

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Farmakognozi Anabilim Dalı**

***POTENTILLA RECTA* L. BİTKİSİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

**Hazırlayan
Uzm. Ecz. Başak ÖKDEM**

**Danışmanlar
Prof. Dr. Müberra KOŞAR
Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK**

Doktora Tezi

**Mart 2017
KAYSERİ**

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

***POTENTILLA RECTA* L. BİTKİSİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Uzm. Ecz. Başak ÖKDEM**

**Danışmanlar
Prof. Dr. Müberra KOŞAR
Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Taraından TDK-2014-5447 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Mart 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Uzm. Ecz. Başak ÖKDEM

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“*Potentilla recta* L. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi doktora tez önerisi ve tez yazımı yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Uzm. Ecz. Başak ÖKDEM

Danışman

Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Yardımcı Danışman

Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

Farmakognози Anabilim Dalı Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

Prof. Dr. Müberra KOŞAR danışmanlığında **Uzm. Ecz. Başak ÖKDEM** tarafından hazırlanan “*Potentilla recta* L. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmakognozi** Anabilim Dalı’nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

....../...../2017

Danışman : Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Doğu Akdeniz Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. M. Betül YERER AYCAN

Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Perihan GÜRBÜZ

Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun..... tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü

Prof.Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana destek olan, her türlü çalışma imkanını bana sağlayan, tez çalışmamı yönlendiren değerli danışmanım Prof. Dr. Müberra KOŞAR'a,

Tez çalışmalarım boyunca, özellikle laboratuvar çalışmalarım sırasında yaptığı bilimsel yardımlar için yardımcı danışmanım Yrd. Doç. Dr. Gökçe Şeker KARATOPRAK'a, bilimsel ve manevi desteği için anabilim dalı hocalarından Yrd. Doç. Dr. Perihan GÜRBÜZ'e,

Tez çalışmamı farmakolojik açıdan değerlendirip, beni bilgilendiren Farmakoloji Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. M. Betül AYCAN'a,

Çalışmalarım süresince, özellikle bitki toplama aşamasında bilimsel yardımlarını esirgemeyen Botanik Anabilim Dalı başkanı Yrd. Doç. Dr. Ayşe BALDEMİR'e,

Çalışmalarım süresince desteklerini benden esirgemeyen Farmakognozi ve Farmasötik Botanik Anabilim Dalları'nın değerli öğretim üyeleri ve yardımcılara,

Laboratuvar arkadaşlarım Gökçen ve Çağlayan'a,

Her kararımda her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme, eşime ve oğluma sonsuz teşekkürler.

Uzm. Ecz. Başak ÖKDEM,

Mart 2017, KAYSERİ

POTENTILLA RECTA L. BİTKİSİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Uzm. Ecz. Başak ÖKDEM

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Mart 2017

Danışman: Prof.Dr. Müberra KOŞAR

Yardımcı Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

ÖZET

Bu tez kapsamında Rosaceae familyasında yer alan *Potentilla recta* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrenin antioksidan aktivitesi, antienflamatuvar aktivitesi ve kimyasal bileşimi incelenmiştir. *P. recta* toprak üstü kısımlarının % 70'lik metanol ekstresi hazırlanmıştır. Ekstrenin spektrofotometrik (toplam fenol, toplam flavonoit, toplam flavonol) ve kromatografik/spektrometrik (SK-KS/KS) olarak kompozisyonları belirlenmiştir.

Ekstrenin antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla indirgenme gücünün belirlenmesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) ve 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS^{•+}) radikallerini süpürücü etki, askorbat-Fe(III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunu engelleyici etki, β -karoten-linoleik asit birlikte oksidasyonunu inhibe edici etki, demir (II) ile şelat oluşumu, spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması, spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması deneyleri yapılmıştır. Aynı ekstrenin RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattında sitotoksitesi incelenmiştir. Ekstrenin antienflamatuvar aktivitesini belirlemek amacıyla, makrofajlar LPS ile indüklenmiş ve nitrik oksit, IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α düzeyleri ölçülmüştür.

Ekstrenin kimyasal bileşimi incelendiğinde fenolik asitler, flavonoitler ve tanenler başta olmak üzere fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu görülmüştür. Yapılan antioksidan ve antienflamatuvar aktivite çalışmalarında gözlenen etkiden bu bileşiklerin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Potentilla recta* L., Rosaceae, Antioksidan aktivite, Antienflamatuvar aktivite

PHARMACOGNOSIC RESEARCHS ON *POTENTILLA RECTA* L.**MSci. Pharm. Başak ÖKDEM****Erciyes University, Graduate Institute of Health Sciences****Department of Pharmacognosy****PH. D. Thesis, March 2017****Supervisor: Prof.Dr. Müberra KOŞAR****Co Supervisor: Assis. Prof. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK****ABSTRACT**

Within this thesis, the antioxidant activity, antiinflammatory activity and chemical composition of extract obtained from aerial parts of *Potentilla recta* L. was investigated. %70 methanol extract was prepared from aerial parts of *P. recta* L.. Chemical composition of extract was analysed spectrophotometrically (total phenol, total flavonoids, total flavonols) and chromatographic/spectrometric (LC-MS/MS) techniques.

In order to determine antioxidant activity of the extracts 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{•+}) radical scavenging effect, preventing peroxidation of the phospholipids, β -carotene-linolenic acid co-oxidation assay, iron (II) chelate formation, reduction, 2-deoxy-d-ribose degradation by site and non site specific OH radical activity assay was investigated. The cytotoxicity of the extracts was investigated using RAW 264.7 mouse macrophage cell. Determining the antiinflammatory activity, macrophages stimulated with LPS and the levels of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , nitric oxide were measured.

Analyzing the chemical composition of the extract, it was observed that extract was rich in phenolic compounds especially phenolic acids, flavonoids and tannins. These compounds are thought to be responsible from the antioxidant and antiinflammatory effects observed in this study.

Keywords: *Potentilla recta* L., Rosaceae, Antioxidant activities, Antiinflammatory activities

İÇİNDEKİLER

POTENTILLA RECTA L. BİTKİSİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Sayfa no

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. BOTANİK ÖZELLİKLER	5
2.1.1. Rosaceae familyasının özellikleri	5
2.1.2. <i>Potentilla</i> L. Cinsinin Dünyadaki Dağılımı	5
2.1.3. <i>Potentilla</i> L. Cinsinin Bitki Sistematığındeki Yeri	6
2.1.4. <i>Potentilla</i> L. Cinsinin Özellikleri.....	6
2.1.5. <i>Potentilla</i> Türleri İçin Tayin Anahtarı	7
2.1.6. <i>Potentilla recta</i> L.	10
2.1.7. <i>Potentilla recta</i> L. Türünün Türkiye’deki Dağılımı	10
2.2. FARMAKOPELERDE KAYITLI OLAN <i>POTENTILLA</i> TÜRLERİ.....	11
2.3. <i>POTENTILLA</i> TÜRLERİNİN GELENEKSEL KULLANIMI	12
2.4. <i>POTENTILLA</i> TÜRLERİNİN KİMYASAL BİLEŞİMLERİ.....	13

2.5. <i>POTENTILLA</i> TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN AKTİVİTE	
ÇALIŞMALARI	16
2.5.1. Antiülser Aktivite.....	16
2.5.2. Antidiyareik Aktivite	17
2.5.3. Antineoplastik Aktivite	17
2.5.4. Antiviral ve Antimikrobiyal Aktivite.....	18
2.5.6. Antihiperglisemik ve Antihiperlipidemik Aktivite	21
2.5.7. Antienflamatuvar, Spazmolitik, Hepatoprotektif Aktivite.....	23
2.5.8. Antioksidan Aktivite	24
2.5.9. Kardiyovasküler Aktivite	27
2.5.10. Tiroit Hastalıklarındaki Kullanımı.....	27
2.5.11. Diğer Aktiviteler	28
2.6. TOKSİSİTE	28
2.7. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR	29
2.7.1. Serbest Radikaller	29
2.7.2. Moleküler Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri.....	30
2.7.2.1. Reaktif Oksijen Türleri	30
2.7.2.2. Reaktif Azot Türleri	31
2.7.3. Antioksidanlar	32
2.7.3.1. Enzim Olan Endojen Antioksidanlar	33
2.7.3.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar	34
2.7.3.3. Eksojen Antioksidanlar	35
2.8. ENFLAMASYONDA BAĞIŞIK YANIT	40
2.8.1. Doğal Bağışıklık	40
2.8.2. Edinsel Bağışıklık	41
2.8.2.1. Hücresel Yanıt.....	41
2.8.2.2. Humoral Yanıt.....	41
2.8.3. Bağışık Yanıtta Başlıca Hücreler Arası İlişkiler: Sitokinler	42
2.8.4. Enflamasyon.....	43

3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN BİTKİSEL MATERYAL, KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR	45
3.1.1. Bitkisel Materyal	45
3.1.2. Kimyasal Maddeler	46
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	46
3.2. DENEYSEL ÇALIŞMA	46
3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı	47
3.2.2. Fenolik İçerik Analizleri	47
3.2.2.1. Toplam Fenol Miktar Tayini	47
3.2.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini	47
3.2.2.3. Toplam Flavonol Miktar Tayini	48
3.2.2.4. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (SK-KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi	48
3.2.3. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	49
3.2.3.1. İndirgenme Gücünün Belirlenmesi	49
3.2.3.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH [•]) Radikalini Süpürücü Etki Tayini	49
3.2.3.3. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS ⁺ •) Radikalini Süpürücü Etki Tayini	49
3.2.3.4. β-karoten / linoleik asit Birlikte Oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini	50
3.2.3.5. Askorbat –Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu	50
3.2.3.6. Demir (II) Şelat Aktivite	51
3.2.3.7. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması	51
3.2.3.8. Spesifik Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması	52
3.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	52
3.2.4.1. RAW 264.7 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	52

3.2.4.2. RAW 264.7 Hücrelerinin Pasajı.....	52
3.2.4.3. Hücre Dondurma ve Saklama	53
3.2.4.4. FCS'nin İnaktivasyonu	53
3.2.4.5. RAW 264.7 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi.....	53
3.2.5. Antienflamatuvar Etki.....	54
3.2.5.1. Nitrik Oksit Deneyi	54
3.2.5.2. İnterlökin-1 β (IL-1 β) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	55
3.2.5.3. İnterlökin-10 (IL-10) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	55
3.2.5.4. İnterlökin-6 (IL-6) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	56
3.2.5.5. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	57
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	57
4. BULGULAR.....	59
4.1. EKSTRENİN HAZIRLANIŞI, İÇERİK ANALİZLERİ	59
4.1.1. Ekstrenin Hazırlanışı.....	59
4.1.2. Toplam Fenol, Flavonoit ve Flavonol Miktar Tayini.....	59
4.1.3. Sıvı kromatografisi Kütle-Spektrometresi (SK-KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi	60
4.2. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI	66
4.2.1. İndirgenme Gücünün Belirlenmesi	66
4.2.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH $^{\bullet}$) Radikalini Süpürücü Etki Tayini.....	68
4.2.3. 2,2'- azino-bis (3- etilbenztiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS $^{+\bullet}$) Radikalini Süpürücü Etki Tayini	69
4.2.4. β -Karoten/Linoleik Asit Birlikte Oksidasyonu İnhibe Edici Etki Tayini	71
4.2.5. Askorbat –Fe (III) Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu.....	72
4.2.6. Demir (II) Şelat Aktivite	73
4.2.7. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması.....	74

4.2.8. Spesifik Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması...	75
4.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI.....	75
4.3.1. RAW 264.7 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB)	
Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi	75
4.4. ANTİENFLAMATUVAR AKTİVİTE	76
4.4.1. Nitrik Oksit Deneyi.....	76
4.4.2. İnterlökin-1 β (IL-1 β) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	77
4.4.3. İnterlökin-10 (IL-10) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	78
4.4.4. İnterlökin-6 (IL-6) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	79
4.4.5. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) Sitokin Seviyesinin Ölçümü.....	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	82
6. KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ.....	110

KISALTMALAR

% AA	: Yüzde Antioksidan Aktivite
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
AA	: Askorbik Asit
ABTS	: 2,2' - azino-bis (3- etilbenztiiazolin-6- sulfonik asit)
AscAE	: Askorbik Asite Eşdeğer
BHA	: Butil Hidroksi Anisol
BHT	: Butil Hidroksi Toluen
CAT	: Katalaz
CD	: Hücre Yüzey Molekülleri
CO₂	: Karbondioksit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FeCl₃	: Demir (III) klorür
FeCl₂	: Demir (II) klorür
g	: Gram
GA	: Gallik Asit
GAE	: Gallik Asite Eşdeğer
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HRP	: Horseradish Peroksidaz

IC₅₀	: Yüzde Ellisini İnhibe Eden Konsantrasyon
Ig	: İmmün Globülin
IL	: İnterlökin
K₂S₂O₈	: Potasyumpersülfat
KH₂PO₄	: Potasyumdihidrojen Fosfat
L	: Litre
LDL	: Düşük Ağırlıklı Lipoprotein
LPS	: Lipopolisakkarit
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
MIK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Na₂CO₃	: Sodyum Karbonat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaNO₂	: Sodyum Nitrat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NK	: Doğal Öldürücü
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
PBS	: Fosfat Tamponu
RA	: Rozmarinik Asit
RAW	: 264.7 Abelson Fare Lösemi Virüsü Transforme Edilmiş Makrofaj Hücre Hattı
RE	: Rutine Eşdeğer Miktar
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SK-KS/KS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi

SOD	: Süperoksit Dismutaz
SRB	: Sulforhodamin B
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TBHQ	: Ter-butil Hidrokinon
TCA	: Trikloroasetik Asit
TEAC	: Troloks' a Eşdeğer
TMB	: 3,3',5,5' tetrametilbenzidin
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	<i>Potentilla</i> türlerinin dünyanın farklı bölgelerindeki kullanımları.....	12
Tablo 2.2.	Bazı <i>Potentilla</i> türlerinin topraküstü kısımlarından izole edilen bileşikler.....	16
Tablo 2.3.	Temel sitokinlerin sınıflandırılması.....	43
Tablo 4.1.	Ekstre verimi, toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları.....	59
Tablo 4.2.	<i>P. recta</i> ekstresinde SK-KS/KS ile tanımlanan bileşikler	60
Tablo 4.3.	<i>P. recta</i> ekstresinin ve standartların demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasiteleri.....	67
Tablo 4.4.	<i>P. recta</i> ekstresi ve standartların DPPH• radikalini süpürücü etkileri.....	68
Tablo 4.5.	<i>P. recta</i> ekstresinin ve standartların ABTS ⁺ • radikalini süpürücü etkileri	70
Tablo 4.6.	<i>P.recta</i> ekstresi ve standartların β-karoten/linoleik asit peroksidasyonuna etkileri	71
Tablo 4.7.	<i>P. recta</i> ekstresinin ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu.....	73
Tablo 4.8.	<i>P. recta</i> ekstresinin ve standartın spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasına etkisi	74
Tablo 4.9.	<i>P. recta</i> ekstresinin RAW 264.7 hücrelerinin canlılığına etkisi	75
Tablo 4.10.	<i>P. recta</i> ekstresinin önce ekstre uygulanan, sonra ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde nitrik oksit miktarına olan etkisi.....	76
Tablo 4.11.	<i>P. recta</i> ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-1β miktarına olan etkisi	77
Tablo 4.12.	<i>P. recta</i> ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-10 miktarına olan etkisi	78
Tablo 4.13.	<i>P. recta</i> ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-6 miktarına olan etkisi	79
Tablo 4.14.	<i>P. recta</i> ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde TNF-α miktarına olan etkisi.....	81

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	<i>Potentilla</i> L. cinsinin dünyadaki dağılımı.....	6
Şekil 2.2.	<i>Potentilla recta</i> 'nın Türkiye'deki dağılımı.....	11
Şekil 2.3.	Flavonoitlerin genel kimyasal yapısı	38
Şekil 2.4.	Sinnamik ve benzoik asitlerin genel kimyasal yapıları	39
Şekil 3.1.	<i>Potentilla recta</i> L. bitkisinin çiçekli toprak üstü kısımları	45
Şekil 4.1.	<i>P. recta</i> ekstresinin toplam iyon spektrumu [E(-) Q3 scan modu]	60
Şekil 4.2.	<i>Potentilla recta</i> bileşimindeki fenolik maddelerin kimyasal formülleri.....	61
Şekil 4.3.	191 [M-H] ⁻ iyonunun spektrumu [Kinik asit].....	62
Şekil 4.4.	301 [M-H] ⁻ iyonunun spektrumu [Elajik asit]	62
Şekil 4.5.	341 [M-H] ⁻ iyonunun spektrumu [Kafeik asit türevi].....	63
Şekil 4.6.	447 [M-H] ⁻ iyonunun spektrumu [Kemferol glikozit].....	63
Şekil 4.7.	477 [M-H] ⁻ iyonunun spektrumu [Kersetin glukronit]	64
Şekil 4.8.	595 [M-H] ⁻ iyonunun spektrumu [Kersetin türevi].....	65
Şekil 4.9.	783 [M-H] ⁻ iyonunun spektrumu [Bis-HHDP glukoz].....	65
Şekil 4.10.	934 [M-H] ⁻ iyonunun spektrumu [Potentilin].....	66
Şekil 4.11.	<i>P. recta</i> ekstresinin ve standartların demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasiteleri.....	67
Şekil 4.12.	<i>P. recta</i> ekstresi ve standartların DPPH [•] radikalini süpürücü etkileri.....	69
Şekil 4.13.	<i>P. recta</i> ekstresinin ve standartların ABTS ^{•+} radikalini süpürücü etkileri	70
Şekil 4.14.	<i>P.recta</i> ekstresinin ve standartların β-karoten/linoleik asit peroksidasyonuna etkileri	72
Şekil 4.15.	<i>P. recta</i> ekstresinin ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu.....	73
Şekil 4.16.	<i>P. recta</i> ekstresinin RAW 264.7 hücrelerinin canlılığına etkisi	76
Şekil 4.17.	<i>P. recta</i> ekstresinin önce ekstre uygulanan, sonra ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde nitrik oksit miktarına olan etkisi.....	77

- Şekil 4.18.** *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-1 β miktarına olan etkisi 78
- Şekil 4.19.** *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-10 miktarına olan etkisi 79
- Şekil 4.20.** *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-6 miktarına olan etkisi 80
- Şekil 4.21.** *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde TNF- α miktarına olan etkisi..... 81

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkiler, yüzyıllardır tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Son yıllarda, sentetik hammaddelerle üretilen ilaçların olası yan etkileri nedeniyle, hastalıklardan korunma ve tedavi amacıyla bitkisel ilaçların kullanımı artmıştır. Tüm dünyada tıbbi bitkilere yoğun bir ilgi olduğu ve bu bitkilerle yapılan çalışmaların gün geçtikçe arttığı bilinmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünya nüfusunun %70-80'i geleneksel tıptan yararlanmaktadır (1). WHO, kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarının 20.000 civarında olduğunu tespit etmiştir (2). Geleneksel tıpta asırlardır kullanılan bitkiler ve etnobotanik araştırmalar, eskiden olduğu gibi bugün de yeni etken madde arayışı içindeki modern ilaç araştırmalarına kaynak olmayı sürdürmektedir. WHO'nun Temel İlaçlar Model Listesinde bulunan 210 küçük moleküllü ilaç hammaddesinden 17'si bitkisel kökenlidir (3).

Türkiye halk ilacı ve besin olarak kullanılabilecek bitkiler açısından zengin bir floraya sahiptir. Türkiye'de 11000 civarında bitki taksonu yetişmektedir. Bunlardan 500 kadarı tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (4). Ülkemiz florasının zenginliğinin temelinde, değişik iklim tiplerinin varlığı, coğrafik durumu, jeolojik yapısı, topoğrafik özellikleri, çeşitli toprak gruplarına sahip olması ve üç değişik fitocoğrafik (Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz bitki coğrafyası) bölgenin birleştiği bir alanda yer alması bulunmaktadır (5).

Rosaceae familyası dünya çapında yaklaşık 110 cins ve 3000'den fazla türle temsil edilmektedir (6). Bunların birçoğu önemli meyve, kabuklu yemiş, süs bitkisi ve odun ürünleridir. Bu familyanın üyeleri çok değerli besin maddelerini, estetik veya endüstri için çok beğenilen ürünleri sağlar (7). Meyveleri kurutulmuş veya taze olarak, meyve suyu ve işlenmiş ürünler gibi çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. Meyvelerinin (elma, armut, kiraz, erik kayısı, çilek) ekonomik değeri yüksektir ve kesme çiçek olarak da önemli bitkileri kapsamaktadır (8).

Potentilla cinsi Rosaceae familyası, Rosoideae alt familyasının bir üyesidir ve genel olarak kuzey yarımkürenin, Alp dağları ve ılıman kutup bölgelerinde dağılım gösterir. Bu cinsin tedavi edici özellikleri eski çağlardan beri bilinmektedir. Toprak üstü ve toprak altı kısımlarının ekstreleri geleneksel tıpta iltihapların, yaraların, bazı kanser tiplerinin, bakteri, mantar ve virüs enfeksiyonlarının, ishal, diyabet gibi bazı rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmıştır (9).

Yunan ve Latin dillerinde *Potentilla* türleri "Heptaphyllon" veya "Pentaphyllon", "Septifolium" ve "Quinquefolium" olarak adlandırılmıştır. Yunan hekim Pedanius Dioscorides, iltihaplı yüz egzamasında ve ağız boşluğu ülserasyonlarında *P. erecta* (L.) Raeusch (Tormentil)'nin toprakaltı kısımlarından hazırlanan dekoksasyonun kullanımını tavsiye etmiştir. Ortaçağlarda Avrupalı hekim ve botanikçiler H. Bock, L. Fuchs, Paracelsus, Tabernaemontanus ve C. Bauhin, *Potentilla* türlerini botanik kitaplarında tarif ve tasvir etmişlerdir. Fuchs, NewKreüterbuch (1543)'da *P. alba* L., *P. reptans* L., *P. neumanniana* Rchb. (toprak altı kısımları ve yapraklar), *P. anserina* L. (toprak üstü kısım) ve *P. erecta* (toprak altı ve toprak üstü kısımları)'yı içeren beş *Potentilla* türünden bahsetmiştir. Su, süt, bal ile hazırlanan ekstreler ve alkollü çözeltiler diş ağrısı, boğaz iltihapları, yara iyileşmesi, sarılık, ağız ülseri, dizanteri tedavisinde ve homeostatik ilaç olarak kullanılmıştır (9).

Geleneksel Çin tıbbında *Potentilla* ekstreleri ishal, hepatit, fonksiyonel uterin kanama, travmatik kanama ve tip 2 diyabette ilaç olarak kullanılmıştır (10,11). Tibet geleneksel tıbbında *P. anserina* kök ekstreleri bazı viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (12). Benzer şekilde birçok *Potentilla* türü Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da farklı kültürlerin geleneksel tıbbında kullanılmıştır.

1811 yılında, C.H. Pfaff, *P. erecta* rizomlarında ana madde olarak tanen varlığını ilk kez kanıtlamıştır ve bu bileşenlerin bitkinin astrenjan etkisinden sorumlu olduğu sonucuna varmıştır. 1960'larda, bitki kimyası üzerine yapılan çalışmalarda özellikle *P. erecta* rizomları incelenmiş ve yayınlanmıştır. 1980'lerden başlayarak sadece yerel olarak önemli *Potentilla* türleri ile ilgili yayınlar yapılmıştır. *Potentilla* türleri ve bunların ekstrelerinin farmakolojik olarak değerlendirilmeleri (*in vitro* ve *in vivo*) özellikle 1980'lerden bu yana yapılmıştır. Son yıllarda *P. erecta* kök ekstrelerinin

ülseratif kolit tedavisinde ve çocuklardaki virüs kaynaklı ishal tedavisinde kullanımı üzerine klinik çalışmalar yapılmaktadır (9).

Antioksidanlar, vücudumuzdaki kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan veya dış etkenler tarafından oluşturulan ve hücrelere zarar veren serbest radikalleri etkisiz hale getirerek kanser dahil pek çok hastalığa neden olabilecek zincir reaksiyonları önleyen moleküllerdir. Bilinen ve halen ticari olarak kullanılan sentetik antioksidanlar (butilhidroksi toluen-BHT, butilhidroksi anisol-BHA, ter-butil hidrokinon-TBHQ gibi) kimyasal yapılarında fenolik gruba sahiptirler. Antioksidan etkiden sorumlu yapının da bu fenolik gruplar olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, son yıllarda kimyasal yapısında fenolik bileşikler içeren bitki türleri ile yapılan çalışmalar artmıştır.

Potentilla cinsinin Türkçe adı digitat yapraklı olması sebebiyle Beşparmakotu olarak bilinmektedir. Bunun yanında İngilizce’de Beşparmakotu anlama gelen "Cinquefoil“ olarak anılmaktadır. İsminin asıl anlamının ise Latince’den (potentiel) Fransızca’ya geçen "potent“ (güçlü, sağlam, dayanıklı) kelimesinden türediği bilinmektedir (13). *Potentilla* türlerinden biri olan, *Potentilla recta* L., halk arasında antibakteriyel, ateş düşürücü ve tonik olarak kullanılmaktadır. Bitkinin özütü, mantarların etkilerini azaltmaktadır ancak bakteri suşlarına karşı zayıf etki göstermektedir. Bitkinin *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* ve *C. krusei*’ye karşı antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (14).

Bu çalışmada, Kayseri İli, Pınarbaşı İlçesi, Aşağıbeyçayır Köyü yakınlarından toplanan *P. recta* türünün kimyasal bileşimleri ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ekstrenin kimyasal bileşimi spektrofotometrik (toplam fenol, toplam flavonoit, toplam flavonol) ve kromatografik/spektrometrik (SK-KS/KS) olarak belirlenmiştir.

Ekstrenin antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla indirgenme gücünün belirlenmesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) ve 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS^{•+}) radikallerini süpürücü etki, askorbat-Fe(III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunu engelleyici etki, β -karoten-linoleik asit birlikte oksidasyonunu inhibe edici etki, demir(II) ile şelat oluşumu, spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması, spesifik hidroksil radikali ile

yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması deneyleri yapılmıştır. Aynı ekstrenin RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattında sitotoksitesi belirlendikten sonra, ekstrenin sitotoksik olmayan dozlarında antienflamatuvar aktivitesini belirlemek amacıyla, makrofajlar LPS ile indüklenmiş ve nitrik oksit, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 düzeyleri ölçülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BOTANİK ÖZELLİKLER

2.1.1. Rosaceae familyasının özellikleri

Rosaceae familyası bitkileri otsu ya da odunsu bazen de dikenli olabilirler. Yaprakları alternan, genellikle stipulalı kenarları sıklıkla dişli basit veya birleşiktir. Çiçek durumu ağaç ve çalılarda genellikle kısa sürgünler üzerindedir; başak, salkım, panikula veya korimbus şeklinde gruplaşmıştır. Çiçek tablası genellikle çukurlaşmış bir kupa şeklini almıştır (hipantiyum), buraya karpeller yerleşmiştir. Çiçekler hermafrodit veya tek eşeyli aktinomorf, perigin veya epigindir. Kaliks 4-5 parçalı serbest; epikaliks mevcut ya da değildir. Koralla 4-5 parçalı ve serbest; ender olarak kaybolabilir. Stamen 1 ya da daha fazla sayıdadır. Ovaryum alt durumludan üst durumluya kadar olabilir, 1 ya da daha fazla karpellidir. Karpeller genelde serbest; stilus terminal, lateral, veya ginobaziktir. Meyve etli veya kuru aken, nuks drupa ya da folikül tipindedir. Çoğunlukla agregat meyve taşır. Tohumlarda endosperma yoktur (15-16).

Rosaceae familyası Amygdaloideae, Maloideae, Rosoideae ve Spiraeoideae olarak dört alt familyaya ayrılmıştır (17).

Potentilla cinsi Rosoideae alt familyasına dahildir.

2.1.2. *Potentilla* L. Cinsinin Dünyadaki Dağılımı

Potentilla cinsi genellikle kuzey yarımkürenin ılıman kutup ve Alp dağları bölgelerinde dağılım gösterir. Birkaç tür de tropik yüksek dağ bölgelerinde ve Güney Amerika'da bulunur. Tür çeşitliliği Kuzey Avrasya'da en yüksektir (9).



Şekil 2.1. *Potentilla* L. cinsinin dünyadaki dağılımı (9)

2.1.3. *Potentilla* L. Cinsinin Bitki Sistematigindeki Yeri

Bölüm: Spermatophyta

Alt Bölüm: Angiospermae

Sınıf: Dicotyledonae

Takım: Rosales

Familya: Rosaceae

Alt Familya: Rosoideae

Cins: *Potentilla* L. (Beş parmak otu)

Tür: *Potentilla recta* L. (9,18).

2.1.4. *Potentilla* L. Cinsinin Özellikleri

Çok yıllık, nadiren tek yıllık, ot veya küçük çalılar. Yapraklar dijitat, pinnat veya trifoliat. Çiçekler genellikle uçta, çiçek durumu simöz ya da tek, 5 ya da nadiren 4 parçalı. Hipantium merkezi yarıküremsi bir reseptakulumla birlikte hafifçe konkav şeklinde. Epikaliks var. Petaller sarı ya da beyaz, nadiren kırmızımsı. Stamenler çoğunlukla 20, bazen de çok ya da az. Meyveler aken. Stilus subterminal (ovaryumun tepesine yakın bir şekilde tutturulmuş gibi), lateral ya da bazal, filiform uzun ya da kısa, genellikle kalınlaşmış bazen de tabanda papilli, akenden kısa, aynı boyda ya da uzun olabilir ve genellikle meyve düşücüdür (16).

2.1.5. *Potentilla* Türleri İçin Tayin Anahtarı

1. Çalılar; yapraklar pinnat
1. Otsu bitki, bazen tabanda odunsu; yapraklar pinnat, dijitat ya da trifoliat
2. Yapraklar pinnat
2. Yapraklar dijitat ya da trifoliat
3. Yapraklar dijitat, nadiren trifoliat (*P. crantzii*) Grup C
4. Yapraklar daima trifoliat

Grup C

1. Bitki stolonlu; çiçekler tek, çiçekler koltuklarda
2. Bazı çiçeklerde sepal ve petaller en azından 4; petaller 4-5.5 mm 43. anglica
2. Sepal ve petaller her zaman 5; petaller 7-11mm 44. reptans
1. Bitki stolonlu değil; çiçekler uç simlerde toplanmış
2. Petaller beyaz, sepallerden daha kısa; akenler kısa yumuşak tüylü
4. Yaprakçıklar altta yoğun villoz-tomentoz, kesik uçla birlikte 49. savvalensis
4. Yaprakçıklar gençken altta ipeksi-tüylü, zamanla seyrek villoz olur, uçlar yuvarlak 50. doddsii
3. Petaller sarı, sepallerden neredeyse her zaman uzun; akenler tüysüz
5. Stilus genellikle obkonikal, nadiren tabanda kalınlaşmış, akenden kısa veya aynı uzunlukta
6. Yaprakçıklar pinnatisekt, yaprak orta damarı neredeyse 3 ila 7 doğrusal veya eliptik dikdörtgen parçaya bölünmüş 40. geranioides
6. Yaprakçıklar bölünmemiş, oymalı veya oymalı-dişli
7. Yaprakçıklar 5 35. crantzii
7. Yaprakçıklar (5-)7(-9)
8. Bitki guddesiz, tabanda odunsuz; yaprakçıklar ipeksi tüylü-piloz 39. cappadocica
8. Bitki salgı tüylü, tamamen otsu; yaprakçıklar seyrek olarak kısa yumuşak tüylü, yeşil
9. Salgı tüylü tüyler saplı, kırmızımsı; stilus papilli değil 38. opaca
9. Guddeler sapsız, sarı; stilus papillin altında 37. humifusa

5. Stilus her zaman tabanda konik, akenden kısa, aynı uzunlukta veya uzun
10. Stilus akenden çok uzun
11. Petaller 8-11 mm
12. Yaprakçıklar her iki tarafta 5-8 dişle birlikte; petaller 9-11 mm
13. Yaprakçıklar oymalı veya oymalı-testere dişli, her zaman 5; bitki uzun, ipeksi, yatık-tüylü 25. umbrosa
13. Yaprakçıklar testere dişli veya kentikli- testere dişli; 5(7-); bitki yoğun olarak kısa tüylerle birlikte yayılan-havlı 24. anatolica
12. Yaprakçıklar her iki tarafta 2-4 dişli; petaller 8-8.5 mm 26. balansae
11. Petaller 5-7.5 mm
14. Yaprakçıklar beyaz-tomentoz veya ipeksi tüylü-villoz; çiçekli gövde 1-3 cm
27. pulvinaris
14. Yaprakçıklar yatık-tüylü veya tüysüz, yeşil; çiçekli gövde 3-15 cm
15. Petaller 7-7.5 mm; yaprakçıklar tüysüz, genellikle kenarlarda kısa kirpikli 30. ruprechtii
15. Petaller 7 mm den kısa; yaprakçıklar tüylü veya tüysüz, kenarlarda kısa kirpikli değil
16. Yaprakçıklar seyrek olarak tüysüzden yumuşak kılsıya kadar, yeşil 29. aucheriana
16. Yaprakçıklar yatık-villoz, gri 28. pannosa
10. Stilus akenden kısa ya da aynı uzunlukta
17. Yaprakçıklar beyaz-tomentoz, altında tüm tüyler kıvrık
18. Yaprakçıklar yelpazemsi-pinnatisekt, yaprak orta damarı neredeyse lineer bölümler halinde bölünmüştür; çiçekli gövde genellikle toprak üzerine yatık 12. calabra
18. Yaprakçıklar çeşitli dişli veya pinnatifid, yaprak orta damarı yarıya bölünmüş; çiçekli gövde dik olarak yükselmiş veya gövde yükselici
19. Yaprakçıklar yoğun olarak her iki tarafta beyaz-sık yumuşak tüylü; petaller 5-5.5 mm; çiçek durumu birkaç çiçekli, yoğun sim 13. meyeri
19. Yaprakçıklar altında beyaz-sık yumuşak tüylü, seyrek olarak tüylü, yukarıda yeşil; petaller 3.5-5 mm; çiçek durumu genellikle birçok çiçekli, gevşek sim 11. argentea

17. Yaprakçıklar altında çeşitli tüylü, kıvrık tüylü veya değil, yeşil veya gri, hiçbir zaman beyaz-sık yumuşak tüylü değil
20. Çiçekli gövde yanal; koçanlar çok sayıda rozet yaprakla birlikte
21. Yaprakçıklar 5; meyve kaliksi zamanla büyüyen
22. Yaprakçıklar obovat veya obovat-baltamsı; dış kaliks bölümleri 2-3-kama, nadiren tam 22. kotschyana
22. Yaprakçıklar dikdörtgensel-eliptik; dış kaliks bölümleri tam
23. Petaller 4 mm 15. armeniaca
23. Petaller 6-8 mm
24. Gövde kırmızımsı; yaprakçıklar 10-20 mm, kenarlar alta doğru kıvrık; stilus akenle aynı uzunlukta 16. lazica
24. Gövde kırmızımsı değil; yaprakçıklar (15-)20-35 mm, kenarlar alta doğru kıvrık değil; stilus akenden kısa 33. adscharica
21. Yaprakçıklar (5-)7(-9); meyve kaliksi zamanla büyüyen değil
25. Bitki guddeli; yaprakçıklar 15-40 mm, obovat-dikdörtgensel 6-12 çift dişli 31. thuringiaca
25. Bitki örtü tüylü; yaprakçıklar 10-12 mm, geniş olarak obovat, 4-5 çift dişli 32. orbiculata
20. Çiçekli gövde uçta; yaprak rozetleri eksik veya az
26. Stilus aken kadar uzun 14. inclinata
26. Stilus akenden kısa
27. Yaprakçıklar yukarıda az çok tüysüz, aşağıda seyrek olarak tüylü; çiçekli gövde az çok tüysüz 19. sublaevis
27. Yaprakçıklar her iki tarafta seyrek tüylüden yoğun tüylüye; çiçekli gövde tüylü
28. Bitki yoğun olarak salgı tüylü, guddeli tüyler kısa guddesiz tüylerden çok uzun; petaller soluk sarı 17. astracantha
28. Bitki guddesiz veya az sayıda guddeli tüyler kısa guddesiz tüylerden daha kısa; petaller sarı
29. Yaprakçıklar 5(-7), geniş olarak obovattan dikdörtgenimsiye, çok küçük miktarda oymalı-dişli 18. detommasii

29. Yaprakçıklar 5(-7), genellikle dikdörtgenimsi-şeritsi, testere dişli, tabanda kentikli-testere dişliden pinnatisekte kadar

20. recta

(16)

2.1.6. *Potentilla recta* L.

Dik veya yükselici gövdeli çok yıllık bitkilerdir. Çiçekli gövde (2-) 20-60 (-90) cm, uzun veya kısa örtü tüyleri ve genellikle sayıları birkaç tane olan yumuşak salgı tüyleri mevcuttur. Yapraklar parmaklı; yaprakçıklar 5 veya 7, oblong-obovattan şeritsi-lanseolata veya bazen kamamsı-obovata değişen şekillerde, 10-50(-70) x 5-25 mm, testere dişli, kentikli-testere dişliden pinnatisekte kadar parçalı, bazen çiftli ve her iki tarafta ince uzun yumuşak tüylü, yeşil veya gri renklidir. Çiçekler simlerde toplanmıştır. Dış kaliks bölümleri şerit-lanseolat, üçgen-ovate sepaller kadar uzun veya onlardan çok az kısa, (3.5-)5-8 mm. Taç yapraklar sarı, obkordat, 6-10(-13) mm, sepallerden uzun. Akenler pürüzlü, kanatlı; boyuncuk tabanda koni şeklinde, akenden kısa. Çiçeklenme dönemi 5-7. Çayırlar, otlaklar, ıslak ve gölgeli yerlerde yetişir, deniz seviyesi -2300 m.'dir (16).

2.1.7. *Potentilla recta* L. Türünün Türkiye'deki Dağılımı

P. recta son derece değişken poliploit komplekstir. Türkiye'de bir dereceye kadar entegre olmuş üç ana resmi olmayan grup tanımlanmıştır.

1. Çanak yapraklar 3.5- 4 mm; taç yapraklar 6-7 mm; yaprakçıklar obovat-küneat, pinnatisekt, linear-lanseolat dişlere ayrılmış

Grup C

1. Çanak yapraklar 5-8 mm; taç yapraklar 7-10(-13) mm; yaprakçıklar oblong-obovattan linear- lanseolata, serrattan pinnatisekte kadar üçgensiz veya dikdörtgen dişli

2. Yaprakçıklar serrat, üçgensiz dişli, sivri, her bir kenarda (5-)6-8(-9)

Grup A

2. Yaprakçıklar kentikli- serrattan pinnatisekte, dişler dikdörtgensiz, sivri veya obtus, her bir kenarda (6-)7-10(-11)

Grup B

Grup A.

A1(E) Tekirdağ (İnecik), A1(A) Çanakkale (Çanakkale Boğazı), A4 Çankırı (İlgaz), A7 Trabzon, A8 Erzurum (Tortum Oltu arası), A9 Kars (Selim Sarıkamış arası), B1 İzmir (Karagöl, Yamanlar Da.), B2 Bilecik (İstasyon), B7 Erzincan (Keşiş Da., Cimin),

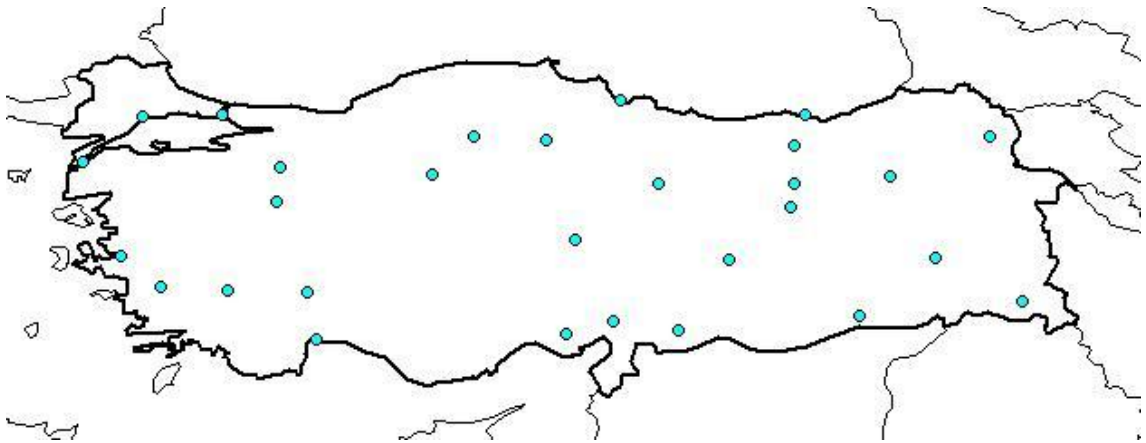
Tunceli (Pülümür), B9 Ağrı (Musun, Balık G.), Bitlis (Tatvan), C6 Adana (Hasanbeyli), C10 Hakkari (Gevar Ovası, Yüksekova).

Grup B.

A1 (E) Tekirdağ, A2 (E) İstanbul (Sarıyer, Belgrat Ormanı, Bahçeköy), A5 Sinop (İnceburun), A6 Samsun (Kızılay Kampından sonra plaj alanı), A7 Gümüşane (Ağa Köyü), B1 İzmir (Kemalpaşa, Nif Da.), B2 Kütahya (Murat Da.), B4 Ankara (Hacıkadın Vadisi, Keçiören), B5 Kayseri (Bakır Da.), B6 Malatya (Hekimhan), B7 Sivas (Divriği, Dumlucadağ), C1 Aydın (Samsun Da.), C2 Denizli (Yeşilova), C2 Antalya (Elmalı, Koçova), C3 Isparta (Sütçüler, Sarp Da., Kazdere), C5 Adana (Bürücek), C6 Gaziantep (Dülük Baba Da.), C8 Mardin (Mardinden Diyarbakıra).

Grup C.

B8 Erzurum (Hinis, Pasinler), C9 Hakkari (Kaval), C10 Hakkari (Şemdinli, Yüksekova), A4 Çorum (Varegöz) (16).



Şekil 2.2. *Potentilla recta*'nın Türkiye'deki dağılımı

2.2. FARMAKOPELERDE KAYITLI OLAN *POTENTILLA* TÜRLERİ

Alman Komisyon E (1985/1990 ve 1988/1990) tarafından, *P. anserina* (bitkisel parçalar) ve *P. erecta* (rizomlar) için monograflar yayınlanmıştır. Komisyona E' ye göre *P. anserina* ve *P. erecta* rizomlarının terapötik endikasyonları; dismenorenin basit formları, akut diyareye destek tedavisi ve basit boğaz ve ağız mukozası iltihaplarını içermektedir. Bazı Farmakopeler; örneğin Avrupa Farmakopesi 6, 2007 ve Polonya Farmakopesi VI, 2002 *Potentilla* türleri üzerine monograflar içermektedir. Ayrıca,

HPUS, HAB gibi homeopatik farmakopeler *P. erecta* (rizomları), *P. anserina* (topraküstü kısımları veya bütün bitki), *P. aurea* (topraküstü kısımları), *P. reptans* (topraküstü kısımları) gibi bazı *Potentilla* türlerinin homeopatik ilaç hazırlamak amacıyla kullanıldığını göstermektedir (9).

2.3. *POTENTILLA* TÜRLERİNİN GELENEKSEL KULLANIMI

Potentilla türleri ve bunların ekstreleri, kuzey yarımkürenin farklı kültürlerinde yaygın olarak kullanılmıştır.

Tablo 2.1. *Potentilla* türlerinin dünyanın farklı bölgelerindeki kullanımları

Kullanılan Ülke	Tür	Kullanılan Kısım	Kullanılış	Kaynak
Avrupa, örneğin Orta Avrupa, İtalya, İsveç, Sırbistan ve Karadağ, Rusya, Bulgaristan, Türkiye	<i>P. erecta</i>	Kökler	İltihap, yara tedavisi, dizanteri, kanama, ishal, enflamatuvar bağırsak hastalığı, bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlar, sitotoksiste, ağız ve boğaz için antiseptik	9,19,20,21,22, 23,24
	<i>P. fruticosa</i>	Topraküstü kısımları	Viral enfeksiyonlar, bağışıklık sistemi bozulmaları	9
	<i>P. anserina</i>	Topraküstü kısımları	Akut,nonspesifik ishal, ağız ve faringeal mukozanın hafif iltihabı, diş ağrısı	9
	<i>P. speciosa</i>	Topraküstü kısımları, Kökler	Antienflamatuvar, antiülser aktivite	25
	<i>P. recta</i>	Topraküstü kısımları	Mikrobik enfeksiyonlar	14
	<i>P. reptans</i>	Topraküstü kısımları,yapraklar	Antidiyareik	26
	<i>P. fulgens</i>	Kökler	Antitümör, diyabet, mide rahatsızlıkları	27,28,29,30,31
Asya, örneğin Çin, Kore, Japonya, Nepal, Hindistan	<i>P. chinensis</i>	Topraküstü kısımları	Bazı kanser tipleri	32
	<i>P. multicaulis</i>	Kökler	Bazı kanser tipleri	33
	<i>P. atrosanguinea</i>	Kökler	Yara iyileştirici	34
	<i>P. kleiniana</i>	Topraküstü kısımları	Grip, öksürük, kabakulak, lenfadenit, hepatit, korku, uzuvların uyuşması, dismenore, ülser	35
	<i>P. peduncularis</i>	Yapraklar, tomurcuklar	Ateş, grip, öksürük	27
	<i>P. freyniana</i>	Kökler	Viral enfeksiyonlar	36
	<i>P. discolor</i>	Topraküstü kısımları, kökler	İshal, kanama, diyabet	37
	<i>P. multifida</i>	Topraküstü kısımları, kökler	Hepatit, enterobiasis, fonksiyonel uterin kanama, tip 2 diyabet	10
Amerika, örneğin Kanada	<i>P. arguta</i>	Kökler	Viral enfeksiyonlar	38
	<i>P. simplex</i>	Yapraklar, gövde	Mantar enfeksiyonları	39

2.4. *POTENTILLA* TÜRLERİNİN KİMYASAL BİLEŞİMLERİ

Tanenler astrenjan etkileri nedeniyle *Potentilla* türleri ve ekstrelerinin önemli bileşikleri olarak bilinir. Bu nedenle *Potentilla* türleri üzerinde 1960'larda başlayan ayrıntılı fitokimyasal çalışmalar özellikle tanenler üzerine odaklanır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise triterpenoit yapılar üzerinde yoğunlaşmıştır. Genellikle fitokimyasal çalışmaların çoğu *Potentilla* türlerinin topraküstü kısımları ile yapılmıştır. *P. erecta*, *Potentilla* türleri içinde en fazla sayıda bileşeni tanımlanandır (topraküstü ve toprakaltı kısımları toplam 68 bileşik), bunu *P. anserina* takip etmektedir (topraküstü ve toprakaltı kısımları toplam 37 bileşik) (9).

P. erecta rizomları içinde yüksek miktarda (%17-22) tanen (% 15-20 kondanse tanen, % 3.5 hidrolize tanen) bulunması nedeniyle, bu grup doğal bileşikler birçok fitokimyasal çalışmanın odak noktası olmuştur. *P. erecta*'nın kondanse tanenleri, kateşin birimlerinin 4,8-; 4,6-; 6,6'- veya 6',8- bağları ile bağlı olduğu dimerik ve trimerik B tipi proantosiyanidinlerden oluşur. *P. erecta* rizomlarından 43 bileşik tespit edilmiştir ve [4,8]-2,3-*trans*-3,4-*cis*-bi-(+)-kateşin, *cis*-konfigüre dimerik proantosiyanidine nadir bir örnektir. Bu bitki kaynağında (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (+)-gallokateşin ve (-)-epigallokateşin gibi kondanse tanenler için çeşitli öncüller belirlenmiştir. Hidrolize tanenler *P. erecta* ve *P. discolor* olmak üzere sadece iki *Potentilla* türünde kök ve rizomlardan izole edilmiştir (9).

Kök ve rizomlar üzerinde yapılan bir kısım fitokimyasal çalışmalar da triterpenoitlerin izolasyonu üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu bileşikler genellikle bir ursan veya olean iskeletinden oluşur ve bunlar *P. erecta*, *P. anserina*, *P. discolor* ve *P. multicaulis*'den oluşan dört *Potentilla* türünden izole edilmiştir. Ayrıca bu bitkisel kaynaklardan, hem aglikonlar hem de onların 28-*O*- β -D-glikozil esterleri izole edilmiştir. Karakteristik bir bileşen olan tormentosit esas olarak *P. erecta*'dan izole edilmiştir ve aynı zamanda *P. anserina* ve *P. discolor*'da da olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *P. erecta* için sınırlı sayıda flavonoit bildirilmiştir. Organik asit ve fenol karboksilik asit dizileri içeren maddeler sadece *P. erecta* için tanımlanmıştır (9).

Bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen toplam 134 bileşik yapısal olarak aydınlatılmıştır. Aydınlatılmış bileşiklerin sayısı açısından önemli *Potentilla* türleri;

P. anserina (26 bileşik), *P. erecta* (25 bileşik), *P. fruticosa* (22 bileşik), *P. chinensis* (19 bileşik), *P. discolor* (14 bileşik), *P. palustris* (12 bileşik) ve *P. reptans* (8 bileşik)'dir. Bitkilerin topraküstü kısımlarında flavonoidler yüksek miktarda bulunmaktadır (9).

P. recta polifenoller ile yapılan bir çalışmada, 1'i neolignan glikoziti ve 9'u flavonoid olmak üzere 10 bileşen tespit edilmiş ve yapıları spektroskopik olarak aydınlatılmıştır. *Potentilla* cinsinde neolignan glikozit varlığı bu çalışma ile ortaya konmuştur (40).

P. astracantha toprak üstü kısımlarının fitokimyasal incelenmesi sonucu 2 izoflavonoid glikoziti, biri flavon-C glikozit olmak üzere 5 flavonoid glikoziti, 2 flavon izole edilmiştir. *Potentilla* cinsinde flavonoid ve C-glikozil flavon varlığı bu çalışma ile rapor edilmiştir (41).

P. multifida'nın kimyasal içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada, 3- β , 24-dihidroksil-urs-12-en, ursolik asit, oskapik asit, tormentik asit ve epihedaragenin'den oluşan beş bileşik tespit edilmiştir (42).

P. chinensis'den; α -amirin, β -amirin, ursolik asit, korosolik asit, oskapik asit, pomolik asit, tormentik asit, 2 α ,3 α -dihidroksiyurs-12-en-28-oik asit, 2 β ,3 β ,19 α -trihidroksiyurs-12-en-28-oik asit, asiatic asit, 24-hidroksi tormentik asit, myricantik asit, oleanolik asit, maslinik asit ve 2 α ,3 α -dihidroksiolean-12-en-28-oik asitten oluşan 15 triterpen izole edilmiştir (32).

P. discolor'da altı bileşik tespit edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Bileşikler 3-O- β -D-glukopiranozil - (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-ksilopiranosil-19 α -hidroksiyurs-12-en-28- asit, 2 α ,3 β ,19 α -trihidroksiyurs-12-en-28-asit, 3 β ,19 α -trihidroksiyurs-12-en-24, 28-asit, 2 α ,3 β -dihidroksiolean-12-en-28 asit, 2 α ,3 α ,19 α -trihidroksiyurs-12-en-28-asit ve β -sitosterol'dur (43).

P. chinensis'den 2 α -hidroksioleanolik asit, 2 α -hidroksiursolik asit, 5, 7, 4'-trihidroksiflavon, β -sitosterol, daikostarin bileşikler izole edilmiştir (44).

P. chinensis triterpenleri ile yapılan bir çalışmada, 3-hidroksi-11-ursen-28,13-olide,11,12-dehidroursolik asit lakton, 3-O-asetil- pomolik asit, betulitik asit, 3-okso-

12-ursen-28-oik asit, ursolik asit, oleanik asit izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (45).

P. multicaulis'den iki yeni bileşik (triterpenoit saponin ve heterosiklik bileşik) , 2α , 3β , 19α , 23,30-pentahidroksiyurs-12-en-28-oik asit-28-O- β -D-glukopiranozil ester ve N-hidroksil heksahidroazepin -2,4- dion bu çalışma ile izole edilmiştir (46).

P. discolor'dan iki yeni pentasiklik triterpenoit, 3α , 30-dihidroksilup-20(29)-en-27-oik asit ve (20S)- 3α , 29- dihidroksilupan-27-oik asit izole edilmiştir (47).

Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile yapılan bir çalışmada, *P. multifida*'da bulunan yedi flavonoitin (hiperin, kersetin-3-O- β -D-glukopiranosit, luteolin-7-O- β -D-glukronit, apigenin-7-O- β -D-glukronit, kersetin, tribuloit ve apigenin) eşzamanlı belirlenmesi için bir metot tanımlanmış ve sonuçlar *P. multifida* flavonoit içeriğinin yöreden yöreye önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir (48).

Bir diğer çalışmada *P. anserina*'dan 2-piron-4,6-dikarboksilik asit izole edilmiştir. Bileşik bu çalışmadan önce, sadece bakterilerde tespit edilip, yüksek bitkilerde bulunmamıştır. Steril ekim ile bu bileşiğin bitkilerde de orijinal olduğu teyit edilmiştir. Buna ek olarak Rosaceae içindeki 2-piron-4,6-dikarboksilik asitin sistematik ilişkisi test edilmiştir (49).

P. evestita etil asetat fraksiyonundan yeni pregnan türevi, 2,6- β , 7 β -trihidroksi-4-metil-19-norpregna-1,3,5 (10) -trien-17-on izole edilmiştir ve 11α , 17α , 21- trihidroksipregna -4,16 (22)-dien-3,20-dion doğal bir ürün olarak bildirilmiştir (50).

P. viscosa kökünden 6',8- bağlı biflavanoit, potentillanın ve prosiyanidin B-3 3'-O-glukozit izolasyon ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (51).

P. aurea ile yapılan çalışma, bitki yapraklarının yağlı asit esterleri biçiminde çok uzun zincirli *cis*-poliprenoller içerdiğini ve poliprenollerin yaprakların taze ağırlığının, % 0.3'ünü oluşturduğunu göstermiştir (52).

Tablo 2.2. Bazı *Potentilla* türlerinin topraküstü kısımlarından izole edilen bileşikler

Flavonoitler		Kaynaklar
Kemferol	<i>P. erecta</i> ; <i>P. palustris</i> ; <i>P. argentea</i> ; <i>P. discolor</i> ; <i>P. recta</i> ; <i>P. reptans</i> ; <i>P. aurea</i> ; <i>P. fruticosa</i> ; <i>P. salesoviana</i> ; <i>P. palustris</i> ; <i>P. bifurca</i> ; <i>P. biflora</i> ; <i>P. multifida</i> ; <i>P. viscosa</i>	9,10,53
Kersetin	<i>P. erecta</i> ; <i>P. palustris</i> ; <i>P. areata</i> ; <i>P. argentea</i> ; <i>P. recta</i> ; <i>P. reptans</i> ; <i>P. discolor</i> ; <i>P. aurea</i> ; <i>P. alba</i> ; <i>P. multifida</i> ; <i>P. chinensis</i> ; <i>P. viscosa</i>	9,10,48,53
Hidrolize tanenler ve ilgili bileşikler		
Elajik asit	<i>P. erecta</i> ; <i>P. anserina</i> ; <i>P. fruticosa</i> ; <i>P. palustris</i> ; <i>P. argentea</i> ; <i>P. recta</i> ; <i>P. reptans</i>	9,53
Potentilin	<i>P. kleiniana</i>	9
Organik asitler ve fenol karboksilik asitler		
p-kumarik asit	<i>P. erecta</i> ; <i>P. anserina</i> ; <i>P. palustris</i> ; <i>P. argentea</i> ; <i>P. recta</i> ; <i>P. reptans</i>	9
Kafeik asit	<i>P. erecta</i> ; <i>P. anserina</i> ; <i>P. fruticosa</i> ; <i>P. palustris</i> ; <i>P. argentea</i> ; <i>P. recta</i> ; <i>P. reptans</i> ; <i>P. fragarioides</i>	9
Ferulik asit	<i>P. erecta</i> ; <i>P. fruticosa</i> ; <i>P. palustris</i> ; <i>P. argentea</i> ; <i>P. recta</i> ; <i>P. reptans</i>	9
Diğer		
2-Piron-4,6-dikarboksilik asit	<i>P. anserina</i> ; <i>P. erecta</i> ; <i>P. recta</i> ; <i>P. argentea</i> ; <i>P. aurea</i> ; <i>P. calycina</i> ; <i>P. crantzii</i> ; <i>P. grandiflora</i>	9,49

2.5. *POTENTILLA* TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

2.5.1. Antiülser Aktivite

Kayseri ilinde *P. reptans* yaprakları, konjenital hastalık tedavisinde, mide ekşimesi için ve karın ağrısı beraberindeki belirtilerde kullanılmaktadır. Son farmakolojik ve histopatolojik çalışmalar sıçanlarda etanol kaynaklı peptik ülserde bu türün yaprak ekstresinin oral kullanımının etkinliğini doğrulamıştır (54).

Histopatolojik bir diğer çalışmada, *P. fulgens* etanolik kök ekstresinin etanol kaynaklı gastrik lezyonları önemli derecede önlediği gösterilmiştir (55).

Tormentil (*P. erecta*) rizom ekstresinin aktif ülseratif kolit tedavisindeki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, 16 hastada artan dozlarda çalışılmış, tormentil ekstresi ile tedavi sırasında, kolit aktivite indeksi (CAI) 2.400 mg/gün doz uygulandığında 8.3-3.9 ($p < 0.001$) ortalama değerini anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Düşük dozlarda (1.200 ve 1.800 mg/gün), 2.400 mg/gün doz kadar yararlı olmadığı görülmüştür. Daha yüksek dozlarda (3.000 mg/gün) hiçbir etkinlik sağlanmamıştır. Çalışma ile tormentil rizom ekstresinin 3.000 mg/gün'e kadar güvenli olduğu ortaya konmuştur (56).

2.5.2. Antidiyareik Aktivite

Kondanse tanenler veya proantosiyanidinler olarak bilinen oligomerik ve polimerik flavan-3-oller diyare tedavisinde terapötik etkinlik gösterirler (9, 24). Tanenlerin antidiyareik etkisi yaygın olarak bağırsaktaki mukozal proteinlerin belirsiz kompleksleşmesi ile koruyucu bir tabaka oluşumuna dayanır.

Çocuklarda rotavirüs kaynaklı ishal tedavisi için tormentil kök ekstresinin (TRE) etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, kontrollü dozlarda tormentil kök ekstresi uygulamasının rotavirüs ishalinin süresini kısalttığı ve rehidrasyon gereksinimini azalttığı gözlenmiştir. Randomize, çift körlü, plasebo-kontrollü klinik denemede, *P. erecta* rizom ekstresinin (bir kısım kuru kök, 10 kısım, % 40 etanol, % 30-40 tanen, saponin ve diğer bileşenler) çocuklardaki rotavirüse bağlı ishal tedavisinde yüksek etkinliği olduğu gösterilmiştir (22). Tormentilin seyahate bağlı ishalin önlenmesinde de etkili olduğu saptanmıştır.

2.5.3. Antineoplastik Aktivite

Yapılan çalışmada, SMMC-7221 (insan hepatoma) ve HL-60 (insan promiyelositik lösemi) hücrelerine karşı *in vitro* sitotoksik aktivite gösteren *P. chinensis* toprak üstü kısımlarından ve *P. multicaulis* köklerinden izole bir dizi triterpenoit bileşiğin önemli anti-kanser aktiviteleri tespit edilmiştir (32,33).

P. erecta, kanserli hastalarda hastalık semptomlarını hafifletmek için kullanılmış, rizomların etanol ekstresi *in vitro* veri sonuçlarına göre lenfoma hücrelerinin büyümesini inhibe etmiştir. *P. erecta*'nın ham etanol (% 40) ekstresi en yüksek

sitotoksositeyi göstermiş, 10 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda hücre büyümesini tamamen baskılamıştır (23).

Bir diğer çalışmada, *P. fulgens* köklerinin metanolik ekstresinin doza bağımlı olarak belli tümörlere karşı aktif olduğu saptanmıştır. Yaklaşık 1×10^6 Dalton lenfoma hücresi swiss-albino farelerde periton içine transplante edilmiş, veriler Dalton lenfoma (DL) hücrelerinde metanolik ekstrenin yüksek antitümör aktivite gösterdiğini işaret etmiştir (29).

İnsan hepatoselüler karsinoma hücre dizisi kullanılarak antitümör aktivitenin araştırıldığı çalışmada, *P. discolor* konsantrasyona bağlı şekilde hücre canlılığını azaltmış ve apoptozun tipik özelliklerini göstermiştir (57).

4T1 fare meme kanseri hücre hattında *P. reptans* sulu ekstresinin (rizom ve topraküstü kısımları) potansiyel antitümör aktivitesi araştırılmıştır. *P. reptans* rizom ve topraküstü kısımlarının sulu ekstreleri test edilen konsantrasyon aralığında, konsantrasyona bağımlı sitotoksik etki göstermiştir. *P. reptans* rizom ekstresinin, toprak üstü ekstresinden biraz daha yüksek antitümör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (58).

P. evestita'dan izole flavonoidlerin (krisin 1 ve umbeliferon 2) sitotoksik, antitümör destekleyici ve protein denatürasyonu aktivitelerinin inhibisyonunu değerlendirmek için bir çalışma tasarlanmıştır. Sonuç olarak, her iki bileşiğin de güçlü sitotoksik, antitümör destekleyici ve protein denatürasyonu faaliyetlerini inhibe edici etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir (59).

P. argentea topraküstü kısımlarından iki polifenol, tilirozit ve metil brevifolinkarboksilat izole edilerek bunların insan meme kanseri hücre hattına (MCF-7) karşı sitotoksitesi ve DNA-bağlama yeteneği değerlendirilmiştir. Metil brevifolinkarboksilatın daha aktif olduğu ve tilirozitten daha yüksek sitotoksik etki gücüne sahip olduğu görülmüştür (60).

2.5.4. Antiviral ve Antimikrobiyal Aktivite

P. arguta metanol kök ekstresi ile yapılan çalışmada, ekstrenin sığır sinsityal solunum virüsünün çoğalmasına karşı baskılayıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir (38).

Bir diğerk çalışmada, *P. erecta* rizomlarından izole edilen hidrolize ve kondanse tanenlerin Herpes virüs tip I ve II'ye karşı antiviral özellik gösterdiğı saptanmıştır (9, 61).

Rus araştırmacılar, boğazı tormentil tentürü ile çalkalamanın, oral mukozanın liken planus tedavisine yardımcı olduğunu göstermişlerdir. Tormentil rizomunun sulu ve etanollü ekstrelerinin suda çözünmeyen glukanların sentezini inhibe ettiği ve sert yüzeylere mutan yapışmayı bozduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, her iki ekstre de etkili bir şekilde diş çürüklerini önlemiştir. Tormentil rizomunun seyreltilmiş tentür ve dekoksasyonları, diş hekimliğinde diş eti kanamalarına ve stomatite karşı da kullanılmıştır (9,62).

Dokuz *Potentilla* türünün (*P. argentea*, *P. fruticosa*, *P. recta*, *P. rupestris*, *P. erecta*, *P. anserina*, *P. nepalensis*, *P. thuringiaca*, *P. grandiflora*) toprak üstü kısımlarının sulu ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Bunun için *Helicobacter pylori* ATCC 43504, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATCC 10231 kullanılmıştır. *Helicobacter pylori*'ye karşı yüksek etkinlik bulunmuş, gram-negatif bakterilere karşı hemen hemen hiçbir etkinlik gözlenmemiştir. Gram-pozitif bakterilere ve *Candida albicans*'a karşı orta derecede etkinlik gözlenmiştir (63).

Toplam 27 tanen (hidrolize tanenler, ilgili bileşikler ve A ve B tipi proantosiyanidinler, *Potentilla* türlerinde ortaya çıkan bir dizi proantosiyanidinler) iki gram-pozitif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), dört gram-negatif bakteri (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) ve iki mayaya (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) karşı etkinlikleri bakımından test edilmiş, bileşikler zayıf ve orta antibakteriyel aktivite, ama oldukça yüksek antikriptokokal aktivite göstermişlerdir (64).

P. recta toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Candida krusei*'ye karşı orta derecede antibakteriyel ve antifungal aktivite göstermiştir (14).

P. simplex kök ve yapraklarının sulu ekstrelerinin antifungal aktiviteleri analiz edilmiş, ekstrenin çeşitli mayalara (*Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans*) karşı zayıf ve orta antifungal aktivite gösterdiği, *Candida glabrata*'ya karşı ise çok güçlü antifungal aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Dermatofitlere (*Trichophyton* sp. *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*) karşı zayıf antifungal aktivite gözlenirken, küflere (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp.) karşı çok zayıf etki gözlenmiş ya da hiç etki gözlenmemiştir (39).

P. sericea bitkisi tüberkülozun genel tedavisinde bir adjuvan ilaç olarak, tüberkülosidal ve tüberkülostatik ajanlar ile birlikte kullanılmıştır. Bitkinin ve bazı tanen içeren preparatların antimikrobiyal ve antifungal ajan olarak kullanımını destekleyen sonuçlar bulunmuştur (65).

P. anserina, *P. argentea*, *P. erecta*, *P. fruticosa*, *P. grandiflora*, *P. nepalensis* var. 'Miss Willmott', *P. recta*, *P. thuringiaca* ve *P. rupestris* toprak üstü kısımlarından elde edilen sulu ekstrelerin antibakteriyel ve antifungal faaliyetleri araştırılmıştır ve ekstreler *H. pylori*'ye (MIC = 0.1-0.5 mg/mL) karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. Ekstreler 12.5 - 100 mg/mL konsantrasyon aralığında gram-pozitif bakterilerin (*M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*) büyümesini engellemiş, ancak gram-negatif bakterilerin büyümesini engelleyememiştir (66).

P. anserina, *P. argentea*, *P. erecta*, *P. fruticosa*, *P. grandiflora*, *P. nepalensis*, *P. norvegica*, *P. pensylvanica*, *P. crantzii* ve *P. thuringiaca* topraküstü kısımları, polifenolik bileşik içeriklerini belirlemek amacıyla kersetin eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar *P. fruticosa*'nın nispeten yüksek konsantrasyonda tanen (167.3 ± 2.0 mg/g kuru ağırlık), proantosiyanidin (4.6 ± 0.2 mg/g kuru ağırlık), fenolik asit (16.4 ± 0.8 mg/g kuru ağırlık), flavonoid (7.0 ± 1.1 mg/g kuru ağırlık) içerdiğini göstermiştir. Ayrıca, diş çürümeye yol açan *Streptococcus* sp. suşlarına bu türlerin sulu ekstrelerinin *in vitro* inhibitör etkileri araştırılmış ve test edilen örneklerin oral streptokok büyümesini orta derecede inhibe ettiği gözlenmiştir (67).

P. fruticosa, *P. glabra* ve *P. parvifolia* yaprak ekstreleriyle yapılan antimikrobiyal aktivite sonuçları *P. fruticosa*'nın gram-pozitif bakterilere karşı güçlü inhibisyon sergilediğini göstermiştir (68).

Diş çürümesine yol açan *Streptococcus* spp suşlarına karşı farklı polaritedeki (su, % 50 etanol, dietil eter, etil asetat ve *n*-butanol) çözücülerle ekstre edilen *P. recta* ve alt fraksiyonlarının *in vitro* inhibitör etkileri araştırılmış, test edilen örneklerin, oral streptokok büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, beş *P. recta* ekstresi de suda çözülme α - (1 $\rightarrow$ 3) -, α - (1 $\rightarrow$ 6) -bağlı glukan (mutan) ve yapay dental plak oluşumu üzerinde önleyici bir etki göstermiştir. Etil asetat fraksiyonu, bu alt fraksiyonun yüksek karyojenik aktivitesi ile ilişkili olabilecek yüksek konsantrasyonda toplam polifenol içeriği göstermiştir. Sonuçlar *P. recta* ekstreleri ve alt fraksiyonlarının, diş bakım ürünleri içinde yeni çürük önleme maddeleri olarak, yararlı katkı sağlayabileceğini göstermiştir (69).

P. fruticosa L.'nin gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), gram negatif bakteri (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus mirabilis*), spor oluşturuıcı bakteri (*Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus*) ve mantara (*Candida albicans*) karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (70).

2.5.6. Antihiperglisemik ve Antihiperlipidemik Aktivite

Hindistan'da yapılan bir çalışmada, *P. fulgens* köklerinin ham metanolik ekstresi normoglisemik ve alloksan kaynaklı diyabetik farelerdeki etkileri bakımından test edilmiştir. Ekstre hem sağlıklı hem de alloksan kaynaklı diyabetik farelerde, kan glukoz seviyesini düşürmüştür. Ekstre alloksan kaynaklı diyabetik farelere değişen dozlarda intraperitoneal (*ip*) uygulanmış (150-450 mg/kg) ve 5 gün boyunca değişen zaman aralıklarında kan şeker düzeyleri ölçülmüştür. Normal farelerde ekstrenin etkili doz uygulamasından 24 saat sonra % 31 azalma gözlemlendiği halde, alloksan kaynaklı diyabetik farelerde kan şekeri belirgin olarak % 63 azalmıştır. Fareler üzerinde yapılan toksisite çalışmaları ekstrenin, 4 haftalık gözlem boyunca 450 mg/kg doza kadar herhangi bir yan etki göstermediğini ortaya koymuştur (28).

P. candicans'dan izole edilen elajik asit türevinin, aldoz redüktaz aktivitesini ve enzim katalizli glikoz geçişini inhibe ettiği bildirilmiştir (71). Benzer şekilde, *P. recta*'nın (topraküstü kısımları) metanolik ekstresi, insan aldoz redüktaz (h-AR) üzerinde % 60'ı aşan güçlü inhibitör aktivite göstermiştir (72).

P. fungens ile yapılan bir çalışmada, α -glukozidaz inhibitör aktivitesi olan bileşenlerin izole edilmesi ve aydınlatılması amaçlanmıştır. Metanolik ekstrenin α -glukozidaza karşı güçlü inhibitör aktivite gösterdiği gözlenmiştir (73).

Başka bir çalışmada, *P. discolor* dekoksiyonu obez-diyabetik farelerde artmış kolesterol ve şeker seviyelerini önemli derecede düşürmüştür (74).

P. chinesis etanol ekstresinden izole edilen transtilirozitin önemli antihiperglisemik, antihiperlipidemik ve antioksidan aktiviteleri gözlemlenmiştir. Alloksan kaynaklı diyabetik farelerde, açlık serum glikoz, trigliserit (TG) ve toplam kolesterol (TC) seviyeleri, 0.4, 0.8 ve 1.6 mg/kg/gün dozlarda 15 gün boyunca transtilirozit günlük oral uygulanması sonrası anlamlı şekilde azalmıştır. Transtilirozit (10 hafta süreyle 1.2 ve 0.3 mg/kg vücut ağırlığı) streptozotosin kaynaklı diyabetik sıçanlarda kan şeker düzeyini anlamlı şekilde azaltmıştır. TC, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL-C) ve TG seviyeleri azalmış ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL-C) seviyesi artmıştır. Transtilirozit diyabetik sıçanlarda antioksidan aktiviteyi; süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırarak, malondialdehit (MDA) seviyesini azaltarak göstermiştir. Histolojik inceleme sonucu transtilirozitin diyabetli sıçanların pankreas doku hasarını onardığını göstermiştir (75).

P. discolor toplam flavonoit ekstresi (TFE) ve toplam triterpenoit ekstresinin (TTE) hipoglisemik ve hipolipidemik özelliklerinin, muhtemelen güçlü antioksidan aktiviteleri ve β -hücreleri üzerindeki koruyucu etkilerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. TFE veya TTE ile tedavi edilen diyabetik farelerde serum total kolesterol düzeyleri, trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol düzeyleri daha düşük ve yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol seviyesi kontrol diyabetik sıçanlardakinden daha fazla bulunmuştur. Ayrıca, ekstre ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda MDA ve NO düzeyleri azalırken, SOD ve glutatyon düzeyleri artmıştır (76).

P. chinesis ile yapılan bir çalışmada *Potentilla* flavonlarının alloksan kaynaklı diyabetik farelerde belirgin hipoglisemik etki gösterdiği bulunmuştur (77).

Astragalus membranaceus ve *P. discolor* karışımının tip 2 diyabetli farelerde insülin direncini artırabildiği gösterilmiştir (78).

2.5.7. Antienflamatuvar, Spazmolitik, Hepatoprotektif Aktivite

Enflamatuvar hastalıkları veya yaraları tedavi etmek için İsveç geleneksel tıbbında kullanılan bitkiler, literatür verilerine dayalı olarak seçilmiş ve *P. erecta* dahil bunlardan bazılarının (rizom ekstresi), çok güçlü siklooksijenaz inhibisyon özelliğine sahip olduğu ve antienflamatuvar aktivite gösterdiği bulunmuştur (19).

P. alba ve *P. erecta* rizom ve köklerinin aseton ve etanol ekstrelerinin *in vivo* lokal antienflamatuvar etkileri fare kulağı test modelinde incelenmiştir. En güçlü farmakolojik etki *P. alba* rizomunun aseton ekstresi ile elde edilmiştir ve hidrokortizon merhemi ile benzer özellik göstermiştir (9).

P. anserina topraküstü kısımlarının etil asetat ekstresinin, bağırsak ve rahim anormal düz kas tonusunda önemli spazmolitik aktivitesi bulunmuştur. Ayrıca, spazmolitik özelliklerin kan damarları ve üriner sistem için de geçerli olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, *P. anserina* bitkisinin karaciğer fonksiyonları üzerinde ve safra salgısını artırmada etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bitki yakı gibi, romatizmal ve artrik ağrıların ve nevrалjinin hafifletilmesinde kullanılmıştır (9).

P. fruticosa'nın çiçek ve genç sürgünlerinden elde edilen sulu ekstrenin karaciğer üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Kronik ve toksik hepatitli sıçanlarda yapılan çalışmalar, ekstrenin mikrozomal karaciğer sistemi üzerinde hepatoprotektif etkisinin yanı sıra ksenobiyotik metabolizması ve plazma lipitleri peroksidasyonu üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, plazmada alanin aminotransferaz aktivitesini ve bilirubin düzeyini normalleştirdiği görülmüştür (79).

P. anserina yumrulu köklerinin metanol ekstresi, farelerde D-galaktozamin (d-GalN)/lipopolisakkarit kaynaklı karaciğer yaralanmalarına karşı hepatoprotektif etki göstermiştir (80).

P. thurberi 'den elde edilen metanolik ekstrenin izole sıçan ileumu üzerindeki etkisi araştırılmış ve ekstrenin konsantrasyon bağımlı bir şekilde bağırsak düz kas spontan kasılmalarını inhibe ettiği gözlenmiştir (81).

P. chinensis'den elde edilen tormentik asitle yapılan çalışmada, tormentik asitin hepatoprotektif etkisi, lipopolisakarit (LPS)/D-galaktozamin (D-GalN) ile indüklenen akut karaciğer yetmezliği modeli kullanılarak değerlendirilmiş ve tormentik asitin akut karaciğer zedelenmesini önlemek için potansiyel bir madde olduğu gösterilmiştir (82).

2.5.8. Antioksidan Aktivite

Tormentil (*P. erecta*) rizom ekstresi ile yapılan bir çalışmada, ekstrenin doza bağımlı olarak süperoksit ve peroksit radikallerini temizlediği tespit edilmiştir. Oksijen radikali salınımı, tormentil ekstresi ile inkübasyondan sonra azalmıştır. Bu bulgu önem taşımaktadır, çünkü iltihaplı bağırsak mukozasında reaktif oksijen radikallerinin yüksek miktarda bulunmasının enflamatuvar bağırsak hastalığında (ülseratif kolit) patojenik rol oynadığı düşünülmektedir (21).

P. alba köklerinin metanolik ekstresinin antioksidan etkileri DPPH[•] ve ABTS⁺ deneyleri ile incelenmiş ve yüksek antioksidan etki bulunmuştur (83).

P. atrosanguinea topraküstü kısımlarının, ABTS⁺, DPPH[•] ve demir indirgeyici antioksidan potansiyel (FRAP) deneyleri ile Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) ölçülmüş ve %50 sulu etanollü ekstrenin güçlü antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur (84). Benzer antioksidan aktiviteler *P. fruticosa* çiçeklerinden elde edilen izole bileşikler için de gösterilmiştir (85).

P. evestita ile yapılan çalışma sonuçları, metanol ve kloroform fraksiyonlarının önemli DPPH[•] radikal süpürücü etkisi olduğunu göstermiştir (86).

Kondense tanenler ve bunların monomerlerini içeren *Potentilla* ekstreleri ile yapılan çalışmalarda ekstrelerin antioksidan özellikleri gösterilmiştir. *P. tormentilla* rizomlarının prosiyanidinleri Sephadex LH-20 kullanılarak kromatografi ile polimerizasyon derecelerine göre fraksiyonlarına ayrılmıştır. Dimer ve trimerlerin lipoperoksidasyona karşı en yüksek antiradikal aktiviteyi gösterdiği, pentamer ve hekzamerlerin belirgin antielastaz özelliklere sahip oldukları bulunmuştur (87).

P. freyniana kök ve rizom ekstrelerinin (%70 EtOH) antioksidan aktiviteleri enzimatik ve non-enzimatik *in vitro* antioksidan yöntemler kullanılarak incelenmiştir. *P. freyniana*

ekstresi üzüm çekirdeği ekstresine göre daha güçlü antioksidan aktivite göstermiştir (36).

P. erecta rizomu alkol tentürünün farklı dozlarının etkisi, normal fizyolojik koşullar altında albino sıçanların kanında araştırılmıştır. Tentür 14 gün boyunca hayvanların vücut ağırlığının her 100 g'ı için 0.05 ve 0.1 mL olarak verilmiştir. *P. erecta* tentür uygulanması sonrasında malonaldehit ve endojenik lipit miktarında azalma tespit edilmiştir. *P. erecta* tentüründe güçlü antioksidan etkiler gözlenmiştir (9).

P. reptans topraküstü kısımlarının etanol ekstresi antioksidan ve hiperkolestrolemik aktiviteleri açısından araştırılmış, ekstrenin serum HDL konsantrasyonunu ve NO'ı arttırdığı gözlenmiştir (88).

Selenizasyon ile *P. anseriana* polisakkaritinin antioksidan aktivitesinin artırılabilceği düşünülmüş ve yapılan çalışmada, selenizasyon modifikasyonunun antioksidan aktiviteyi arttırdığı görülmüştür (89). *P. anserina* köklerinin n-butanol ekstresinin, mitokondriyal hücre ölümünü azaltarak hipoksik yaralanmaya karşı birincil hipokampal nöronları koruyabileceği tespit edilmiştir (90). *P. anserina* polisakkaritleri (PAP)'nin hücre içi oksidatif hasarı azalttığı ve apoptozisi doza bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu PAP'ın potansiyel antiapoptotik ajan olduğunu göstermiştir (91).

P. recta ile yapılan bir çalışmada, test edilen tüm numuneler konsantrasyon bağımlı bir şekilde incelenen tüm reaktif türlere karşı süpürücü aktivite göstermiştir. DPPH[•], H₂O₂ ve HClO radikallerine karşı en yüksek süpürücü etki etil esetat fraksiyonunda gözlenmiştir (92).

P. anserine köklerinin suda çözünen polisakkarit fraksiyonu incelenmiş ve bu fraksiyonun doza bağımlı bir şekilde H₂O₂ ile uyarılan oksidatif hasarı azalttığı gözlemlenmiştir (93).

P. fulgens köklerinin antioksidan aktiviteleri ABTS⁺•, DPPH[•] ve FRAP deneyleri ile değerlendirilmiştir. Butanol fraksiyonunun güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir, ABTS⁺•, DPPH[•] ve FRAP deneyleri için sırasıyla (2.54 ± 0.69, 2.41±0.53, 3.57±0.05 mM Trolox eşdeğer/mg ekstre)'dir. Ekstrelerin kimyasal bileşimi

toplam polifenolik içerik açısından incelenmiştir ve $20.61 \pm 0.38 - 33.28 \pm 0.11$ mg/g galik asite eşdeğer aralığında bulunmuştur (94).

P. fulgens köklerinin alloksan kaynaklı diyabetik farelerde lipit peroksidasyonu üzerine etkisi ve antioksidan etkileri araştırılmıştır. Diyabetik koşullarda tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinde (TBARS) artış ve glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. *P. fulgens* kökü metanol ekstresinin 14 gün boyunca 250 mg/kg dozda erkek Swiss albino diyabetik farelere intraperitoneal uygulamasından sonra yüksek TBARS seviyesinde önemli bir azalma, diyabetik farelerde antioksidan enzim aktivitelerinde artma görülmüştür. Sonuçlar *P. fulgens* metanolik kök ekstresinin deneysel *Diabetes mellitus*'ta serbest radikal aracılı oksidatif stresi azaltabileceğini göstermiştir (95).

P. fulgens bitkisinde ursolik asit, oskaphik asit, korosolik asit, epikateşin, kateşin, *p*-hidroksibenzaldehit, gallik asit ve iki yeni ursan türü triterpenoid fuljik asit A ve fuljik asit B tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bileşikler iyi antioksidan aktivite göstermişlerdir bu nedenle bu bitkinin doğal antioksidan kaynağı olabileceği düşünülmüştür (96).

Potentilla türlerinden *Dasiphora fruticosa* (*P. fruticosa*), *P. norvegica*, *P. pensylvanica*, *P. thuringiaca*, *P. crantzii* ve *P. nepalensis* sulu ekstrelerinin biyolojik aktiviteleri analiz edilmiştir. Tüm ekstreler konsantrasyon-bağımlı serbest radikal süpürücü (DPPH[•]) etki göstermiştir (97).

P. anserine polisakkaritleri (PAP)'nin antioksidan aktivitesi, farelerde deksametazon kaynaklı oksidatif stres modeli kullanılarak *in vivo* çalışılmıştır. Sonuçlar PAP'la deksametazon kaynaklı oksidatif stresin üstesinden gelmenin mümkün olduğunu ve PAP'ın bağışıklık sistemi oksidatif hasarının onarılmasında önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (98).

P. fulgens topraküstü kısımlarının fitokimyasal incelemesi sonucunda potenten A ve potenten B olmak üzere iki yeni triterpenin izole edilmiştir. Buna ek olarak, üç bilinen bileşik afzelşin-4 α - --> 8-kateşin, epiafzelşin ve rutin izole edilmiştir. Bileşiklerden afzelşin-4 α --> 8-kateşin, epiafzelşin ve rutin sırasıyla 1.21; 2.88; 5.20 mg/mL 'lik IC₅₀

değerleriyle önemli DPPH• radikal süpürücü aktivite göstermiştir. Bilinen standart antioksidan C vitamininin IC₅₀ değeri ise 0.44 mg / mL bulunmuştur (99).

P. atrosanguinea topraküstü kısımlarının antioksidan aktivitesine, farklı çözücülerin (metanol, etanol, aseton ve bunların % 50 sulu konsantrasyonları) ve ekstraksiyon prosedürlerinin (mikrodalga, ultrason, soxhlet ve maserasyon) etkileri, ABTS⁺•, DPPH• radikal süpürücü ve FRAP deneyleri ile araştırılmıştır. % 50 sulu etanol ekstresi ABTS⁺•, DPPH• ve FRAP deneylerinde sırasıyla Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite açısından (TEAC) [(122.96-54.34, 101.22-29.82 ve 41.43-13.64 mg) Trolox/ g] güçlü antioksidan aktivite sergilemiştir. Genel olarak, Soxhlet ekstratlarının TEAC'ının ultrason ve maserasyondan 1.8-3 kat daha yüksek, mikrodalgadan biraz (1.2 kat) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Antioksidan aktivite ile toplam polifenol (TCK) ve toplam flavonoit (TFC) içerikleri arasında pozitif korelasyon ($R^2 = 0.931-0.982$) gözlenmiştir. (Sırasıyla 30.7-26.7 mg/g gallik asit eşdeğeri ve 20.8-16.8 mg/g kersetin eşdeğeri arasında değişen) (84).

2.5.9. Kardiyovasküler Aktivite

P. anserina ile yapılan bir çalışmada, *n*-butanol ekstresinin Ca⁺² konsantrasyonunu azalttığı, Ca⁺²-ATPaz aktivitesini arttırdığı ve verapamil ile karşılaştırıldığında hipoksilli miyokard hücrelerinde sarkoplazmik retikulum (SR) Ca⁺²-ATPases (SERCA2)'nın mRNA ve protein ekspresyonunu geliştirdiği gösterilmiştir (100).

İspanya Navarra'da kardiyovasküler hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bitkiler üzerinde yapılan etnofarmakolojik çalışmada, kardiyovasküler hastalıklarda *Rhamnus alaternus* L., *Potentilla reptans* L., *Equisetum telmateia* Ehrh., *Centaurium erythraea* Rafn. ve *Parietaria judaica* L. türlerinin kullanımı önerilmiştir (101).

2.5.10. Tiroit Hastalıklarındaki Kullanımı

P. alba kök ekstresi ile hazırlanan, bitkisel tıbbi bir ürün olan Alba® ile gerçekleştirilen 3 bağımsız açık etiketli klinik çalışma sonuçları değerlendirilmiş ve çeşitli tiroit bezi patolojilerinde Alba® kullanımı tedavi seçeneği olarak sunulmuştur (102).

P. alba kök ekstresinin tiroit patolojisindeki etkisini araştıran bir çalışmada, bulgular tiroit bezinin büyüklüğünde görünür azalma olduğunu doğrulamış ve Alba® ile oral tedavinin çocuklarda ve yetişkinlerde tiroit bezi fonksiyonlarını normalleştirdiğini göstermiştir (103).

Yapılan araştırma sonuçları, *P. alba*'nın iyi huylu tiroit guatrda ve aynı zamanda toksik ve hipotiroidi guatrın karmaşık tedavisinde tavsiye edilebileceğini göstermiştir (104).

2.5.11. Diğer Aktiviteler

P. bifurca metanol ekstresi ve butanol fraksiyonu güçlü tirozinaz inhibe edici aktivite göstermiştir. *P. bifurca* butanol fraksiyonundan tirozinaz inhibe edici bileşen kersetin-4'-O- β -D-glukozit izole edilmiş ve aydınlatılmıştır. Bu bileşik kojik asit olarak bilinen tirozinaz inhibitöründen daha güçlü tirozinaz inhibe edici etki göstermiştir (105).

Alchemilla türleri ve *P. anserina*'dan hazırlanan etanol, su ekstraktları ve ticari tentürleri, standart mutajen olarak 2-nitrofluoren kullanılarak antimutajenik etki yönünden karşılaştırılmıştır. Toplam tanen miktarı ile inhibisyon derecesi arasında iyi bir korelasyon bulunmamıştır. Ancak, tanen içermeyen ekstraktlar mutajenik olarak herhangi bir inhibisyon göstermemişlerdir. Bu nedenle incelenen ekstraktların antimutajenik tanen fraksiyonunun kısmen etkisi olduğu düşünülmüştür (106).

P. fulgens etanolik kök kabuğu ekstresiyle yapılan çalışma sonuçları, *P. fulgens* fitokimyasallarının antihelmentik potansiyeli olduğunu düşündürmektedir (107).

P. indica ve *Dendrophthoe pentandra* yaprak ekstraktları immünomodülatör aktiviteleri yönünden *in vitro* olarak araştırılmış ve ekstraktların potansiyel immünoestimulan olarak görev yapabileceği ve dolayısıyla insan immün-aracılı hastalıkların tedavisi için immünomodülatör bileşiklerin alternatif bir kaynağı olabileceği gösterilmiştir (108).

2.6. TOKSİSİTE

Potentilla türleri ve bunların ekstraktlarının geleneksel tıpta rapor edilmiş toksik etkileri yoktur.

P. erecta rizomu su ekstresinin akut toksisitesi, sırası ile sıçan ve farelere intragastrik yoldan 2.5 g/kg ve 6.8 g/kg dozlarda, tek doz verilerek değerlendirilmiştir. Ayrıca ekstrenin tek dozu 3.8 ve 14.5 g/kg olacak şekilde sırasıyla sıçan ve farelere intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Mide uygulanmasından 2 hafta ve intraperitoneal uygulamadan 3 gün sonra, hiçbir ölüm gözlenmemiş, görünüm, davranış veya vücut ağırlığında herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu kemirgenlerin iç organlarının makroskobik ve mikroskobik çalışmalarında patolojik değişiklikler görülmemiştir. Veriler, yetişkinlerde ülseratif kolit ve çocuklarda rotavirüs kaynaklı ishalin tedavisinde *P. erecta* rizom ekstresi uygulamasının herhangi bir toksik etkisi olmadığını ortaya koymuştur. *P. erecta* rizom ekstresi insanlar için, akut toksisite açısından emniyetli kabul edilmiştir (109).

Wistar sıçanlarında *P. fulgens* kök kabuk ve *C. baccans* kök yumru ekstrelerinin subakut toksisite profilini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, sonuçlar tedavinin uzun bir süre devam etmesi halinde bitki ekstresinin yüksek dozlarda toksikolojik etkiye neden olabileceğini göstermiştir (110).

2.7. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

2.7.1. Serbest Radikaller

Yüksek oranda reaktif özellikler taşıyan ve tahrip gücü fazla olan serbest radikaller, insan sağlığı ve hastalıklardaki rollerinden dolayı son yıllarda oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. Serbest radikaller son yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran molekül veya molekül parçacıklarıdır (111). Serbest radikaller oldukça kararsız moleküllerdir (112). Stabil hale gelebilmek için elektronlarını paylaşmak üzere diğer stabil moleküllerle hızla reaksiyona girerler. Serbest radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için, onlar da reaktif hale gelir ve bu reaksiyon zincirleme olarak devam eder. Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmasına neden olurlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipit peroksidasyonun, miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diyabet, romatoid artrit gibi romatolojik

hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığını göstermektedir (113).

Reaktif oksijen türleri, mutasyonlara ya da kansere neden olacak şekilde nükleik asit fonksiyonunun bozulmasına, geri dönüşümsüz DNA hasarı oluşmasına, enzim aktivitelerinde değişikliklere, proteinlere zarar vererek, yeni immunolojik yapıların oluşmasına neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri özellikle hücre membranındaki doymamış yağ asitlerine etki ederek lipid peroksidasyonu oluştururlar. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan membran yapısındaki yağ asitleri zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlayarak membran lipid yapısını değiştiren ve dolaylı olarak da reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerinin yapı ve fonksiyonlarına zarar veren çok zararlı kimyasal bir zincir reaksiyonudur. Bu reaksiyon otokatalitik olarak bir kez başladığında zincirleme olarak devam eder ve eğer engellenmezse hücre membranını harap eder, organelleri parçalayarak lizozomal enzimlerin salınmasına ve otolize neden olur (114).

2.7.2. Moleküler Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri

Moleküler oksijen kendi başına serbest bir radikaldir veya başka bir ifade ile iki eşleşmemiş elektron içeren bir diradikaldir. Oksijenin reaktivitesi ayrı orbitallerde bulunan ve paralel spine sahip olan iki eşleşmemiş elektronu dolayısıyla sınırlanmaktadır (115). Moleküler oksijen, radikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türü (ROT) oluşturma eğilimindedir.

2.7.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Süperoksit Anyon Radikali

Moleküler oksijenin bir elektronunun redüksiyonu ile süperoksit anyon radikali oluşur (115). Süperoksit anyonu bir serbest radikal olmasına karşın çok fazla reaktif değildir. Süperoksit, özellikle solunum zinciri ile birlikte mitokondriyal membranın iç yüzeyinde elektronca zengin aerobik bir ortamda kendiliğinden oluşmaktadır. Süperoksit ayrıca iskemi reperfüzyonda aktif olan örneğin, ksantin oksidaz gibi flavoenzimler tarafından endojen olarak da üretilmektedir. Diğer süperoksit üretici enzimler lipoksijenaz ve siklooksijenazdır. Membran bağımlı enzim kompleksi olan, fagositik hücrelerin

NADPH'a bağımlı oksidazı yüksek düzeyde $O_2^{\bullet-}$ üretimine neden olur. İki molekül süperoksit hızlıca hidrojen perokside ve moleküler oksijene dönüşür ve bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) ile katalizlenir (116).

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

Hidroksil radikali biyolojik sistemlerde yaklaşık 10^{-9} saniye yarı ömrü olan ve yaklaşık 1.5 atom difüzyon yolu olan son derece güçlü bir oksidandır. Bilinen en toksik radikaldir ve lipitler, proteinler ve nükleik asitler dahil hemen hemen tüm biyolojik makromolekülleri difüzyon ile sınırlı oranlarda okside edebilir. Demir iyonu varlığında hidrojen peroksitten hidroksil radikallerinin oluşumu “Fenton Reaksiyonu”, hidrojen peroksit ve süperoksitten hidroksil radikallerinin oluşumu ise “Haber-Weiss reaksiyonu” olarak bilinmektedir (115).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

H_2O_2 reaktif bir radikal değildir, bununla birlikte biyolojik membranlardan geçerek, uzak mesafelere gidebilir, böylece oluştuğu yerden çok uzaklarda oksidatif hasara neden olabilir (117). Ortamda metal iyonları fazla miktarda bulunduğunda fenton reaksiyonu tetikleneceği ve bu reaksiyon sonucunda da hidroksil radikali oluşacağı için tehlikelidir.

2.7.2.2. Reaktif Azot Türleri

Nitrik oksit

Nitrik oksit nitrik oksit sentaz (iNOS) tarafından L-argininden üretilir (118). Diğer serbest oksijen radikalleri her konsantrasyonda zararlı iken, NO düşük konsantrasyonlarda kan basıncı ve sindirim sisteminin düzenlenmesinden konak savunması ve özgül olmayan immüniteye kadar bir çok önemli fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynar. Ancak, aşırı miktarda üretildiğinde, bir çok patolojik durumun da ortaya çıkmasına neden olur. iNOS vasıtasıyla üretilen makrofaj kaynaklı NO bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerine sitotoksik etki yaparken, DNA ve RNA virüslerinin yayılmasını da önler. NO bu etkilerini, bazı enzimlerdeki duyarlı demir gruplarına bağlanarak, çoğalmayı sağlayan anahtar metabolik yolların blokajına yol açarak ve oksijen ile birleşip güçlü hücrel toksinler ortaya çıkararak gösterir (119).

Nitrik oksit vazodilatasyonu artırır, ödem oluşturur ve hassas sinir uçlarını etkiler. Tüm bu etkiler enflamatuvar yanıtın önemli göstergelerindendir (120).

Peroksinitrit (ONOO[•])

Süperoksit ile NO reaksiyonunun ürünü olan peroksinitrit (ONOO[•]) güçlü ve yarılanma ömrü uzun bir oksidandır. Organizmada peroksinitrit, hidroksil radikali gibi davranan hidroksinitrite (HOONO) dönüşür. Peroksinitritin parçalanmasıyla yüksek konsantrasyonlarda NO₂ oluşur. Bu reaktif nitrojen bileşikler lipitler, DNA, tioller, amino asitler ve metallerle reaksiyona girerek enzim fonksiyonlarını bozar, membran bütünlüğüne zarar verir ve DNA mutasyonuna neden olabilir (120).

2.7.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük konsantrasyonlarda, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir. Prooksidanlar ise lipitler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler (121).

Sağlıklı bireylerde, serbest radikallerin üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge mevcuttur. Denge, antioksidan seviyelerinin azalması veya serbest radikallerin üretiminin artması lehine olduğunda *oksidatif stres* oluşmaktadır. Oksidatif stresin, özellikle yaşlanmaya bağlı olarak Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif bozukluklara neden olabileceği yaygın bir şekilde bilinmektedir. Dahası oksidatif hasar kanser, kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz, katarakt ve enflamasyon gibi birçok kronik hastalığı başlatabilmekte ve ilerletebilmektedir (122).

Antioksidanlar, serbest radikalleri indirgeyerek oluşacak hasarı önlemede rol oynar. Bunlar serbest radikalleri tutarak veya daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek aktivitelerini azaltır veya serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırma/onarma şeklinde etki gösterirler. Antioksidanların sınıflandırılması farklı şekillerde yapılabilmektedir; yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan,

kaynaklarına göre endojen ve eksojen, çözünürlüklerine göre suda çözünenler ve yağda çözünenler ve organizmada yerleşimlerine göre intraselluler ve ekstraselluler olarak sınıflandırılırlar (114).

Endojen antioksidanlar enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar:

2.7.3.1. Enzim Olan Endojen Antioksidanlar

En önemli antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon-S -transferaz, glutatyon redüktazdır. Bu antioksidan enzimler, serbest oksijen radikallerine karşı önemli hücre içi enzimatik savunma sistemleridir.

Süperoksit dismutaz (SOD)

Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma işlemi SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, endojen olarak üretilen ve organizmayı oluşturan her hücre için esansiyel bir enzim olup peroksinitrit oluşumunu engelleyici ve hücre hasarına yol açan süperoksit radikalini, daha az zararlı hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürücü etkisi nedeniyle organizmayı oksidanların zararlı etkilerinden korur (114). Süperoksit dismutaz enziminin 3 farklı tipi vardır: metal içeren süperoksit dismutaz enzimi (Fe-SOD), manganez içeren süperoksit dismutaz enzimi (Mn-SOD), bakır/çinko içeren süperoksit dismutaz enzimi (Cu, Zn-SOD) (124).

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px, her birinde selenosistein içeren 4 alt birimden oluşur. Redükte glutatyonu yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif strese karşı korur. Ayrıca E vitamini yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. GSH-Px yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir, çünkü selenyum bu enzimin integral bir parçasıdır (125).

Katalaz (CAT)

CAT, tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan bir hemoproteindir. Peroksizomlarda H_2O_2 'in H_2O ve O_2 'ye dönüşümünü katalizler. CAT aynı zamanda fenoller ve alkoller gibi farklı substratların detoksifikasyonunda görev alır. Katalazın

antioksidan rolüne örnek olarak Cu^{+2} ve Fe^{+3} tarafından katalizlenen Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 'den hidroksil radikali oluşum riskini azaltması verilebilir (116).

Glutasyon-S-Transferaz (GST)

GST, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen antioksidan bir enzimdir (123).

Glutasyon Redüktaz (GR)

GR, hücre içi glutasyon (GSH) seviyelerini korunmasına yardımcı olarak hücre içinde oksidatif hasarın önlenmesi açısından dolaylı ama önemli bir rol oynamaktadır. Glutasyon peroksidaz enzimi ile birlikte zararlı hidrojen peroksitin hücredeki düzeyini düşürmekten sorumludur. Bir flavoprotein olan GR hidrojen donör olarak β -nikotinamid dinükleotid fosfat (NADPH) kullanarak okside glutasyonu (GSSG) indirgenmiş glutatyon (GSH) katalizler. Böylelikle güçlü antioksidan etkiye sahip glutasyon muhafaza edilir (123).

2.7.3.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar

Melatonin

Melatonin immünite, uyku, retinal fizyoloji, endokrin sistem, sirkadiyen ritmin düzenlenmesi gibi birçok biyolojik fonksiyonda rol oynayan bir hormondur. Bununla birlikte, son yıllarda, indolün etkili bir serbest radikal süpürücü ve antioksidan olduğu bulunduğu beri melatoninin etki alanı da genişlemiştir. İndol, hem yüksek derecede toksik olan hidroksil radikalının hem de doymamış lipidlerin oksidasyonu sırasında üretilen ve lipid peroksidasyonunu yayan peroksil radikalının etkili bir temizleyicisidir. Ayrıca, melatonin bazı önemli antioksidan enzimleri, yani süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazı uyararak da etki gösterebilir. Toksik olmaması, fizyolojik engelleri aşabilmesi ve hücre içi bölmelere girme kolaylığı bu antioksidanın temel özellikleridir. Yaş artımı ile birlikte melatonin üretiminin de azaldığı tesbit edilmiştir (126). Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Glutasyon

Glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir. Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutasyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. GSH proteinlerdeki SH gruplarının korunması ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev almasının yanı sıra, aminoasitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar (127). Diyetteki GSH kısmen ince bağırsaktan emilebilir ve de novo sentezlenebilir; böylece GSH eksojen ve endojen bir antioksidan olarak görev yapabilir. GSH'nin oksidasyonundan oluşan glutasyon radikali (GS[•]), pro-oksidan bir radikal olmasına rağmen, GS[•] başka bir GS[•] ile reaksiyona girebilir GS-SG'yi üretebilir ve daha sonra NADPH'ye bağlı glutasyon redüktaz tarafından GSH'ye indirgenir. GSH, enzimatik reaksiyonlar yoluyla doğrudan ve dolaylı olarak reaktif türleri (örneğin;lipit peroksil radikali, peroksinitrit, H₂O₂) süpürür (118).

Transferrin

Transferrin esas olarak serumda mevcut olmasına rağmen diğer vücut sıvılarında da düşük konsantrasyonlarda bulunur. Temel işlevi çoğalan hücrelere demir taşımasıdır. Dolayısıyla hücrelerin gelişmesinde oynadığı rol önemlidir. Demir iyonları, fenton reaksiyonlarına neden olarak hidrojen peroksitin yüksek toksisiteye sahip hidroksil radikallerine dönüşümünü katalizler. Böylelikle oksidatif stresin artışına katkıda bulunur. Transferin serbest demir iyon konsantrasyonu azaltarak antioksidan etki gösterir (123).

Bilirubin

Bilirubinin büyük bir kısmı ömrünü dolduran eritrositlerin parçalanmasıyla meydana gelir. Dolaşım esnasında karaciğer tarafından alınır, biyotransformasyona uğratarak safra veya idrarla atılır. Antioksidan etkisi peroksil radikallerini toplamasından kaynaklanır (123).

2.7.3.3. Eksojen Antioksidanlar

E Vitamini

E vitamini normal metabolik süreç sırasında üretilen serbest radikalleri etkisiz hale getiren bir antioksidandır. E vitamini ile GSH-Px serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etkilere sahiptir. E vitamini tokoferol yapısında olup α , β , γ ve δ olarak

adlandırılan dört tokoferol karışımıdır. Antioksidan etkisi en fazla olan α -tokoferol'dür. α -tokoferol biyolojik membranlardaki lipoproteinleri oksidasyona karşı koruyan ve yağda çözünen ana antioksidan vitamindir (114). E vitamininin görevi kardiyovasküler hastalıklarda rol oynayan lipit peroksidasyonunu engellemektir (128). Ayrıca, E vitamini singlet oksijeni de söndürerek oksidatif strese karşı oluşan savunma hattına da katkıda bulunur (129).

C Vitamini

Askorbik asit veya C vitamini, insan plazmasında ve hücre membranlarında bulunan, başlıca antioksidan olarak gösterilmektedir. Reaktif oksijen türlerini, peroksitleri ve α -tokoferolü indirger. Vitamin, esas itibarıyla lipit peroksil radikalleri ile reaksiyon sonucunda oluşan α -tokoferol radikallerini azaltarak plazma lipoproteinlerinde, örneğin LDL'de lipit hidroperoksit oluşumunu önler. Bu fonksiyonu aterosklerotik plak oluşumunun engellenmesinde önemlidir. Ayrıca askorbat bu mekanizma ile hücre membranlarındaki lipitleri de korur (116, 130).

Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, bitkiler alemindeki yaygın sekonder metabolitlerin büyük bir grubunu oluştururlar. Fenolik bileşikler yapılarına göre sınıflandırılırlar ve hidroksil gruplarının sayısına, konumuna ve diğer süstitüentlerin varlığına göre alt gruplara ayrılırlar. Fenolik bileşikler, özellikle flavonoidler, farklı biyolojik aktivitelere sahiptirler, bunlardan en önemlileri; antioksidan aktivite, damar koruyucu etki ve tümörün çeşitli evrelerinde ortaya çıkan inhibe edici etkidir. Fenolikler reaktif oksijen türlerinin elektron verme özelliklerine bağlı olarak bunları süpürücü etki göstermektedirler. Antioksidan etkinlikleri hidroksil gruplarının sayısı ve bulunduğu yerin yanı sıra farklı sistemlerdeki kararlılıklarına bağlıdır. Birçok *in vitro* çalışmaya göre, fenolik bileşikler vitaminler ve karotenoidlerden daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir (129).

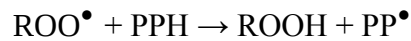
Bitki polifenollerini çok fonksiyonlu olup hidrojen atomu verici, singlet oksijeni süpürücü ve indirgeyici olarak davranırlar. Bazı polifenoller ise antioksidan özelliklerini metal iyonlarını şelatlama özelliklerine borçludurlar (131).

Bir polifenolün antioksidan olarak tanımlanabilmesi için iki temel özelliğin sağlanması gerekmektedir. Bunlar;

a) Okside olabilen substratlara oranla düşük konsantrasyonlarda bulunduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir.

b) Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır (131).

Polifenolik antioksidanlar (PPH), peroksil radikale ($ROO^\bullet$) hızlı bir şekilde hidrojen atomu vererek ve onları alkil hidroperoksit ($ROOH$) yapısına dönüştürerek lipid peroksidasyonunu inhibe ederler.



Oluşan polifenol fenoksil radikali bir başka hidrojen atomu vererek ve kinonların oluşumu ile kararlı hale gelmekte veya başka fenoksil radikali ile reaksiyona girerek yeni bir zincir reaksiyonu başlamadan kesilmektedir (131).

Flavonoitler

Flavonoit terimi sarı anlamına gelen Latince "flavus" sözcüğünden türetilmiştir. Flavonoitler serbest radikalleri doğrudan hidrojen atomu vererek temizleyebilirler. Flavonoitlerin *in vitro* antioksidan aktiviteleri, çekirdek yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşimine bağlıdır. Hidroksil gruplarının hem konfigürasyonu hem de sayısı, antioksidan aktivitenin mekanizmasını büyük ölçüde etkiler. B halkasının hidroksil konfigürasyonu reaktif oksijen türlerini süpürücü etkinin en önemli belirleyicisidir. Ancak, A ve C halkalarının süstitüsüyonu süperoksit anyon radikali süpürme hız sabitleri üzerinde çok az etkiye sahiptir. *In vitro* antioksidan aktivite, flavonoit monomerlerin polimerizasyonu ile artırılabilir; proantosiyanidinler, kateşin polimerleri, moleküllerinde bulunan çok sayıda hidroksil grubundan dolayı mükemmel *in vitro* antioksidan özellik gösterirler. Proantosiyanidinlerin antioksidan kapasitesi, oligomer zincir uzunluğuna ve reaksiyona girdiği reaktif türüne bağlıdır. Flavonoitlerin glikozilasyonu, *in vitro* antioksidan aktiviteyi azaltır (132).

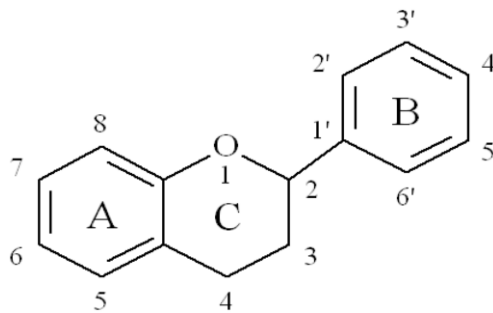
Flavonoitlerin etkin radikal süpürücü aktiviteleri için gerekli olan temel yapısal özellikleri şöyle özetlenebilir:

A) elektron delokalizasyonu için B halkasında bir orto-dihidroksi (katekol) yapısı,

B) C halkasında 4-okso grubu ile 2,3 arasında çifte bağ, B halkasından elektron delokalizasyonunu sağlar.

C) 3 ve 5 konumlarındaki hidroksil grupları, okso grubu ile hidrojen bağına sağlar (132).

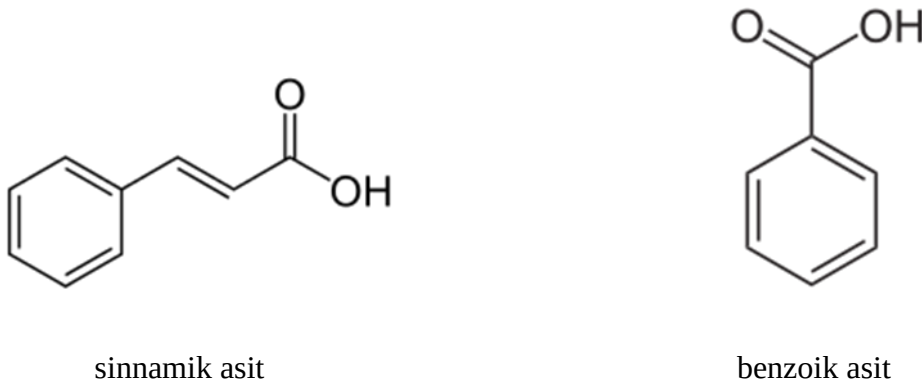
Flavonoitler doğrudan reaktif oksijen radikallerini süpürerek, antioksidan enzimleri aktive ederek, metal şelatlayıcı olarak, oksidazları inhibe ederek, nitrik oksitin neden olduğu oksidatif stresi azaltarak etki gösterebilirler (132). Flavonoitlerin aterosklerozda önemli rol oynayan LDL peroksidasyonunu önlediği de bildirilmiştir. Flavonoitlerin kanseri önleyebilmesi, antimutajenik ve antiproliferatif yeteneklerinden, güçlü antioksidan kapasitelerinden, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve anjiyogenezde yer almalarından kaynaklanmaktadır (133). Flavonoitler ayrıca, antiviral, antitrombotik, antienflamatuvar, antialerjik ve vazodilatasyon etkileri, aterosklerosis ve koroner kalp hastalıklarından koruma, hücrel immunitenin stimülasyonu gibi etkiler de gösterirler (134).



Şekil 2.3. Flavonoitlerin genel kimyasal yapısı

Fenolik Asitler

Fenolik asitler, sinamik asit ve benzoik asitin hidroksi türevleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenilmetan yapısında olup, hidroksisinnamik asitler ise C6-C3 fenilpropan yapısındadırlar (135).



Şekil 2.4. Sinnamik ve benzoik asitlerin genel kimyasal yapıları

Fenolik asitlerin ve bunların esterlerinin antioksidan aktivitesi, molekül içindeki hidroksil gruplarının sayısına bağlıdır. Benzoik asitlerdeki karboksil grubunun elektron çekici özelliği, hidroksi benzoatların H-verici kabiliyeti üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Hidroksi sinnamatlar, hidroksi benzoatlara göre daha aktiftirler (136). Fenolik asitlerin singlet oksijen, hidroksil, hidrojen peroksit radikallerini giderme ve metal şelatlama kabiliyetine sahip olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (137, 138). Ayrıca fenolik asitler iltihap önleyici, bağışıklık sistemlerini güçlendirici ve kan dolaşımını iyileştirici özelliklerinden dolayı vücutta önemli düzeyde anti-aging etki gösterirler (123).

Tanenler

Fenolik polimerler diğer bir deyişle tanenler veya proantosiyanidinler, yüksek molekül ağırlıklı bileşikler olup flavonoitlerin (flavan-3-ol) oligomer veya polimeridirler. Bitkilerin sekonder metabolitleri olup, bitkileri zararlılara (mantarlar ve böcekler v.s) karşı korurlar. Proantosiyanidin içeriği yüksek gıda ya da gıda takviyelerini kısa/uzun süreli kullananlarda ateroskleroz, bazı kanser türleri ve enflamasyonun görülme oranlarının azaldığı bildirilmiştir. Tanenlerin ayrıca kan pıhtılaşmasını hızlandırma, kan basıncını azaltma, serum lipid düzeylerini düşürme, immün cevabı ayarlama gibi fizyolojik etkileri de bildirilmiştir (139).

Karotenoitler

Karotenoitler, birçok meyve ve sebzede bulunan sarı, turuncu ve kırmızı renk veren pigmentlerdir. Çoklu doymamış yapıları bu pigmentlere kolay okside olabilen ve stabil

olmayan bir yapı kazandırmaktadır. Karotenoitler antioksidan aktivitelerini serbest radikal reaksiyonlarına katılarak, zararlı hidrojen peroksitlerin oluşum hızını azaltmak suretiyle gösterirler. Ayrıca, süperoksit anyonlarını yok ederler ve plazmada düşük yoğunluklu lipoprotein içinde taşındıkları için potansiyel olarak LDL oksidasyonunu sınırlarlar ve oksidasyona karşı koruyucu görev üstlenirler. Karotenoitlerin *in vitro* ortamlarda antioksidan etkili olduğu; buna karşılık, *in vivo* ortamlarda antioksidan davranışlarının, konsantrasyon, gerçek hedef ve dokularda birikim, reaktif oksijen türlerinin yapısı gibi henüz tam açıklanamamış faktörlere bağlı olduğu bildirilmektedir (140).

Antosiyaninler

Antosiyaninler meyve sebzelerin yanı sıra çiçeklerde de bulunur ve suda çözünen doğal pigmentler arasında en önemli grup olarak kategorize edilir. Bunlar meyve sebzelere mavi, kırmızı, mor rengi veren pigmentlerdir. Bu doğal pigmentlere antioksidan, antikanser, antidiyabetik ve iltihap önleyici özellikleri ve aynı zamanda çekici renkleri nedeniyle gıda sanayinde ve alternatif tıpta büyük ilgi gösterilmektedir. Antosiyaninler, LDL konsantrasyonunu yani kötü kolesterolün oluşumunu önler. Ayrıca kemoprotektif, antienflamatuvar ve üriner enfeksiyonları önleyici etkilerinin de olduğu bildirilmektedir (123).

2.8. ENFLAMASYONDA BAĞIŞIK YANIT

Bağışıklık; organizmanın kendine yabancı nesnelerin tümünü tanıma, kendi dokuları yararına ya da zararına nötralize etme ve ortadan kaldırma yeteneği ile karakterize fizyolojik bir fonksiyondur. Vücuttaki bağışıklık sistemi doğal ve edinsel bağışıklık olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Her iki grubun da humoral (kanda dolaşan) ve hücrel olmak üzere iki türü bulunmaktadır (141).

2.8.1. Doğal Bağışıklık

Doğal bağışıklık sistemi, mikroorganizma veya patojenle karşılaşıldığında ortaya çıkan ilk enflamatuvar yanıttır (142). Doğal immunitenin hücrel elemanları fagositik makrofajlar, granülositler, antijen sunan dendritik hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler ve T lenfositlerdir (143).

2.8.2. Edinsel Bağışıklık

Edinsel bağışıklık ise pasif ve aktif bağışıklık olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Pasif bağışıklık antikorların daha önce bağışıklık geçirmiş bir canlıdan başka bir canlıya geçmesi ile elde edilen bağışıklıktır. Aktif bağışıklık ise aşılarda ya da hastalığın geçirilmesiyle mevcut antijenle daha önce tanışıp ikinci kere karşılaşmasıyla oluşmaktadır (141).

Edinsel bağışıklık T ve B lenfositlerden oluşmaktadır ve belirli bir antijene özgü olan bağışıklıktır (144). B lenfositler humoral bağışıklığın oluşumunu sağlayan antikorların üretiminden sorumlu iken, T lenfositler direkt olarak hücresel bağışıklıktan sorumludurlar (141).

2.8.2.1. Hücresel Yanıt

Hücresel yanıt, T lenfositler tarafından oluşturulur ve intrasellüler mikroplarla savaşır. T lenfositler kendi içerisinde Yardımcı T (T Helper) lenfositler ve Sitolitik T lenfositler olmak üzere ikiye ayrılır. Yardımcı T lenfositler makrofajları aktive ederek fagosite ettikleri patojenleri ortadan kaldırırlar. Sitolitik T hücreleri ise intrasellüler mikrop içeren enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasından sorumludurlar. Yardımcı T hücreleri de kendi içerisinde Th1 ve Th2 olmak üzere ikiye ayrılır ve birbirinden farklı sitokinler aracılığıyla farklı enflamasyonlar oluştururlar. Th1'in ürettiği en önemli sitokin IFN γ 'dır ve çok potent bir makrofaj aktivatörüdür. Bu sayede fagositöz aracılığıyla mikropların ortadan kaldırılmasını hızlandırır aynı zamanda B lenfositleri de aktive ederek kompleman sisteminde kullanılan fagositozu kolaylaştıran antikorların üretimini hızlandırır. Th2 hücreleri ise IL-4 salgılayarak B lenfositlerden IgE salınımını hızlandırır ve IL-5 salgılayarak eozinofilleri aktive ederek özellikle parazitlere karşı bir enflamasyon oluştururlar. Th2 tarafından salgılanan IL-4, IL-10 ve IL13; Th1 hücreleri ve makrofajları inhibe etmektedir. Bu nedenle Th1 ve Th2 arasında enflamasyon sırasında bir denge oluşmaktadır (145).

2.8.2.2. Humoral Yanıt

Humoral immüniteden sorumlu B lenfositleri antijene spesifik antikor yapımı ve bu antikorların dolaşıma salınması ile görevlidirler (146). Canlı vücudu her gün

milyonlarca farklı B lenfosit hücresi üretir ve bu hücrelerin zarında farklı bir antijene bağlanabilecek özgün bir protein bulunmaktadır. Bu proteinleri taşıyan B lenfositleri kan ve lenf içinde antikor üretmeden dolaşırlar. Bu lenfositler yabancı bir antijen ile karşılaştığında veya T lenfositten ilave sinyal aldığı anda farklılaşır, çoğalır ve plazma hücresine dönüşür. Bunun sonucunda da immünglobulinler üreilmeye başlar (141). B lenfositler antikor yapımı için özelleşmiş hücrelerdir. Uygun antijenik uyarı sonucu B hücreleri beş farklı sınıftan (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD) immünoglobulin salgılayan plazma hücrelerini oluştururlar (147).

2.8.3. Bağışık Yanıtta Başlıca Hücreler Arası İlişkiler: Sitokinler

Sitokinler, organizmada immün sisteminin düzenlenmesinde ve inflamatuvar olaylarda önemli rol oynayan moleküllerdir. Lenfositlerin meydana getirdiği sitokinlere lenfokin, monositlerin meydana getirdiği sitokinlere ise monokin denir. Sitokinler yabancı antijenlere ve ajanlara karşı organizmanın reaksiyonlarının kontrol ve düzenlenmesinde önemli rol oynarken aynı zamanda hücreler arası ilişkileri de düzenleyerek lokal ve sistemik enflamatuvar cevapta önemli rol oynarlar. Sitokinler hormona benzemekle beraber özellemiş bir dokudan değil de çeşitli hücreler tarafından yapıldıkları için hormon kabul edilemezler ve etkilerini otokrin veya parakrin şekilde gösterirler. Bazı hücreler kültür ortamında spontan olarak sitokin salgılayabilirse de sitokinlerin çoğu hücrenin aktivasyonundan sonra salgılanmaktadır. İstirahat halindeki hücrelerden sitokin salgılanmamaktadır. Sitokinler peptit veya glikoprotein yapısında olup mol ağırlıkları 6000 ila 60.000 arasında değişmektedir. Çok aktif maddeler olup çok küçük miktarları dahi etkili olabilmektedir (148).

Tablo 2.3. Temel sitokinlerin sınıflandırılması (149,150)

Sitokin	İmmün Sistem Kaynağı	Esas Hedefler	Esas Etkiler
IL-1 α IL-1 β	Makrofajlar, B hücreleri	T, B hücreleri, makrofaj, endotel, doku hücreleri	Lenfosit ve makrofaj uyarımı, lökosit/endotel adezyon artışı, yüksek ateş oluşturmak
IL-2	T hücreleri	T hücreleri	T hücre farklılaşması ve çoğalması, sitotoksik lenfosit ve makrofaj uyarımı
IL-3	T hücreleri		Birçok hücre çeşitinde koloni uyarım faktörü
IL-4	T hücreleri	T hücreleri, B hücreleri	B hücre büyüme faktörü, eozinofil ve mast hücrelerinin gelişmesi, monokin üretiminin baskılanması
IL-5	T hücreleri	B hücreleri	B hücre büyüme ve farklılaşması, IgA seçimi
IL-6	T hücreleri, B hücreleri	B hücreleri, hepatositler	B hücre farklılaşması, akut faz proteinlerinin artırılması
IL-7		Pre-B hücreleri, T hücreleri	T ve B hücrelerinin çoğalması
IL-8	Monositler	Nötrofil, bazofil, T hücreleri, keratinositler	Kemotaksi, angiogenez, süperoksit ve granül salınması
IL-9	T hücreleri		T hücre yaşamını uzatma, Mast hücre uyarımı
IL-10	T hücreleri	TH1 hücreleri	Sitokin sentezini önleme, B hücre çoğalmasını ve antikor yapımını kamçulamak, hücre sel bağışıklığı baskılamak
TNF α	Aktive makrofajlar, diğer somatik hücreler		IL-1 benzeri etkiler, vasküler tromboz ve tümör nekrozu
TNF β	Lenfositler		TNF α gibidir

2.8.4. Enflamasyon

Enflamasyon organizmanın iç veya dış tehlikelerden korunmak için kullandığı temel mekanizmadır. Bu yolla organizma, dışarıdan gelen bakteri, virüs, mantar gibi mikroorganizmalara veya kendi dokularından oluşan tümörlere veya doku antijenlerine

karşı kendini korumaya çalışır. Bir patojenin enflamasyon oluşturmaları için geçmesi gereken birinci engel deri veya mukozal yüzeylerde yer alan enzimler veya doğal faktörlerle oluşan bariyerdir. Bunu geçebilen organizma önce doğal, sonra kazanılmış immün sistem tarafından karşılanır. Akut enflamatuvar yanıtın başlaması için immün sistem hücre ve moleküllerinin patojenin bulunduğu yere gelmesi gerekir. Dışarıdan gelen organizmanın vücuda giriş yaptığı yerdeki 1. temel bariyer mekanizması yıkıldıktan sonra doku içine giren organizmaya karşı savunma ve enflamatuvar yanıtın oluşması öncelikle doğal bağışıklık sistemi hücre grupları ve molekülleri tarafından gerçekleştirilir. Kompleman sistemi aktive olur ve yabancı mikroorganizmanın yüzeyi kaplanır, mast hücrelerinin degranüle olması sağlanarak ortama bazı mediyatörlerin (histamin gibi) salınımı başlar. Hızla lokal kaslarda kasılma ve vasküler yatakta genişleme ile olay yerine daha fazla kan akımı gelmesi sağlanır. Hem yabancı patojenden hem de hasarlı dokudan salgılanan mediatörler, genişleyen damarlarda adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Böylece oradan geçmekte olan hücreleri bu bölgede bir enflamasyon olduğu konusunda uyarıp kolaylıkla dokuya geçmelerine yardımcı olurlar. Nötrofillerde yer alan L-selektin vasküler yapıdaki karbonhidrat yapılarına bağlanır. Bu yolla nötrofilin damar üzerine yapışarak dönmesi sağlanır. Aktive olan nötrofil L-selektini dökerek yerine integrin ailesinden bazı molekülleri eksprese eder. Bu da endotelde TNF ve IL-1 gibi sitokinlerin etkisi ile artmış olan e-selektin ile bağlanarak nötrofillerin damara yapışmasını artırır. Kemokinler olarak isimlendirilen kemotaktik moleküller, prostoglandinler, lökotrienlerin etkisi ile olay yerine daha fazla hücre gelir. Aktive olan lökositler damar endotelini geçerek doku içinde ilerleyip patojenin olduğu bölgeye ulaşırlar ve organizmayı fagosite ederler (151).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN BİTKİSEL MATERYAL, KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR

3.1.1. Bitkisel Materyal

Potentilla recta L. bitkisi, 2013 yılının haziran ayında Kayseri'nin Pınarbaşı İlçesi, Aşağıbeyçayır Köyü civarından toplanmıştır. Bu çalışmada bitkinin, açık havada ve gölgede kurutulmuş çiçekli toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Bitkinin herbaryum örneği Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryum'unda (ERCH) saklanmaktadır. Toplayıcı numarası 1001 (BAAB 1001)'dir.



Şekil 3.1. *Potentilla recta* L. bitkisinin çiçekli toprak üstü kısımları

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik kalitededir. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi analizlerinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kalitesinde çözücüler ve kimyasal maddeler kullanılmıştır. Tüm deneylerde kullanılan su, distile su veya deiyonize sudur.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Çalkalamalı su banyosu (Nüve ST 402)

Su banyosu (Memmert)

Rotavapor (Ilmvac vakum pompası, Heidolph Laborat 4000 efficient)

Liyofilizatör (Labconco Freezone 4.5)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)

Ultrasonik banyo (Elma S 100H Elmasonic)

Vorteks karıştırıcı (Velp scientifica)

pH metre (Inolab pH 720 WTW)

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

Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy HT)

Steril kabin (Safe Fast Elite)

Hücre sayım cihazı (Roche Innovatis Cedex Xs)

Karbondioksitli etüv (New Brunswick Galaxy 170R)

SK-KS/KS (Shimadzu 20A Prominence)

3.2. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölümde *P. recta* bitkisinin toprak üstü kısımları ile yapılan ekstraksiyon işlemi, ekstrenin kimyasal bileşimi, *in vitro* antioksidan ve antienflamatuvar aktivite çalışmalarının yöntemleri hakkında bilgi verilmektedir.

3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkisel materyalin kurutulmuş toprak üstü kısımları (150 g) kaba toz edildikten sonra, çalkalamalı su banyosunda çözücü olarak %70'lik metanol kullanılarak, 24'er saat süreyle 3 kez masere edildi. Ekstreler süzülüp, birleştirildikten sonra, vakum altında rotavaporda (37 °C) yoğunlaştırıldı. Elde edilen yoğunlaştırılmış ekstre liyofilize edildi. Ekstre analiz anına kadar -18 °C'de saklandı.

3.2.2. Fenolik İçerik Analizleri

Bitkisel materyalden hazırlanan ekstre antioksidan aktiviteden sorumlu fenolik bileşikleri bakımından incelendi.

3.2.2.1. Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrenin içerdiği toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı (152). Bu yöntemin esası, fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) reaktifi ile bazik ortamda reaksiyona girmelerine dayanmaktadır. 6 mL distile su içeren 10 mL ölçekli kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin- Ciocalteu reaktifi eklendi. 1 dakika sonra 1.5 mL %20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edilip, 10 mL'ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 25 °C'de 2 saat bekletildikten sonra 760 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

3.2.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrenin toplam flavonoit miktarı Zhishen ve ark. (1999)'nın kullandıkları yöntem modifiye edilerek hesaplandı (153). 1 mL ekstre, 4 ml distile su ve 0.3 mL %5' lik NaNO₂ (50 g/L) ile karıştırıldı. Beş dakika sonra 0.3 ml %10' luk alüminyum triklorit (100 g/L) eklendi. Altıncı dakikada 2 mL 1 M NaOH (40 g/L) eklenip, toplam hacim su ile 10 mL'ye tamamlandı. Çözeltilerin absorbansları 510 nm' de ölçüldü. Ekstrenin içerdiği toplam flavonoit miktarı, kateşin kalibrasyon eğrisi kullanılarak, kateşine eşdeğer olarak (mg_{CE}/g_{ekstre}) hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

3.2.2.3. Toplam Flavonol Miktar Tayini

Ekstrenin içerdği toplam flavonol miktarı rutine eşdeğer olarak ((RE) $\text{mg}_{\text{RE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$) hesaplandı (154). Rutinin kalibrasyon eğrisi 0.5-0.015 mg/mL konsantrasyonlardaki etanolik rutin çözeltilerinin 2 mL' sinin 2 mL etanolik alüminyum triklorit (20 g/L) ve 6 mL sodyum asetat (50 g/L) ile karıştırılması ile hazırlandı. Çözeltilerin absorpsanları 20°C de 2.5 saat bekletildikten sonra 440 nm' de ölçüldü. Aynı işlemler rutin yerine 2 mL ekstre (10 g/L) eklenerek tekrarlandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

3.2.2.4. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (SK-KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

Bir organik bileşiğin yapı analizi için en kolay yol, hidrojen ve karbon atomlarının konumuna, sayısına bakmak, fonksiyonel gruplarını belirlemek yerine tüm yapısını aynı anda değerlendirmektir. Kütle spektrometrisi, günümüzde mevcut spektroskopik yöntemler arasında araştırmacıya molekülün tüm yapısı hakkında bilgi veren ve çoğu kez molekül kütlesinin ve molekül formülünün de bulunmasını sağlayan tek yöntemdir. Bununla beraber pahalı oluşu ve özel kullanım tekniklerini bilen bir kullanıcı gerektirmesi nedeniyle geçmiş yıllarda yaygın olarak kullanılamamıştır. Bu durum son yıllarda değişmeye başlamış ve sıvı kromatografisi ile kütle spektrometresinin birlikte kullanıldığı çalışmalar oldukça artmıştır. Bu çalışmada SK-KS/KS sistemi kullanıldı ve oluşan moleküler iyon pikleri ve temel pikler üzerinden değerlendirmeler yapıldı.

Cihaz	: Shimadzu Prominence LC-20A ve Üçlü Kuadropol Hibrid Lineer İyon Trap Kütle Spektrometre Sistemi
Dedektör	: Shimadzu SK/KS-8040 SK-KS/KS sistemi
İyonlaşma modu	: Elektro Sprey İyonizasyon (ESI), negatif iyonlaşma
Hareketli faz	: A (%1 asetik asit su içerisinde) B (%1 asetik asit metanol içinde)
Akış hızı	: 0.2 mL/dak

3.2.3. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

3.2.3.1. İndirgenme Gücünün Belirlenmesi

Ekstrenin demir (III)' ü indirgeme kapasitesi Oyaizu (1986) yöntemine göre yapıldı (155). 1 mL ekstre çözeltisi, 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ve 2.5 mL %1'lik potasyum hekzasiyanoferrat çözeltisi karıştırıldı. 50 °C' de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL %10' luk trikloroasetikasit (TCA) ilave edildi ve karışım 10 dakika santrifüj edildi. Sonrasında, 2.5 mL üst kısım, 2.5 mL su ve 0.5 mL %1'lik FeCl₃ ilave edilip karıştırılarak 700 nm'de absorbansları ölçüldü. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA, rozmarinik asit, askorbik asit ve gallik asit kullanıldı. Ekstrenin indirgeme gücü askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak verildi (156). Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

3.2.3.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrenin DPPH• radikalini süpürücü etkisi Gyamfi ve ark.'nın (1999) yöntemine göre yapıldı (157). Ekstre çözeltisi Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.4) ve 1mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH•) ile karıştırıldı. Karışım karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra absorbanslar 517 nm'de ölçüldü. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA, askorbik asit, rozmarinik asit ve gallik asit kullanıldı. IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri (Sigma Plot 2001 versiyon 7.0, SPSS Inc., Chicago IL) kullanılarak hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

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

3.2.3.3. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS^{•+}) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrenin ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkisi Re ve ark.'nın (1998) yöntemine göre yapıldı (158). ABTS^{•+} radikali (7 mM) ABTS' in sulu çözeltisi ile K₂S₂O₈ (2.45 mM, son konsantrasyon)'un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirildi ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm'de 0.700 (±0.030) olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltisi (10 µL) karıştırıldı ve

734 nm’de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks’a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplandı. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA, askorbik asit, rozmarinik asit ve gallik asit kullanıldı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

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

Ekstrenin antioksidan aktivitesi β -karoten soldurma deneyine göre yapıldı (159,160). Tween 20 (120 mg) ve linoleik asit (120 mg) tartıldı, kloroformla yıkanarak bir kaba alındı. Sonrasında bu kaba 1.2 mL β -karoten (1mg/mL kloroform içerisinde) eklendi ve karışımındaki kloroform rotavaporda uçurularak uzaklaştırıldı. 300 mL distile su eklenerek yavaşça karıştırıldı. Kontrol, standart ve örnekler eklenmeden aynı prosedürle hazırlandı. Kontrol ve örneklerin şahitleri ise aynı şekilde β -karotensiz olarak hazırlandı. Ekstreler, standartlar ve kontroller hazırlanan emülsiyonlarla beraber tüplere aktarıldı ve 470 nm’de ölçümleri yapıldı. Daha sonra tüplerdeki bu örnekler otooksidasyon için 50 °C’de 120 dakika su banyosunda bekletildi ve her 15 dakikada bir ölçüm yapılarak solma derecesi izlendi. Deneyler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı. AA% aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

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

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

Ekstrenin hidroksil radikalini süpürücü etkisi Aruoma ve ark. yöntemine (1997) göre yapıldı (161). Sığır beyin ekstresi (Bovine brain extract, Folch VII) 10 mM PBS (pH 7.4) ile karıştırıldı ve buz banyosu içerisinde şeffaf bir süspansiyon oluncaya kadar (5 mg/ mL fosfolipit lipozomu) ultrasonik banyoda bekletildi. 0.2 mL Lipozom, 0.5 mL PBS tamponu, 0.1 mL 1 mM FeCl₃ ve 0.1 mL ekstre çözeltisi karıştırıldı. Peroksidasyon reaksiyonunu hızlandırmak için 0.1 mL 1 mM askorbat çözeltisi ilave edildi. Karışım 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 50 µL %2’lik (a/h) butillenmiş hidroksi tolüen (etanol içerisinde), 1 mL % 2.8 (a/h) trikloroasetik asit ve 1 mL % 1 (a/h) 2-tiyobarbitürik asit (TBA, 0.05 M NaOH içerisinde) ilave edildi. Karışım 100°C’de su banyosunda 20 dakika ısıtıldı. Reaksiyon sonucunda oluşan (TBA)₂-MDA kromojenleri 2 mL *n*-butanolle ekstre edildi. Butanol fazlarının absorbansı 532 nm’de

ölçüldü. IC₅₀ değerleri nonlinear regresyon eğrileri (Sigma Plot 2001 version 7.0, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılarak hesaplandı. Deneyler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı. İnhibisyon yüzdeleri aşağıdaki formülle hesaplandı.

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

3.2.3.6. Demir (II) Şelat Aktivite

Demir (II) iyonlarının ekstre ile kelasyonu Carter (1971) yöntemine göre yapıldı (162). 200 µL ekstre çözeltisi, 100 µL 2.0 mM sulu FeCl₂ ve 900 µL metanol karıştırıldı. Reaksiyon karışımı 5 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon 400 µL 5.0 mM ferrozin çözeltisi ile hızlandırıldı. 10 dakika bekletildikten sonra absorbans 562 nm’de ölçüldü. Demir kelasyon aktivitesi kontrolün absorbansı (A_k) ve örnek absorbansı (A_ö) kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı ve Na₂EDTA’ya eşdeğer (mg_{Na2EDTA}/g_{örnek}) olarak verildi. Deneyler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

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

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

Deney Halliwell ve ark. (1987) yöntemine göre yapıldı (163). 100 µL eksre çözeltisi, 500 µL 5.6 mM 2-deoksiriboz (50 mM KH₂PO₄-NaOH tampon, pH 7.4 içerisinde), 200 µL önceden karıştırılmış 100 µL FeCl₃ ve 104 mM EDTA (1:1, h/h) çözeltisi, 100 µL 1.0 mM H₂O₂ ve 100 µL 1.0 mM sulu askorbik asit çözeltileri karıştırıldı. Karışım vortekslenip 50 °C’de 30 dakika inkübe edildi, 1 mL % 2.8 trikloroasetik asit ve 1 mL % 1.0 tiyobarbitürik asit eklenerek karışım tekrar 50 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Oluşan oksidasyon 532 nm’de ölçüldü. İnhibisyon yüzdesi kontrolün absorbansı (A_k) ve örnek absorbansı (A_ö) kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı. Deneyler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

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

3.2.3.8. Spesifik Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması

Ekstrenin spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını engelleme gücü, spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması deneyindeki yöntem kullanılarak hesaplandı. Sadece farklı olarak EDTA yerine tampon çözelti kullanıldı (163).

3.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü, hücrelerin *in vitro* ortamda büyütülmesi ve çoğaltılması işlemidir. Bu çalışmada RAW 264.7 (Abelson fare lösemi virüsü transforme edilmiş makrofaj hücre hattı) kullanıldı. Çalışmalar süresince bu hücreler +37 °C' de CO₂'li inkübatörde delikli kapaklı hücre kültür kapları içinde tutuldu ve düzenli olarak takip edilip besi yerleri iki gün ara ile değiştirilerek kültür sürdürüldü. Çoğalan hücrelerin bir kısmı dondurulup -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.4.1. RAW 264.7 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

RAW 264.7 hücreleri, +37 °C' de çözöldü. Hücrenin üzerine 5 mL PBS eklendi ve 20°C'de 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra hücre pelleti üzerine 5 mL kadar taze besiyeri eklenip yavaşca pipetleyerek homojenize edildi ve delikli hücre kültür kabına aktararak CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Çalışma süresince kullanılacak olan hücrelerin devamının sağlanması ve canlılığının korunması için pasajlar yapıldı.

3.2.4.2. RAW 264.7 Hücrelerinin Pasajı

Hücre pasajlama işlemi; flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücre dizilerini zarar vermeden, yüzeyden ısı ve tripsin yardımıyla kaldırıp sıvı içinde süspanse ederek başka ortamlara aktarma prensibine dayanır. Flask içerisinde kültüre edilen hücreler iki günlük inkübasyon süresi sonunda, 15 mL' lik ependorf tüplere aktarıldı ve 800 g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet, penisilin içeren yaklaşık 5 mL PBS (pH:7.3) tamponu içinde hücrelere zarar vermeyecek şekilde çözölüp, aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pellet önceden hazırlanmış besiyeri içinde çözölerek kültür kabına aktarıldı. Pasajlama

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

3.2.4.3. Hücre Dondurma ve Saklama

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

3.2.4.4. FCS’nin İnaktivasyonu

FCS, besiyerinin en önemli besin kaynağıdır. İnaktivasyon işlemi ile ısıya duyarlı komplement proteinler denatüre edildi. Ayrıca 0.22 µm’lik filtreden geçirilmelerine rağmen mikoplazma gibi mikroorganizmalar hala ortamda mevcut olabileceği için ısıyla gerçekleştirilen bu inaktivasyon prosesi sayesinde besiyeri kontaminasyon riski azalmış oldu. İnaktivasyon isleminde -20 °C’de muhafaza edilen FCS alınıp 37 °C’lik su banyosuna konuldu ve burada aralıklarla çalkalanarak erimesi sağlandı. Tamamen eridikten sonra 15 dakika kadar yine aralıklı olarak karıştırıldı ve FCS’nin sıcaklığının 37 °C’ye gelmesi beklenip su banyosunun sıcaklığı +56 °C’ye çıkarıldı. Beş dakika su banyosunu sıcaklığının +56 °C’ye gelmesi beklenip sıcaklık tamamen yükselince her 10 dakikada bir karıştırmak suretiyle yarım saat su banyosunda bekletildi süre sonunda steril tüplere bölünüp -20 °C’ye kaldırıldı.

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

Ekstrenin RAW 264.7 hücreleri üzerindeki sitotoksitesisi sulforhodamin B (SRB) kolorimetrik yöntemi ile belirlendi. Çalışmadan 24 saat önce flasttaki hücreler sayılarak 96 kuyucuklu mikropiğa kuyucuk başına 100 µL’ de 25000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonunda piğa yapışmış olan hücrelerin üstündeki besi yerleri atıldı. 7.81 µg/mL, 15.6 µg/mL, 31.25 µg/mL, 62.5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ve besi yerinde seyreltilen ekstreler kuyucuklara 100 µL eklendi. 37°C’de karbondioksitli etüvde 24 saat bekletildi. Süre

sonunda +4 °C’de bekletilen % 40’lık soğuk TCA çözeltisi kuyucuklara ilave edildi ve plak +4°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltılarak 5 defa 100 µL deiyonize su ile yıkandı. Kuyucuklar kurutulduktan sonra %1 asetik asit içinde hazırlanmış %0.4 SRB boyası kuyucuklara 50 µL eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kuyucuklar içeriği uzaklaştırıldıktan ve 5 defa %1 asetik asit çözeltisi ile yıkandıktan sonra kurutuldu, daha sonra 10 nM Tris bazı 100 µL eklenerek 5 dk çalkalayıcıda çalkalandı. Absorbanslar mikrolaka okuyucuda 492 nM’de ölçüldü (164). Deneyler 3 paralel çalışıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

3.2.5. Antienflamatuvar Etki

Birinci deney grubunda 1×10^6 sayıda kuyucuklara dağıtılan RAW 264.7 hücreleri 62.5 µg/mL ve 125 µg/mL konsantrasyonlarda ekstre ile 6 saat inkübe edildikten sonra 1 µg/mL konsantrasyonda LPS ile 24 saat inkübe edilerek enflamatuvar yanıt tetiklendi. İkinci deney grubunda ise 1×10^6 sayıda kuyucuklara dağıtılan RAW 264.7 hücreleri 62.5 µg/mL ve 125 µg/mL konsantrasyonlarda ekstre ve 1 µg/mL konsantrasyonda LPS ile aynı anda kuyucuklara eklenerek 24 saat inkübe edildi.

Kuyucuklardan toplanan süpernatant kısmı ile İnterlökin-1 beta (IL-1β), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin- 10 (IL-10), Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α) sitokin seviyelerinin ölçümü ve nitrik oksit deneyleri yapıldı.

3.2.5.1. Nitrik Oksit Deneyi

Nitrik oksit ölçümünde kullanılan birçok yöntem mevcuttur, bunlardan biri de Griess yöntemidir. Griess yöntemi, nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamit) diazotizasyonu ve N-(1-naftil)etilendiamin hidroklorit (NED) ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına dayanır (165). 0.2 gr $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 100 mL distile suda çözüldü. Üzerine 0.069 gr NaNO_2 eklendi. Standart eğri hazırlamak için 5, 10, 20, 40, 80, 100 µmol/L konsantrasyonlarda sodyum nitrit çözeltileri hazırlandı. Deney gruplarına ait 50 µL hacmindeki örneklerin üzerine 50 µL Griess reajanı ilave edildi, renk oluşumu için oda sıcaklığında 10 dakika beklendi. Farklı konsantrasyonda hazırlanan sodyum nitrit çözeltileri de 50 µL hacminde kuyucuklara eklendikten sonra Griess reajanı ilave edilerek inkübe edildi. Mikrolak okuyucuda 540 nm’de ölçüldü.

Örneklerdeki nitrit konsantrasyonu, standart sodyum nitrit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı (166).

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

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

-Kuyucuklar 400 μ L yıkama tamponu ile iki kez yıkandı.

-Standart kuyucuklarına 100 μ L farklı konsantrasyondaki standartlar, örnek kuyucuklarına 50 μ L örnek eklendi.

-Kuyucuklara 50 μ L Biotin-Konjugat eklenerek oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 400 rpm'de 2 saat inkübe edildi.

-Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

-Kuyucuklara 100 μ L dilüe Streptavidin-HRP eklenerek, plak orbital çalkalayıcıda 400 rpm'de 1 saat inkübe edildi.

- Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

-100 μ L 3,3',5,5' tetrametilbenzidin Substrat çözeltisi eklenerek plak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

-100 μ L stop çözeltisi eklenerek 450 nm'de absorbanlar okundu.

IL-1 β standardı 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.3 pg/mL, 15.6 pg/mL, 7.8 pg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak standart eğri çizdirildi ve doğru denkleminde örneklerdeki IL-1 β miktarları hesaplandı.

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

Sigma-Aldrich Mouse IL-10 (RAB0245-1KT) kit prosedürüne göre ölçüm yapıldı.

-Kullanmadan önce bütün reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.

-Standartlar ve örnekler kuyucuklara 100 μ L eklenerek plak kapatıldı ve 2.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

-Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

-100 μ L biotinlenmiş tanımlama antikoru eklenerek oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.

-Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

- Kuyucuklara 100 μ L Streptavidin-HRP eklenerek 45 dakika oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edildi.

-Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

-100 μ L Elisa kolorimetrik TMB reaktifi eklenerek 30 dakika karanlıkta orbital çalkalayıcıda inkübe edildi.

-50 μ L stop çözeltisi eklenerek 450 nm'de absorbanslar ölçüldü.

IL-10 standardı 5000 pg/mL, 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 312.5 pg/mL, 156.3 pg/mL, 78.13 pg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak standart eğri çizdirildi ve doğru denkleminde örneklerdeki IL-10 miktarları hesaplandı.

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

Sigma-Aldrich Mouse IL-6 (RAB0308) kit prosedürüne göre ölçüm yapıldı.

-Kullanmadan önce bütün reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.

-Standartlar ve örnekler kuyucuklara 100 μ L eklenerek plak kapatıldı ve 2.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

-Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

-100 μ L biotinlenmiş tanımlama antibody eklenerek oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi.

-Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

- Kuyucuklara 100 μ L Streptavidin-HRP eklenerek 45 dakika oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edildi.

-Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

-100 μ L Elisa kolorimetrik TMB reaktifi eklenerek 30 dakika karanlıkta orbital çalkalayıcıda inkübe edildi.

-50 μ L stop çözeltisi eklenerek 450 nm'de absorbanslar ölçüldü.

IL-6 standardı 600 pg/mL, 200 pg/mL, 66.7 pg/mL, 22.2 pg/mL, 7.4 pg/mL, 2.5 pg/mL, 0.82 pg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak standart eğri çizdirildi ve doğru denkleminde örneklerdeki IL-6 miktarları hesaplandı.

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

eBioscience Mouse TNF- α (BMS 607/3) kit prosedürüne göre ölçüm yapıldı.

-Kuyucuklar 400 μ L yıkama tamponu ile iki kez yıkandı.

-Bütün kuyucuklara 50 μ L örnek dilüsyon çözeltisi eklendi.

-Standart kuyucuklarına 50 μ L farklı konsantrasyondaki standartlar, örnek kuyucuklarına 50 μ L örnek eklendi.

-Kuyucuklara 50 μ L Biotin-Konjugat eklenerek oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 400 rpm'de 2 saat inkübe edildi.

-Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 6 kez yıkandı.

-Kuyucuklara 100 μ L dilüe Streptavidin-HRP eklenerek, plak oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 400 rpm'de 1 saat inkübe edildi.

- Kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 6 kez yıkandı.

-100 μ L TMB Substrat çözeltisi eklenerek plak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

-100 μ L stop çözeltisi eklenerek 450 nm'de absorbanslar okundu.

TNF- α standardı 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.3 pg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak standart eğri çizdirildi ve doğru denkleminde örneklerdeki TNF- α miktarları hesaplandı.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. İkili gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenler için bağımsız iki örneklem t testi uygulandı. İki den

fazla gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Dunnett testi ve Tukey testi uygulandı. Veriler R Studio 3.2.2 programı ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. EKSTRENİN HAZIRLANIŞI, İÇERİK ANALİZLERİ

4.1.1. Ekstrenin Hazırlanışı

Potentilla recta L. bitkisinin kurutulmuş toprak üstü kısımları kabaca toz edilip, %70'lik metanol ile çalkalamalı su banyosunda, 24'er saat süreyle 3 kez masere edildi. Ekstreler süzülüp birleştirildikten sonra vakum altında rotavaporda (37 °C) yoğunlaştırıldı ve sonrasında liyofilize edildi. Ekstre analiz anına kadar -18 °C'de saklandı. Ekstreye ait verim Tablo 4.1'de görüldüğü gibi % 20.5'dir.

4.1.2. Toplam Fenol, Flavonoit ve Flavonol Miktar Tayini

Ekstrenin toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları deneysel çalışma kısmında verilen yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Toplam fenol miktarı gallik asite, toplam flavonoit miktarı kateşine ve toplam flavonol miktarı ise rutine eşdeğer olarak hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

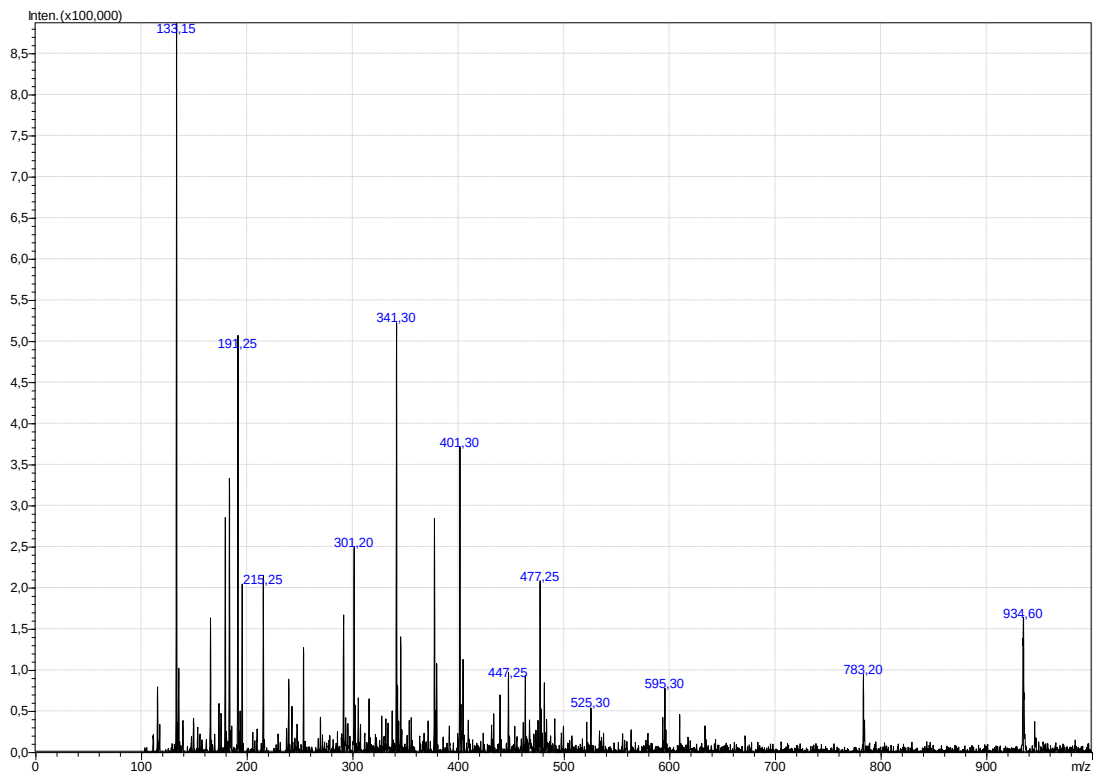
Tablo 4.1. Ekstre verimi, toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları

Ekstre	Verim [%]	Toplam Fenol [mg _{GAE} /g _{ekstre}]	Toplam Flavonoit [mg _{CA} /g _{ekstre}]	Toplam Flavonol [mg _{RE} /g _{ekstre}]
Pr70	20.5	185.85 ± 6.51	43.46 ± 1.48	54.14 ± 0.88

*Ortalama ± SD; Pr70 : %70'lik metanol ekstresi

4.1.3. Sıvı kromatografisi Kütle-Spektrometresi (SK-KS/KS) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

Ekstrenin kimyasal içeriği SK-KS/KS sistemi kullanılarak, oluşan moleküler iyon pikleri ve temel pikler üzerinden değerlendirildi. *P. recta* ekstresinin toplam iyon spektrumu [E(-) Q3 scan modu] Şekil 4.1’de, ekstrede tanımlanan bileşikler Tablo 4.2 ‘de verilmiştir.

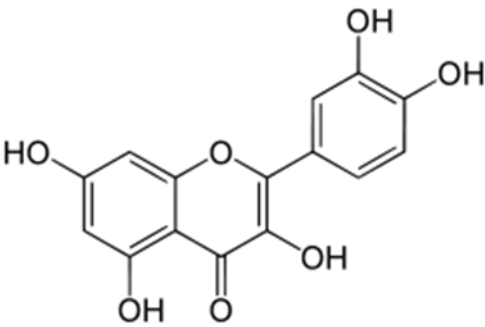
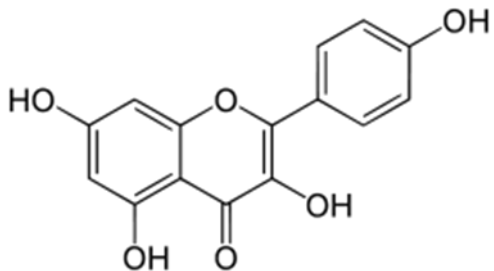
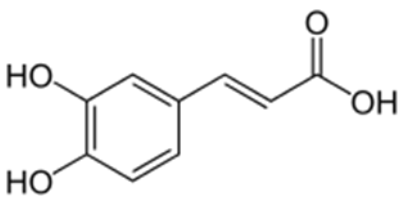
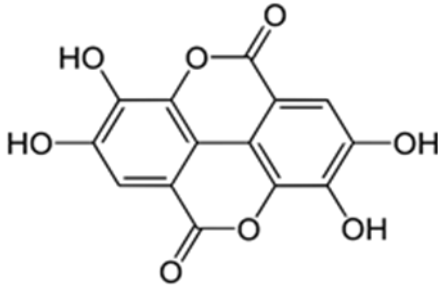
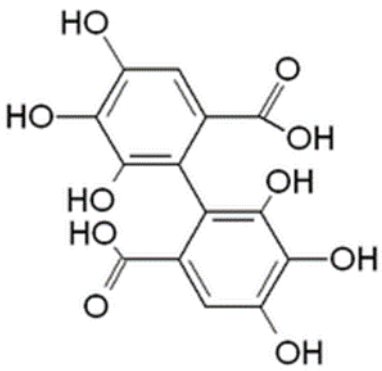
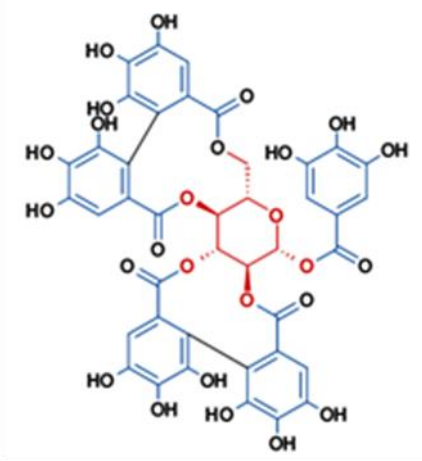


Şekil 4.1. *P. recta* ekstresinin toplam iyon spektrumu [E(-) Q3 scan modu]

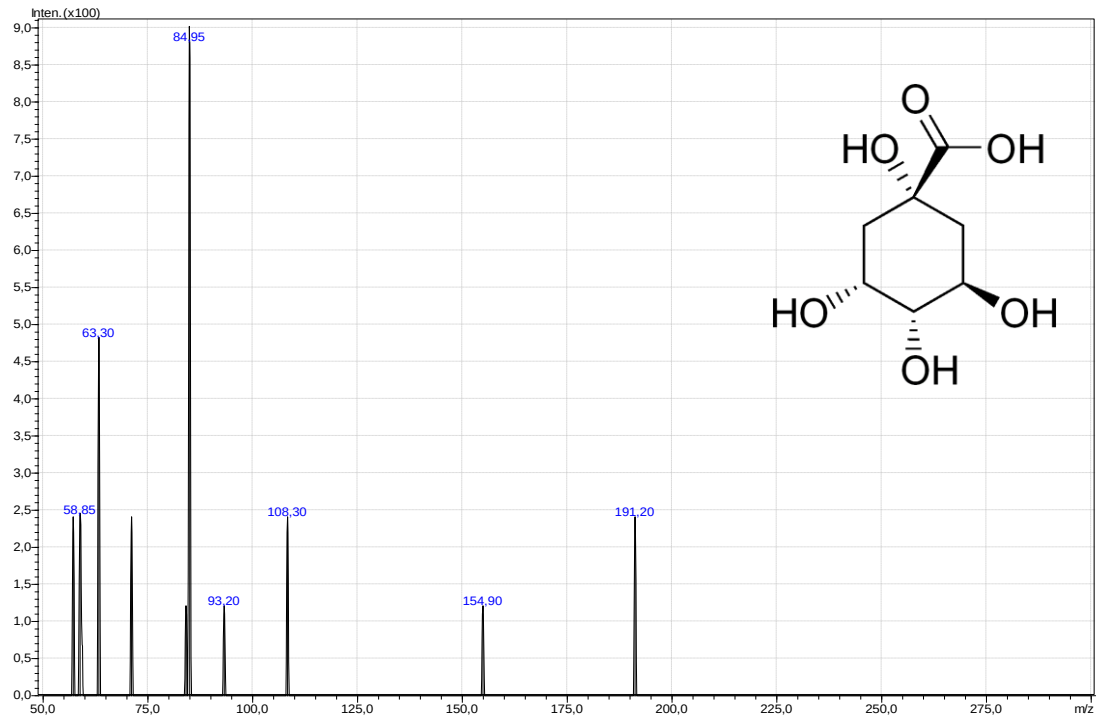
Tablo 4.2. *P. recta* ekstresinde SK-KS/KS ile tanımlanan bileşikler

MA	[M-H] ⁻ m/z	Madde	% miktar*	Kaynak
192	191, (85)	Kinik asit	7.40	74
302	301, (199, 145)	Elajik asit	3.75	167
342	341, (179, 119)	Kafeik asit türevi	7.86	74
448	447, (284, 255)	Kemferol glikozit	1.37	74,167
478	477, (301, 135)	Kersetin glukronit	3.12	74,167
596	595, (301)	Kersetin türevi	1.17	74,167
784	783, (301, 275)	Bis-HHDP glukoz	1.43	92,167
935	934, (633, 301)	Potentilin	2.46	167

*yüzdelere SK-KS/KS ile alınan toplam iyon spektrumundaki relatif değerlerdir; MA: molekül ağırlığı

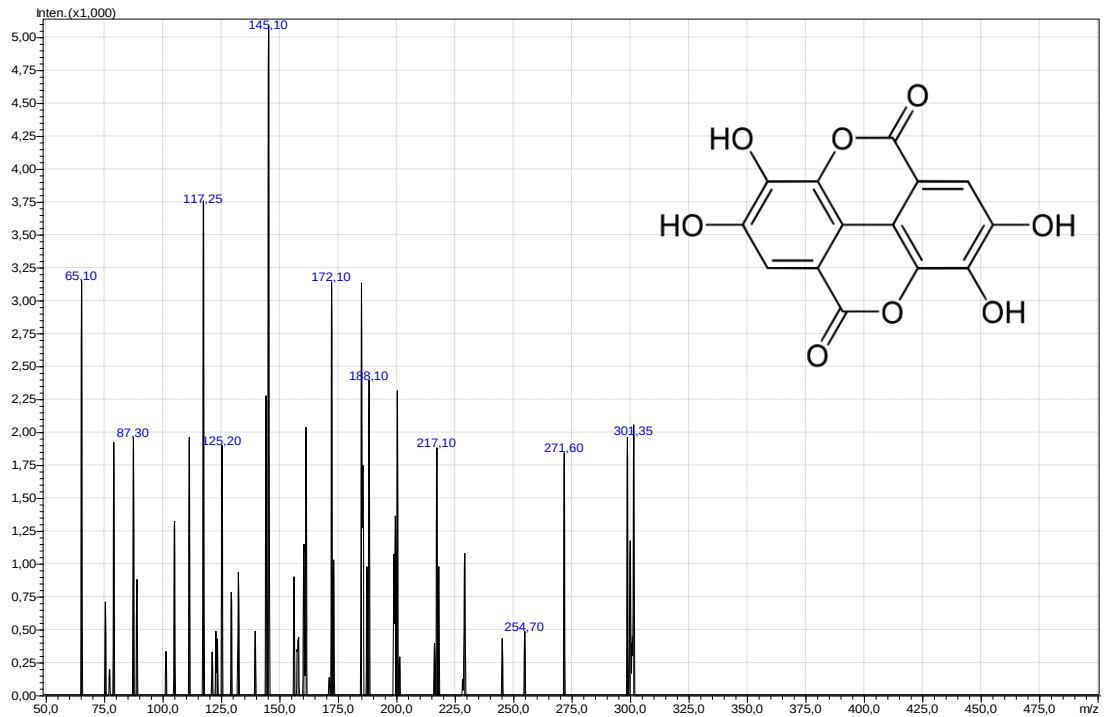
 kersetin	 kemferol
 kafeik asit	 elajik asit
 HHDP	 Potentilin

Şekil 4.2. *Potentilla recta* bileşimindeki fenolik maddelerin kimyasal formülleri



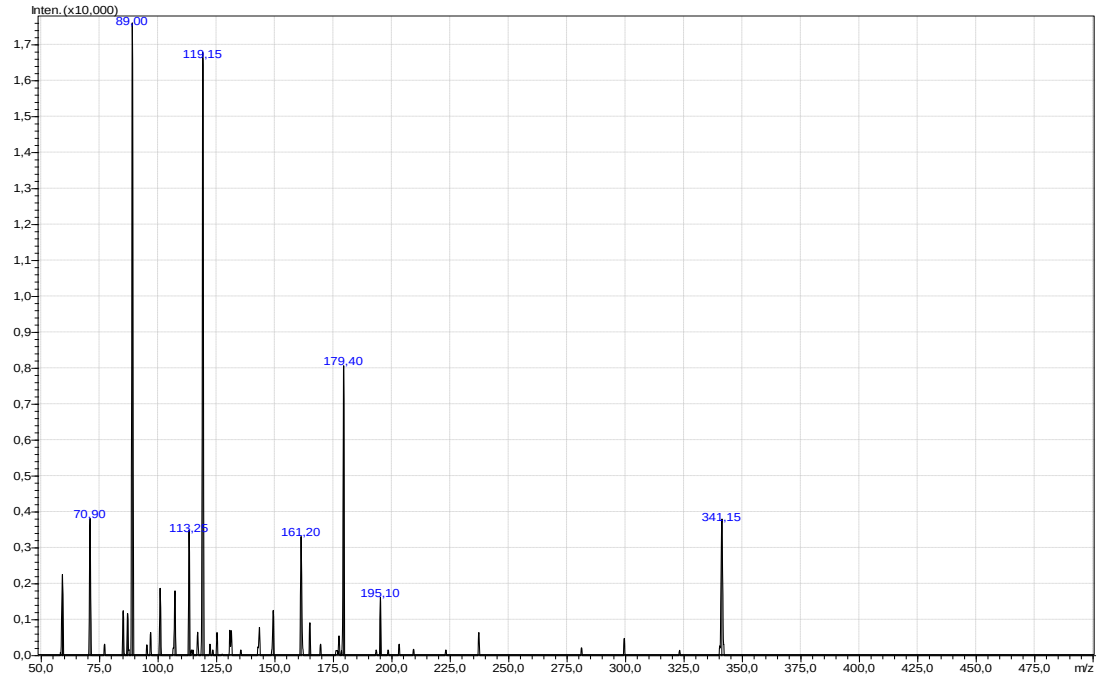
Şekil 4.3. 191 $[M-H]^-$ iyonunun spektrumu [Kinik asit]

Spektrumda görülen m/z 191 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikine sahip bileşik kinik asit olarak tanımlandı (74).



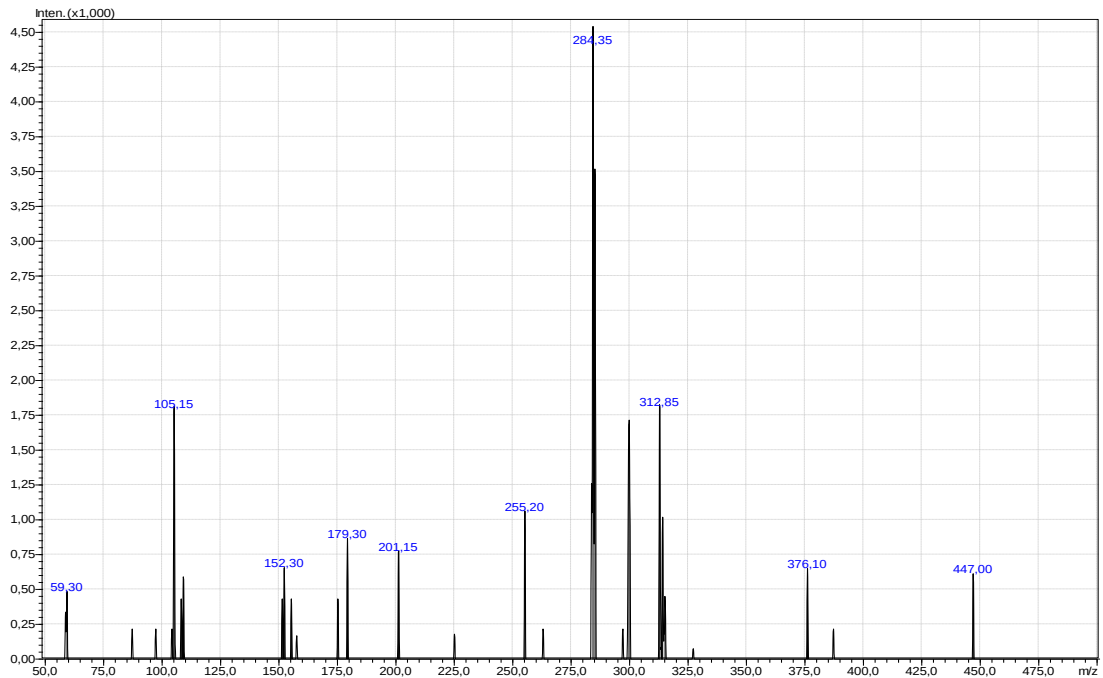
Şekil 4.4. 301 $[M-H]^-$ iyonunun spektrumu [Elajik asit]

Spektrumda görülen m/z 301 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikine sahip bileşik elajik asit olarak tanımlandı (167).



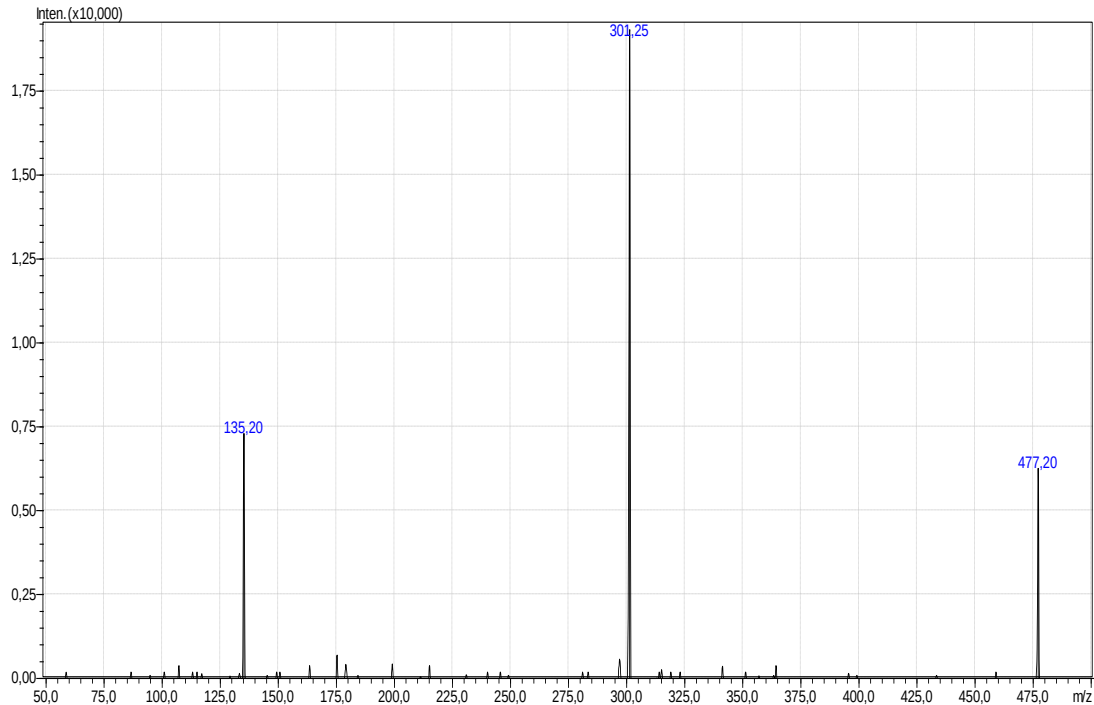
Şekil 4.5. 341 $[M-H]^-$ iyonunun spektrumu [Kafeik asit türevi]

Spektrumda görülen m/z 341 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikine ve m/z 179 $[M-H]^-$ (kafeik asit) pikine sahip molekül üzerinde yapılan incelemede molekülün bir kafeik asit türevi olduğu anlaşılmıştır (74).



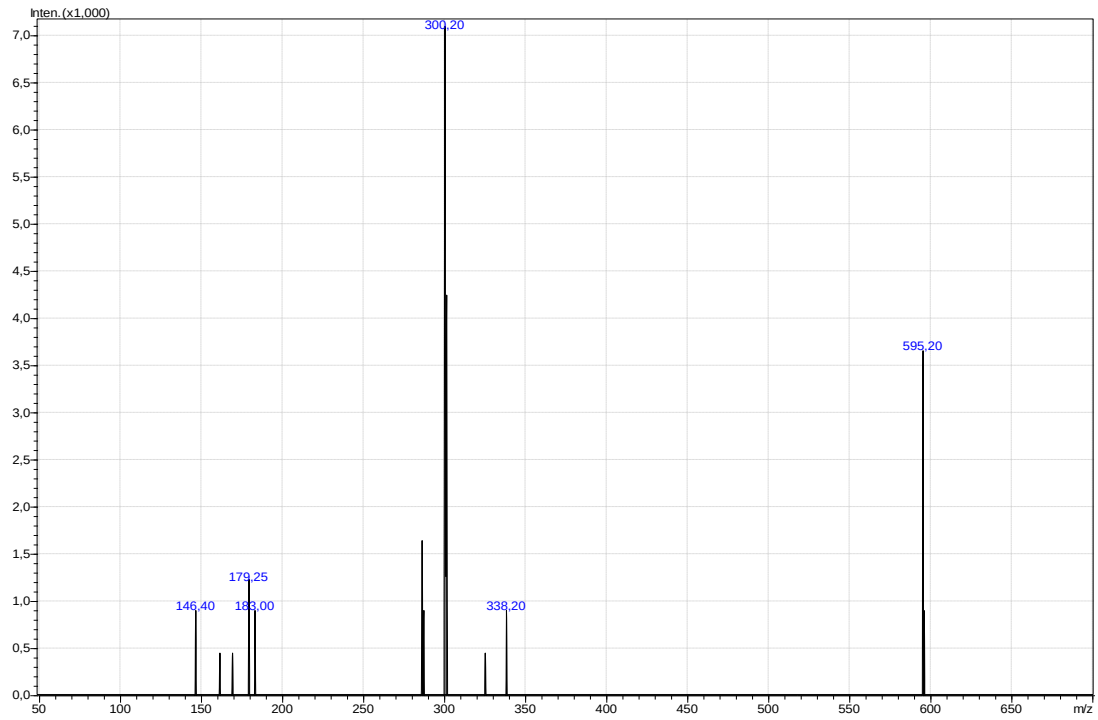
Şekil 4.6. 447 $[M-H]^-$ iyonunun spektrumu [Kemferol glikozit]

m/z 447 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikli ve m/z 255 $[M-H]^-$ (kemferol) parçalanma ürünü molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu m/z 255 $[M-H]^-$ parçalanmasının ana molekülden bir şeker kopması ile oluştuğu düşünülmüştür. Bu durumda molekül kemferol glikozit olarak tanımlanmıştır (74, 167).



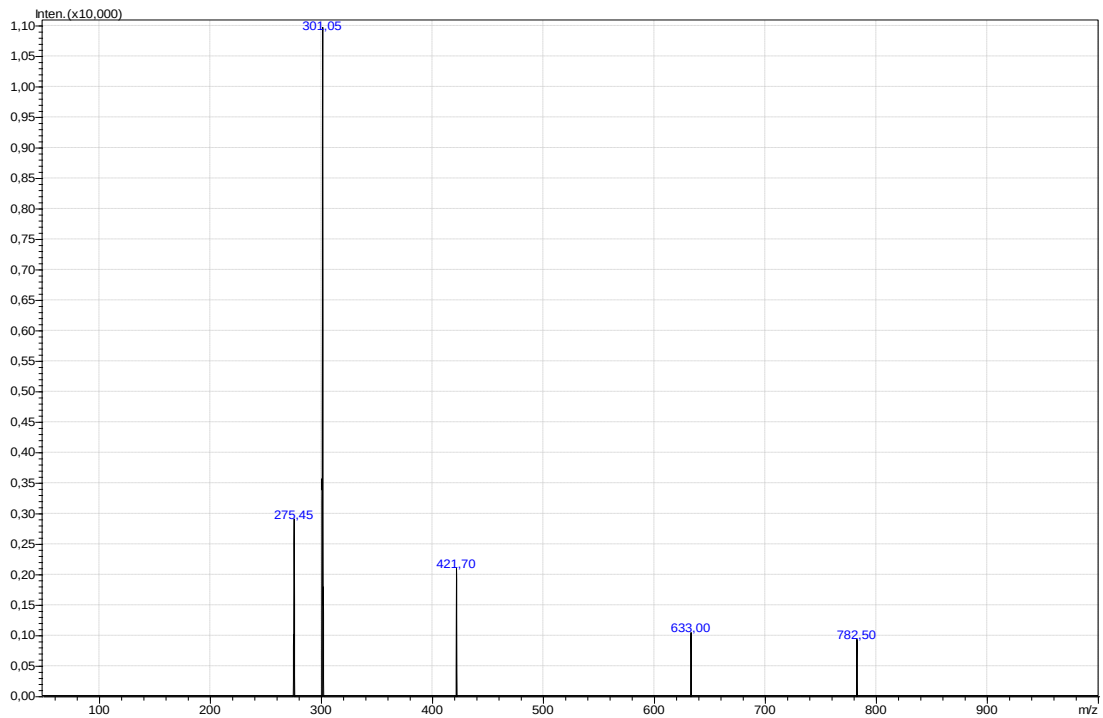
Şekil 4.7.. 477 $[M-H]^-$ iyonunun spektrumu [Kersetin glukronit]

Glukuronik asitin flavonoidler ile yaptığı esterler sonucu flavonoid glukronitler oluşmaktadır ve bu grup moleküllerde moleküler iyon pikli ve temel pik arasında karakteristik olarak 176 amu (glukuronik asit – H_2O) fark görülmektedir. m/z 477 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikli ve m/z 301 $[M-H]^-$ (kersetin) pikine sahip madde üzerinde yapılan incelemede molekülün kersetin glukronit olduğu anlaşılmıştır (74,167).



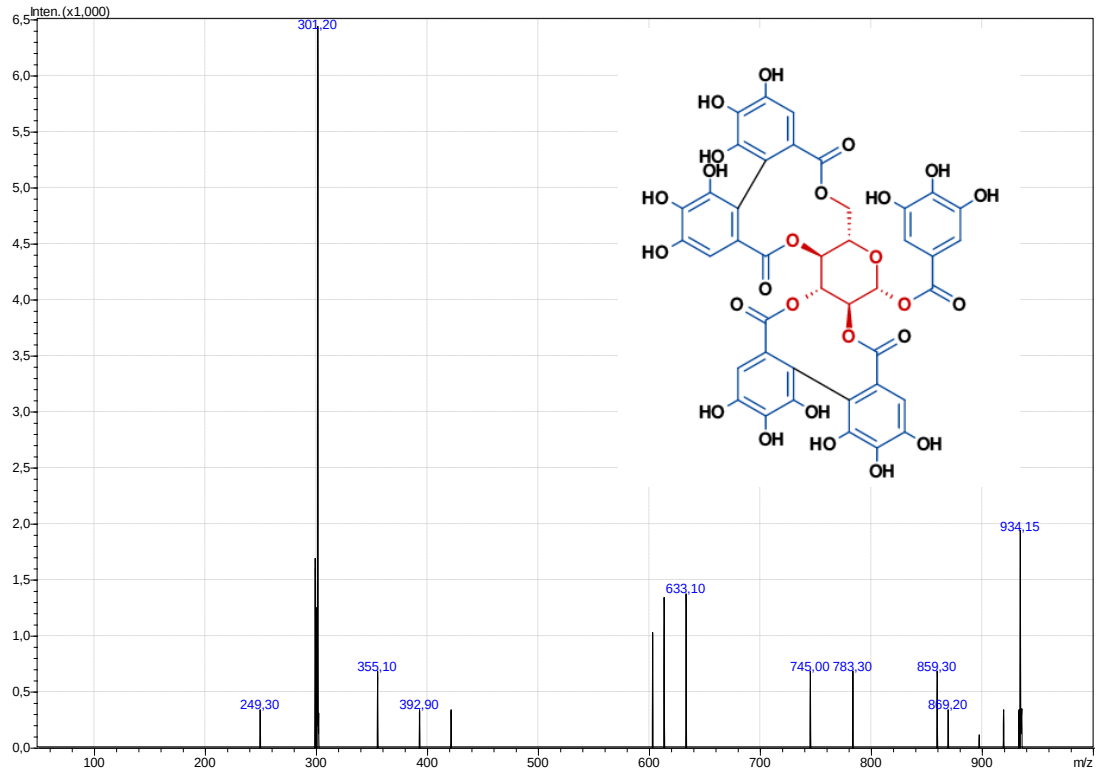
Şekil 4.8. 595 [M-H]⁻ iyonunun spektrumu [Kersetin türevi]

m/z 595 [M-H]⁻ moleküler iyon pikli ve m/z 301 [M-H]⁻ (kersetin) temel pikine sahip madde üzerinde yapılan incelemede molekülün bir kersetin türevi olduğu anlaşılmıştır (74,167).



Şekil 4.9. 783 [M-H]⁻ iyonunun spektrumu [Bis-HHDP glukoz]

m/z 783 [M-H]⁻ moleküler iyon pikli ve m/z 301 [M-H]⁻ (-HHDP glukoz) temel pikine sahip madde üzerinde yapılan incelemede molekülün bis-HHDP glukoz olduğu anlaşılmıştır (92,167).



Şekil 4.10. 934 [M-H]⁻ iyonunun spektrumu [Potentilin]

m/z 934 [M-H]⁻ moleküler iyon pikli ve m/z 633 [M-H]⁻ pikine sahip madde üzerinde yapılan incelemede molekülün potentilin olduğu anlaşılmıştır (167).

4.2. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

4.2.1. İndirgenme Gücünün Belirlenmesi

Deney, ortamdaki indirgen maddenin, Fe⁺³ iyonlarını Fe⁺² iyonlarına indirgemesi ve FeCl₃ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansının ölçülmesi esasına dayanır. Antioksidan aktivite ile maddelerin indirgeme güçleri arasında genellikle doğrusal bir bağlantı vardır. Bu nedenle indirgeme kapasitesinin belirlenmesi o maddenin antioksidan aktivitesi hakkında bilgi verir. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir. *P. recta* bitkisinden elde edilen ekstre ve standartların demiri indirgeme kapasiteleri incelendi ve sonuçlar Tablo 4.3 ve Şekil 4.11' de verildi. Burada verilen sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplandı.

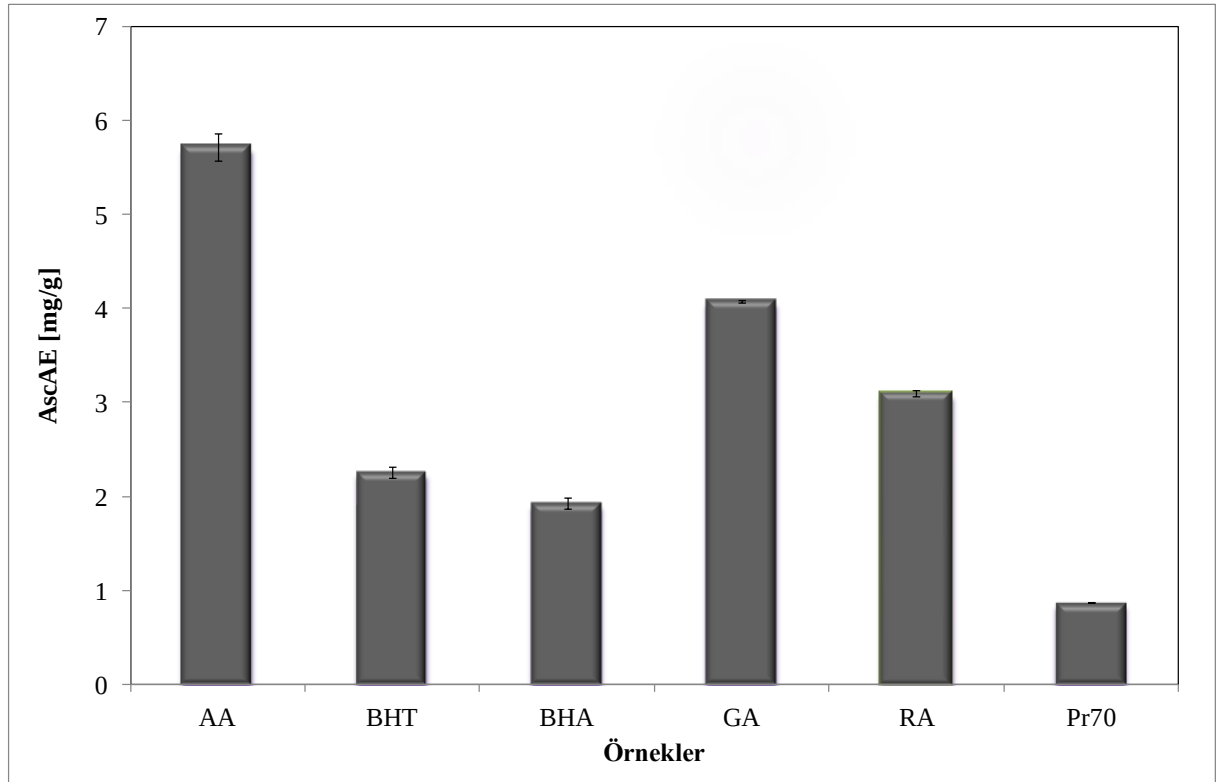
P. recta'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrenin demir (III)'ü indirgeme gücü pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA, rosmarinik asit ve gallik asit kadar yüksek bulunmamıştır.

Tablo 4.3. *P. recta* ekstresinin ve standartların demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasiteleri

Değişken	Örnekler						p
	BHT (n=3)	BHA (n=3)	AA (n=3)	GA (n=3)	RA (n=3)	Pr70 (n=3)	
AscAe mmol/g	2.26±0.05*	1.93±0.06*	5.72±0.10*	4.08±0.01*	3.10±0.03*	0.87±0.00	<0.001

*İlgili satır için Pr70 ekstresi ile farklılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

AscAe mmol/g değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda AscAe mmol/g değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Pr70 ekstresinin GA, RA, AA, BHT, BHA gruplarından anlamlı düzeyde ($p<0.001$) düşük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.11. *P. recta* ekstresinin ve standartların demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasiteleri (AA: Askorbik asit, BHT: Butil hidroksi toluen, BHA: Butil hidroksi anisol, GA: Gallik asit, RA: Rozmarinik asit, Pr70: %70'lik metanol ekstresi)

4.2.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

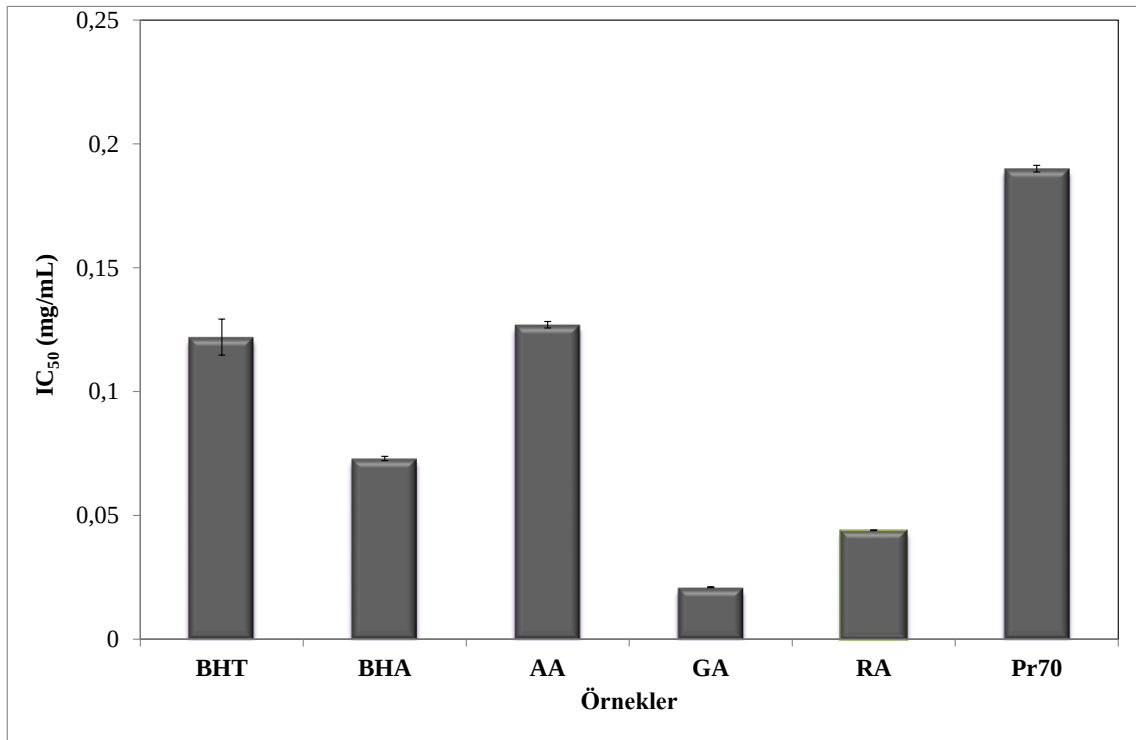
Deney, antioksidanların azot merkezli kararlı bir serbest radikal olan DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeyi amaçlamaktadır. IC₅₀ değeri, radikalın % 50'sini süpürmek için gerekli konsantrasyon olarak tanımlanır. Absorbansın düşmesi, yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Ekstrenin IC₅₀ değeri hazırlanan doğrusal olmayan eğriler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Ekstre DPPH[•] radikalini fizyolojik pH'da konsantrasyona bağlı olarak süpürmüştür. Bununla beraber, ekstrenin süpürücü etkisinin pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA, gallik asit ve rosmarinik asit kadar yüksek olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 4.4. *P. recta* ekstresi ve standartların DPPH[•] radikalini süpürücü etkileri

Değişken	Örnekler						p
	BHT (n=3)	BHA (n=3)	AA (n=3)	GA (n=3)	RA (n=3)	Pr70 (n=3)	
IC ₅₀ mg/mL	0.12±0.01*	0.07±0.00*	0.13±0.00*	0.02±0.00*	0.04±0.00*	0.19±0.00	<0.001

*İlgili satır için Pr70 ekstresi ile farklılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

IC₅₀ mg/mL değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda IC₅₀ mg/mL değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Pr70 ekstresinin IC₅₀ değerinin GA, RA, AA, BHT, BHA gruplarından anlamlı düzeyde (p<0.001) yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.12. *P. recta* ekstresi ve standartların DPPH• radikalini süpürücü etkileri (AA: Askorbik asit, BHT: Butil hidroksi tolüen, BHA: Butil hidroksi anisol, GA: Gallik asit, RA: Rozmarinik asit, Pr70: %70'lik metanol ekstresi)

4.2.3. 2,2'- azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS⁺) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

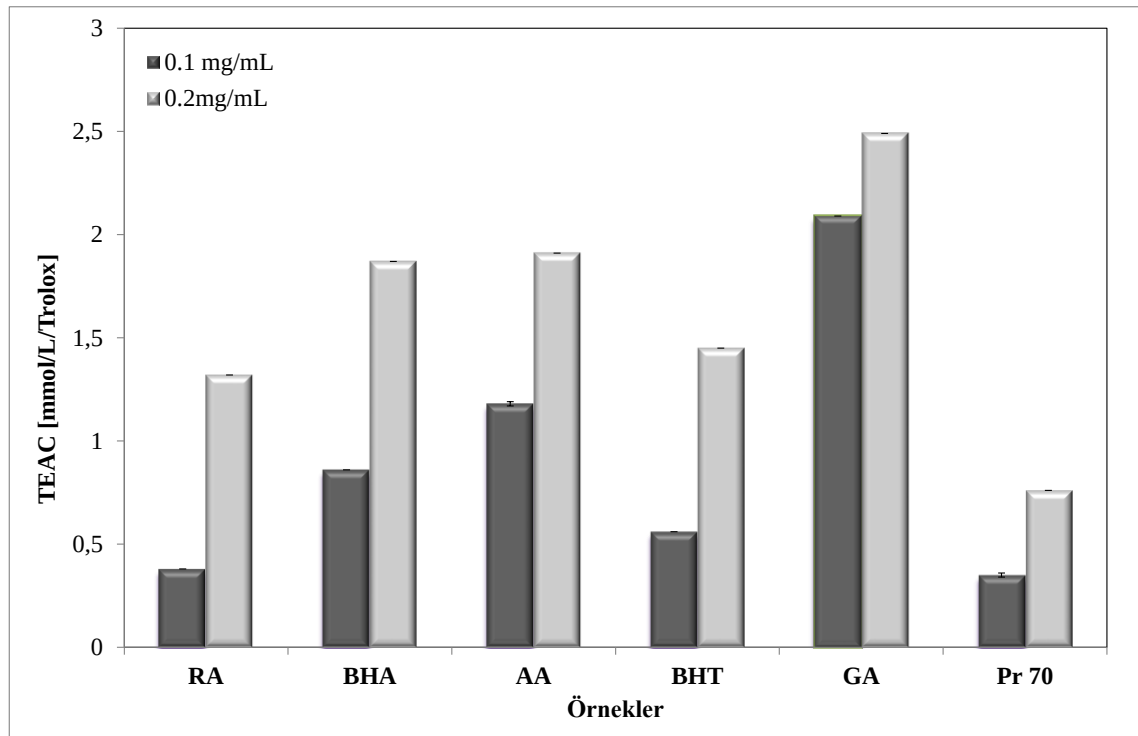
Deney yeşil renkli bir bileşik olan ABTS⁺ radikal katyonu kullanılarak, antioksidan madde miktarlarının spektroskopik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile; flavonoidler, hidroksisinnamik asitler, karotenoidler gibi hidrofilik ve lipofilik antioksidanların ölçümü yapılabilmektedir. Ekstrenin ABTS⁺ radikalini süpürücü etkisi değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.5 ve Şekil 4.13'de verilmiştir. Ekstre ve tüm standartlar 2 farklı konsantrasyonda analiz edilmiştir. Ekstrenin süpürücü etkisinin 0.2 mg/mL konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA, gallik asit ve rozmarinik asit kadar yüksek olmadığı, 0.1 mg/mL konsantrasyonda sadece rozmarinik asitten yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.5. *P. recta* ekstresinin ve standartların ABTS⁺ radikalini süpürücü etkileri

Konsantrasyon	Örnekler						p
	BHT (n=3)	BHA (n=3)	AA (n=3)	GA (n=3)	RA (n=3)	Pr70 (n=3)	
0,1 mg/mL (18)	0.55±0.01*	0.86±0.01*	1.18±0.01*	2.09±0.02*	0.37±0.01*	0.41±0.02	<0.001
0,2 mg/mL (18)	1.45±0.01*	1.87±0.01*	1.91±0.00*	2.49±0.01*	1.32±0.00*	0.76±0.04	<0.001
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

*İlgili satır için Pr70 ekstresi ile farklılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

TEAC değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda TEAC değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Pr70 ekstresinin 0.2 mg/mL konsantrasyonda GA, RA, AA, BHT, BHA gruplarından anlamlı düzeyde ($p<0.001$) düşük olduğu, 0.1 mg/mL konsantrasyonda ise BHT, BHA, AA, GA gruplarından anlamlı düzeyde ($p<0.001$) düşük, RA grubundan anlamlı düzeyde ($p<0.001$) yüksek olduğu bulunmuştur. Ekstre ve tüm standartların yüksek konsantrasyonda ABTS⁺ radikalini süpürücü etki bakımından daha aktif oldukları gözlenmiştir.



Şekil 4.13. *P. recta* ekstresinin ve standartların ABTS⁺ radikalini süpürücü etkileri (AA: Askorbik asit, BHT: Butil hidroksi toluen, BHA: Butil hidroksi anisol, GA: Gallik asit, RA: Rozmarinik asit, Pr70: %70'lik metanol ekstresi)

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

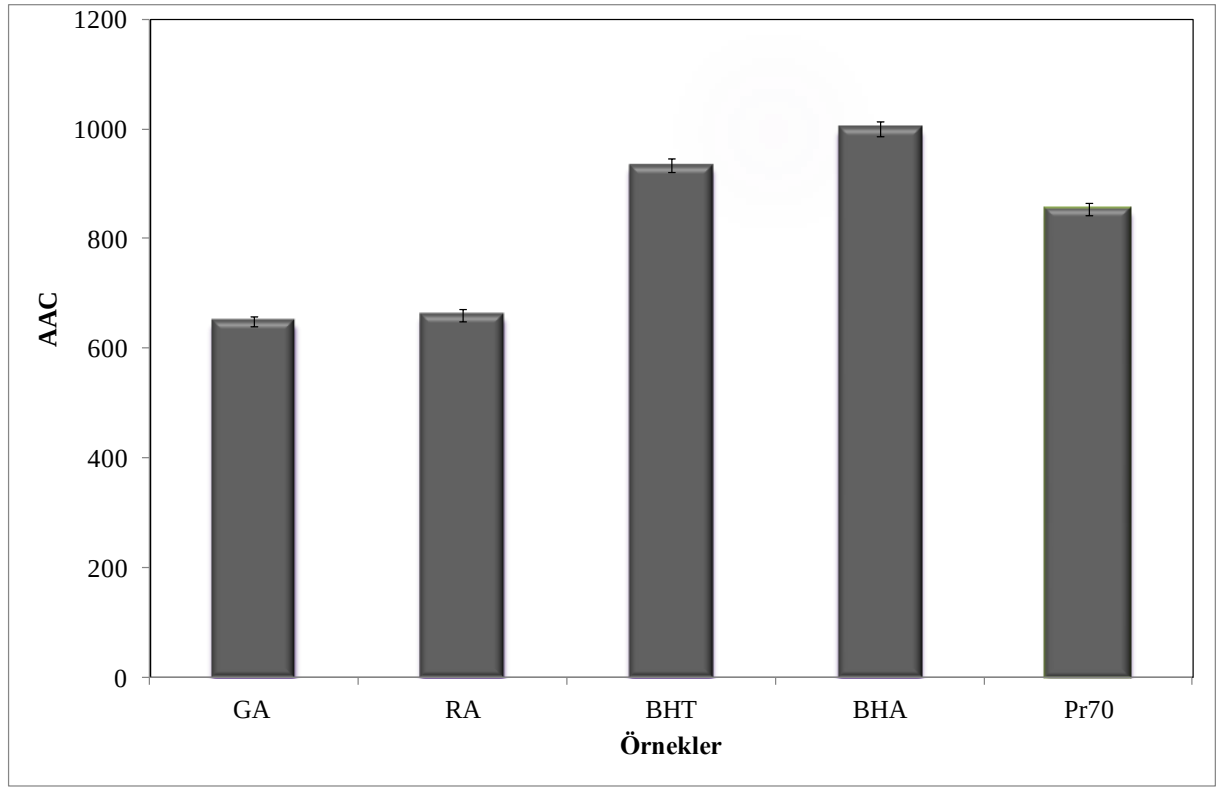
β -karoten/linoleik asit soldurma deneyi özellikle hücre duvarındaki ve gıdalardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun tanımlanmasında sıklıkla kullanılır. Hücre membranında bulunan lipitler linoleik asit ve araşidonik asit gibi oksidasyona oldukça müsait doymamış yağ asitleri bakımından zengindirler. Bu yüzden doymamış yağ asitleri içeren deney ortamlarının kullanılması önemlidir. Linoleik asitten bir hidrojen çıkması ile oluşan serbest radikalın yüksek konjugasyona sahip β -karotene hücum etmesi sonucu renk açılır. Ekstrenin β -karotenin renginin açılmasını inhibe etmesi veya geciktirmesi serbest radikal süpürücü etkiyi düşündürür. *P. recta* ekstresinin β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu engelleme derecesi Tablo 4.6 ve Şekil 4.14’de verilmiştir. % 70’lik metanol ekstresi gallik asit ve rozmarinik asit standartlarından daha yüksek aktivite göstermiştir.

Tablo 4.6. *P.recta* ekstresi ve standartların β -karoten/linoleik asit peroksidasyonuna etkileri

Değişken	Örnekler					p
	BHT (n=3)	BHA (n=3)	GA (n=3)	RA (n=3)	Pr70 (n=3)	
AAC	933.23±1.25*	987.55±1.33*	639.13±0.88*	661.42±1.10*	857.62±1.14	<0.001

*İlgili satır için Pr70 ekstresi ile farklılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

AAC değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda AAC değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Pr70 ekstresinin GA, RA gruplarından anlamlı düzeyde ($p<0.001$) yüksek, BHT ve BHA gruplarından ise anlamlı düzeyde ($p<0.001$) düşük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.14. *P.recta* ekstresinin ve standartların β -karoten/linoleik asit peroksidasyonuna etkileri (BHT: Butil hidroksi toluen, BHA: Butil hidroksi anisol, GA: Gallik asit, RA: Rozmarinik asit, Pr70: %70'lik metanol ekstresi)

4.2.5. Askorbat –Fe (III) Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu

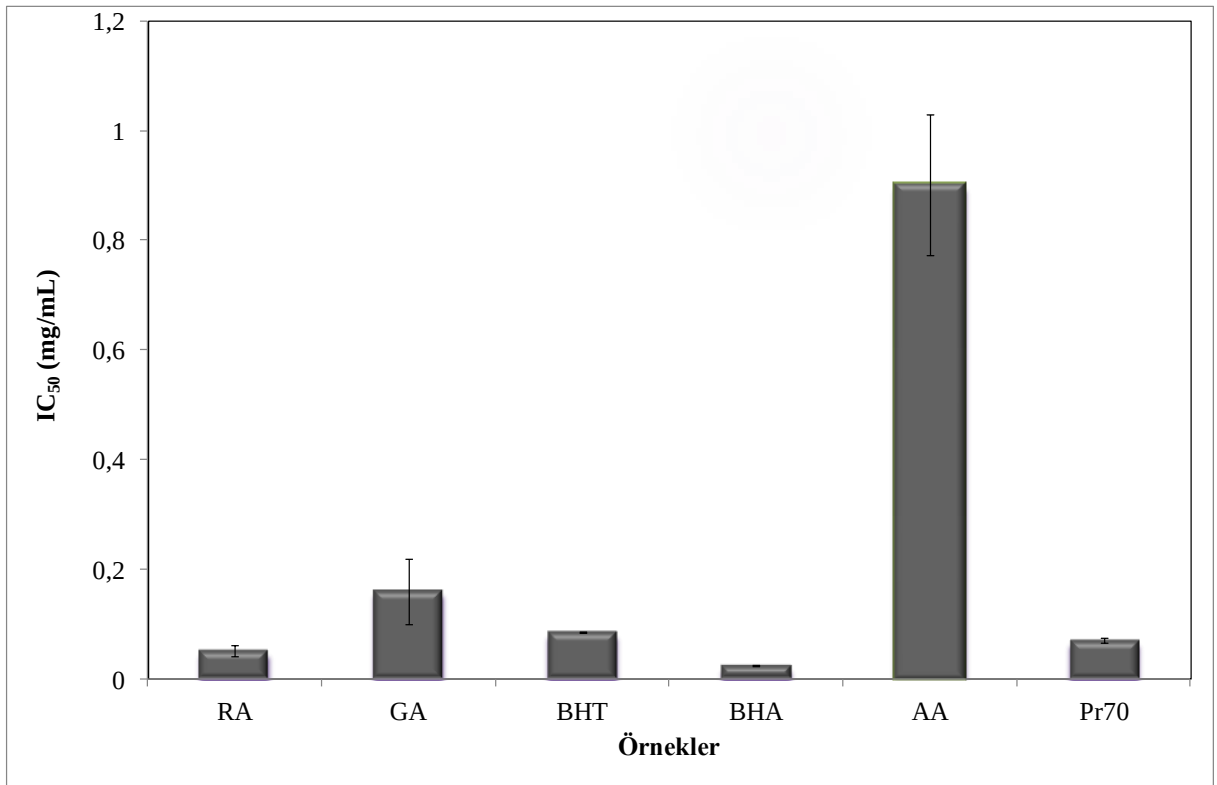
Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin fosfolipitler biyolojik olarak önemli moleküllerdir ve hidroksil radikali kaynaklı bozulmaya açıktırlar. Deneyde, sığır beyninden elde edilen fosfolipit lipozomlar hızla hidroksil kaynaklı peroksidasyona tabi tutulmuş, MDA ve benzer aldehitlerin oluşumu sağlanmıştır. Oluşan bu reaktif aldehitler TBA ile reaksiyona sokularak oluşan pembe renk 532 nm'de ölçülmüştür. Oluşan renk şiddeti reaktif aldehit miktarı ile doğru orantılıdır ve antioksidan maddeler hidroksil radikalini süpürerek ve TBA-reaktif türlerinin oluşumunu engelleyerek etki gösterirler. Tablo 4.7 ve Şekil 4.15' de görüldüğü gibi ekstre standart olarak kullanılan askorbik asitten daha yüksek aktivite göstermiştir.

Tablo 4.7. *P. recta* ekstresinin ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu

Değişken	Örnekler						p
	BHT (n=3)	BHA (n=3)	AA (n=3)	GA (n=3)	RA (n=3)	Pr70 (n=3)	
IC ₅₀ mg/mL	0.09±0.00	0.02±0.00	0.90±0.13*	0.16±0.06	0.05±0.01	0.07±0.00	<0.001

*İlgili satır için Pr70 ekstresi ile farklılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

IC₅₀ mg/mL değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda IC₅₀ mg/mL değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Pr70 ekstresinin AA grubundan anlamlı düzeyde (p<0.001) düşük olduğu, BHT, BHA, GA ve RA'dan anlamlı bir farklılığı olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.15. *P. recta* ekstresinin ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu (AA: Askorbik asit, BHT: Butil hidroksi toluen, BHA: Butil hidroksi anisol, GA: Gallik asit, RA: Rozmarinik asit, Pr70: %70'lik metanol ekstresi)

4.2.6. Demir (II) Şelat Aktivite

Fe, normal fizyolojik fonksiyonlar için gerekli bir element olmasına rağmen, Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşturarak son derece reaktif ve sitotoksik türlerin oluşmasında katalitik bir rol oynayabilir. Bu durum göz önüne alındığında hücreler, Fe'i

bu tür etkileşimlerden korumak için, Fe'nin taşınması ve depolanması için tasarlanmış proteinler ve hücre içi Fe-havuzunu korumak için geliştirilmiş mekanizmalar da dahil olmak üzere, koruyucu araçlar geliştirmişlerdir. Bu araçlara rağmen, iskemi / reperfüzyon hasarı gibi bazı patolojik koşullar, Fe'i proteinlerden serbest bırakarak ve sitoplazmada Fe'in serbest bulunabilirliğini arttırarak Fe ile ilgili toksisiteye neden olabilirler. Fe, DNA'ya ve proteinlere nonspesifik olarak bağlanabildiğinden, ortaya çıkan hasar, serbest radikal süpürücüler tarafından kolayca önlenemez. Dolayısıyla, bir antioksidanın, bu gibi zararlı reaksiyonlara katılmadan önce geçiş metallerini şelatlama ve hareketsiz kılma kabiliyetinin olması önemlidir. Metal şelatlama aktivitesi ferrozinin, Fe^{+2} ile kantitatif olarak kompleks oluşturması esasına dayanır. Fe^{+2} iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşikler yarışır. Şelatlama gücü yüksekse Fe^{+2} /ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir. Ekstrenin demir (II) iyonlarının şelasyonuna etkisi incelendi ve ekstrenin aktivitesi 10 mg/mL'den büyük bulundu.

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

Deney, Fenton reaksiyonu ile üretilen hidroksil radikalının deoksiriboza atak yapması ve parçalaması sonucu oluşan bozunma ürünlerinin düşük pH ve sıcaklık etkisiyle TBA ile reaksiyona girmesi ve pembe renk oluşturması esasına dayanır. Tablo 4.8 görüldüğü gibi ekstre ile standart olarak kullanılan askorbik asit arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

Tablo 4.8. *P. recta* ekstresinin ve standartın spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasına etkisi

	Örnekler		<i>p</i>
	AA (<i>n</i> =3)	Pr70 (<i>n</i> =3)	
IC ₅₀ mg/mL	0.81±0.12	0.62±0.03	0.053

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

IC₅₀ mg/mL değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Pr70 ekstresinin AA grubundan anlamlı düzeyde farklı olmadığı gözlenmiştir.

4.2.8. Spesifik Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması

Ekstrenin spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını engelleme gücü deneyi, spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını engelleme gücü deneyindeki aynı prosedürle yapıldı, sadece EDTA yerine tampon çözelti kullanıldı. Deneyde, hidroksil radikali deoksiriboza hızlı bir şekilde atak yaparak bozunma ürünlerinin oluşumuna sebep olur ve bu ürünler TBA ile reaksiyona girerek kromojen oluşturur. Ekstre spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozunması deneyinde kullanılan konsantrasyonlarda çalışılmış, fakat spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını engelleyememiştir.

4.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

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

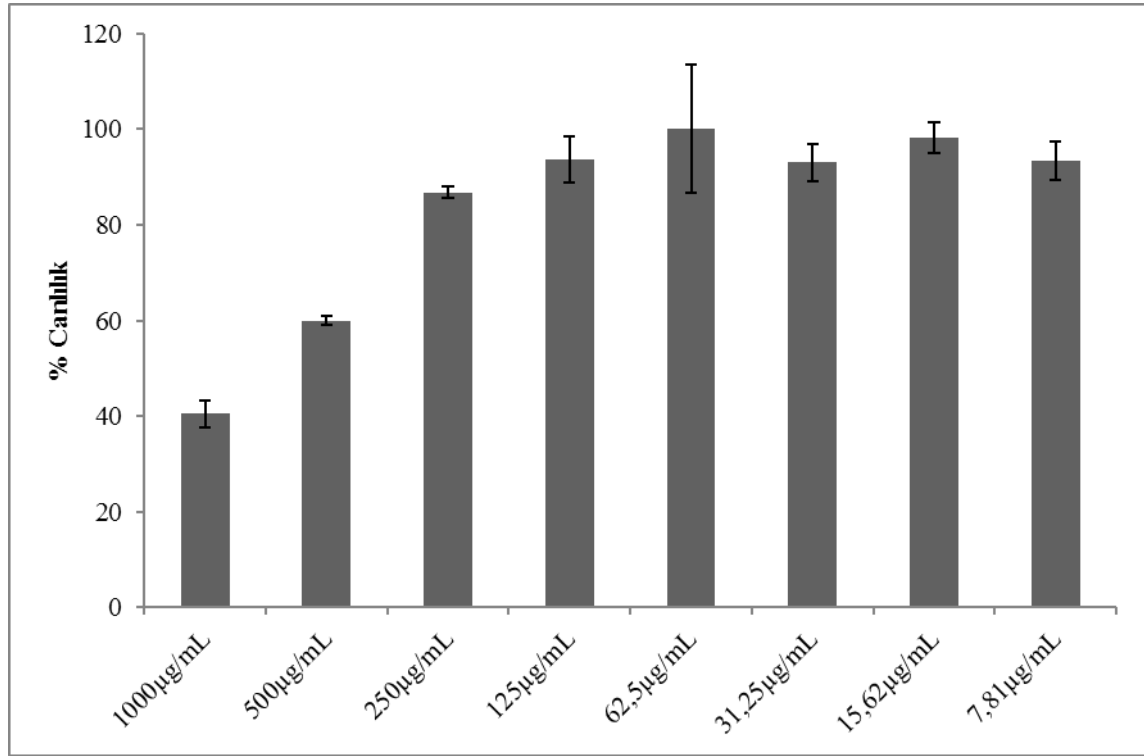
Sulforhodamin B (SRB) testi *in vitro* sitotoksisite taramasında sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Deneyin esası TCA ile hücre kültür plağına fiks edilen hücrenin protein bileşiklerine SRB'nin bağlanmasıdır. SRB parlak pembe renkte, iki sülfonik grup içeren, asidik şartlarda temel aminoasit yapılarına bağlanan ve bazik şartlarda ayrılabilen, aminoksanten yapıda bir boyadır. Test materyalinin sitotoksisitesine bağlı hücre sayısındaki artma veya azalma (toplam biyokütle) hücre kültüründe hücrelere hapsolmuş boya oranındaki değişikliklerle doğru orantılıdır.

P. recta'dan elde edilen ekstrenin sitotoksik olmayan dozları RAW 264.7 hücreleri kullanılarak SRB deneyi ile belirlenmiştir. Sonuçlar % hücre canlılığı olarak Tablo 4.9 ve Şekil 4.16 'de verilmiştir. Ekstreler 7.81 µg/mL, 15.6 µg/mL, 31.25 µg/mL, 62.5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda test edilmiştir ve ekstrenin 1000 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını % 50'nin altına düşürdüğü tespit edilmiştir.

Tablo 4.9. *P. recta* ekstresinin RAW 264.7 hücrelerinin canlılığına etkisi

Değişken	Konsantrasyon (µg/mL)								p
	1000 (n=3)	500 (n=3)	250 (n=3)	125 (n=3)	62.5 (n=3)	31.25 (n=3)	15.62 (n=3)	7.81 (n=3)	
Canlılık	40.07±2.64 ^a	59.69±0.68 ^b	87.17±0.84 ^c	95.27±3.04 ^{cd}	101.59±12.84 ^d	93.77±3.35 ^{cd}	99.38±1.51 ^{cd}	94.47±3.23 ^{cd}	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.



Şekil 4.16. *P. recta* ekstresinin RAW 264.7 hücrelerinin canlılığına etkisi

4.4. ANTİENFLAMATUVAR AKTİVİTE

4.4.1. Nitrik Oksit Deneyi

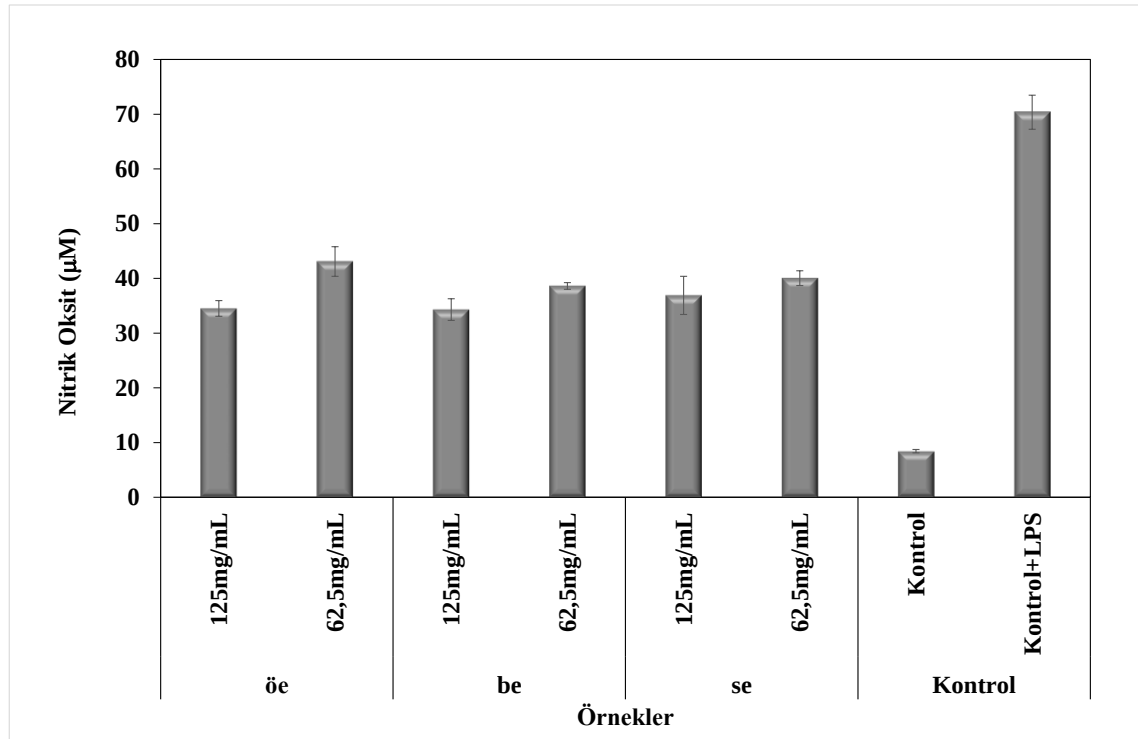
Tablo 4.10. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan, sonra ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde nitrik oksit miktarına olan etkisi

Konsantrasyon	Örnekler					p
	Öe (n=6)	Be (n=6)	Se (n=6)	Kontrol (n=3)	Kontrol+LPS (n=3)	
125 mg/mL (n=9)	34.50±1.44 ^a	34.30±1.97 ^a	36.90±3.49 ^a	8.43±0.00 ^b	70.37±0.00 ^c	<0.001
62.5 mg/mL (n=9)	43.10±2.71 ^a	38.63±0.61 ^b	40.03±1.36 ^{ab}	8.43±0.00 ^c	70.37±0.00 ^d	<0.001
p	0.008	0.022	0.221	-	-	

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Nitrik oksit değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda nitrik oksit değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Kontrol grubu ile kontrol+LPS grubu karşılaştırıldığında, kontrol+LPS grubunun kontrol grubundan anlamlı düzeyde ($p<0.001$) yüksek olduğu ve önce ekstre, beraber ekstre, sonra ekstre uygulanan grupların her iki konsantrasyonda da kontrol+LPS'den anlamlı düzeyde ($p<0.001$) düşük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.17. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan, sonra ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde nitrik oksit miktarına olan etkisi. (ÖE: önce ekstre, BE: beraber ekstre, SE: sonra ekstre)

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

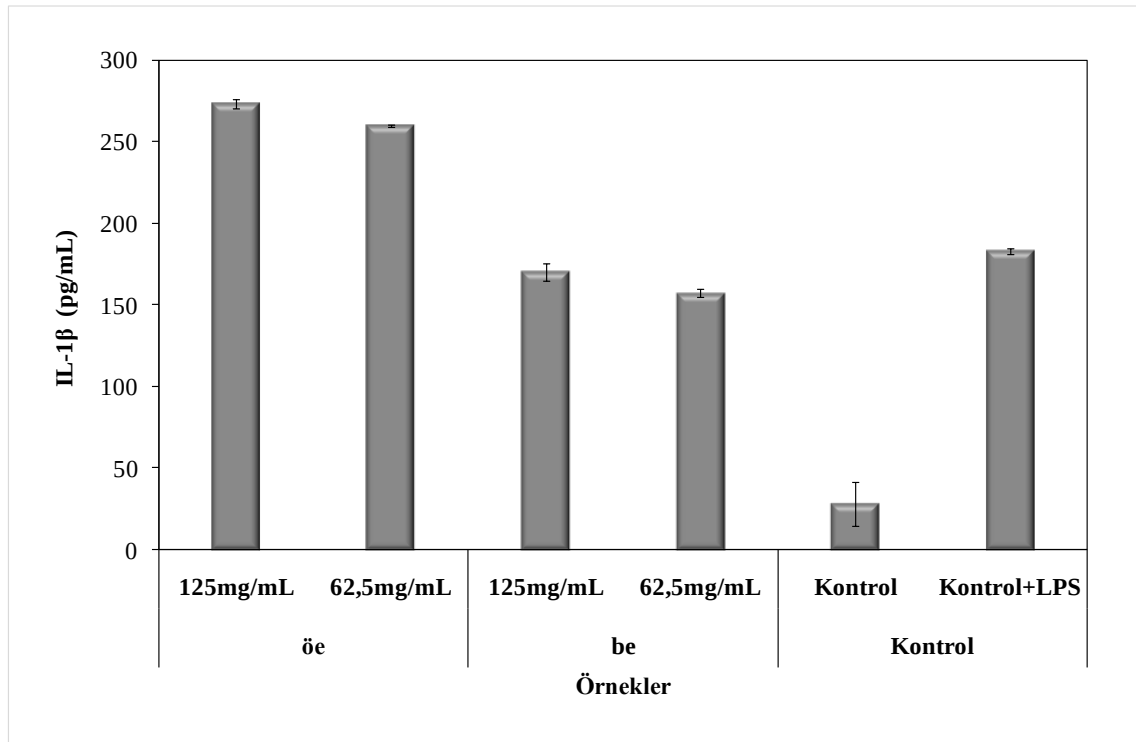
Tablo 4.11. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-1 β miktarına olan etkisi

Konsantrasyon	Örnekler				p
	Öe (n=6)	Be (n=6)	Kontrol (n=3)	Kontrol+LPS (n=3)	
125 mg/mL (n=6)	273.28 $\pm$ 2.72 ^a	170.10 $\pm$ 5.34 ^b	28.38 $\pm$ 13.37 ^c	183.03 $\pm$ 1.60 ^d	<0.001
62.5 mg/mL (n=6)	259.83 $\pm$ 0.97 ^a	157.17 $\pm$ 2.43 ^b	28.38 $\pm$ 13.37 ^c	183.03 $\pm$ 1.60 ^b	<0.001
p	0.001	0.019	-	-	

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

IL-1 β değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda IL-1 β değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol+LPS'nin kontrol

grubundan anlamlı derecede ($p<0.001$) yüksek olduğu gözlenmiştir. Beraber ekstre uygulanan grup her iki konsantrasyon için de kontrol+LPS'den anlamlı düzeyde ($p<0.001$) düşüktür. Önce ekstre uygulanan grup ise her iki konsantrasyon için de kontrol+LPS'den anlamlı düzeyde ($p<0.001$) yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.18. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-1β miktarına olan etkisi (ÖE: önce ekstre, BE: beraber ekstre)

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

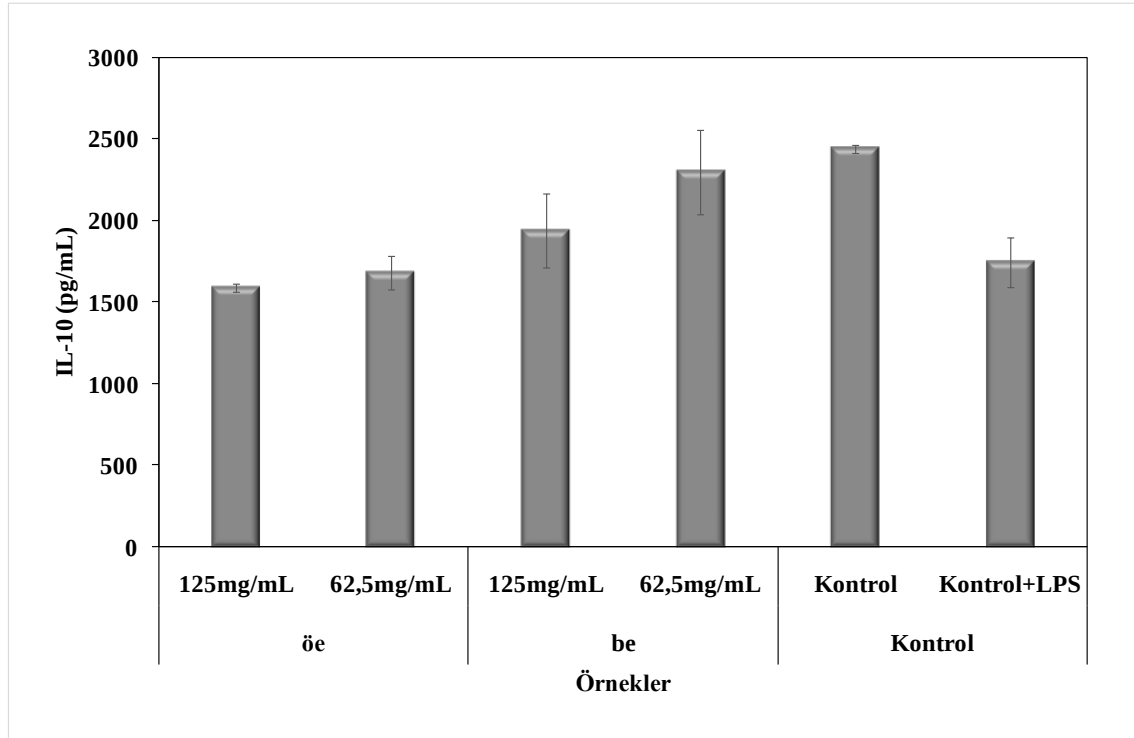
Tablo 4.12. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-10 miktarına olan etkisi

Konsantrasyon	Örnekler				p
	Öe (n=6)	Be (n=6)	Kontrol (n=3)	Kontrol+LPS (n=3)	
125 mg/mL (n=6)	1587.50±25.00 ^a	1937.50±225.00 ^b	2437.50±25.00 ^c	1745.83±152.75 ^{ab}	0,011
62.5 mg/mL (n=6)	1679.17±101.40 ^a	2295.83±256.58 ^{bc}	2437.50±25.00 ^c	1745.83±152.75 ^a	<0.001
p	0,202	0,02	-	-	

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

IL-10 değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda IL-10 değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol+LPS'nin kontrol

grubundan düşük olduğu gözlenmiştir. Beraber ekstrenin uygulandığı grubun düşük ($p<0.001$) ve yüksek ($p<0.05$) konsantrasyonunun kontrol+LPS'den anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Önce ekstre uygulanan grubun kontrol+LPS'den anlamlı bir farklılığı olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.19. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-10 miktarına olan etkisi. (ÖE: önce ekstre, BE: beraber ekstre)

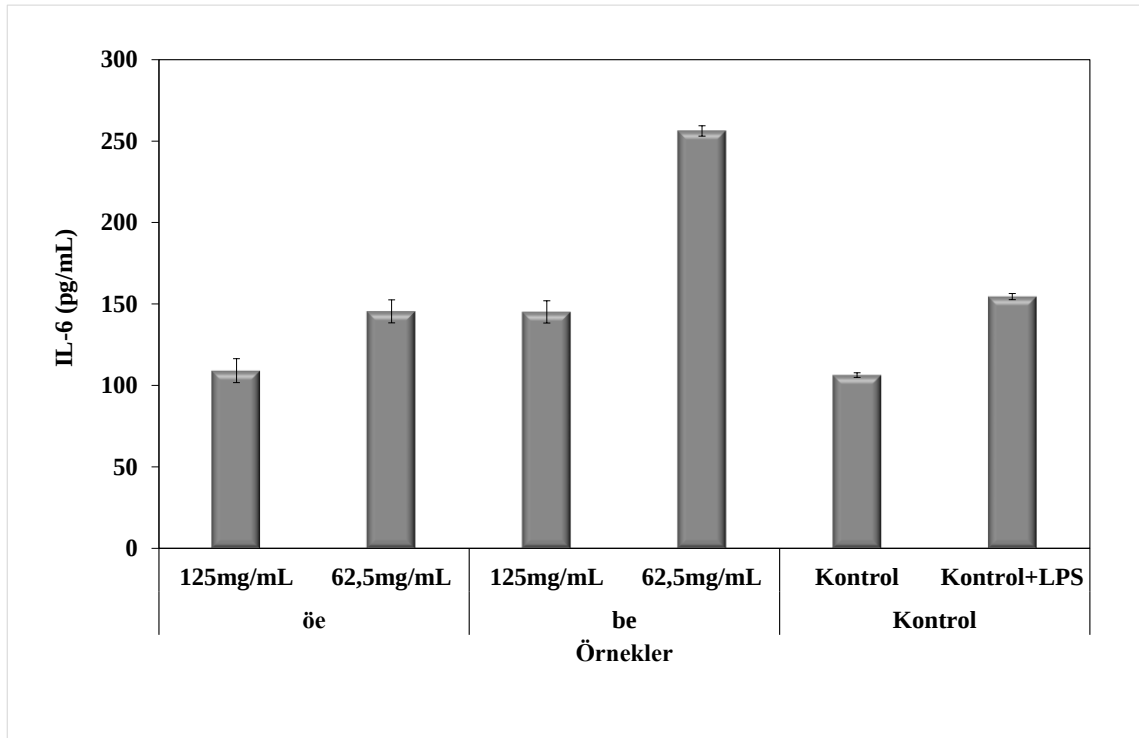
4.4.4. İnterlökin-6 (IL-6) Sitokin Seviyesinin Ölçümü

Tablo 4.13. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-6 miktarına olan etkisi

Konsantrasyon	Örnekler				p
	Öe (n=3)	Be (n=3)	Kontrol (n=3)	Kontrol+LPS (n=3)	
125 mg/mL (n=6)	109.06±7.35 ^a	145.12±6.82 ^b	106.33±1.39 ^a	154.52±1.89 ^b	<0.001
62.5 mg/mL (n=6)	145.42±7.06 ^a	256.18±3.18 ^b	106.33±1.39 ^c	154.52±1.89 ^a	<0.001
p	0.003	<0.001	-	-	

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

IL-6 değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda IL-6 değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol+LPS'nin kontrol grubundan anlamlı derecede ($p<0.001$) yüksek olduğu gözlenmiştir. Ekstrenin beraber uygulandığı grubun düşük konsantrasyonda kontrol+LPS'den anlamlı düzeyde ($p<0.001$) yüksek olduğu, yüksek konsantrasyonda ise kontrol+LPS'den anlamlı bir farklılığı olmadığı gözlenmiştir. Önce ekstre uygulanan grupta yüksek konsantrasyonun kontrol+LPS'den anlamlı düzeyde ($p<0.001$) düşük olduğu, düşük konsantrasyonun ise kontrol+LPS'den anlamlı bir farklılığı olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.20. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde IL-6 miktarına olan etkisi. (ÖE: önce ekstre, BE: beraber ekstre)

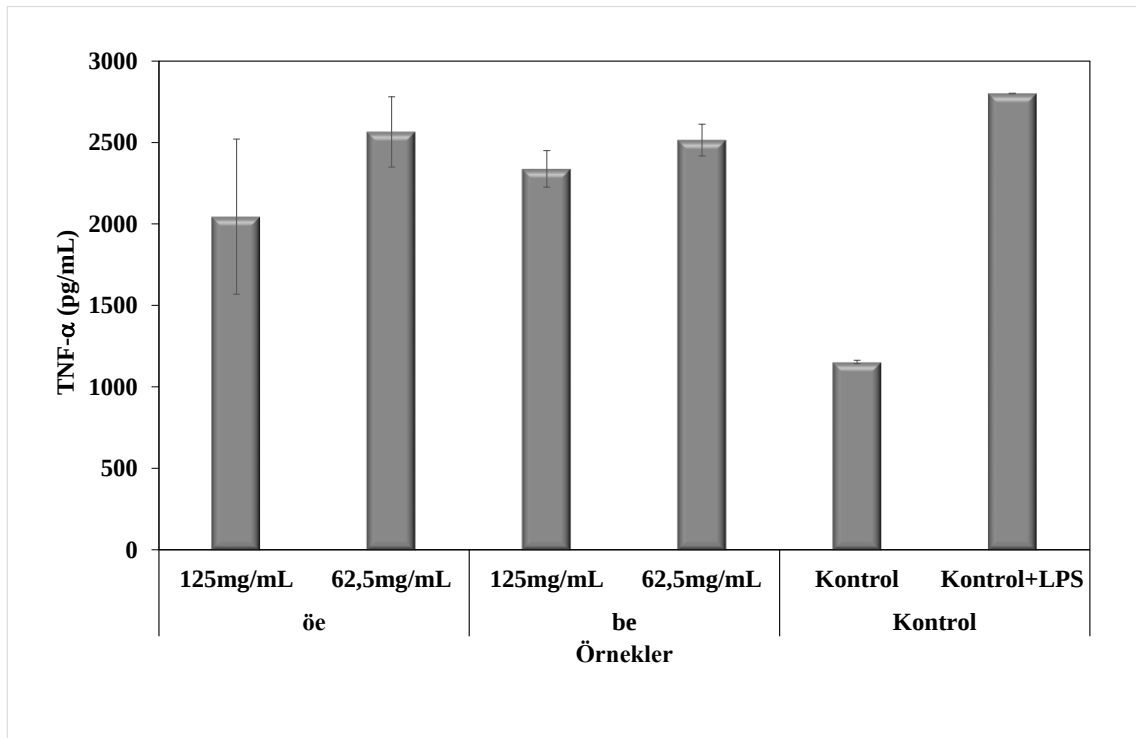
4.4.5. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) Sitokin Seviyesinin Ölçümü

Tablo 4.14. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde TNF- α miktarına olan etkisi

Konsantrasyon	Örnekler				p
	Öe (n=6)	Be (n=6)	Kontrol (n=3)	Kontrol+LPS (n=3)	
125 mg/mL	2045.18 $\pm$ 476.12 ^a	2338.26 $\pm$ 112.12 ^a	1152.62 $\pm$ 10.00 ^b	2800.82 $\pm$ 1.94 ^c	<0.001
62.5 mg/mL	2565.18 $\pm$ 215.54 ^a	2514.92 $\pm$ 97.36 ^a	1152.62 $\pm$ 10.00 ^b	2800.82 $\pm$ 1.94 ^c	<0.001
p	0.01	0.108	-	-	

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

TNF- α değişkeni gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda TNF- α değişkeni istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol+LPS'nin kontrol grubundan anlamlı düzeyde (p<0.001) yüksek olduğu gözlenmiştir. Önce ekstre ve beraber ekstre uygulanan grupların kontrol+LPS'den anlamlı düzeyde (p<0.001) düşük olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.21. *P. recta* ekstresinin önce ekstre uygulanan ve beraber ekstre uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde TNF- α miktarına olan etkisi (ÖE: önce ekstre, BE: beraber ekstre)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez kapsamında, *P. recta* L. bitkisinin *in vitro* antioksidan, antienflamatuvar etkileri ve etkiden sorumlu bileşikleri kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiştir. Bu amaçla bitkinin %70'lik metanol ekstresi hazırlanmıştır. Bu ekstre hem *in vitro* antioksidan, antienflamatuvar aktivite deneylerinde hem de kalitatif ve kantitatif içerik analizlerinde kullanılmıştır. *P. recta*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan %70'lik metanol ekstresinin verimi % 20.5 bulunmuştur. Bitkinin toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Toplam fenol miktarı $185.85 \pm 6.51 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$, toplam flavonoit miktarı $43.46 \pm 1.48 \text{ mg}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$, toplam flavonol miktarı ise $54.14 \pm 0.88 \text{ mg}_{\text{RE}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ bulunmuştur.

Ekstrenin kimyasal bileşimi SK-KS/KS analizi ile belirlenmiştir. Bu analizler sonucunda ekstrede kinik asit, elajik asit, kafeik asit türevi, kemferol glikozit, kersetin glukronit, kersetin türevi, bis-HHDP glukoz ve potentilin tespit edilmiştir. Literatürde *Potentilla* türlerinin toprak üstü kısımlarının flavonoitler, hidrolize tanenler, kondanse tanen prekürsörleri, terpenoitler, organik asit ve fenol karboksilik asitler içerdikleri bildirilmektedir. Ayrıca, çalışmamızda kullandığımız *P. recta*'nın kemferol, kersetin, elajik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, 2-piron-4,6 dikarboksilik asit içerdiği bildirilmiştir (9). *P. reptans* türü ile HPLC-MS-MS kullanılarak yapılan çalışmada, rizomlarda kateşin, topraküstü kısımlarda ise kafeik asit ana bileşen olarak tesbit edilmiştir (168). *P. recta* ile HPLC-DAD-MS kullanılarak yapılan çalışmada, aktiviteden sorumlu ana bileşiğin agrimonin olduğu tespit edilmiştir (92). Çalışılan *P. recta* ekstresinde kimyasal bileşen olarak organik asit türevlerinden; kinik asit, fenolik asit türevlerinden; kafeik asit türevi, flavonoit türevlerinden; kemferol glikozit, kersetin glukronit, kersetin türevi, tanen türevlerinden; elajik asit, bis-HHDP glukoz ve potentilin bulunması literatürle uyum göstermektedir.

İndirgeme gücü elektron verme yeteneğini gösteren bir mekanizma olduğu için antioksidan kapasitenin yorumlanması açısından oldukça önemlidir (169). Ekstrenin indirgeme gücünün belirlenmesi, $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{+3}$ 'nin $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{+2}$ 'ye antioksidanlarla indirgenmesi ve indirgenmiş ürüne Fe^{3+} ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ kompleksinin absorbansının 700 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Absorbansdaki artış kompleksin oluşumundan kaynaklanan artışı, yani indirgeme kapasitesindeki artışı gösterir (169, 170). Maddelerin indirgeme güçleri ile antioksidan aktivite arasında genellikle doğrusal bir bağlantı vardır. Fenolik bileşikler kuvvetli antioksidanlardır. Ayrıca polar madde oldukları için, polar çözücülerde çözünürler ve polar sistemlerde güçlü aktivite gösterirler. Demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme reaksiyonu testi de polar ortamda yapılmaktadır (171). Literatürde, sulu ekstraktların demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasiteleri ile antioksidan aktiviteleri arasında yüksek korelasyon bulunmasına rağmen, bunun her zaman doğru olmadığı kayıtlıdır (156).

Çalışmamızda ekstrenin demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme gücü spektroskopik olarak test edilmiştir. Sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmış (AscAE) ve bu değerler kullanılmıştır. AscAE değeri büyüdükçe aktivite de artmaktadır. Bu tez kapsamında incelenen ekstre içerisinde flavonoidler, fenolik asitler ve tanenler tanımlanmıştır. Fenolik asitler ve flavonoidler elektron vererek antioksidan aktivite gösterebilirler (172, 173). Literatürde antioksidan aktivitenin tanen içeriği ile orantılı artış gösterdiği ve tanen konsantrasyonundaki artışın, demir (III)'ü indirgeme gücünü arttırdığı bildirilmiştir (174). Ekstrenin demir (III)'ü indirgeme gücünün olduğu görülmüştür. Ancak, ekstrenin indirgeme gücü pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA, rosmarinik asit ve galik asit kadar yüksek bulunamamıştır.

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil ($\text{DPPH}^\bullet$) radikal süpürücü etki tayini, ekstrenin serbest radikal süpürücü etkisinin değerlendirilmesi için kullanılan ve hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Deney, mor renkli, kararlı bir serbest radikal olan $\text{DPPH}^\bullet$ 'ın indirgenerek sarı renkli difenilpikrilhidrazin'e dönüşmesi esasına dayanır (171). $\text{DPPH}^\bullet$ radikalinin miktarındaki azalma tespit edilerek, $\text{DPPH}^\bullet$ radikali ile ne kadar antioksidan madde etkileştiği bulunur. Ekstrenin azot merkezli stabil bir radikal olan $\text{DPPH}^\bullet$ radikalini süpürme kapasitesi fizyolojik pH'da incelenmiş ve sonuçlar IC_{50} (mg/mL) değerleri olarak verilmiştir. IC_{50} değeri, radikalın % 50'sini süpürmek için gerekli konsantrasyon

olarak tanımlanır. IC₅₀ değeri küçüldükçe aktivite artmaktadır. *P. recta* ekstresinin süpürücü etkisinin pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA, gallik asit ve rozmarinik asit kadar yüksek olmadığı tespit edilmiştir.

P. fulgens türü ile yapılan çalışmada, toprak üstü kısımlarından izole edilen afzelçin-4a --> 8-kateşin, epiafzelçin ve rutin sırasıyla 1.21, 2.88, 5.20 mg/mL 'lik IC₅₀ değerleriyle önemli DPPH• radikal süpürücü aktivite göstermişlerdir (99). *P. reptans* ile yapılan DPPH• radikal süpürücü aktivite deneyinde, topraküstü kısımlarının IC₅₀ değeri 12.11 µg/mL, rizomun IC₅₀ değeri 2.57 µg/mL bulunmuştur. Rizomun radikal süpürücü etkisinin standart olarak kullanılan BHT'den yüksek olduğu tespit edilmiştir (168). Bir diğer çalışmada, sekiz farklı bölgeden toplanan, *P. fruticosa* türü ekstrelerinin IC₅₀ değerlerinin 7.936 ± 0.423 - 34.68 ± 1.275 µg/mL aralığında olduğu tespit edilmiş ve standart olarak kullanılan rutin IC₅₀ değeri 5.25 ± 0.265 µg/mL bulunmuştur (175). *Potentilla* türlerinden *Dasiphora fruticosa* (*P. fruticosa*), *P. norvegica*, *P. pensylvanica*, *P. thuringiaca*, *P. crantzii* ve *P. nepalensis* sulu ekstrelerinin biyolojik aktiviteleri analiz edilmiş ve tüm ekstreler konsantrasyon-bağımlı serbest radikal temizleyici (DPPH•) etki göstermişlerdir (97).

En çok kullanılan antioksidan aktivite ölçüm metodlarından birisi de ABTS^{•+}/TEAC yöntemidir. ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) radikal giderme aktivitesi, ABTS^{•+} radikal katyonunun absorbansının antioksidan tarafından inhibisyonu esasına dayanır. Maksimum absorbansı 734 nm'de gösteren bu radikalın absorbans değeri, antioksidanlarla girdiği reaksiyon periyodu süresince azalır (170). Deney hem lipofilik bileşenlere hem de hidrofilik bileşenlere uygulanabilir. Trolox, E vitamini'nin suda çözünen analogu olup referans standart olarak kullanılır (176). Reaksiyon sonucu harcanan ABTS^{•+} miktarı, troloks eşdeğeri olarak hesaplanmakta ve sonuç "TEAC değeri" (Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi) olarak ifade edilmektedir. Ekstre ve standartların ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkileri 0.1 ve 0.2 mg/mL olmak üzere iki farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Ekstrenin süpürücü etkisinin 0.2 mg/mL konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT, BHA, gallik asit ve rozmarinik asit kadar yüksek olmadığı, 0.1 mg/mL konsantrasyonda ise sadece rozmarinik asitten yüksek olduğu belirlenmiştir. Ekstre ve tüm standartların yüksek konsantrasyonda ABTS^{•+} radikalini süpürücü etki bakımından daha aktif oldukları gözlenmiştir.

P. fruticosa'nın DPPH[•] ve ABTS^{+•} radikal süpürücü etkileri araştırılmış ve *P. fruticosa* ekstresinin her iki aktivite deneyinde de *S. officinalis* ekstresinden daha yüksek radikal süpürücü etki gösterdiği tespit edilmiştir. Radikal süpürücü etki ile ekstrenin toplam fenolik bileşik içeriği arasında bir korelasyon gözlenmiştir (154). *P. atrosanguinea* topraküstü kısımlarının, % 50 sulu etanol ekstresinin ABTS^{+•}, DPPH[•] deneylerinde sırasıyla Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite açısından (TEAC) [(122.96-54.34; 101.22-29.82) Trolox/ g] güçlü antioksidan aktivite sergilediği tespit edilmiştir (84). *P. fulgens* kökleri ile yapılan çalışmada butanol fraksiyonunun yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur, ABTS^{+•}, DPPH[•] ve FRAP deneyleri için sırasıyla (2.54 ± 0.69, 2.41 ± 0.53, 3.57 ± 0.05 mM Trolox eşdeğer/mg ekstre)'dir (94). *P. fruticosa*'nın 16.87 µg/mL IC₅₀ değeriyle yüksek DPPH[•] radikal süpürücü aktivite ve 2763.48 µmol Trolox eşdeğeri/g değeriyle yüksek ABTS radikal süpürücü aktivite gösterdiği, bunun bitkinin içerdiği yüksek miktardaki toplam fenol ve toplam flavonoit miktarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (68).

Membran lipitleri, oksidatif süreçlere duyarlı doymamış yağ asitleri açısından zengindirler. Özellikle linoleik asit ve araşidonik asit, lipit peroksidasyonunun olası hedefleridir (177, 178). Antioksidan aktivite araştırılırken lipit oksidasyonuna ait deney ortamlarının kullanılması önemlidir. Bu amaçla en çok kullanılan yöntemlerden birisi olan β- karoten/linoleik asit yöntemi, linoleik asit oksidasyonu sonucu oluşan parçalanma ürünlerinin, β- karoten molekülünün rengini açması esasına dayanır (179). Örneklerin β- karoten renginin açılmasını inhibe etmesi ya da geciktirmesi serbest radikal süpürücü etkiyi dolayısıyla antioksidan etkiyi düşündürebilir (169, 178). Ekstrenin gallik asit ve rozmarinik asit standartlarından yüksek, BHT ve BHA standartlarından ise düşük aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Serbest oksijen radikallerinin biyolojik sistemlerdeki en önemli etkileri lipitler üzerinedir. Bu olay lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve kısaca hücrelerdeki zar fosfolipitlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olayı şeklinde tanımlanır. Lipit peroksidasyonunun zincir aşamasında ortaya çıkan lipit hidroperoksitler son derece dayanıksız ürünlerdir; özellikle zincirde açılmalar şeklinde yapısal bozulmalara uğrayarak, aldehidler, ketonlar, alkanlar, alkenler, karboksilik asitler ve polimerizasyon ürünleri gibi çeşitli metabolik şekillere dönüşürler (180).

Membran fosfolipitlerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi için en kullanışlı model sistemleri fosfolipitlerin kullanıldığı sistemlerdir. Bu çalışmada demir (III) ve askorbik asit varlığında fosfolipit esaslı lipozomlar, hızla hidroksil radikali kaynaklı peroksidasyona tabi tutulmuş ve malondialdehit ve benzer reaktif aldehitlerin oluşması sağlanmıştır. Bu reaktif aldehitler 2-tiyobarbitürik asit ile reaksiyona sokularak oluşan pembe renk 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Oluşan renk şiddeti reaktif aldehit miktarı ile doğru orantılıdır. 2-tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin (TBARS) oluşumunun engellenmesi güçlü antioksidan etkiyi gösterir. Ekstrenin askorbik asit standardından yüksek aktivite gösterdiği, BHA, BHT, RA ve GA standartları ile anlamlı bir farklılığı olmadığı gözlenmiştir.

Demir iyonları (Fe^{2+}), fenton reaksiyonlarında rol alarak en tehlikeli radikal olarak nitelendirilen hidroksil radikalının oluşumunda etkin rol oynar. Fe^{2+} iyonlarının lipit peroksidasyonunda görev alan en etkin prooksidan olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, demir iyonlarını bağlayarak etkisiz hale getirme, diğer bir deyişle şelatlama aktivitesi antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Aynı zamanda, Fe^{2+} iyonlarının konsantrasyonundaki azalma oksidatif hasara karşı koymada etkin bir yoldur. Demir iyonlarını şelatlama aktivitesinin belirlenmesinde ferrozin testi sıklıkla kullanılmaktadır. Testte, ferrozin Fe^{2+} iyonları ile kompleks oluşturur ve bu kompleks kantitatif olarak değerlendirilir. Şelatlayıcı ajanların varlığında ferrozin ile Fe^{2+} kompleks oluşumu inhibe olur ve kompleksin kırmızı renginde düşüş meydana gelir. Bu kompleks oluşumunu engelleme oranı 562 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülebilir (169).

Demir şelatlama gücü antioksidan aktivite açısından önemli bir parametredir. *P. recta* ekstresinin demir (II) şelatlama aktivitesi 10 mg/mL’den büyük bulunmuştur. Ekstrenin demir (II) şelatlama aktivitesini, serbest radikal süpürücü aktivite sonuçları ile karşılaştırdığımızda paralellik gözlenmemektedir. Bu durum radikal süpürücü aktivite deney mekanizmalarının farklı olmasına bağlanabilir. Bulduğumuz sonuçlar *Hypericum perforatum* ekstresi sonuçları ile uyumludur (181). Ayrıca, flavonollerin kuvvetli metal şelasyon aktivitelerinin olduğu ve metallerle stabil kompleksler oluşturdukları literatürde kayıtlıdır (182). Ekstrenin flavonol yönünden zengin olmayışı metal şelatlayıcı özelliklerinin olmayışı ile ilişkilendirilebilir.

Hidroksil radikali canlılarda biyolojik moleküllere hasar veren en reaktif serbest radikallerden biridir. *In vitro* Fenton reaksiyon sisteminde spesifik olmayan ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{EDTA}$) ve spesifik olan ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2$) hidroksil radikalini yönlendirilmesiyle, hidroksil radikali deoksiriboza atak yapar ve reaktif tiyobarbitürik asit ürünlerine dönüştürür. Ekstrenin bileşiminde bulunan fenolik gruplar, hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması deneyinde, hidroksil radikalini süpürücü etkiden sorumludur. Ekstrenin spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını engelleme gücü, pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asitle karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması deneyinde ekstre, spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması deneyinde kullanılan aynı konsantrasyonda aktivite gösterememiştir. Deney ortamında EDTA bulunmaması nedeniyle serbest kalan Fe^{+2} şelatlanamamıştır. Ekstrenin spesifik hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulması deneyinde aktivite gösterememesi metal şelatlama kapasitesinin olmaması ile ilişkilendirilmiştir.

Bir bitki ekstresinin antioksidan veya süpürücü aktivitesi ile fenolik içeriği arasındaki ilişkinin, istatistiksel olarak belirlenmesi çok zordur. Çünkü, aynı miktardaki fenolik maddenin aynı antioksidan aktiviteyi gösterme olasılığı önemli ölçüde değişkenlik gösterebilir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için kullanılan farklı yöntemler farklı reaksiyon mekanizmalarına dayanır, bu nedenle de genellikle farklı sonuçlar verirler. Ekstreler, farklı polarite ve antioksidan - prooksidan özelliklere sahip çok sayıda farklı bileşiğin çok karmaşık karışımlarıdır ve bazen bireysel bileşiklerle karşılaştırıldığında sinerjik etki gösterdikleri görülebilir. Bir ekstrenin süpürücü aktivitesinin, sadece toplam fenolik içeriği temelinde tahmin edilmesi zordur. Oksidasyon-antioksidasyon süreçlerinin karmaşıklığına bağlı olarak, incelenen bir bileşiğin antioksidan profilini kapsamlı bir şekilde verebilen tek bir test yönteminin bulunmadığı açıktır. Yapılan çalışmalar, antioksidan aktivite değerlendirmesinde çoklu metot yaklaşımının gerekli olduğunu doğrulamaktadır. Örneğin, BHA sadece DPPH yöntemi ile test edilirse, zayıf bir antioksidan olarak düşünülebilir; oysa, kemoluminesans testi ve β -karoten soldurma testi, güçlü antioksidan potansiyelini ortaya çıkarır (122). Flavonoidlerin yüksek antioksidan aktivitesi çok sayıda yayında bildirilmiştir ve sonuçları açıklamak için yapı-

aktivite ilişkileri açıklanmıştır. Flavonoitlerin hidroksil gruplarının metoksillenmesinin (özellikle B halkasında) veya bağlı grupların (glikozitler gibi) molekülün antioksidan aktivitesini önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir (85). Ekstrenin içeriğinde glikoz bağlı flavonoitler olması, süpürücü aktivitesinin standartlara göre düşük olmasının nedenlerinden biri olabilir. Ayrıca, flavonoitlerin nispeten zayıf DPPH radikal süpürücü aktivitelerinin olduğu da bildirilmiştir (156). Flavonoit aglikonlarının lipofilik antioksidanlar oldukları bilinmektedir. Aynı zamanda, literatürde fenolik asitlerde orto pozisyonunda ikinci bir hidroksil grubu bulunmasının (kafeik asit gibi) lipid sistemlerdeki antioksidan aktiviteyi artırdığı belirtilmiştir (136). Lipofilik deney sistemlerinde gözlenen yüksek antioksidan aktivite ile bu literatür verileri ilişkilendirilmiştir.

P.recta ekstresinin antienflamatuvar aktivitesi LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri tarafından salınan anti-enflamatuvar ve pro-enflamatuvar sitokinlerin miktar tayini ile belirlenmiştir.

Makrofajlar, fagositoz, antijen sunumu, sitokin salımı gibi fonksiyonları olan hücrelerdir ve konağın mikroorganizmalarla mücadelesinde önemli bir yere sahiptirler (183). Makrofaj aktivasyonu IL- 1β , TNF- α , NO ve diğer enflamatuvar medyatörlerin üretimini sağlayarak enflamatuvar yanıtın başlangıç ve yayılımında önemli bir rol oynar.

Gram-negatif bakteriler gram boyama prosedürü sırasında kristal viyole boyasını tutmayan bakterilerdir. Gram-negatif bakterilerin pek çoğu patojendir. LPS gram negatif bakterilerin hücre duvarında bol miktarda bulunur. LPS ile indüklenmiş makrofaj aktivasyonu IL- 1β , TNF- α , nitrik oksit gibi sitokinlerin üretimini artırır (184).

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz olarak adlandırılan bir enzim ailesi tarafından L-arjinininden sentezlenir (185). Nitrik oksitin süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu güçlü sitotoksik bir oksidan olan peroksinitrit radikali ($ONOO^{\bullet}$) meydana gelir (186). Nitrik oksit enfeksiyon durumlarında sitokinler ve endotoksinler tarafından yüksek miktarda üretilir ve parazitlerin öldürülmesinde rol oynar. Çalışmamızda nitrik oksit ölçümü için Griess yöntemi kullanılmıştır. Nitrik oksit deneyinde, nitrik oksit seviyesinin LPS uygulanan kontrol grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek olması enflamasyon oluştuğunu göstermektedir. Ekstre uygulanan bütün gruplarda, LPS

uygulanan kontrol grubuna göre nitrik oksit seviyesinin düşmüş olması bize anti-enflamatuvar etkiyi gösterir.

Sitokinler aktive olmuş lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere birçok hücreden sentezlenen ve diğer hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan polipeptit yapıdaki maddelerdir. Sitokinler, doğrudan salgılandıkları hücreler üzerine (otokrin), komşu hücrelere (parakrin) veya uzak hücrelere (endokrin) etki edebilirler (187). Pro-enflamatuvar sitokinler, enflamasyona yol açan etkenin uyarısı ile ilk ortaya çıkan ve enflamasyonun artmasını, devam etmesini sağlayan moleküllerdir. Anti-enflamatuvar sitokinler ise, pro-enflamatuvar sitokinlerin aktivitelerini baskılayan moleküllerdir. Tez kapsamında incelenen IL-1 β , IL-6 ve TNF- α pro-enflamatuvar sitokinlerden, IL-10 ise anti-enflamatuvar sitokinlerdendir.

IL-1 β enfeksiyonlara ve diğer immün uyarılara karşı oluşan konak immün yanıtı sonucu üretilen önemli bir pro-enflamatuvar sitokindir. IL-1 β , makrofajlar ve mast hücreleri gibi immün hücrelerde, endotel hücrelerinde, astrositlerde, keratinositlerde, glial hücrelerde, fibroblastlarda ve nötrofillerde üretilmektedir (188). IL-1 β 'nın mononükleer fagositler tarafından üretimi LPS gibi bakteriyel ürünler veya TNF- α gibi sitokinler tarafından uyarılır. Fonksiyonları TNF- α ile benzerdir ve enflamasyon oluşumunda TNF- α ile birlikte çalışır. LPS uygulanan kontrol grubunda, kontrol grubuna göre IL-1 β seviyesinde artış olmuştur, bu enflamasyon oluştuğunu göstermektedir. Ekstrenin beraber uygulandığı grupta, LPS uygulanan kontrol grubuna göre düşüş gözlenmiştir. Bununla birlikte, ekstrenin önce uygulandığı grupta, LPS uygulanan kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. Bu ekstrenin önce uygulandığında pro-enflamatuvar etkisi, beraber uygulandığında anti-enflamatuvar etkisi olabileceğini göstermektedir.

IL-6, kronik enflamasyon, otoimmünite, endotel hücre disfonksiyonu ve fibrogenizde farklı rolleri olan pleiotropik bir sitokindir (189). Enfeksiyon etkenleri ve IL-1, TNF- α gibi sitokinlerin uyarıları sonucu mononükleer fagositler, endotel hücreleri ve fibroblastlardan salgılanır. IL-6 endotel hücrelerinde IL-1 ve TNF- α 'nın sekresyonunu arttırırken, IL-1 ve TNF- α ise IL-6 sekresyonunu arttırmaktadır. Ayrıca IL-6 T lenfositlerinde IL-10 üretimi uyarır. IL-10 ise posttranskripsiyonel mekanizma ile IL-6'nın sentez ve sekresyonunu baskılar. LPS uygulanan kontrol grubunda, kontrol grubuna göre IL-6 seviyesinde artış olmuştur, yani enflamasyon oluşmuştur. Ekstrenin

beraber uygulandığı grubun düşük konsantrasyonda, LPS uygulanan kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek olduğu, yüksek konsantrasyonda ise anlamlı düzeyde bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Önce ekstre uygulanan grupta yüksek konsantrasyonun, LPS uygulanan kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük olduğu, düşük konsantrasyonda ise anlamlı düzeyde bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Bu ekstrenin önce uygulandığında yüksek dozda anti-enflamatuvar etkisi, beraber uygulandığında düşük dozda pro-enflamatuvar etkisi olabileceğini göstermektedir.

IL-10, anti-enflamatuvar bir sitokindir. Enfeksiyon sırasında, patojenlerin yok edilmesi için gerekli olan ama aynı zamanda doku hasarına katkıda bulunan Th1 hücreleri, NK hücreleri ve makrofajların aktivasyonunu inhibe eder (190). IL-10 aynı zamanda B hücreleri, NK hücreleri, sitotoksik ve yardımcı T hücreleri, mast hücreleri, granülositler, dendritik hücreler, keratinositler ve endotelial hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını düzenler (191). IL-10, yardımcı T lenfositler, B lenfositler, mast hücreleri, eozinofiller, monositler, makrofajlar ve keratinositler tarafından üretilmektedir (192). Lipopolisakkaritler (LPS) tarafından uyarılan monosit ve makrofajlarda pro-enflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-6'nın üretimi ile anti-inflamatuvar etkiye sahip olan IL-10 sentezi artar. IL-10 makrofajların IL-1, IL-6 ve TNF- α salgılamasını baskılar. Ayrıca makrofajlarda iNOS'un uyarılmasını da azaltır. LPS uygulanan kontrol grubundaki IL-10 miktarının, kontrol grubundan anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir. Ekstrenin beraber uygulandığı grubun düşük ve yüksek konsantrasyonlarda, LPS uygulanan kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Ekstrenin önce uygulandığı grupta, LPS uygulanan kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF- α), çeşitli enfeksiyöz uyaranlara karşı cevap olarak aktive makrofajlar / monositler, T lenfositler ve diğer bağışıklık hücreleri tarafından salınan bir sitokindir ve hücre içinde nekroz ya da apoptaza neden olan çok çeşitli sinyal olaylarından sorumludur (193, 194). TNF- α 'nın en önemli kaynağı aktive olmuş makrofajlardır. Makrofajlardan TNF- α salınımını uyaran en önemli etken, LPS ve diğer mikrobik ürünlerdir. LPS uygulanan kontrol grubunda, kontrol grubuna göre TNF- α seviyesinde anlamlı bir artış olmuştur. Ekstrenin önce ve beraber uygulandığı gruplarda, LPS uygulanan kontrole göre, TNF- α seviyesinde azalma görülmüştür. Bu anti-enflamatuvar etkiyi göstermektedir.

Literatürlerde ekstrenin içeriğinde bulunan kersetin, kemferol, kafeik asit ve elajik asitin anti-enflamatuvar özelliklerinin olduğu bildirilmektedir (195, 196, 197). Yapılan çalışmalarda ekstrenin uygulanış zamanı (önce veya birlikte) ve konsantrasyonuna göre anti-enflamatuvar veya pro-enflamatuvar özelliklerinin olabileceği gözlenmiştir.

P.recta topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin antioksidan ve anti-enflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada ekstrenin kimyasal bileşimi incelendiğinde fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler başta olmak üzere fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan antioksidan ve anti-enflamatuvar etki çalışmalarında ekstrede gözlenen aktivite ile fenolik bileşiklerin varlığı ilişkilendirilmiştir.

Ekstre halk arasında değişik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Ekstre ile yapılacak etki ve güvenilirlik çalışmaları belki de enflamasyonu azaltmaya yönelik yardımcı bir tedavinin bulunmasına kapı açabilir. Bu yüzden gerekli ileri çalışmaların yapılması, yeni bitkisel ilaçların üretilmesi açısından önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Ersöz T. Bitkisel ilaçlar ve gıda takviyeleri ile ilgili genel yaklaşım ve sorunlar. MİSED 2012; 27-28.
2. İlçim A, Dığrak M, Bağcı E. Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. Turk J Biol 1998; 22: 119-125.
3. Başer HC. Bitkisel drogların standart/farmakope monografları. MİSED 2012; 42: 27-28.
4. Türkan Ş, Malyer H, Öz Aydın S, Tümen G. Ordu İli ve Çevresinde Yetişen Bazı Bitkilerin Etnobotanik Özellikleri. Süleyman Demirel Üniv Fen Bilimleri Enstitüsü Derg 2006; 162-166.
5. Kaya B. *Alchemilla* L. (Rosaceae) Cinsi Türlerinde Flavonoit Bileşiklerinin Tayin Edilmesi ve Bu Bileşiklerin Taksonomik Olarak Kullanılması, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale 2009: 266.
6. Zhebentyayeva T N, Swire-Clark G, Georgi LL, et all. A framework physical map for peach, a model Rosaceae species. Tree Genet Genomes 2008; 4(4): 745-756.
7. Shulaev V, Korban S S, Sosinski B, et all. Multiple models for Rosaceae genomics. Plant Physiol 2008; 147(3): 985-1003.
8. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik. Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, Ders Kitapları, 1998: 252.
9. Tomczyk M, Latté KP. *Potentilla*—A review of its phytochemical and pharmacological profile. J Ethnopharmacol 2009; 122(2): 184-204.
10. Xue PF, Luo G, Zeng WZ, Zhao YY, Liang H. Secondary metabolites from *Potentilla multifida* L.(Rosaceae). Biochem Syst Ecol 2005; 33(7): 725-728.

11. Xue PF, Zhao YY, Wang B, Liang H. Secondary metabolites from *Potentilla discolor* Bunge (Rosaceae). *Biochem Syst Ecol* 2006; 34(11): 825-828.
12. Zhao YL, Cai GM, Hong X, Shan LM, Xiao XH. Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserine* L.. *Phytomed* 2008; 15(4): 253-258.
13. Sarpkaya U, Düşen O. Türkiye'deki *Potentilla* cinsi'nin taksonomik durumu üzerine genel bir bakış. 1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi, s 133, 2-4 Eylül 2015, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu.
14. Tosun A, Bahadır Ö, Altanlar N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine in Turkey. *Turk J Pharm Sci* 2006; 3(3): 167-176.
15. Baytop A. Farmasötik Botanik Ders Kitabı (Altıncı baskı), İ. Ü. Basımevi ve Film Merkezi, 1996: 315.
16. Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 4, Edinburgh, 1970: 1-55.
17. Serdar B, Karaköse M, Mazlum R, ve ark. Türkiye'de doğal olarak yetişen *Amelanchier* Medik. taksonlarının odun anatomileri. *BİBAD* 2014; 7(2): 30-33.
18. Gidik Ç. Kütahya ve çevresi *Potentilla* L. cinsi üzerinde taksonomik ve morfolojik bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 2011: 81.
19. Tunon H, Olavsdotter C, Bohlin L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *J Ethnopharmacol* 1995; 48(2): 61-76.
20. Ivancheva S, Stantcheva B. Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. *J Ethnopharmacol* 2000; 69(2): 165-172.
21. Langmead L, Dawson C, Hawkins C, et all. Antioxidant effects of herbal therapies used by patients with inflammatory bowel disease: an *in vitro* study. *Aliment Pharm Therap* 2002; 16(2): 197-205.
22. Subbotina MD, Timchenko VN, Vorobyov MM, et all. Effect of oral administration of tormentil root extract (*Potentilla tormentilla*) on rotavirus

- diarrhea in children: a randomized, double blind, controlled trial. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(8): 706-711.
23. Spiridonov NA, Konovalov DA, Arkhipov VV. Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. *Phytother Res* 2005; 19(5): 428-432.
 24. Palombo EA. Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: modes of action and effects on intestinal function. *Phytother Res* 2006; 20(9): 717-724.
 25. Kovzačević NN, Ristić MS. Composition of *Potentilla speciosa* herb essential oil. *J Essent Oil Res* 2007; 19(5): 416-418.
 26. De Natale A, Pollio A. Plants species in the folk medicine of *Montecorvino rovello* (inland Campania, Italy). *J Ethnopharmacol* 2007; 109(2): 295-303.
 27. Manandhar NP. A survey of medicinal plants of Jajarkot district, Nepal. *J Ethnopharmacol* 1995; 48(1): 1-6.
 28. Syiem D, Syngai G, Khup PZ, et al. Hypoglycemic effects of *Potentilla fulgens* L. in normal and alloxan-induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 2002; 83(1): 55-61.
 29. Syiem D, Syngai C, Kharbuli B, Kayang H, Khongwir BS. Anti-tumor activity of crude root extract of *Potentilla fulgens*. *Indian Drugs* 2003; 40(2): 124-125.
 30. Rosangkima G, Prasad SB. Antitumour activity of some plants from Meghalaya and Mizoram against murine ascites Dalton's lymphoma. *Indian J Exp Biol* 2004; 42(10): 981-988.
 31. Chhetri DR, Parajuli P, Subba GC. Antidiabetic plants used by Sikkim and Darjeeling Himalayan tribes, India. *J Ethnopharmacol* 2005; 99(2): 199-202.
 32. Liu P, Duan HQ, Pan Q, Zhang YW, Yao Z. Triterpenes from herb of *Potentilla chinesis*. *China Journal of Chinese Materia Medica* 2006; 31(22): 1875-1879.
 33. Li PL, Lin CJ, Zhang ZX, Jia ZJ. Three new triterpenoids from *Potentilla multicaulis*. *Chem Biodivers* 2007; 4(1): 17-24.

34. Sharma PK, Chauhan NS, Lal B. Observations on the traditional phytotherapy among the inhabitants of Parvati valley in western Himalaya, India. *J Ethnopharmacol* 2004; 92(2): 167-176.
35. Long CL, Li R. Ethnobotanical studies on medicinal plants used by the Red-headed Yao People in Jinping, Yunnan Province, China. *J Ethnopharmacol* 2004; 90(2): 389-395.
36. Chen K, Plumb GW, Bennett RN, Bao Y. Antioxidant activities of extracts from five anti-viral medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2005; 96(1): 201-205.
37. Jang DS, Kim JM, Yoo JL, Kim JS. An ellagic acid rhamnoside from the roots of *Potentilla discolor* with protein glycation and rat lens aldose reductase inhibitory activity. *Nat Prod Sci* 2007; 13(2): 78-81.
38. McCutcheon AR, Roberts TE, Gibbons E, et al. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1995; 49(2): 101-110.
39. Webster D, Taschereau P, Belland RJ, Sand C, Rennie RP. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *J Ethnopharmacol* 2008; 115(1): 140-146.
40. Şöhretoğlu D, Kırmızıbekmez H. Polyphenols from *Potentilla recta*. *Biochem Syst Ecol* 2011; 39(2): 132-134.
41. Şöhretoğlu D, Sterner O. Isoflavonoids, flavonoids and flavans from *Potentilla astracanica*. *Biochem Syst Ecol* 2011; 39(4): 666-668.
42. Xue PF, Qiao L, Liang H, Zhao YY. Studies on the chemical constituents from *Potentilla multifida* L. *Journal of Peking University, Health Sciences* 2004; 36(1): 21-23.
43. Li YY, Xiao CM, Yao M, et al. Study on chemical constituents of triterpenoids from *Potentilla discolor*. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 2013; 36(7): 1099-1101.
44. Shen, Y., Wang, Q. H., Lin, H. W., Shu, W., Zhou, J. B., & Li, Z.Y. Study on chemical constituents of *Potentilla chinensis* Ser. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 2006; 29(3): 237.

45. Wang QH, Li ZY, Shen Y, et al. Studies on triterpenoids from *Potentilla chinensis*. China Journal of Chinese Materia Medica 2006; 31(17): 1434-1436.
46. Jia L, Wang J, Lv C, et al. Two new compounds from *Potentilla multicaulis* Bunge. Nat Prod Res 2013; 27(15): 1361-1365.
47. Yang J, Chen XQ, Liu XX, et al. Structural determination of two new triterpenoids from *Potentilla discolor* Bunge by NMR techniques. Magn Reson Chem 2008; 46(8): 794-797.
48. Xue P, Zhao Y, Wang B, Liang H. Simultaneous determination of seven flavonoids in *Potentilla multifida* by HPLC. J Chromatogr Sci 2007; 45(4): 216-219.
49. Wilkes S, Glasl H. Isolation, characterization, and systematic significance of 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid in Rosaceae. Phytochemistry 2001; 58(3): 441-449.
50. Khan R, Siddiq F, Fatima I, et al. Pregnane derivatives from *Potentilla evestita*. Nat Prod Commun 2011; 6(8): 1083-1084.
51. Zhang B, Nonaka GI, Nishioka I. Potentillanin, a biflavanoid and a procyanidin glycoside from *Potentilla viscosa*. Phytochemistry 1988; 27(10): 3277-3280.
52. Świeżewska, E, Chojnacki T. Long-chain polyprenols from *Potentilla aurea*. Phytochemistry 1991; 30(1): 267-270.
53. Tomczyk M. Secondary metabolites from *Potentilla argentea*. Biochem Syst Ecol 2006; 34(10): 770-773.
54. Gürbüz I, Özkan AM, Yesilada E, Kutsal O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). J Ethnopharmacol 2005; 101(1): 313-318.
55. Laloo D, Prasad SK, Krishnamurthy S, Hemalatha S. Gastroprotective activity of ethanolic root extract of *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook. J Ethnopharmacol 2013; 146(2): 505-514.
56. Huber R, Dittfurth AV, Amann F, et al. Tormental for active ulcerative colitis: an open-label, dose-escalating study. J Clin Gastroenterol 2007; 41(9): 834-838.

57. Quan JIN, Ji-Xing NAN, Li-Hua LIAN. Antitumor activity of leaves from *Potentilla discolor* on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. Chinese Journal of Natural Medicines 2011; 9(1): 61-64.
58. Radovanovic AM, Cupara SM, Popovic S, et all. Cytotoxic effect of *Potentilla reptans* l. Rhizome and aerial part extracts. Acta Pol Pharm 2013; 70(5): 851-854.
59. Rauf A, Khan R, Khan H, Tokuda H. Cytotoxic, antitumour-promoting and inhibition of protein denaturation effects of flavonoids, isolated from *Potentilla evestita* Th. Wolf. Nat Prod Res 2015; 29(18): 1775-1778.
60. Tomczyk M, Drozdowska D, Bielawska A, Bielawski K, Gudej J. Human DNA topoisomerase inhibitors from *Potentilla argentea* and their cytotoxic effect against MCF-7. Pharmazie 2008; 63(5): 389-393.
61. Fukuchi K, Sakagami H, Okuda T, et all. Inhibition of *Herpes simplex* virus infection by tannins and related compounds. Antivir Res 1989; 11(5): 285-297.
62. Volodina EV, Maksimovskiĭ I, Lebedev KA. The combined treatment of lichen *ruber planus* of the mouth mucosa. Stomatologĭia 1996; 76(2): 28-32.
63. Tomczyk M, Leszczyńsk, K, Tomczykowa M, Jakoniuk P. Screening of antimicrobial activity of aqueous extracts of selected *Potentilla* L. species. Planta Med 2007; 73(09):100.
64. Kolodziej H, Kayser O, Latté KP, Ferreira D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method. Planta Med 1999; 65(05): 444-446.
65. Gautam R, Saklani A, Jachak SM. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. J Ethnopharmacol 2007; 110(2): 200-234.
66. Tomczyk M, Leszczyńska K, Jakoniuk P. Antimicrobial activity of *Potentilla* species. Fitoterapia 2008; 79(7): 592-594.
67. Tomczyk M, Pleszczyńska M, Wiater A. Variation in total polyphenolics contents of aerial parts of *Potentilla* species and their anticariogenic activity. Molecules 2010; 15(7): 4639-4651.

68. Wang SS, Wang DM, Pu WJ, Li DW. Phytochemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of three *Potentilla* species. BMC Complem Altern M 2013; 13(1):1.
69. Tomczyk M, Wiater A, Pleszczyńska M. In vitro anticariogenic effects of aerial parts of *Potentilla recta* and its phytochemical profile. Phytother Res 2011; 25(3): 343-350.
70. Jurkštienė V, Pavilonis A, Garšvienė D, et al. Investigation of the antimicrobial activity of Rhaponticum (*Rhaponticum carthamoides*) and shrubby cinquefoil (*Potentilla fruticosa* L.). Medicina 2010; 47(3): 174-179.
71. Terashima S, Shimizu M, Nakayama H, et al. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. Part III. Studies on aldose reductase inhibitors from medicinal plant of "Sinfito," *Potentilla candicans*, and further synthesis of their related compounds. Chem Pharm Bull 1990; 38(10): 2733-2736.
72. Enomoto S, Okada Y, Güvenc A, et al. Inhibitory effect of traditional Turkish folk medicines on aldose reductase (AR) and hematological activity, and on AR inhibitory activity of quercetin-3-O-methyl ether isolated from *Cistus laurifolius* L. Biol Pharm Bull 2004; 27(7): 1140-1143.
73. Kumar D, Ghosh R, Pal BC. α -Glucosidase inhibitory terpenoids from *Potentilla fulgens* and their quantitative estimation by validated HPLC method. J Funct Foods 2013; 5(3): 1135-1141.
74. Song C, Huang L, Rong L, et al. Anti-hyperglycemic effect of *Potentilla discolor* decoction on obese-diabetic (Ob-db) mice and its chemical composition. Fitoterapia 2012; 83(8): 1474-1483.
75. Qiao W, Zhao C, Qin N, Zhai HY, Duan HQ. Identification of trans-tiliroside as active principle with anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects from *Potentilla chinesis*. J Ethnopharmacol 2011; 135(2): 515-521.
76. Zhang L, Yang J, Chen XQ, et al. Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. J Ethnopharmacol 2010; 132(2): 518-524.

77. Zhao C, Qiao W, Zhang YW, Lu B, Duan HQ. Study on anti-diabetes active fraction and constituents from *Potentilla chinesis*. China Journal of Chinese materia medica 2008; 33(6): 680-682.
78. Zhang DM, Lou LX, Wu AM, et al. Effects of *Astragalus membranaceus* and *Potentilla discolor* mixture on insulin resistance and its related mRNA expressions in KKAY mice with type 2 diabetes. Journal of Chinese Integrative Medicine 2012; 10(7): 821-826.
79. Kolpakov MA, Grek OR, Bashkirova YV, Lyubarskii MS, Ravilova YR. Hepatoprotective properties of aqueous extract from *Pentaphylloides fruticosa* during chronic toxic hepatitis. B Exp Biol Med 2001; 131(5): 470-472.
80. Morikawa T, Ninomiya K, Imura K, et al. Hepatoprotective triterpenes from traditional Tibetan medicine *Potentilla anserina*. Phytochemistry 2014; 102: 169-181.
81. Rojas A, Cruz S, Rauch V, et al. Spasmolytic potential of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Phytomedicine 1995; 2(1): 51-55.
82. Lin X, Zhang S, Huang R, et al. Protective effect of tormentic acid from *Potentilla chinensis* against lipopolysaccharide/D-galactosamine induced fulminant hepatic failure in mice. Int Immunopharmacol 2014; 19(2): 365-372.
83. Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E, Swiader K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. Food Chem 2007; 100(2): 579-583.
84. Kalia K, Sharma K, Singh HP, Singh B. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC†. J Agr Food Chem 2008; 56(21): 10129-10134.
85. Miliauskas G, Van Beek TA, Venskutonis PR, et al. Antioxidant activity of *Potentilla fruticosa*. J Sci Food Agr 2004; 84(15): 1997-2009.
86. Rauf A, Khan R, Muhammad N. Antioxidant studies of various solvent fractions and chemical constituents of *Potentilla evestita* Th. Wolf. Afr J Pharm Pharmacol 2013; 7(40): 2710-2713.

87. Bos M, Vennat B, Meunier M, et al. Procyanidins from tormentil: antioxidant properties towards lipoperoxidation and anti-elastase activity. *Biol Pharm Bull* 1996; 19(1): 146-148.
88. Avcı G, Kupeli E, Eryavuz A, Yesilada E, Kucukkurt I. Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J Ethnopharmacol* 2006; 107(3): 418-423.
89. Zhao B, Zhang J, Yao J, et al. Selenylation modification can enhance antioxidant activity of *Potentilla anserina* L. polysaccharide. *Int J Biol Macromol* 2013; 58: 320-328.
90. Qin XJ, Li LZ, Qi LV, et al. Neuroprotection of n-Butanol Extract from Roots of *Potentilla anserina* on Hypoxic Injury in Primary Hippocampal Neurons. *Chinese Herbal Medicines* 2012; 4(3): 195-200.
91. Hu T, Wei X, Zhang X, Cheng F, et al. Protective effect of *Potentilla anserine* polysaccharide (PAP) on hydrogen peroxide induced apoptosis in murine splenic lymphocytes. *Carbohydr Polym* 2010; 79(2): 356-361.
92. Bazylo A, Piwowarski JP, Filipek A, Bonarewicz J, Tomczyk M. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Potentilla recta* and its main ellagitannin, agrimoniin. *J Ethnopharmacol* 2013; 149(1): 222-227.
93. Shuai XH, Hu TJ, Zhang X, Cheng FS, Chen JR. Inhibitory action of *Potentilla anserine* polysaccharide fraction on H₂O₂-induced apoptosis of murine splenic lymphocytes. *Acta Pharm Sinic* 2009; 44(9): 987-993.
94. Jaitak V, Sharma K, Kalia K, et al. Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western Himalaya. *J Food Compos Anal* 2010; 23(2): 142-147.
95. Saio V, Syiem D, Sharma R. Effect of *Potentilla fulgens* on lipid peroxidation and antioxidant status in alloxan-induced diabetic mice. *J Basic Clin Pharm* 2012; 3(2): 249.
96. Choudhary A, Mittal AK, Radhika M, et al. Two new stereoisomeric antioxidant triterpenes from *Potentilla fulgens*. *Fitoterapia* 2013; 91: 290-297.

97. Tomczyk M, Paduch R, Wiater A, et al. The influence of aqueous extracts of selected *Potentilla* species on normal human colon cells. *Acta Pol Pharm* 2012; 70(3): 523-531.
98. Hu TJ, Shuai XH, Chen JR, Wei YY, Zheng RL. Protective effect of a *Potentilla anserina* polysaccharide on oxidative damages in mice. *Int J Biol Macromol* 2009; 45(3): 279-283.
99. Jaitak V, Kaul VK, Kumar N, et al. New hopane triterpenes and antioxidant constituents from *Potentilla fulgens*. *Nat Prod Commun* 2010; 5(10): 1561-1566.
100. Li LZ, Wang LJ, Yue WANG, et al. Effect of n-butanol extract from *Potentilla anserina* on hypoxia-induced calcium overload and SERCA2 expression of rat cardiomyocytes. *Chinese Herbal Medicines* 2012; 4(2): 142-149.
101. Calvo MI, Cavero RY. Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from official sources. *J Ethnopharmacol* 2014; 157: 268-273.
102. Kaminskiĭ AV, Kiseleva IA, Teplaia EV. Clinical application of *Potentilla alba* for prevention and treatment of thyroid gland pathologies. *Likars' ka sprava* 2013; (8): 99-108.
103. Turchaninova LI. Experience of using phytopreparation Alba (root extract of the *Potentilla alba*) in complex treatment of thyroid pathology in children and adolescents. *Likars' ka sprava* 2016; 125-129.
104. Kvacheniuk AN, Kvacheniuk EL. The use of phytotherapy for treatment of thyroid diseases. *Likars' ka sprava* 2011; (3-4): 99-104.
105. Piao X, Tian Y, Mi X, Cui J. Tyrosinase inhibition of *Potentilla bifurca*. *China J Chinese Materia Medica* 2009; 34(15): 1952-1954.
106. Schimmer O, Lindenbaum M. Tannins with antimutagenic properties in the herb of *Alchemilla* species and *Potentilla anserina*. *Planta Med* 1995; 61(2): 141-145.
107. Roy B, Swargiary A, Syiem D, Tandon V. *Potentilla fulgens* (Family Rosaceae), a medicinal plant of north-east India: a natural anthelmintic? *Journal of Parasitic Diseases* 2010; 34(2): 83-88.

108. Ang HY, Subramani T, Yea SK, et all. Immunomodulatory effects of *Potentilla indica* and *Dendrophthoe pentandra* on mice splenocytes and thymocytes. *Exp Ther Med* 2014; 7(6): 1733-1737.
109. Shushunov S, Balashov L, Kravtsova A, et all. Determination of acute toxicity of the aqueous extract of *Potentilla erecta* (Tormentil) rhizomes in rats and mice. *J Med Food* 2009; 12(5): 1173-1176.
110. Roy B, Giri BR, Chetia M, Swargiary A. Ultrastructural and biochemical alterations in rats exposed to crude extract of *Carex baccans* and *Potentilla fulgens*. *Microsc Microanal* 2012; 18(05): 1067-1076.
111. Jenkins Robert R. Free radical chemistry. *Sports Med* 1988; 5(3): 156-170.
112. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sport Exer* 2001; 33(3): 368-370.
113. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem* 2006; 31(2): 51-56.
114. Tabakoğlu E, Durgut R. Oxidative stress in veterinary medicine and effects in some important diseases. *AVKAE Derg* 2013; 3(1): 69-75.
115. Fantel AG. Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis. *Teratology* 1996; 53(3): 196-217.
116. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Bio Med* 2001; 31(11): 1287-1312.
117. Farrugia G, Balzan R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front Oncol* 2012; 2(64): 1-22.
118. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18(10): 872-879.
119. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. *T Klin J Med Sci* 2000; 20(2): 107-111.
120. Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM, Besler HT. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Ulus Travma Derg* 2004; 10(3): 149-159.

121. Prior RL, Cao G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods 1. Free Radical Bio Med 1999; 27(11): 1173-1181.
122. Parejo I, Viladomat F, Bastida J, et al. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. J Agr Food Chem 2002; 50(23): 6882-6890.
123. Kasnak C, Palamutoğlu R. Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. Turk J Agric-Food Sci Technol 2015; 3(5): 226-234.
124. Cheng W, Tung YH, Liu CH, Chen JC. Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shellfish Immun 2006; 20(4): 438-449.
125. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. Düzce Tıp Fak Derg 2005; 3: 30-39.
126. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. Horm Metab Res 1997; 29(08): 363-372.
127. Konukoğlu D, Akçay T. Glutation metabolism and clinical importance. J Med Sci 1995; 15(4): 214-218.
128. Akpanabiatu MI, Uboh FE, Ekanem TB, et al. The effect of interaction of *Rauwolfia vomitoria* root bark extract with vitamin E on rats' liver enzymes. Turk J Biol 2009; 33(3): 189-194.
129. Podsędek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. LWT-Food Sci Technol 2007; 40(1): 1-11.
130. May JM. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? FASEB J 1999; 13(9): 995-1006.
131. Packer L. Handbook of antioxidants (Vol. 8), CRC Press, California, 2001: 309.
132. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia 2011; 82(4): 513-523.

133. Neuhouster ML. Review: Dietary flavonoids and cancer risk: Evidence from human population studies. *Nutr Cancer* 2004; 50(1):1-7.
134. Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoitler. *Kocatepe Tıp Derg* 2002; 3: 1-8.
135. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006; 99(1): 191-203.
136. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med* 1996; 20(7): 933-956.
137. Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol* 2003; 41(6): 753-758.
138. Andjelković M, Van Camp J, De Meulenaer B, et al. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem* 2006; 98(1): 23-31.
139. Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a review. *Cr Rev Food Science* 1998; 38(6): 421-464.
140. Koca N, Karadeniz F. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda* 2005; 30(4): 229-236.
141. Yılmaz N, Akgül Y. Immunoglobulins and septicemia. *Uludag Univ J Fac Vet Med* 2014; 33(1/2): 33-42.
142. Tokgözoğlu L. Ateroskleroz ve enflamasyonun rolü. *Türk Kardiyol Dern Arş* 2009; 37(4): 1-6.
143. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(2): 240-273.
144. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327(5963): 291-295.
145. Çekiç E. Kronik Rinosinüzit Etiyopatogenezi. *Turkish J Rhinology* 2015; 4(2): 83-89.

146. Fadiloğlu Ç, Tokem Y, Özçelik H. Biyolojik ajanların kullanımında hemşirenin sorumlulukları. *Türk Onkol Derg* 2008; 23(1): 45-53.
147. Uluoğlu Ö. Patoloji (4. Baskı), Güneş Kitabevi, Ankara, 1990: 166-167.
148. Baykal Y, Karaayvaz M, Kutlu M. İnterlökinler. *T Klin J Med Sci* 1998; 18: 77-84.
149. Bilgehan H. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi (10. Baskı), Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 2002: 325-330.
150. Male D, Champion B, Cooke A, et al. Cytokines. In: *Advanced Immunology*, New York, Gower, 1991; 11(1): 11-17.
151. Terzioğlu E. İnflamasyonun İmmünolojik Özellikleri. *ANKEM Derg* 2004; 18 (Ek 2):156-157.
152. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 1999; 299: 152-178.
153. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999; 64(4): 555-559.
154. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 2004; 85(2): 231-237.
155. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan J Nutri* 1986; 44(6): 307-315.
156. Dorman HD, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J Agr Food Chem* 2003; 51(16): 4563-4569.
157. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Gen Pharmacol-Vasc S* 1999; 32(6): 661-667.

158. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 1999; 26(9): 1231-1237.
159. Oomah BD, Mazza G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *J Agr Food Chem* 1996; 44(7): 1746-1750.
160. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agr Food Chem* 1998; 46(10): 4113-4117.
161. Aruoma OI, Spencer JP, Warren D, et al. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chem* 1997; 60(2): 149-156.
162. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal Biochem* 1971; 40(2): 450-458.
163. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165(1): 215-219.
164. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* 2007; 42(4): 377-387.
165. Fidancı ŞB, Gümüş LT. Nitrik oksit ölçüm yöntemleri. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg* 2011; 4(3): 1-8.
166. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41(6): 892-896.
167. Simirgiotis MJ, Schmeda-Hirschmann G. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD–ESI-MS and free radical quenching techniques. *J Food Compos Anal* 2010; 23(6): 545-553.

168. Tomovic MT, Cupara SM, Popovic-Milenkovic MT, et all. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Potentilla reptans* L. Acta Pol Pharm 2015; 72(1): 137-45.
169. Sarikurkcü C, Zengin G, Aktümsek A, Ceylan O, Şanda MA. *Onopordum anaticum* tohumlarının antioksidan aktiviteleri. Selçuk Üniv Fen Fak Fen Derg 2015; 41(41): 89-96.
170. Sökmen BB, Aydın S, Sağkal Y, Akyurt İ. Giresun'dan toplanan *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh deniz yosununun antioksidan aktivitesinin incelenmesi. Karadeniz Fen Bilim Derg 2016; 6(14): 66-76.
171. Özmen I, Çelikoğlu U, Özçelik H, Yazici SO. *In vitro* antioxidant activity of extract of *Ankyropetalum reuteri* Fenzl. In 2nd International Non-Wood Products Symposium, p. 102, 8-10 September 2011, Isparta, Turkey.
172. Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J Food Sci Technol 1996; 28(2): 232-239.
173. Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. J Phys Chem A 2004; 108(22): 4916-4922.
174. Zhang LL, Lin YM. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. Afr J Biotechnol 2009; 8(10): 2301-2309.
175. Liu W, Wang D, Liu J, Li D, Yin D. Quality Evaluation of *Potentilla fruticosa* L. by High Performance Liquid Chromatography Fingerprinting Associated with Chemometric Methods. Plos one 2016; 11(2):e0149197.
176. Okan OT, Varlıbaş H, Öz M, Deniz İ. Antioxidant analysis methods and some non wood forest plant products as sources of antioxidants in Eastern Black Sea Region. Kastamonu Univ J For Fac 2013; 13(1): 48-59.
177. Braca A, Politi M, Sanogo R, et all. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. J Agr Food Chem 2003; 51(23): 6689-6695.

178. Liyana- Pathirana CM, Shahidi F. Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *J Sci Food Agr* 2006; 86(3): 477-485.
179. Taga MS, Miller EE, Pratt DE. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1984; 61(5): 928-931.
180. Yarsan E. Lipit peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg* 1998; 9(1-2): 89-95.
181. Orhan IE, Kartal M. *Hypericum perforatum* L.'da (St. John's Wort) İşaretleyici maddelerin LC-DAD-MS ile miktar tayini ve antioksidan aktivitesi. *Turk J Pharm Sci* 2015; 12(3): 30-39.
182. Shahidi F. Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. Shahidi F (Eds.), AOCS Press, United States of America, 1997: 98.
183. Jin M, Iwamoto T, Yamada K, et all. Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774. 1 cells. *Biosci Biotech Bioch* 2011; 75(7): 1283-1289.
184. Kim HG, Shrestha B, Lim SY, et all. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 2006; 545(2): 192-199.
185. Ali EMM, Soha HM, Mohamed TM. Nitric oxide synthase and oxidative stress: regulation of nitric oxide synthase, In: *Oxidative stress—molecular mechanisms and biological effects*. Lushchak V, Semchyshyn H (Eds.), InTech, Croatia, 2012: p 61-72.
186. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol* 2013; 11(1): 1.
187. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007; 45(2): 27.
188. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Rev* 2009; 60(1): 57-64.

189. Barnes TC, Anderson ME, Moots RJ. The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis, In: International Journal of Rheumatology, Chung L (Eds.), Liverpool, 2011: 6.
190. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008; 180(9): 5771-5777.
191. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19(1): 683-765.
192. Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allerg Asthma Imm* 1997; 79(6): 469-484.
193. Idriss HT, Naismith JH. TNF- α and the TNF receptor superfamily: Structure- function relationship (s). *Microsc Res Techniq* 2000; 50(3): 184-195.
194. Winthrop KL. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. *Nat Clin Pract Rheum* 2006; 2(11): 602-610.
195. Keskin E, Dönmez N, Kılıçarslan G, Kandır S. Beneficial effect of quercetin on some haematological parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bull Env Pharmacol Life Sci* 2016; 5: 65-68.
196. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 2007; 557(2): 221-229.
197. Chao PC, Hsu CC, Yin MC. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr Metab* 2009; 6(1): 33.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Başak ÖKDEM

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 25 Ekim 1980, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 352 207 66 66

Fax: +90 352 437 91 69

Email: basakakdemir@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 38039 Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fak.	Kayseri, 2008
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fak.	Ankara, 2003
Lise	Melikgazi Lisesi	Kayseri, 1999

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2004-2007	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Arş. Gör.
2007-2016	Serbest Eczane	Eczacı
2016	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	Eczacı
2017	Kayseri İl Sağlık Müdürlüğü	Eczacı

YABANCI DİL

İngilizce