi ile incelenmiştir. Bitkinin *n*-BuOH altekstresinde klorojenik asit, kafeik asit ve gallik asit bileşikler tespit edilmiştir. Bitkinin EtOAc altekstresinde ise rutin, kersetin, klorojenik asit, kafeik asit ve apigenin-7-glukozit bileşikler tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, toplam fenolik ve flavanoit madde miktarları incelendiğinde bitkinin EtOAc altekstresinin zengin içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; halk arasında sıklıkla kullanılan *Hypericum* türleri arasında üzerinde az sayıda çalışma bulunan *H. calycinum* türü, fitokimyasal içerik ve biyolojik aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz bulguların, ileride daha kapsamlı *in vivo* ve *in vitro* antienflamatuvar etki çalışmaları ile, bitkinin etkili bileşenlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar için yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Nathan, C., Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, 140(6), 871–882.
2. Ricciotti, E., FitzGerald, G.A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 31(5), 986–1000.
3. Germolec, D.R., Shipkowski, K.A., Frawley, R.P., Evans, E. (2018). Markers of inflammation. *Methods in Molecular Biology*, 1803, 57–79.
4. Vane, J.R., Botting, R.M. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Medicine*, 104(3A), 2S–8S.
5. Şentürk, N. (2013). Kütanöz inflamasyon. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı*, 47(1), 28–36.
6. Stein, C. (2018). New concepts in opioid analgesia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(10), 765–775.
7. Teixeira, D.F., Santos, A.M., Oliveira, A.M.S., Nascimento, J.A.C., Frank, L.A., Santana Souza, M.T. De., Camargo E.A., Serafini M.R. (2021). Pharmaceuticals agents for preventing NSAID-induced gastric ulcers: a patent review. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 14(6), 677–686.
8. Guatam, R., Jachak, S.M. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Review*, 29, 767–820.
9. Kuralay, F., Çavdar, Z. (2006). Enflamatuvar mediyatörlere toplu bakış. *Genel Tıp Dergisi*, 16(3), 143–152.
10. Tincani, A., Andreoli, L., Bazzani, C., Bosio, D., Sozzani, S. (2007). Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 7(1), 1–7.
11. Yeşilada, E., Ustun, O., Sezik, E., Takaishi, Y., Ono, Y., Hondo, G. (1997). Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1 alpha, interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *Journal of Ethnopharmacology*, 58 (1), 59–73.
12. Giuliano, F., Warner, T.D. (2002). Origins of prostaglandin E 2: Involvements of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in human and rat systems. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 303(3), 1001–1006.
13. Gökşen, U.A. (2010). Antiinflatuvar tedavide yeni bir yaklaşım siklooksijenaz ve 5-Lipooksijenazın dual inhibitörleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 30(1), 81–118.
14. Zamora, R., Vodovotz, Y., Billiar, T.R. (2000). Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Molecular Medicine*, 6(5), 347–373.
15. Stefanovic-Racic, M., Stadler, J., Evans, C.H. (1993). Nitric oxide and arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 36(8), 1036–1044.
16. Miles, A.M., Bohle, D.S., Glassbrenner, P.A., Hansert, B., Wink, D.A., Grisham, M.B. (1996). Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 40–47.
17. Hirano, T. (2021). IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *International Immunology*, 33(3), 127–148.
18. Schultz, F., Osuji, O.F., Wack, B., Anywar, G., Garbe, L.A. (2021). Antiinflammatory medicinal plants from the Ugandan Greater Mpigi region act as potent inhibitors in the COX-2/PGH2 Pathway. *Plants*, 10(2), 351.
19. Wisastra, R., Dekker, F. (2014). Inflammation, cancer and oxidative lipoxigenase activity are intimately linked. *Cancers (Basel)*, 6(3), 1500–1521.
20. Robson, N.K.B., Davis, P.H. (Ed.). (1967). *Hypericum L. in Flora of Turkey and East Aegean Islands*. University Press, Edinburgh, Vol. 2, 355–401.
21. Ersoy, E., Özkan E.E. (2019). Yeni çalışmalar ışığında *Hypericum* türlerinin farmakolojik aktiviteleri. *Istanbul University Institute of Health Sciences. Journal Advanced Research in Health Sciences*, 2(2), 71–79.
22. Crockett, S.L., Robson, N.K.B. (2011). Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5(1), 1–13.
23. Öztürk, N., Kıyan, H.T. (2016). Evaluation of Biological Activities of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. extracts. *Free Radical Biology and Medicine*, 100(23), 107.
24. Koçyiğit, M. (2005). *Yalova ilinde etnobotanik bir araştırma* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

25. Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*, 46(3), 133–152.
26. Zhang, R., Ji, Y., Zhang, X., Kennelly, E.J., Long, C. (2020). Ethnopharmacology of *Hypericum* species in China: A comprehensive review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 254, 112686.
27. Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2–3), 95–115.
28. Polat, R., Satıl, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir – Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 626–641.
29. Öztürk, M., Uysal, I., Gücel, S., Altundag, E., Dogan, Y., Baslar, S. (2013). Medicinal uses of natural dye-yielding plants in Turkey. *Research Journal of Textile Apparel*, 17(2), 69–80.
30. Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yilmazer, D., Baykal, T., Kırmızıbekmez, H., Alper, M., Yeşilada, E. (2010). Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 468–477.
31. Robson, N.K.B., Adams, P. (1968). Chromosome numbers in *Hypericum* and related genera. *Brittonia*, 20(2), 95.
32. Baytop, T. (1984). *Türkiye’de bitkiler ile tedavi: Geçmişte ve bugün*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi
33. Furkan, M.K. (2016). *Adıyaman ilinde yetişen bazı bitkilerin etnobotanik özellikleri* (Yüksek Lisans Tezi), Adıyaman Üniversitesi, Adıyaman.
34. Nath, E., Kültür, Ş. (2016). Natural dye plants in Savaştepe (Balıkesir, Turkey). *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 46(2), 89–95.
35. Yeşilada, E., Akaydın, G. (2008). *Kayışdağı’nın çiçekleri*. İstanbul: Yeditepe Üniversitesi.
36. Uçar, B. (2012). *Bursa ve çevresinde yayılışı olan Hypericum L. taksonları üzerinde taksonomik ve korolojik araştırmalar* (Yüksek Lisans Tezi), Uludağ Üniversitesi, Bursa.
37. Çırak, C., Kurt, D. (2014). Önemli tıbbi bitkiler olarak *Hypericum* türleri ve kullanım alanları. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24(1), 38–52.
38. Robson, N.K.B. (2001). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 4(1). Sections 7. *Roscyna* to 9. *Hypericum sensu lato* (part 1). *Bulletin of the Natural History Museum. Botany series*, 31(2), 37–88.
39. Alkaç, S.A. (2013). *Alaçam mountains (Balıkesir) from Bigadic city area around economic importance of some plants and features ethnobotany* (Yüksek Lisans Tezi), Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
40. Naht, E.Ö., Kültür, Ş. (2016). The local names of the plants in Kepsut and Savaştepe (Balıkesir), *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 47(1), 12–23.
41. Win, T., Htwe, T.T., Shwe, H.H., Heilmann, J. (2012). Lavandulyl flavanones from the stems of *Hypericum calycinum* L. *Chemistry and Biodiversity*, 9(6), 1198–1204.
42. Baytop, T. (1963). *Türkiye’nin tıbbi ve zehirli bitkileri*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi
43. Aktan, T. (2011). *Yenişehir (Bursa) köylerinin etnobotanik özellikleri* (Yüksek Lisans Tezi), Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.
44. Pytlakowska, K., Kita, A., Janoska, P., Połowniak, M., Kozik, V. (2012). Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. *Food Chemistry*, 135(2), 494–501.
45. Tuzlacı, E., Aymaz, P.E. (2001). Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia*, 72(4), 323–343.
46. Genç, G.E. (2003). *Çatalca yöresinde etnobotanik bir araştırma* (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
47. Bulut, G.E. (2008). *Bayramiç (Çanakkale) yöresinde etnobotanik araştırmalar* (Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
48. Saçlı, S. (1996). *Kazdağı ve çevresinde tıbbi amaçla kullanılan bazı bitkiler üzerinde morfolojik araştırmalar* (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
49. Alparslan, D.F. (2003). *Babaeski (Kırklareli) yöresinin geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkileri* (Yüksek Lisans Tezi), Marmara Üniversitesi, İstanbul.
50. Akaydın, G., Şimşek, I., Arituluk, Z.C., Yeşilada, E. (2013). An ethnobotanical survey in selected towns of the Mediterranean subregion (Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 37, 230–247.
51. Bulut, G., Tuzlacı, E. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa - Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 149, 663–647.
52. Altundag, E., Öztürk, M. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 19, 756–777.

53. Şenkardeş, İ. (2014). *Nevşehir'in güney ilçelerinde (Acıgöl, Derinkuyu, Gülşehir, Nevşehir-Merkez, Ürgüp) etnobotanik araştırmalar* (Doktora Tezi), Marmara Üniversitesi, İstanbul.
54. Öztürk, M. (2006). *Nizip bütçesi (Aksaray) florası ve etnobotanik özellikleri / Nizip bölgesinin (Aksaray) florası ve botanikleri* (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi, Konya.
55. Savić, J., Mačukanović-Jocić, M., Jarić, S. (2019). Medical ethnobotany on the Javor Mountain (Bosnia and Herzegovina). *European Journal of Integrative Medicine*, 27, 52–64.
56. Zivile, P., Nijole, S., Arunas, S., Jurga, B., Zenona, S., Zenona, K., Andrius, P.R.L., Tauras, A.M. (2010). Urban ethnobotany study in Samogitia region, Lithuania. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(1), 64–71.
57. Šavikin, K., Zdunić, G., Menković, N., Živković, J., Čujić, N., Tereščenko, M., Bigović, D. (2013). Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(3), 803–810.
58. Jarić, S., Popović, Z., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., Mitrović, M., Pavlović, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 160–175.
59. Scherrer, A.M., Motti, R., Weckerle, C.S. (2005). Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 97(1), 129–143.
60. Gijan, M. (2019). Ethnobotanical study of medicinal plants in Nagelle Arsi District, West Arsi Zone of Oromia, Ethiopia. *Journal of Natural Science and Research*, 9(13), 1–19.
61. Long, C., Li, R. (2004). Ethnobotanical studies on medicinal plants used by the Red-headed Yao People in Jinping, Yunnan Province, China. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2–3), 389–395.
62. Ersoy, E., Ozkan, E.E., Boga, M., Yilmaz, M.A., Mat, A. (2019). Anti-aging potential and anti-tyrosinase activity of three *Hypericum* species with focus on phytochemical composition by LC–MS/MS. *Industrial Crops and Products*, 141, 111735.
63. Kirmizibekmez, H., Bassarello, C., Piacente, S., Celep, E., Atay, I., Mercanoğlu, G., Yeşilada, E. (2009). Phenolic compounds from *Hypericum calycinum* and their antioxidant activity. *Natural Product Communications*, 4(4), 531–534.
64. Napoli, E., Siracusa, L., Ruberto, G., Carrubba, A., Lazzara, S., Speciale, A., Cimino, F., Saija, A., Cristani, M. (2018). Phytochemical profiles, phototoxic and antioxidant properties of eleven *Hypericum* species – A comparative study. *Phytochemistry*, 152, 162–173.
65. Hoş, A. (2016). Antibacterial potential of *Hypericum calycinum* L. from Turkey. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 9(2), 51–54.
66. Koç, L.Y. (2012). *Bazı bitki ekstraktlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkileriyle kanserli dokularda adenozin deaminaz enzimi üzerine etkisi* (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
67. Nogueira, T., Medeiros, M.A., Marcelo-Curto, M.J., García-Pérez, B.E., Luna-Herrera, J., Costa, M.C. (2013). Profile of antimicrobial potential of fifteen *Hypericum* species from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 47, 126–131.
68. Gottshall, R.Y., Lucas, E.H. (1949). The occurrence of antibacterial substances active against *Mycobacterium tuberculosis* in seed plants. *Journal of Clinical Investigation*, 28(5/1), 920–923.
69. Decosterd, L.A., Hoffmann, E., Kyburz, R., Bray, D., Hostettmann, K. (1991). A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity. *Planta Medica*, 57(6), 548–551.
70. Öztürk, Y., Aydın, S., Beis, R., Başer, K.H.C., Berberoğlu, H. (1996). Effects of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. extracts on the central nervous system in mice. *Phytomedicine*, 3(2), 139–146.
71. Crockett, S.L., Poller, B., Tabanca, N., Pferschy-Wenzig, E.-M., Kunert, O., Wedge, D.E., Bucar, F. (2011). Bioactive xanthenes from the roots of *Hypericum perforatum* (common St John's wort). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 428–434.
72. Obložinský, M., Bezáková, L., Holková, I., Vanko, M., Kartnig, T., Pšenák, M. (2006). Antilipoxygenase activity of compounds from *Hypericum perforatum*. *Biologia (Bratislava)*, 61(3), 331–332.
73. Crockett, S.L., Wenzig, E.M., Kunert, O., Bauer, R. (2008). Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytochemistry Letters*, (1), 37–43.
74. Berköz, M., Allahverdiyev, O., Yıldırım, M. (2018). Investigation of the effect of hyperforin and hypericin on inflammatory response in RAW 264.7 macrophages. *Van Medical Journal*, 25(2), 124–131.
75. Statti, G.A., Conforti, F., Menichini, F., Marrelli, M., Gangale, C., Tundis, R., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Menichini, F. (2011). Protective effect of *Hypericum calabricum* Sprengel on oxidative damage

- and its inhibition of nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biological Research*, 44(3), 213–218.
76. Hammer, K.D.P., Hillwig, M.L., Neighbors, J.D., Sim, Y.J., Kohut, M.L., Wiemer, D.F., Wurtele, E.S., Birt, D.F. (2008). Pseudohypericin is necessary for the light-activated inhibition of prostaglandin E2 pathways by a 4 component system mimicking an *Hypericum perforatum* fraction. *Phytochemistry*, 69(12), 2354–2362.
 77. Huang, N., Rizshsky, L., Hauck, C., Nikolau, B.J., Murphy, P.A., Birt, D.F. (2011). Identification of anti-inflammatory constituents in *Hypericum perforatum* and *Hypericum gentianoides* extracts using RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry*, 72(16), 2015–2023.
 78. Rabanal, R.M., Bonkanka, C.X., Hernández-Pérez, M., Sánchez-Mateo, C.C. (2005). Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 591–596.
 79. Raziq, N., Saeed, M., Shahid, M., Muhammad, N., Khan, H., Gul, F. (2015). Pharmacological basis for the use of *Hypericum oblongifolium* as a medicinal plant in the management of pain, inflammation and pyrexia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 41.
 80. Sánchez-Mateo, C.C., Bonkanka, C.X., Hernández-Pérez, M., Rabanal, R.M. (2006). Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1), 1–6.
 81. Öztürk, B., Apaydin, S., Goldeli, E., Ince, I., Zeybek, U. (2002). *Hypericum triquetrifolium* Turra. extract exhibits antiinflammatory activity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(2), 207–209.
 82. Trovato, A., Raneri, E., Kouladis, M., Tzakou, O., Taviano, M.F., Galati, E.M. (2001). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd. (Guttiferae). *Farmaco*, 56(5–7), 455–457.
 83. Šavikin, K., Dobrić, S., Tadić, V., Zdunić, G. (2007). Antiinflammatory activity of ethanol extracts of *Hypericum perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. richeri* Vill. and *H. androsaemum* L. in rats. *Phytherapy Research*, 21(2), 176–180.
 84. Meinke, M.C., Schanzer, S., Haag, S.F., Casetti, F., Müller, M.L., Wölflle, U., Kleemann, A., Lademann, J., Schempp, C.M. (2012). In vivo photoprotective and anti-inflammatory effect of hyperforin is associated with high antioxidant activity *in vitro* and *ex vivo*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(2), 346–350.
 85. Samadi, S., Khadivzadeh, T., Emami, A., Moosavi, N.S., Tafaghodi, M., Behnam, H.R. (2010). The effect of *Hypericum perforatum* on the wound healing and scar of cesarean. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16(1), 113–117.
 86. Decosterd, L.A., Stoeckli-Evans, H., Chapuis, J.C., Sordat, B., Hostettmann, K. (1989). New cell growth-inhibitory cyclohexadienone derivatives from *Hypericum calycinum* L. *Helvetica Chimica Acta*, 72(8), 1833–1845.
 87. Fujiwara, N., Kobayashi, K. (2005). Macrophages in Inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation Allergy*, 4(3), 281–286.
 88. Sharma, J.N., Al-Omran, A., Parvathy, S.S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252–259.
 89. Davies, M.G., Fulton, G.J., Hagen, P-O. (2005). Clinical biology of nitric oxide. *British Journal of Surgery*, 82(12), 1598–1610.
 90. Choudhary, S., Pilbeam, C. (2020). Prostaglandins and bone metabolism. In *Principles of Bone Biology* (pp. 1247–1269). Elsevier.
 91. Göçmen, C. (2005). Autacoids derived from membrane phospholipids: prostaglandins and leukotrienes. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 1(1), 1–9.
 92. Atzeni, F., Sarzi-Puttini, P. (2013). Tumor necrosis factor. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 229–231.
 93. Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S., Scheller, J. (2011). The soluble Interleukin 6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer. *European Journal of Cell Biology*, 90(6–7), 484–494.
 94. Atay Balkan, İ., Gören, A.C., Kırmızıbekmez, H., Yeşilada, E. (2018). Evaluation of the *in vitro* Anti-inflammatory Activity of *Nerium oleander* L. flower extracts and activity-guided isolation of the active constituents. *Records of Natural Products*, 12(2), 128–141.
 95. Yang, E-J., Jang, S., Hyun, K.H., Jung, E-Y., Kim, S-Y., Hyun, C-G. (2018). Anti-Inflammatory Activity of *Sonchus oleraceus* Extract in Lipopoly saccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(4), 1755–1761.

96. Aye, A., Jeon, Y-D., Lee, J-H., Bang, K-S., Jin, J-S. (2019). Anti-inflammatory activity of ethanol extract of leaf and leaf callus of basil (*Ocimum basilicum* L.) on RAW 264.7 macrophage cells. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19(2), 217–226.
97. Ataseven, S., Mısırlı, D., Uzar, F., Türkan, N.N., Elmastaş, M. (2021). Determination of phenolic compound composition of water and ethanol extracts of Horsetail (*Equisetum arvense*). *Journal of integrative and anatolian medicine*, 2(2), 3–9.
98. Sile, I., Videja, M., Makrecka-Kuka, M., Tirezite, D., Pajuste, K., Shubin, K., Krizhanovska, V., Grinberga, S., Pugovics, O., Dambrova, M. (2021). Chemical composition of *Prunus padus* L. flower extract and its anti-inflammatory activities in primary bone marrow-derived macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113678.
99. Ondua, M., Njoya, E.M., Abdalla, M.A., McGaw, L.J. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 234, 27-35.
100. Eroglu, E., Girgin, S.N. (2021). A unique phenolic extraction method from olive oil macerate of *Hypericum perforatum* using DMSO: Assessment of in vitro anticancer activity, LC-MS/MS profile, total phenolic content and antioxidant capacity. *South African Journal of Botany*, 139, 6-12.
101. Sulak, E.M. (2019). *Sağlığa faydalı iddiaları ile satılan harnup pekmezlerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi, Ankara.
102. Bong, F.J., Yeou Chear, N.J., Ramanathan, S., Mohana-Kumaran, N., Subramaniam, S., Chew, B.L. (2021). The development of callus and cell suspension cultures of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus nutans*) for the production of flavonoids and phenolics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33-101977.
103. Montiel-Sánchez, M., García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., García, H.S., Cano, M.P. (2021). In vitro gastrointestinal stability, bioaccessibility and potential biological activities of betalains and phenolic compounds in cactus berry fruits (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Chemistry*, 342, 128087.
104. García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., Guajardo-Flores, D., Welte-Chanes, J., Cano, M.P. (2019). Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) tissues: A comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76, 1–13.
105. Horszwald, A., Andlauer, W. (2011). Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. *Journal of Berry Research*, 1(4), 189–199.
106. Seyis, F., Yurteri, E., Özcan, A., Cirak, C. (2020). Altitudinal impacts on chemical content and composition of *Hypericum perforatum*, a prominent medicinal herb. *South African Journal of Botany*, 135, 391–403.
107. Silva, A.R., Taofiq, O., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L. (2021). *Hypericum* genus cosmeceutical application – A decade comprehensive review on its multifunctional biological properties. *Industrial Crops and Products*, 159, 113053.
108. Ugurlu, E., Secmen, O. (2008). Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia*, 79(2), 126–131.
109. Galeotti, N. (2017). *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 136–146.
110. Yuk, H.J., Oh, K.Y., Kim, D-Y., Song, H-H., Kim, J.Y., Oh, S-R., Ruyun, H-W. (2017). Metabolomic profiling, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Hypericum* species growing in South Korea. *Natural Product Communications*, 12(7), 1041-1044.
111. Medina, M.A., Martínez-Poveda, B., Amores-Sánchez, M.I., Quesada, A.R. (2006). Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound?. *Life Sciences*, 79(2), 105–111.
112. Couladis, M., Chinou, I.B., Tzakou, O., Petrakis, P.V. (2003). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp.apollinis (Boiss. & Heldr.). *Phytherapy Research*, 17(2), 152–154.
113. Galati, E.M., Contartese, G., Miceli, N., Taviano, M.F., Sdrafkakis, V., Couladis, M., Tzakou, O., Lanuzza, F. (2008). Antiinflammatory and antioxidant activity of *Hypericum rumeliacum* Boiss. subsp. apollinis (Boiss. & Heldr.) Robson & Strid methanol extract. *Phytherapy Research*, 22(6), 766–771.
114. Gültekin, N., Ersanlı, M., Küçükates, E., (1996). Güncel ve Etkin Bir Transmitter: Nitrik Oksid. *Arch. Turkish Soc. Cardiol.*, 24, 311–320.
115. Meller, S.T., Lewis, S.J., Bates, J.N., Brody, M.J., Gebhart, G.F. (1990). Is there a role for an endothelium-derived relaxing factor in nociception?. *Brain Research*, 531(1–2), 342–345.

116. Elisha, I.L., Dzoyem, J-P., McGaw, L.J., Botha, F.S., Eloff, J.N. (2016). The anti-arthritis, anti-inflammatory, antioxidant activity and relationships with total phenolics and total flavonoids of nine South African plants used traditionally to treat arthritis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 307.
117. Hehlhans, T., Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115(1), 1–20.
118. Özorun, K., Tulek, N., Duzgun N. (1994). Romatoid Artrit (RA) ve Sitokinler : İnterlökin-1 (IL-1), İnterlökin-6 (IL-6), Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF-a) ve İnterferon Gama (IFN-y). *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 47(3), 1.
119. Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research and Therapy*, 6, 1–6.
120. Beşar, S., Walaa, H.E. (2016). *Hypericum triquetrifolium* extracts modulate IL-6, IL-10 and TNF-protein and mRNA expression in LPS-Activated human peripheral blood mononuclear cells and THP-1-derived macrophages. *Medicinal and Aromatic Plants*, 4(4), 1-6.
121. Strzemiński, M., Dresler, S., Sowa, I., Kurach, Ł., Kováčik, J., Wojas-Krawczyk, K., Wojciak, M. (2020). Direct spectroscopic and GC profiling combined with chemometric analysis as an alternative approach to investigate *Hypericum* species: Is it possible to replace HPLC?. *Industrial Crops and Products*, 157, 112930.
122. Hammer, K.D.P., Hillwig, M.L., Solco, A.K.S., Dixon, P.M., Delate, K., Murphy, P.A., Wurtele, E.S., Birt, D.F. (2007). Inhibition of Prostaglandin E 2 production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW 264.7 mouse macrophage cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7323–7331.
123. Balkan, İ.A., Taşkın, T., Doğan, H.T., Deniz, İ., Akaydin, G., Yesilada, E. (2017). A comparative investigation on the in vitro anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial potentials of subextracts from the aerial parts of *Daphne oleoides* Schreb. subsp. *oleoides*. *Industrial Crops and Products*, 95, 695–703.
124. Morais, S.M. de, Nascimento, J.E.T. do, Silva, A.A. de S, Junior, JERH, Pinheiro, D.C.S.N., Oliveira, R.V. (2017). Fatty acid profile and anti-Inflammatory activity of fixed plant oils. *Acta Scientiae Veterinariae*, 45(1), 8.

EK

Araştırma İzni

20.02.2021 12528



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü

GIDANI KORU
SOFRAMA SAHİP ÇIK

Sayı : E-21264211-288.04-501116

19.02.2021

Konu : Araştırma İzinleri (İrem ATAY BALKAN
)

DAĞITIM YERLERİNE

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Eczacılık Fakültesi Biyoloji Bölümü Dr. Öğretim Üyesi İrem ATAY BALKAN tarafından yürütülecek olan "**Hypericum calycinum Toprak Üstü Ekstresinin 15-Lipoksijenaz Enzim İnhibitörü Etkili Bileşenlerinin Belirlenmesi**" başlıklı proje kapsamında araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlerin yanı sıra ekosistem bütünlüğüne de zarar vermeyecek şekilde yapılması,
- Söz konusu alanların özelliklerinin kaybolmamasına özen gösterilerek yaban hayatının tahrip edilmemesi,
- Arazide yapılacak her türlü çalışma ile ilgili arazi çalışmalarından en az bir (1) gün önce Bakanlığımız Doğa Koruma ve Milli Parklar Bölge Müdürlüklerine bağlı ilgili İl Şube Müdürlükleri/Milli Park Müdürlüklerine ve genel kolluk kuvvetlerine bilgi verilmesi,
- Söz konusu çalışmaların 2873 sayılı Milli Parklar Kanunu, 4915 sayılı Kara Avcılığı Kanunu veya Sulak Alanların Korunması Yönetmeliği kapsamındaki korunan alan sınırları dahilinde kalması durumunda çalışmanın süreç ve sonucu hakkında mutlak suretle ilgili İl Şube Müdürlükleri/Milli Park Müdürlüğüne bilgi verilmesi,
- Arazi çalışmalarının 2873 sayılı Milli Parklar Kanunu, 4915 sayılı Kara Avcılığı Kanunu veya Sulak Alanların Korunması Yönetmeliği kapsamındaki korunan alan sınırları dahilinde yapılacak olması durumunda bu kısımlarda çalışma yapılırken Bakanlığımız Doğa Koruma ve Milli Parklar Bölge Müdürlüklerine bağlı ilgili İl Şube Müdürlükleri/Milli Park Müdürlüklerinden bir mihmandar eşliğinde araziye çıkılmasının sağlanması,
- Arazi çalışmalarının yapılacağı yerin il merkezlerinde Valiliğe, ilçelerde ise Kaymakamlığa bilgi verilmesi,
- Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde izin dosyasında belirtilen miktarın aşılması ve bu örneklerin yurtdışına çıkarılmaması,
- Araştırma ara ve sonuç raporlarının basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze gönderilmesi,

şartıyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüştür.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Hasan KANCA

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu : IWLUYHCH Belge Doğrulama Adresi: <https://www.turkiye.gov.tr/tarim-ve-orman-bakanligi-cbys>
Beştepe Mah. Alparslan Türkeş Cad. No:71 Yenimahalle/ANKARA Bilgi için: Serkan ÇAMALAN
Telefon: (0312) 207 50 00 Tarım ve Orman Uzmanı
KEP: tarimveormanbakanligi@hs01.kep.tr



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

1 / 2

Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı

Ek: Rapor Genel Tanım Bilgileri (2 sayfa)

Dağıtım:

Gereği:

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Rektörlüğüne

Bilgi:

Tarım ve Orman Bakanlığı 1. Bölge Müdürlüğüne

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu: DWLUYHCH Belge Doğrulama Adresi: <https://www.turkiye.gov.tr/tarim-ve-orman-bakanligi-ebys>
Beştepe Mah. Alparslan Türkeş Cad. No:71 Yenimahalle/ANKARA Bilgi için: Serhan ÇAMALAN
Telefon: (0312) 207 50 00 Tarım ve Orman Uzmanı
KEP: tarim.ve.orman.bakanligi@kds01.kep.tr



