

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI

***HELIANTHEMUM CANUM* (L.) BAUMG ÜZERİNDE
FARMASÖTİK BOTANİK YÖNÜNDEN ARAŞTIRMALAR**

Hazırlayan
Neslihan ŞAM GÖKŞEN

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Ayşe BALDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2016
KAYSERİ

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

***HELIANTHEMUM CANUM (L.) BAUMG ÜZERİNDE
FARMASÖTİK BOTANİK YÖNÜNDEN ARAŞTIRMALAR***

**Hazırlayan
Neslihan ŞAM GÖKŞEN**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Ayşe BALDEMİR**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2015-5642 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Neslihan ŞAM GÖKŞEN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“*Helianthemum canum* (L.) Baumg Bitkisi Üzerinde Farmasötik Botanik Yönünden Araştırmalar” adlı **Yüksek Lisans** tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan**Neslihan ŞAM GÖKŞEN****İmza****Danışman****Yrd. Doç Dr. Ayşe BALDEMİR****İmza****Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı****Prof. Dr. Müberra KOŞAR****İmza**

Yrd. Doç. Dr. Ayşe BALDEMİR danışmanlığında **Neslihan ŞAM GÖKŞEN** tarafından hazırlanan “*Helianthemum canum* (L.) Baumg Bitkisi Üzerinde **Farmasötik Botanik Yönünden Araştırmalar**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmakognozi** Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../...../2016

JÜRİ

İmza

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayşe BALDEMİR (Farmasötik Botanik ABD)

Üye : Prof. Dr. Müberra KOŞAR (Farmakognozi ABD)

Üye : Prof. Dr. Maksut COŞKUN (Farmasötik Botanik ABD)



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2016

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana değerli bilgilerini aktarıp her türlü her zaman destek olan tez danışmanım Yrd. Doç Dr. Ayşe BALDEMİR'e,
Desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli vaktini bana ayırıp her daim yardımcı olan hocam Prof. Dr. Müberra KOŞAR'a,
Laboratuvar çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen, yol gösteren ve desteğini hep arkamda hissettiğim hocam Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK'a,
Antimikrobiyal çalışmalarında benden desteğini esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Nilay ILDİZ'a,
Botanik çalışmalarında bana yardımcı olup manevi desteğini her zaman için hissettiren hocam Arş. Gör. Selen ERTÜRK'e,
Çalışmalarım sırasında benden fikirlerini ve manevi desteklerini esirgemeyen hocalarım Dr. Berrak ALTINSOY ve Yrd. Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL'e,
Reaksiyon çalışmalarında bana vaktini ayırıp yardımcı olan hocam Öğr. Gör. Leyla PAŞAYEVA'ya,
Tez çalışmamı TYL-2015-5642 kodlu proje ile finansal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,
Bitkinin teşhis edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Uluslararası Kıbrıs Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Mehmet KOYUNCU hocama ve Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümünde görev yapan Dr. Emine Burcu YEŞİLYURT'a,
Uçucu yağ analiz çalışmamızın yapılmasında desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye ve kurumun imkanlarından faydalanmamıza olanak sağlayan Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı'na,
Antiamibik aktivite çalışmalarımızın yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Ülkü KARAMAN'a ve kurumun imkanlarından faydalanmamıza olanak sağlayan Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,
Her zaman yanımda olan maddi ve manevi her türlü desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen anneme, babama, kardeşime ve eşime,
Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**HELIANTHEMUM CANUM (L.) BAUMG ÜZERİNDE
FARMASÖTİK BOTANİK YÖNÜNDEN ARAŞTIRMALAR**

Neslihan ŞAM GÖKŞEN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2016

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayşe BALDEMİR

ÖZET

Bu çalışma Kayseri'nin Pınarbaşı ilçesinde doğal olarak yetişen Cistaceae familyasına ait *Helianthemum canum* (L.) Baumg üzerinde yapılmış ve morfolojik-anatomik özellikleri, kimyasal bileşenleri, biyolojik aktivitesi çalışılmıştır. Türün morfolojik ve anatomik özelliklerini araştırmak için ışık mikroskobu, stereomikroskop ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile fotoğrafları çekilmiş; çizimlerle gösterilmiştir. Kimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere bitkinin toprak üstü kısımlarından su ve %70'lik metanol ekstraktları hazırlanmıştır. Kimyasal çalışmalarda, *H. canum*'un su ve %70'lik metanol ekstraktlarının kalitatif ve kantitatif kompozisyon analizleri ters faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile yapılmıştır. Ayrıca ekstraktların toplam fenol, flavonoid ve flavonol miktarları ile uçucu yağın analizi yapılmıştır. Biyolojik aktivite çalışmalarında, ekstraktların antimikrobiyal, antioksidan ve anti-amibik aktiviteleri araştırılmıştır. Ekstraktların antioksidan aktivitelerini tanımlamak için 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH[•]) ve 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS^{•+}) radikal süpürücü etkileri, demir şelat aktivite, β -karoten-linoleik asit birlikte oksidasyon ve lipid peroksidasyonu inhibitörü etki yöntemleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında Gram (-)'lerden (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* NCTC 8394, *Haemophilus influenzae* ATCC 4447) ve Gram (+)'lerden (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* NJ-1, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) mikroorganizmalar disk difüzyon ve mikrodilüsyon (MİK) metodları için kullanılmıştır. Anti-amibik aktivite çalışmalarında *H. canum*'un metanol ekstresinin *Acanthamoeba castellanii* türü üzerindeki lethal etkisi gösterilmiştir. Bu çalışma, *H. canum*'un kimyasal içerikleri ve biyolojik aktivitelerini gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: *Helianthemum canum*, Anatomi, Morfoloji, Aktivite, YBSK

INVESTIGATIONS ON *HELIANTHEMUM CANUM* (L.) BAUMG FROM THE POINT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

Neslihan ŞAM GÖKŞEN

Erciyes University, Graduate Institute of Health Science

Department of Pharmacognosy

MS Thesis, January 2016

Advisor: Assist. Prof. Dr. Ayşe BALDEMİR

ABSTRACT

This study was conducted on *Helianthemum canum* (L.) Baumg belong to Cistaceae growing to province of Kayseri (Pınarbaşı) and morphological-anatomical features, chemical constituents, biological activities of species were studied. For investigation in the morphological and anatomical features of the species were demonstrated with drawings and their photographs taken with light microscope, stereomicroscope and scanning electron microscope (SEM). Water (HCW) and 70% MeOH extracts (HCMEOH) were prepared from aerial parts of *H. canum* for chemical analysis and biological activity studies. In chemical analysis, qualitative and quantitative compositional analyses of HCMEOH and HCW extracts of *H. canum* were performed with reversed-phase High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Total phenols, flavonoids, flavonols and essential oils of extracts were also analyzed. In biological activity studies; antioxidant, antimicrobial, antiparasite activities of extracts were examined. To determine the antioxidant activity of the extracts, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{•+}) radical scavenging activity, iron chelation activity, β -carotene-linoleic acid co-oxidation assay and lipid peroxidation assay were used. In antimicrobial studies, Gram (-) (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* NCTC 8394, *Haemophilus influenzae* ATCC 4447) and Gram (+) (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* NJ-1, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) microorganisms were used for disc diffusion and microdilution methods (MIC). In antiamibic activity studies, HCMEOH extract of *H. canum* is showed high potency in its lethal effects on *Acanthamoeba castellanii*. This is the first study demonstrating the plant's chemical contents and biological activities.

Keywords: *Helianthemum canum*, Anatomy, Morphology, Activity, HPLC

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	xiii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. BOTANİK BİLGİLER	4
2.1.1. Cistaceae Familyasının Dünya’da Yayılışı ve Önemi.....	4
2.1.2. <i>Helianthemum</i> Miller Cinsinin Bitki Sistematikindeki Yeri	4
2.1.3. Cistaceae Familyasının Genel Özellikleri.....	5
2.1.3.1. Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası’nda Yer Alan Cistaceae Familyasının Cins Tayin Anahtarı	5
2.1.4. <i>Helianthemum</i> Mill. Cinsinin Dünya’da Yayılışı	6
2.1.5. <i>Helianthemum</i> Mill. Cinsinin Genel ve Botanik Özellikleri	6
2.1.6. <i>Helianthemum canum</i> (L.) Baumg Türünün Genel ve Botanik Özellikleri	7
2.1.6.1. <i>Helianthemum</i> Mill. Cinsinin Tür Tayin Anahtarı	9
2.1.6.2. <i>H. canum</i> Türünün Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası’nda Yer Alan Grup Tayin Anahtarı	11
2.2. <i>HELIANTHEMUM</i> MILL. TÜRLERİNİN KULLANIMLARI.....	12
2.3. <i>HELIANTHEMUM</i> MILL. TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI	14
2.4. <i>HELIANTHEMUM</i> TÜRLERİNİN KİMYASAL BİLEŞENLERİ.....	16

2.5. ANTİOKSİDANLAR	17
2.5.1. Oksijen ve Önemi	17
2.5.2. Serbest Radikaller	18
2.5.2.1. Oksijen Türevi Serbest Radikaller	18
2.5.2.1.1. Süperoksit Anyon Radikali	18
2.5.2.1.2. Hidroksil Radikali	19
2.5.2.2. Oksijen Türevi Serbest Olmayan Radikaller	20
2.5.2.2.1. Hidrojen Peroksit	20
2.5.2.2.2. Singlet O ₂	21
2.5.2.3. Oksijen Türevi Olmayan Reaktif Azot Türleri	22
2.5.2.3.1. Nitrojen oksit	22
2.5.2.3.2 Peroksinitrit	22
2.5.3. Oksidatif Stres	23
2.5.4. Lipit Peroksidasyon	24
2.5.4.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması	24
2.5.5. Antioksidanlar ve Savunma Mekanizmaları	25
2.5.5.1. Enzimatik Olan Koruyucu Sistemler	27
2.5.5.2 Enzimatik Olmayan Koruyucu Sistemler	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN MATERYAL VE KİMYASAL MADDELER	31
3.1.1 Bitkisel Materyal	31
3.1.2. Kimyasal Maddeler	32
3.1.3. Kullanılan Aletler	32
3.2. MORFOLOJİK VE ANATOMİK ÇALIŞMALAR	33
3.3. DENEYSEL ÇALIŞMA	34
3.3.1. Ekstrelerin Hazırlanışı	34
3.3.2. Etken Madde Gruplarının Teşhis Reaksiyonları	34
3.3.2.1. Alkaloit Teşhisi	34

3.3.2.2. Kardiotonik Glikozit Teşhisi.....	35
3.3.2.3. Saponozit Teşhisi	36
3.3.2.4. Flavonozit Teşhisi	38
3.3.2.5. Antosiyanozit Teşhisi	38
3.3.2.6. Siyanogenetik Heterozit Teşhisi	38
3.3.2.7. Tanen Teşhisi	39
3.3.2.8. Kumarin Teşhisi	39
3.3.2.9. Uçucu Yağ Teşhisi	40
3.3.3 Kompozisyon Analizleri	41
3.3.3.1. Toplam Fenol Miktar Tayini.....	41
3.3.3.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini.....	41
3.3.3.3. Toplam Flavonol Miktar Tayini.....	41
3.3.3.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analiz.....	42
3.3.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....	42
3.3.4.1. Demir(II) Şelat (Kelat) Aktivite.....	42
3.3.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH [•]) Radikalini Süpürücü Etki Tayini.....	43
3.3.4.3. β -Karoten / Linoleik Asit Birlikte Oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini.....	43
3.3.4.4. 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS ⁺ •) Radikalini Süpürücü Etki Tayini.....	44
3.3.4.5. Askorbat –Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu.....	44
3.3.5. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları.....	44
3.3.6. Antiamibik Aktivite Çalışmaları	46
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	47
4. BULGULAR	48
4.1. MORFOLOJİK VE ANATOMİK ÇALIŞMALAR.....	48
4.1.1. <i>H. canum</i> türünün çiçek morfolojisi.....	48

4.1.2. <i>H. canum</i> türünün yaprak morfolojisi.....	51
4.1.3. <i>Helianthemum canum</i> türünün yaprak anatomisi.....	54
4.1.3.1. Yaprak ayası.....	54
4.1.3.2. Yaprak orta damarının enine kesiti	55
4.1.3.3. Yaprak üst ve alt epiderması.....	56
4.1.3.4. Petiyol enine kesiti	61
4.1.4. <i>H. canum</i> türünün gövde anatomisi.....	62
4.2. ESKTRELERİN HAZIRLANIŞI, SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOĞRAFİK BİLEŞİM ANALİZLERİ	64
4.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı	64
4.2.2. Ana Etken Madde Gruplarının Teşhis Reaksiyonları.....	64
4.2.2.1. Alkaloit Teşhisi	64
4.2.2.2. Kardiotonik Glikozit Teşhisi.....	64
4.2.2.3. Saponozit Teşhisi	64
4.2.2.4. Flavonozit Teşhisi	65
4.2.2.5. Antosiyanozit Teşhisi	65
4.2.2.6. Siyanogenetik Heterozit Teşhisi	65
4.2.2.7. Tanen Teşhisi	65
4.2.2.8. Kumarin Teşhisi	65
4.2.2.9. Uçucu Yağ Teşhisi	66
4.2.3. Kompozisyon Analizleri	68
4.2.3.1. Toplam fenol, flavonoit ve flavonol miktar tayinleri	68
4.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Analizi.....	69
4.3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI.....	73
4.3.1. Demir(II) şelat (kelat) aktivite.....	73
4.3.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH [•]) radikalini süpürücü etki tayini	74
4.3.3. β -Karoten / linoleik asit birlikte oksidasyonu inhibe edici etki tayini.....	75

4.3.4. 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS ⁺ •)	
radikalini süpürücü etki tayini.....	76
4.3.5. Askorbat –Fe (III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun	
inhibisyonu	77
4.4. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÇALIŞMALARI	78
4.5. ANTİAMİBİK AKTİVİTE ÇALIŞMASI	80
5. TARTIŞMA-SONUÇ	82
5.1. MORFOLOJİK VE ANATOMİK ÇALIŞMALAR	82
5.2.UÇUCU YAĞ KOMPOZİSYON ANALİZİ	84
5.3. SPEKTROSKOPİK VE KROMATOĞRAFİK BİLEŞİM ANALİZLERİ	
İLE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ANALİZLERİ	85
5.4. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ANALİZİ	89
5.5 ANTİAMİBİK AKTİVİTE ANALİZİ	90
6. KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

Abs	: Absorbans
ABTS ^{•+}	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit)
AEF	: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
ANOVA	: Varyans analizi
BHA	: Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluene
CAT	: Kateşin , Katalaz
CE	: Kateşin'e eşdeğer
CLSI	: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH [•]	: 1,1-difenil-2-pikrihidrazil radikali
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
ERCH	: Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryumu
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
FCS	: Fetal Calf Sera
Fl	: Flora
FMN	: Flavın mononükleotit
FRAP	: Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü
g	: gram
GA	: Gallik asit
GAE	: Gallik asit'e eşdeğer
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi–Kütle spektroskopisi
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
IC ₅₀	: Yüzde ellisini inhibe eden konsantrasyon

İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
M	: Molar
mg	: miligram
MH	: Mueller-Hinton agar
mL	: mililitre
mM	: milimolar
N	: normal
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
nm	: nanometre
NO ⁻	: Nitrik oksit
OH ⁺	: Hidroksil
PBS	: Fosfat Buffer Saline
Quer	: Kersetin
RE	: Rutin'e eşdeğer
RNS	: Reaktif Azot Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAUM	: Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi
TBARS	: Tiyoarbütirik asit reaktif türleri
TEAC	: Troloks'a eşdeğer
YBSK	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
μmol	: Mikromolar
Mm	: Mikromol
μL	: Mikrolitre

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 2.1. Türkiye’de yayılış gösteren <i>Helianthemum</i> türlerinin Türkçe adları ve yetiştği bölgeler	7
Tablo 2.2. Türkiye’de yayılış gösteren <i>Helianthemum</i> türlerinin Türkçe adları ve yetiştği bölgeler.....	8
Tablo 2.3. Reaktif Oksijen Türleri	22
Tablo 2.4. Reaktif Nitrojen Türleri.....	23
Tablo 2.5. Oksidatif strese neden olan faktörler	23
Tablo 2.6. Antioksidan savunma sistemi elemanları	27
Tablo 4.1. <i>H. canum</i> bitkisinde teşhis edilen madde grupları... ..	65
Tablo 4.2. <i>H. canum</i> ’un uçucu yağının kimyasal bileşimi.....	66
Tablo 4.3. Ekstre verimleri, toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları	68
Tablo 4.4. <i>Helianthemum canum</i> ekstrelerinin YBSK sonuçları	69
Tablo 4.5. Standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	70
Tablo 4.6. <i>H. canum</i> metanol, su ekstreleri ve standartların minimum inhibisyon konsantrasyonu metoduna göre antimikrobiyal aktivite sonuçları	78
Tablo 4.7. <i>H. canum</i> metanol, su ekstreleri ve standartların disk difüzyon metoduna göre antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	79
Tablo 4.8. <i>H.canum</i> %70’lik metanol ve su ekstrelerinin anti-amibik aktivite sonuçları	81
Şekil 1.1. <i>Helianthemum canum</i> (L.) Baumg türünün doğadaki genel görünüşü	3
Şekil 2.1. <i>Helianthemum canum</i> türünün habitatu (Kayseri-Pınarbaşı).....	9
Şekil 2.2. Oksijenin suya indirgenmesi.....	17
Şekil 2.3. Haber-Weiss reaksiyonu	19
Şekil 2.4. Su molekülünden hidrojen radikali ve hidroksil radikali oluşumu.....	20
Şekil 2.5. Hidroksil radikali ile H çıkartılması ve lipid peroksidasyonunun başlaması	20
Şekil 2.6. Süperoksit anyonunun dismutasyonu	21
Şekil 3.1. <i>H. canum</i> türünün herbaryum örneği.....	32
Şekil 4.1. Çiçeğin genel görünüşü	49
Şekil 4.2. Papillili ovaryum.....	49
Şekil 4.3. <i>H. canum</i> çiçeğinin kaliks ve pediselinde yoğun tüyler	49

Şekil 4.4. <i>H. canum</i> çiçeğinin kaliks ve pediselinde yoğun tüyler	49
Şekil 4.5. <i>H. canum</i> petalinin genel görünüşü	50
Şekil 4.6. <i>H. canum</i> petalinin genel görünüşü morfolojik çizim	50
Şekil 4.7. <i>H. canum</i> papillili ovaryum	50
Şekil 4.8. <i>H. canum</i> papillili ovaryum morfolojik çizim.....	50
Şekil 4.9. <i>H. canum</i> stamen genel görünüşü	50
Şekil 4.10. <i>H. canum</i> stamen genel görünüşü morfolojik çizim.....	50
Şekil 4.11. Çiçeğin genel görünüşü	51
Şekil 4.12. Çiçeğin kaliksinde yoğun tüyler.....	51
Şekil 4.13. Papilli ovaryum	51
Şekil 4.14. Stamen	51
Şekil 4.15. <i>H. canum</i> bitkisinin yaprak üst yüzeyinde tüylerin görünümü	52
Şekil 4.16. <i>H. canum</i> bitkisinin yaprak alt yüzeyinde tüylerin görünümü	52
Şekil 4.17. Yaprak üst yüzeyi.....	53
Şekil 4.18. Yaprak alt yüzeyi	53
Şekil 4.19. Yaprak üst yüzey petiyolde tüyler.....	53
Şekil 4.20. Yaprak alt yüzey petiyolde tüyler	53
Şekil 4.21. Yaprak üst yüzeyde tüyler	54
Şekil 4.22. Tüy tabanı	54
Şekil 4.23. Yaprak ayası enine kesiti	54
Şekil 4.24. Yaprak ayası enine kesitinde palizat parankiması, iletim demeti ve druzlar.....	55
Şekil 4.25. Yaprak ayası enine kesitinde kapitat salgı tüyü	55
Şekil 4.26. Yaprak orta damarı enine kesit.....	56
Şekil 4.27. Yaprak üst epidermada stomalar	57
Şekil 4.28. Yaprak üst epidermada stomalar (SEM).....	57
Şekil 4.29. Yaprak üst epidermada tüyler	58
Şekil 4.30. Yaprak üst epidermada tüyler (SEM)	58
Şekil 4.31. Tüy tabanı karakteristik sarı lekeli	58
Şekil 4.32. Yaprak alt epidermada stomalar.....	59
Şekil 4.33. Yaprak alt epidermada stomalar (SEM)	59
Şekil 4.34. Yaprak alt epidermada örtü tüyleri.....	60
Şekil 4.35. Yaprak alt epidermada tüyler (SEM).....	60

Şekil 4.36. Yaprak enine kesitinde sünger ve palizat parankimalarının genel görüntüsü (mezofil)	60
Şekil 4.37. Petiyol enine kesiti şematik görüntü.....	61
Şekil 4.38. İletim demetlerinde druz kristalleri	61
Şekil 4.39. Petiyol enine kesitinde örtü tüyleri.....	61
Şekil 4.40. Petiyol enine kesitte parenkima hücrelerinde nişasta taneleri.....	61
Şekil 4.41. Gövde enine kesiti şematik görüntü	62
Şekil 4.42. Gövde enine kesitte örtü tüyleri	62
Şekil 4.43. Gövde enine kesitte örtü tüyleri	63
Şekil 4.44. Gövde enine kesitinde parankimada druz kristali ve salgı hücresi.....	63
Şekil 4.45. Gövde enine kesitinde parankima hücrelerinde kristaller	63
Şekil 4.46. Gövde enine kesitinde parankimada nişasta taneleri	63
Şekil 4.47. <i>H. canum</i> metanol ekstresine ait YBSK kromatogramı.....	71
Şekil 4.48. <i>H. canum</i> su ekstresine ait YBSK kromatogramı.....	71
Şekil 4.49. <i>H. canum</i> 'un bileşiminde tespit edilen maddelerin kimyasal formülleri	72
Şekil 4.50. <i>H. canum</i> ekstrelerinin ve standartların demir(II) şelat aktivitesi	73
Şekil 4.51. <i>H. canum</i> ekstrelerinin ve standartların DPPH [•] radikali süpürücü etkileri.....	74
Şekil 4.52. <i>H. canum</i> ekstrelerinin ve standartların β -karoten-linoleik asit peroksidasyonuna etkileri	75
Şekil 4.53. <i>H. canum</i> ekstrelerinin ve standartların ABTS ^{•+} radikalini süpürücü etkileri.....	76
Şekil 4.54. <i>H. canum</i> ekstrelerinin ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu	77
Şekil 4.55. <i>Acanthamoeba castellanii</i> trofozoitleri.....	80
Şekil 4.56. <i>Acanthamoeba castellanii</i> canlı trofozoitler ve kistleri (Eosini alan ölü trofozoit)	80
Şekil 4.57. <i>Acanthamoeba castellanii</i> ölü trofozoit.....	80

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye son kayıtlara göre 11707 bitki türü ile dünyanın en zengin floraya sahip ülkelerindendir. Bu türlerden 3649'u endemik olup endemizm oranı ise % 31.82'dir (1, 2). Ülkemiz florasının zenginliğinin temelinde, değişik iklim tiplerinin varlığı, coğrafik durumu, jeolojik yapısı, topoğrafik özellikleri, çeşitli toprak gruplarına sahip olması ve üç farklı fitocoğrafik (Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz bitki coğrafyası) bölgenin birleştiği yerde bulunması sayılabilir.

Bitkiler alemi biyolojik olarak aktif bileşiklerin ve yeni ilaçların keşfinde temel bir kaynaktır. Çoğu bitki ekstreleri ve bitkisel ürünler, tıbbi bitkilerin önemli bir özelliği olan güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. Yıllardır insanlarda çeşitli hastalıkların potansiyel terapötik ajanları olarak bilinen bitkilerin/bitkisel türevli doğal bileşiklerin kullanımına dayalı çalışmalar yapılmaktadır. Bu sebeple özellikle son yıllarda sentetik orjinli ilaçların insanlara ve çevreye olan çeşitli zararları göz önüne alınarak bitkisel ilaçlara ilgi giderek artmaktadır. Bitkilerin sahip oldukları sekonder metabolit olarak adlandırılan organik bileşenlerin tedavi edici özellikleri bu bitkilerin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasına olanak sağlamıştır. Genellikle farmakolojik olarak yüksek aktivite gösteren bu sekonder bileşikler, bitkinin antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar ve yara iyi edici olarak kullanılmasına sebep olmuştur.

Doğal olarak elde edilen ürünler, tıpta insan sağlığı açısından önemli bir kaynak teşkil etmektedir. İlaçların hazırlanmasında kullanılan birçok farmasötik maddeler, bitkilerdeki doğal ürünlerin taranmasıyla ortaya çıkmıştır. Ülkemizde bulunan bitkilerin yaklaşık 1000 kadarı tıbbi özellikleri nedeniyle hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (3).

Son yıllarda giderek artan kanser ve kalp hastalıklarının da içinde bulunduğu kronik hastalıklara yakalanma riskini azaltan bileşikler olarak sıklıkla adından bahsedilen antioksidanlar, sağlığımızın koruması için faydalı maddelerdir. Bitkiler; flavonoidler, antosiyaninler, vitaminler ve endojen metabolitler gibi çok çeşitli fenolik nüveye sahip, antioksidan özellikleri olan maddeleri içerirler (4).

Bu tez kapsamında, Kayseri'nin Pınarbaşı ilçesinde doğal yayılışı olan ve literatürde bu cinsle ilgili çeşitli halk arasında kullanımları olduğu tespit edilen, *Helianthemum canum* (L.) Baumg türü üzerinde Farmasötik Botanik ve Farmakognozik araştırmalar yapılmıştır. *Helianthemum* Miller cinsi, dünya genelinde öncelikle Kuzey ılıman bölgelerde, Güney Amerika'da ve Akdeniz Bölgesi'nde yayılış gösteren, yaklaşık 100 tür ile temsil edilen, çalı ve otsulardan oluşan bir bitki cinsidir (1,5). Bu çalışma kapsamında *H. canum* türünün anatomik, morfolojik, antioksidan, antimikrobiyal ve antiamibik aktivite çalışmalarının yanı sıra spektroskopik ve kromatografik analiz yöntemleri kullanılarak kimyasal içerik analizleri yapılmıştır.

Çeşitli *Helianthemum* taksonlarının gastrointestinal rahatsızlıklar, kabız ve kan kesici, antienflamatuar, antiülserojenik, antiparazitik, antimikrobiyal, analjezik, sitotoksik, vazodilatör ilaç, yara iyi edici ve yanık tedavilerinde merhem olarak geleneksel kullanımları mevcuttur (6).

Yapılan literatür taramasında ülkemizde doğal yayılış gösteren bu bitki türü üzerinde herhangi bir çalışma tespit edilmemiştir. Dolayısıyla bu tür üzerinde yapılması hedeflenen bu kapsamdaki çalışma literatürde bir ilk olacaktır.



Şekil 1.1. *Helianthemum canum* (L.) Baumg türünün doğadaki genel görünüşü

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BOTANİK BİLGİLER

2.1.1. Cistaceae Familyasının Dünya’da Yayılışı ve Önemi

Cistaceae bitkileri özellikle Kuzey ılıman bölgelerde, Güney Amerika’da ve Akdeniz Bölgesi’nde yayılış gösteren; gösterişli çiçekleri olan, tek yıllık ya da çok yıllık otsular veya çalılardan oluşan büyük bir familyadır. Dünya genelinde 8 cins ve yaklaşık olarak 200 türü mevcuttur (5). Familyanın birçok türü Kuzey Yarımkürenin ılıman ya da sıcak ılıman bölgelerinde yayılış gösterir (7).

2.1.2. *Helianthemum* Miller Cinsinin Bitki Sistematikindeki Yeri

Bölüm: Spermatophyta

Alt Bölüm: Angiospermae

Sınıf: Dialypetalae

Takım: Parietales

Familya: Cistaceae

Cins: *Helianthemum* Mill.

Tür: *Helianthemum canum* (L.) Baumg (8)

2.1.3. Cistaceae Familyasının Genel Özellikleri

Genellikle alkali ya da kumlu topraklarda yetişirler. Yapraklar basit ve tam, genelde oppozit dizilişlidir. Çiçek durumu simöz, sıklıkla rasemöz. Kaliks 5 sepalden oluşur ve düzensizdir, dışta brakteye benzeyen 2 sepal mevcuttur. Korolla ise aktinomorf, çabuk düşen 5 petalden oluşur, bazen 3'te olabilir. Androkeum çok sayıda stamen içerir, filamentler ayrı ve belirgindir, anterler ise filamente tabandan bağlıdır. Ginekeum 1 pistil içerir, 3 ya da 5 karpelli. Ovaryum üst durumlu ve tek stilusludur. Meyve lokulusit kapsül, derimsi ya da odunsu, tohumlar küçük ve köşeli, endosperm bol ve embriyo kıvrıktır (1, 9). Üyelerinin çoğu özellikle tüylerinin yapısı ile karakteristiktir. Taban kısmından dallanan tüyler basit ve tek hücrelidir. Kümeleşmiş tüylerin de yapıları genellikle benzerdir. Çeşitli formlarında sıklıkla ve bir sıra üzerinde dizili baş şeklinde salgı tüyü vardır. Ksilem ve floem özün etrafında silindirik şeklindedir. Küme kristallerde kalsiyum oksalat genellikle bol miktardadır (10).

Cistaceae familyasının karakteristik özelliği; tohum kabuğundaki fiziksel dormansinin (durgunluk) varlığıdır (11).

Son kayıtlara göre Cistaceae familyası Türkiye'de; *Cistus* L., *Fumana* Dunal Spach, *Helianthemum* Miller ve *Tuberaria* Spach olmak üzere 4 cins, 34 tür ile temsil edilmektedir (2).

2.1.3.1. Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası'nda Yer Alan Cistaceae Familyasının Cins Tayin Anahtarı (1)

1. Karpeller 5-10 adet; dıştaki sepaller içteki sepallere göre daha geniş; odunsu

1. *Cistus*

1. Karpeller 3 adet; içteki sepaller dıştakilere göre daha geniş; odunsu ya da otsu

2. Stigmalar az çok uzamış, dize benzer şekilde kıvrık stiluslu; sepallerin damarları belirgin; sarı renkli odunsu ya da otsu, petaller lekesiz

3. Bütün stamenler verimli; yapraklar karşılıklı; her kapsülde çok sayıda tohum olan kısa boylu odunsular ya da tek yıllık otsular

2. *Helianthemum*

3. Dıştaki stamenler verimsiz, boncuk dizisi gibi; yapraklar genellikle alternat dizilişli (*F. thymifolia* hariç); her kapsülde 3-12 adet tohum içeren kısa boylu odunsular

3. *Fumana*

2. Stigmalar hemen hemen sapsız ya da çok kısa saplı, düz stiluslu; sepallerin damarları belirgin; petaller sarı ve tabanda lekeli ya da beyaz ve lekesiz olan odunsu ya da otsular

4. Yapraklar şeritsi ve çiçek durumu umbel olan kısa boylu odunsular; petaller beyaz, lekesiz

4. *Halimium*

4. Geniş yapraklı ve çiçek durumu gevşek rasemöz olan tek yıllık otsular; petaller sarı, tabanda lekeli

5. *Tuberaria*

2.1.4. *Helianthemum* Mill. Cinsinin Dünya’da Yayılışı

Helianthemum cinsi dünya genelinde yaklaşık 100 tür ile temsil edilmektedir (5). Çoğunlukla Güney Avrupa, Doğu-Tropik Amerika ve Akdeniz Havzası’nda yayılış gösterir (7). Türkiye’de ise 16 tür ve 3 alt tür olmak üzere toplam 19 takson yetişmektedir. Bu türlerden 4’ü endemiktir (2).

2.1.5. *Helianthemum* Mill. Cinsinin Genel ve Botanik Özellikleri

Kısa boylu çalılar, çok yıllık ya da tek yıllık otsulardan oluşan bir bitki cinsidir. Yapraklar oppozit dizilişli, genelde stipulalı, saplı ya da sapsızdır. Sepaller dışta 2 içte 3 olmak üzere 5 adettir. Petaller genellikle sarı renkte ve tüm stamenler fertildir (1). *Helianthemum* cinsinin stamenleri çok hassastır. Böceklerle temas ettiklerinde dışa doğru hareket ederler. Cinsin çiçekleri ise kendi kendini dölleme özelliğine sahiptir (kapalı dölleme) (9). Bazı türlerde epidermis müsilaajlıdır. Stomalar ise birçok türde her iki yüzeyde de mevcuttur (10).

Bu cinsin türleri halk arasında “Güngülü”, “Tüylü güngülü” isimleriyle bilinmekte (2) ve gösterişli çiçeklerinden dolayı süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (7). Bazı türleri ise Amerika, Avrupa, Kuzey Afrika ve Türkiye’de yayılış gösterip, peyzaj bitkisi olarak yetiştirilmektedir (12). Dolayısıyla ekonomik bir öneme de sahiptir.

2.1.6. *Helianthemum canum* (L.) Baumg Türünün Genel ve Botanik Özellikleri

Yarı çalimsı çok yıllık bitkilerdir. Yaprakları eliptik, stipulasız, grimsi beyaz renkli, sık tüylü ya da değildir. İçteki sepaller 3-5 mm'dir. Petaller sarı ve 4-7 mm'dir. Çiçeklenme mevsimi 5-8. aylardır. 800-1000 m yükseklikte dağ yamaçlarındaki çakıllarda ve steplerde yetişmektedir. Morfolojik varyantları yaygın olarak Avrupa, Anadolu ve Kafkasya'da yayılış gösterir (1). Bu tür, Türkiye Florası'nda *Helianthemum canum* olarak yer almaktadır. Ancak 2012 yılında yayınlanan Türkiye Bitkileri Listesi'nde Emine Burcu Yeşilyurt tarafından *Helianthemum oelandicum* (L.) DC türüne sinonim (*Helianthemum oelandicum* subsp. *incanum*) olarak verilmiştir (2).

Tablo 2.1. Türkiye'de yayılış gösteren *Helianthemum* türlerinin Türkçe adları ve yetiştiği bölgeler (2)

Tür Adı	Halk Arasındaki Adı	Yetiştigi Bölge	Endemik/Endemik değil
<i>H. aegyptiacum</i> (L.) Mill.	Ege güngülü	Güney Marmara Bölümü	Endemik değil
<i>H. antitauricum</i> P. H. Davis&Coode	Has güngülü	Orta Kızılırmak Bölümü	Endemik
<i>H. apenninum</i> (L.) Mill.	Ak güngülü	Türkiye'deki varlığı teyide muhtaç	Endemik değil
<i>H. germanicopolitanum</i> Bornm.	Özge güngülü	Orta Kızılırmak Bölümü	Endemik
<i>H. kotschyanum</i> Boiss.	Kır güngülü	Adana Bölümü-Orta Fırat Bölümü	Endemik değil
<i>H. lasiocarpum</i> Desf ex Willk.	Bağ güngülü	Orta Karadeniz Bölümü-Orta Fırat Bölümü-Akdeniz Bölgesi	Endemik değil
<i>H. ledifolium</i> (L.) Mill.	Kuru güngülü	Yukarı Sakarya ve Konya Bölümleri-Yukarı Fırat Bölümü-Adana Bölümü-GD. Anadolu Bölgesi	Endemik değil
<i>H. microcarpum</i> Coss. ex Boiss.	Çalı güngülü	Doğu Karadeniz Bölümü-Orta ve Yukarı Kızılırmak Bölümleri-Yukarı Fırat Bölümü-Antalya Bölümü-Dicle Bölümü	Endemik değil
<i>H. nummularium</i> (L.) Mill.	Güngülü		Endemik değil
<i>H. nummularium</i> subsp. <i>lycaonicum</i> Coode&Cullen	Çayır güngülü	Batı Karadeniz Bölümü-İç B. Anadolu Bölümü-Yukarı Sakarya Bölümü-Yukarı Fırat Bölümü	Endemik

Tablo 2.2. Türkiye’de yayılış gösteren *Helianthemum* türlerinin Türkçe adları ve yetiştiği bölgeler (8)
(Tablo 2.1.’in devamı)

<i>H. nummularium</i> subsp. <i>nummularium</i>	Güngülü	Güney Marmara Bölümü-B. Karadeniz Bölümü-O. Kızılırmak Bölümü-Adana Bölümü	Endemik değil
<i>H. oelandicum</i> (L.) DC.	Tüylü güngülü		
<i>H. oelandicum</i> subsp. <i>incanum</i> (Willk.) G. Lopez	Tüylü güngülü	B. ve D. Karadeniz Bölümleri-İç B. Anadolu Bölümü- Konya, Y. Ve O. Kızılırmak Bölümleri- Adana Bölümü-Y. Fırat Bölümü	Endemik değil
<i>H. ovatum</i> Dun	Yeşil güngülü	Batı Karadeniz Bölümü	Endemik değil
<i>H. salicifolium</i> (L.) Mill.	Söğüt güngülü	Ergene,Çatalca- Kocaeli ve G. Marmara Bölümleri- Karadeniz Bölgesi-Y. Sakarya Bölümü- Akdeniz Bölgesi-GD. Anadolu Bölgesi	Endemik değil
<i>H. stipulatum</i> (Forssk.) C. Chr.	Kulak güngülü	Akdeniz Bölgesi	Endemik değil
<i>H. strickeri</i> Grosser	Bolkar güngülü	Adana Bölümü	Endemik
<i>H. syriacum</i> (Jacq.) Dum Cours	Arap güngülü	Orta Kızılırmak Bölümü-Adana Bölümü	Endemik değil
<i>H. tomentosum</i> Gray	Boz güngülü	O. ve D. Karadeniz Bölümleri-Y. Ve O. Kızılırmak Bölümleri- Adana Bölümü	Endemik değil



Şekil 2.1. *Helianthemum canum* türünün habitatu (Kayseri-Pınarbaşı)

2.1.6.1. *Helianthemum* Mill. Cinsinin Tür Tayin Anahtarı (1)

1. Çok yıllıklar
2. Yapraklar stipulalı; içteki sepaller 5 mm'den büyük
3. İçteki sepallerin damarları bir yana doğru, petaller yaklaşık olarak sepallerin boyuna eşit; kapsüller meyve sepallerinin boyunu çok aşar

1. *racemosum*

3. İçteki sepallerin damarları hemen hemen muntazam yerleşik; Petaller sepalleri aşar; kapsüller meyve sepallerinin boyunu genellikle çok aşmaz

4. Bitki tamamen çalimsı; çiçekler hemen hemen sapsız

2. *stipulatum*

4. Bitki sadece tabanda çalimsı; çiçekler belirgin biçimde saplı
5. İçteki sepallerin iç yüzeylerinde kısa yıldız tüyler mevcut; stilus iki kez kıvrılmış
6. Çiçekler uçta, brakteli çiçek durumları ya da eklemli pediseller üzerinde oluşmuş; yapraklar (2·4-)2·7-3·4 x genişliğinden daha uzun

7. Gövde dik olarak yükselmiş, noduslar arası yapraklara göre daha uzun, çiçek durumu sık sık dallanmış, gevşek olarak simöz 3-6 çiçekli; pediseller genelde eklemli değil, içteki sepaller genişçe ovat, hemen hemen sivri

4. *germanicopolitanum*

7. Gövde toprak üzerine yatık; internodlar yapraklara göre kısa, çiçek durumu basit, gevşek biçimde 2-4 çiçekli pedisel genellikle eklemli, içteki sepaller genişçe eliptik, obtus (sivri-yuvarlak arası)

5. *antitauricum*

6. Çiçekler tek, yanda ve tüm yapraklarla ya da 2-3 yaprakla birlikte, eklemsiz pediseller üzerinde oluşmuş; yapraklar 1-8-2·2 x genişliğinden daha uzun

3. *strickeri*

5. İçteki sepallerin iç yüzeyi tüysüzdür; stilus tabanda kıvrılmış, üst yarıda az çok düz

8. Gövde dik olarak yükselmiş,boylu çubuksu; içteki sepallerin dışında yıldız tüyler değil uzun tüyler var, basit ya da çatallanmış, özellikle damarların üstünde

6. *kotschyanum*

8. Gövde toprak üzerine yatık ya da yükselici, içteki sepallerin dışında kısıcık yıldız tüyler mevcut, damarlar üzerindeki tüyler yumuşak uzun ya da değil

9. Çiçekler sarı, Türkiye’de sık rastlanır

7. *nummularium*

9. Çiçekler beyaz ya da pembe; Türkiye’nin güneybatısında nadir

8. *apennium*

2. Yapraklar stipulasız; içteki sepaller 3-5 mm

9. *canum*

1. Tek yıllıklar

10. Brakteler çoğunlukla stipulalı, gövde yapraklarına göre hemen hemen daha küçük; pediseller çiçek ve meyvede dik

10. *ledifolium*

10. Brakteler çoğunlukla stipulasız, gövde yapraklarına göre çok küçük, pediseller meyvede ya yayılmış biçimde ya da aşağı doğru kıvrık

11. Meyveler dik, sağlam yapılı yayılan; pediseller tepenin yanında yukarı kıvrık,

11. *salicifolium*

11. Meyveler aşağı doğru kıvrık, sarkık, ince pedisellere sahip; yapraklar linear-lanseolat; kapsüller parlak tüylü

12. *aegyptiacum*

2.1.6.2. *H. canum* Türünün Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası'nda Yer Alan Grup Tayin Anahtarı (1)

1. Yaprakların en azından alt yüzeyinde yıldız tüyler mevcut

2. Bitkiler gevşek, çok odunsu bir toprak altı organından; yapraklar daralan bir şekilde eliptik ya da lanseolat; petaller 5-7 mm Grup a

2. Bitkiler oldukça dik, sıkı, zayıf odunlu bir toprak altı organından; yapraklar eliptik ya da daralan eliptik; petaller 4-5 mm Grup b

1. Yapraklarda yıldız tüy yok

3. Yapraklar canlı yeşil renkte; sepaller seyrek olarak tomentoz, yeşilimsi; petaller 4-5(-6) mm Grup c

3. Yapraklar grimsi beyaz görünüşte az tüylü; sepaller yoğun olarak beyaz tomentoz tüylü; petaller (5-)6-7 mm Grup d

Grup a. *H. canum* sensu Boiss., Fl. Or. 1: 444 (1867) p.p.; *H. canum* (L.) Baumg. var. *vineale* sensu Hayek, Prodr. Fl. Balc. 1: 496 (1925) p.p., et var. *balcanicum*, op. Cit. 497; *H. marifolium* (L.) Mill. var. *canum* (Jacq.) Gross. f. *strigosum* Gross., Cistaceae 118 (1903); ?*H. ciscaucasicum* Juz. & Pozd., Fl. URSS, 15: 680 (1949); *H. stevenii* Rupr. ex Juz. & Pozd., loc. cit.

Dağınık, Doğu'dan bitki yok. **A3** Bolu: Seben, 1000 m, Kühne 2238! **A4** Kastamonu : Kastamonu'nun kuzeyi, 900 m, D. 21643. p.p.! **B2** Kütahya: Emet, 1100 m, D. 36558! **B3** Konya : Cihanbeyli, D. 16621! **B5** Kayseri: Bakir Dağları, Akoluk yaylası, 2000 m,

D. 19456 p.p.! Nevşehir Ürgüp arası, 12-1300 m, D. 19139! **C5** İçel: Burucik (Bürücek), 1700 m, Balls, 1344 p.p.!

Merkez ve Güney Avrupa, İtalya'dan Kırım'a kadar uzanır.

Grup b. *H. canum* sensu Boiss., Fl. Or. 1 : 444 (1867), p.p.; *H. canum* (L.) Baumg var. *vineale* sensu Hayek, Prodr. Fl. Balc. 1: 496 (1925) p.p.; ?*H. marifolium* (L.) Mill. var. *canum* (Jacq.) Gross. f. *vineale* (Willd.) Gross., in Grosser, Cistaceae, 217 (1903); ?*H. georgicum* Juz. & Pozd., Fl. URSS, 15, 680 (1949).

İç Anadolu. **A3** Ankara: Beypazarı, 1050 m, Kühne 213! **B5** Yozgat: Akdağ madeni, Curtis 175 p.p.- Grup a'ya eğilimli! **B6** Sivas: Kangal, 1300 m, Stainton 8482! Kayseri : Pınarbaşı, 1300 m Stn. & Hend. 5145!

Grup c. ?*H. oelandicum* (L.) var. *alpestre* (Reichb.) Boiss., Fl. Or. 1 : 444 (1867); *H. italicum* sensu Hayek, Prodr. Fl. Balc. 1: 497 (1925) p.p.; *H. marifolium* (L.) Mill. var. *italicum* (L.) Gross. f. *orientale* Gross., Cistaceae, 117 (1903); *H. orientale* (Gross.) Juz. & Pozd. in Fl. URSS, 15: 344 (1949).

Güney Anadolu, Phrygia (Balıkesir-Kütahya-Uşak bölgesinin klasik Latince adı). **A4** Kastamonu: Kastamonu'nun kuzeyi, 900 m, D. 21643! Zonguldak: Karabük üstü Kel Tepe, 1950 m, D. 38904! **A7** Gümüşhane: Gümüşhane, 1350 m, Balls 1747! **B2** Kütahya: Tavşanlı Inegöl arası, 800 m, Dudley, D. 36147c!

Kırım, Kafkasya.

Grup d. *H. oelandicum* var. *penicillatum* Boiss., Fl. Or. 1: 444 (1867); *H. italicum* sensu Hayek, Prodr. Fl. Balc. 1: 497 (1925) p.p.; *H. marifolium* (L.) Mill. var. *italicum* (L.) Gross., f. *orientale* Gross. Cistaceae, 117 (1903) p.p.; ?*H. buschii* (Palib.) Juz. & Pozd. in Fl. URSS 15: 344 (1949).

Dağınık, çoğunlukla Doğu'da yetişir. **A4** Zonguldak: Karabük, 1050 m, Kühne 2996! Madeni **B5** Kayseri: Bakır Dağları Akoluk Yaylası, 2000 m, D. 19456

Tez çalışmasında, Kayseri'nin Pınarbaşı ilçesinden toplanan bitki örneğinin tayin anahtarı ile yapılan teşhisinde Grup d'ye dahil olduğu tespit edilmiştir.

2.2. HELIANTHEMUM MILL. TÜRLERİNİN KULLANIMLARI

Türkiye'de *H. nummularium* (L.) Miller (Altınotu) türünün kabız ve kan kesici olarak kullanıldığı bilinmektedir (3). Ayrıca *Helianthemum*'un farklı türleri İspanya ve

Amerika’da geleneksel olarak antienflamatuar, antiülserojenik, yara iyi edici, antiparaziter, antimikrobiyal, analjezik, sitotoksik ve vazodilatör etkili olarak kullanılmaktadır (6). *H. glomeratum* (Lag.), Güney Meksika’da gastrointestinal rahatsızlıkları tedavi etmek için sık kullanılan tıbbi bir bitkidir. Yaprak ve köklerin dekoksasyonlarının ishal, karın ve epigastrik ağrıların tedavisinde kullanımı tavsiye edilmektedir. Ayrıca *H. glomeratum* türünün *Chenopodium ambrosioides* (L.) ile birlikte kombine edildiğinde bağırsak parazitlerine karşı tedavi edici etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (12). Mayalar tarafından da kanlı diyarenin tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (13). Yapılan çalışmalarda bitkinin eski medeniyetlerde sıklıkla kullanımının olduğu görülmektedir.

H. cinereum subsp. *rotundifolium*, *H. hirtum*, *H. apenninum*, *H. marifolium* subsp. *marifolium*, *H. marifolium* subsp. *origanifolium* ve *H. syriacum* türlerinin yaprakları İspanya’da yara iyi edici, mide ile ilgili rahatsızlıklar, diyare, gastroenterit (mide ve bağırsak iltihabı) ve yanık tedavisi gibi tıbbi olarak farklı etkileri nedeniyle kullanılmaktadır. Ayrıca *H. cinereum* subsp. *rotundifolium* ve *H. syriacum* türlerinin ise yaygın olarak “Dağ çayı” ve “Kır çayı” olarak adlandırılan ve sindirimde etkili olan infüzyonları kullanılmaktadır (6).

Meksika’da *H. glomeratum* türünün yaprakları maserasyon ile oral olarak mide ve vücut ağrılarında, osteoporoz tedavisinde kullanılmaktadır (14). *H. glomeratum*, “Sensilla” adıyla popülerlik kazanan şifalı bir bitkidir. Türün toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi ile yapılan bir çalışmada; bitkinin antibakteriyel, antifungal ve antiprotozoal özellikte olduğu tespit edilmiştir (15). Bu bitkinin aynı zamanda diyare, dizanteri ve bağırsak paraziti tedavilerinde de kullanıldığı bilinmektedir (16).

İspanya’da *H. viscarium* Boiss. & Reut. türünün bütün halde kaynatılmış suyu haricen ödem giderici olarak kullanılmaktadır (17).

Iber yarımadasında (İspanya ve Portekiz), *H. oelandicum* Mill. türünün toprak üstü kısımlarının dekoksasyonunun dahilen boğaz ağrılarında (analjezik ve antienflamatuar etkili olarak) kullanıldığı belirtilmiştir (18, 19).

H. glomeratum ayrıca Meksika’da da halk arasında kanlı diyarenin tedavisinde kullanılmaktadır (20).

2.3. *HELIANTHEMUM* MILL. TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Antienflamatuar etki: Aralarında *H. glomeratum* türünde bulunduğu bazı bitkilerin; karragenin ile indüklenmiş sıçan pençe ödemi modeli kullanılarak antienflamatuar aktiviteleri araştırılmıştır. Kanlı diyarenin tedavisinde kullanılan bu türün toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin enflamasyonu giderici özellikte olduğu tespit edilmiştir (20).

Antioksidan etki: Aralarında *H. ledifolium* (L.) Mill türünde yer aldığı Ürdün'ün 51 tıbbi bitkisinin su ve metanol ekstrelerinin antioksidan ve toplam fenolik içerikleri araştırılmıştır. Antioksidan aktivite çalışmasında ABTS⁺• ve Folin-Ciocalteau kolorimetrik metotları uygulanmıştır. Su ekstresinde antioksidan aktivite 40.1 ± 10.3 (μmol TE/g kuru ağırlık) iken, metanol ekstresinde 69.8 ± 6.0 (μmol TE/g kuru ağırlık) olarak tespit edilmiştir. Ekstrelerin total fenolik içerikleri de su ekstresinde 8.7 ± 3.0 (mg GAE/g kuru ağırlık); metanol ekstresinde ise 17.3 ± 1.0 olarak tespit edilmiştir (21).

Diğer bir çalışmada bazı fenolik maddelerce zengin ekstrelerin, *in vitro* alfa-glukozidaz / alfa-amilaz enzim inhibitörlüğü ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sonuçta *H. kahiricum* ekstrelerinin 10 μM'dan daha az aKi değerleri ile güçlü bir alfa-glukozidaz ve alfa-amilaz inhibitörü kapasitesine sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Toplam fenolik içeriği 3.46 (mg GAE/ g kuru ağırlık), flavonoit içeriği ise 2.23 (mg RE/g kuru ağırlık) olarak tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite çalışmalarında ABTS⁺•, FRAP, OH⁺, NO⁻ deneyleri yapılmıştır (ABTS⁺•: 03.27 mM FRAP: 2.31 M OH: 1.90 EC₅₀ mg/l NO: 97 EC₅₀ mg/l). *H. kahiricum*, en yüksek antioksidan aktivite gösteren bitkilerdendir (22).

Antimikrobiyal etki: Türkiye'de yetişen bazı tıbbi bitkilerin *in vitro* antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Aralarında *Helianthemum ledifolium* L. türünde bulunduğu çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımlarından metanol ekstresi hazırlanmış, fakat kullanılan mikroorganizmalara karşı (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans*) herhangi bir aktivite göstermemiştir. (23).

H. kahiricum türünün petrol eteri, kloroform ve bütanol ekstrelerinin disk difüzyon metodu ile; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922),

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853), *Enterobacter* ESBL ve çoklu ilaç dirençli *Staphylococcus* ile *Pseudomonas* CAZR'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Bütanol ekstresi bütün mikroorganizmalara karşı en güçlü aktiviteyi göstermiştir. Ayrıca ekstrelerin aktiviteleri Gram (+) bakterilere (15-16 mm) karşı, Gram (-)'lerden (9-15 mm) çok daha etkili olarak bulunmuştur. Kloroform ekstresi bütün test bakterilerine karşı orta derecede bir etki göstermiş, petrol eteri ekstresi ise inaktif olarak bulunmuştur (24).

Antiprotozoal Etki: Çocuklarda bulaşıcı diyarenin tedavisinde kullanılan *H. glomeratum* türünün köklerinden flavan-3-ol, (-)-epigallokateşin ve (-)-epigallokateşin gallat polifenollerini izole edilmiş ve bu maddelerin antiamibik ve anti giardial etkileri *in vitro* olarak test edilmiştir. Yaprak ve kök metanol ekstrelerinin aktivitelerinde (-)-epigallokateşin'in *Entamoeba histolytica*'ya benzer etkiler tespit edilirken, aynı bileşik aksenik kültürde *Giardia lamblia*'nın gelişimini baskılamıştır. Yine Mayalar tarafından kanlı diyarenin ve gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmasından yola çıkılarak, bitkinin köklerinden izole edilen bileşikler ile yeni aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiş, antiamibik ve anti giardial etkileri test edilmiştir. Yapraklarından ise antiprotozoal etkiyi test etmek amacıyla kamferol, kersetin ve tilirozit adlı flavonoidler izole edilmiştir (12).

Helianthemum glomeratum'un toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstrelerine uygulanan fraksiyonlama işlemi ile antiprotozoal etkili 5 flavonol glikoziti elde etmişlerdir. Bunlar tilirozit, kamferol-3-O-(3'',6''di-O-E-p-kumaril)- β -D-glukopiranozit, astragalin, kersetin ve izokersetin'dir. Antiprotozoal testlerin sonucuna göre tilirozit, en güçlü antiamebik ve anti giardial etkiyi gösteren bileşik olmuştur. Tilirozit bileşiğinin *Entamoeba histolytica* için IC₅₀ değeri 17.5 μ g/ml, *Giardia lamblia* için ise 17.4 μ g/ml'dir. İzokersetin *E. histolytica*'ya karşı seçicilik gösterirken (IC₅₀ 14.7 μ g/ml), kersetin *G. lamblia*'ya karşı seçicilik göstermiştir (IC₅₀ 24.3 μ g/ml). Bütün izole bileşikler, pozitif kontrol olarak kullanılan iki antiprotozoal ilaca; yani metronidazol ve emetin'e göre düşük aktivite göstermiştir (15).

-Antiamibik etki: *H. lippii* (L.) türünün, etilasetat ve metanol ekstrelerinin; amibik keratitis'li hastalardan izole edilen *Acanthamoeba castellanii* kistlerine karşı öldürücü etkileri çalışılmıştır. Tedavi süresince etilasetat ekstresinin, metanol ekstresine göre daha yüksek öldürücü yüzdeye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca bitkinin tıbbi önemini

sağlayan toplam fenol (2.96 mg / 100 g), toplam flavonoit (0.289 mg / 100 mL) ve toplam tanen (37 mg / 100 mL) miktarları tespit edilmiştir (25).

-Antigiardial etki: Meksika’da nüfusun önemli bir bölümü ishal ve dizanteri gibi gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde şifalı olarak adlandırdıkları bitkileri sıklıkla kullanmaktadırlar. Yapılan bir çalışmada, *H. glomeratum* türünün metanol ekstresinin deneysel olarak enfekte edilmiş farelerdeki *Giardia* trofozitime karşı antiigiardial etkili olduğu tespit edilmiştir (16).

Antimalaryal etki: Antimalaryal ilaç geliştirmek amacıyla IspC protein (2c-metil-D-eritrol 4-fosfat sentez) inhibisyonu için bazı Akdeniz bitkileri üzerinde tarama çalışması yapılmıştır. Aralarında *H. ventosum* türünde yer aldığı bitki ekstraktları artan dilüsyonlarda önemli enzim inhibisyonu göstermişlerdir (26).

Kardiyovasküler rahatsızlıklar: Diğer bir çalışmada; *Impatiens glandulifera* Royle, *Ornithogalum umbellatum* L., *Prunus cerasifera* Ehrh., *Helianthemum nummularium* (L.) Mill. ve *Clematis vitalba* L. türlerinin çiçeklerinden oluşan bir kombinasyonun ratlar üzerindeki kardiyovasküler hastalıkların risk faktörlerini kontrolünde etkili olup olmadıkları araştırılmıştır. Sonuçta bu bitki grubunun glisemi, HDL-kolesterol ve trigliserit seviyelerinde etkili oldukları gözlenmiştir (27).

2.4. HELIANTHEMUM TÜRLERİNİN KİMYASAL BİLEŞENLERİ

Güneydoğu İspanya’da hayvanların beslendiği bitkilerin kullanımı ve bu bitkilerin mevsime bağlı olarak tanen içerikleri araştırılmıştır. Aralarında *H. almeriensis* Pau türünde yer almakta olup, en yüksek tanen içeriği ilkbaharda (% 4.45 a/a), sonra kış (% 3.77 a/a) ve en düşük içerik sonbaharda (% 3.60 a/a) gözlenmiştir (28).

H. glomeratum türünün antibakteriyel aktivitesinden sorumlu bileşikler izole edilmiştir. Bu maddeler: flavon glikozitleri olarak kamferol, tilirozit, epikateşin, kersetin, izokersetin, astragalin; polifenol olarak ise flavan-3-ol, epigallokateşin ve epigallokateşin gallat’tır (12, 15).

H. lippii türünde ise flavonoit, tanen, saponin ve basit fenolik bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir (29).

Diğer bir çalışmada, *H. cinereum*, *H. alypoides* ve *H. hirtum* türlerinin yüksek miktarda ellajitanen içerdiği, *H. marifolium*’un ise yüksek miktarlarda gallik asitle karakterize edildiği belirtilmiştir (6).

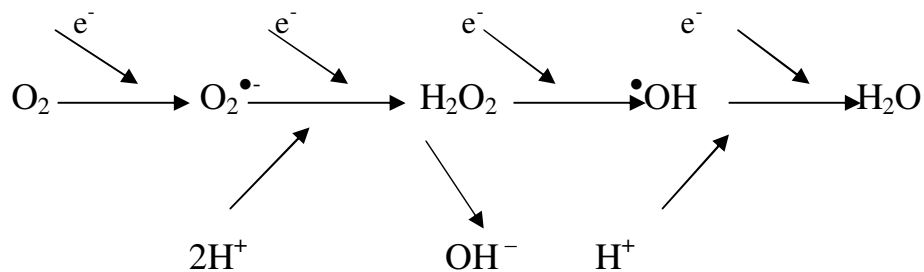
2.5. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar son yıllarda oldukça fazla araştırılan ve yazılan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Antioksidan maddelerin serbest radikallerle savaştığı, yaşlanmayı geciktirdiği ve birçok tipteki hastalığı önlediği en çok bilinen özelliklerindendir. Serbest radikallerin verdiği hasarın neden olduğu, aralarında kanser ve kalp rahatsızlıkları gibi önemli hastalıklarında bulunduğu 60'ın üzerinde hastalık mevcuttur. Antioksidanların hastalıklardan korunmada nasıl anahtar rol oynadığını anlayabilmemiz adına serbest radikallerin ve oksijenin vücudumuz üzerine olan etkilerini ve antioksidanların çalışma mekanizmasını bilmemiz önemlidir (30).

2.5.1. Oksijen ve Önemi

Hayvan, bitki ve bakteri gibi aerobik organizmaların enerji ihtiyaçlarını karşılamak için son derece gerekli ve hayati öneme sahip oksijen elementi, aynı zamanda bu organizmalar için toksik, zararlı, mutajenik ve hatta ölümcül olabilir (31).

Soluduğumuz havanın % 21'ini oluşturan oksijen, solunum olayı sonucunda mitokondrielerde bulunan elektron taşıma sistemlerinde birtakım enzimsel olaylar ve indirgenme reaksiyonları ile suya çevrilmekte ve zararsız hale getirilmektedir (Şekil 2.2). Ancak bazı durumlarda oksijen suya kadar indirgenmeden ortamdan ayrılır. Henüz reaksiyonunu tam olarak gerçekleştiremeyen oksijen, yarım kalan bu reaksiyonunu diğer hücrel materyallerle tamamlama eğilimine girer. Bu olay 'Oksijen Paradoksu' olarak adlandırılır (32).



Şekil 2.2. Oksijenin suya indirgenmesi

Oksijenin vücut için zararlı olan molekülleri oluşturması karşısında, vücutta kendi antioksidan savunma mekanizmasını geliştirmiştir. Bu sistem pek çok endojen ve ekzojen kaynaklara bağlı kompleks bir sistemdir (32).

2.5.2. Serbest Radikaller

Biyolojik sistemlerde normal oksidasyonun işleyişi sırasında yüksek oranda serbest radikal oluşur (33). Serbest radikaller eşleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir. Eğer bir molekül eşleşmemiş elektrona sahip ise stabil değildir ve sürekli reaksiyona girme eğilimindedir (30). Bu noktada da serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmaktadır.

Serbest radikaller vücudun normal fonksiyonları sırasında oluşan ya da vücudun dış faktörlerle etkileşmesi sonucu açığa çıkan moleküllerdir. Vücut besinleri ve oksijeni enerji elde etmek üzere kullanırken, eşleşmemiş elektronlara sahip olan oksijen molekülleri serbest radikalleri oluşturur. Normal metabolizmanın oluşturduğu bu ürünler ise DNA, lipid ve proteinlere büyük ölçüde zarar vermektedir. Hava kirliliği, X-ray, güneş ışınlarından dolayı maruz kaldığımız radyasyon da serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (30).

Serbest radikallerin tamamen zararlı olması gibi bir durum söz konusu değildir. Aslında vücudumuzun serbest radikallere ihtiyacı vardır. Örneğin bazı yaşamsal hormonların üretiminde, belli başlı öneme sahip bazı hormonların aktivasyonunda serbest radikallere ihtiyaç vardır (30). Enfeksiyon gibi bazı istenmeyen durumlarda ve yabancı maddeleri uzaklaştırmak için de vücut serbest radikalleri kullanır, ancak bu sırada kendi hücrelerine zarar verebilir; örnek olarak bu hasar DNA üzerinde oluşursa kanser oluşabilir. İşte antioksidanlarda, hücreler kendine zarar vermeden önce oksidasyonu azaltarak oluşabilecek hasarı azaltır (33).

2.5.2.1. Oksijen Türevi Serbest Radikaller

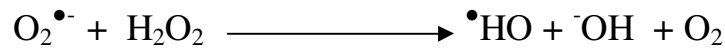
2.5.2.1.1. Süperoksit Anyon Radikali

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) moleküler oksijene ekstra bir elektron bağlanmasıyla meydana gelir. Milisaniyelik yarı ömrü ile zayıf bir oksidan ancak güçlü bir redüktandır. Bu radikal oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ise organizmayı bu radikalın etkilerine karşı korur (34).

Süperoksit radikalinin en muhtemel kaynağı, aerobik hücrelerde mitokondriler içinde bulunan elektron taşıma sisteminde meydana gelen kaçaklardır. Sistemden çıkan elektronlar moleküler oksijenle birleşerek süperoksit radikalini oluştururlar (35).

Ayrıca süperoksit radikali aktive olmuş fagositik hücreler tarafından oluşturulurlar. Bu hücreler istilacı mikroorganizmalara karşı savunma amacıyla NADPH enzimatik sistemini kullanarak doğrudan süperoksit radikalini oluşturabilir (31).

Zayıf bir oksidan olarak süperoksit radikalinin hücreye kendi başına önemli bir hasar vermesi muhtemel görülmemektedir. Ancak $O_2^{\bullet-}$ radikali oluştuktan sonra tiyol gruplarıyla reaksiyon verebilir, bu durumda ya GSH (Glutatyon peroksidaz) tüketilmesine yol açar ve hücreyi ileri derecede oksidatif strese sokar ya da diğer hücrel proteinler üzerindeki tiyol grupları ile reaksiyon vererek proteinleri inaktive eder. Aynı zamanda $O_2^{\bullet-}$ oksidatif strese sebep olabilecek bir dizi reaksiyonun başlamasına da sebep olabilir. Bu reaksiyonlara örnek olarak Haber-Weiss reaksiyonu verilebilir. Bu reaksiyonda $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 radikalleri demir varlığında etkileşerek son derece reaktif olan $\bullet HO$ radikalini verir (Şekil 2.3). Üretilen bu $\bullet HO$ radikali son derece önemli hücrel hasarlara yol açar (34).



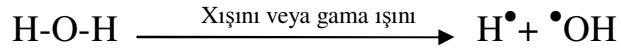
Şekil 2.3. Haber-Weiss reaksiyonu ($O_2^{\bullet-}$ Süperoksit anyonu, H_2O_2 : Hidrojen peroksit, $\bullet HO$: Hidroksil)

2.5.2.1.2. Hidroksil Radikali

$\bullet HO$ radikali kimyada bilinen en reaktif oksijen radikalidir. Hemen hemen tüm hücrel makro moleküllerle reaksiyona girebilir. Fakat en önemli etkileri lipitler, proteinler, sitokromlar ve nükleik asitler üzerinedir (35). Hidroksil radikalının en tehlikeli olduğu durum DNA bileşenleri yerine (örnek olarak deoksiriboz şekeri) DNA ile eşleşmesi durumunda gerçekleşir. Bu durumda DNA mutasyonları gerçekleşir ve kanser gibi birçok önemli hastalığın oluşmasına neden olur (30).

Haber-Weiss reaksiyonunda görüldüğü gibi demir iyonu varlığında $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 'in reaksiyonu ile $\bullet HO$ radikali oluşur. Ayrıca canlı hücrelerin başlıca bileşenleri su olduğu

için bu hücrelerin iyonize edici radyasyona maruz kalmaları durumunda su molekülünden hidrojen radikali ve hidroksil radikali meydana gelir (Şekil 2.4).

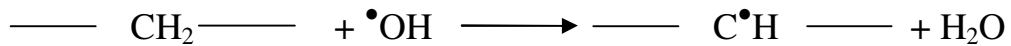


Şekil 2.4. Su molekülünden hidrojen radikali ve hidroksil radikali oluşumu

Hidroksil radikali reaksiyonları genelde üç başlık altında özetlenebilir. Bunlar hidrojen verilmesi, eklenmesi ve elektron transferidir. Bu reaksiyonlar sonucu radikal olmayan bir türle, serbest radikallerin etkileşimi değişik radikalleri oluşturur. Genellikle oluşan bu yeni radikaller orijinal radikale eşit veya daha az reaktif özellik gösterir (35).

Hidroksil radikalini süpürücü etkiye sahip spesifik bir molekül geliştirilememiştir. Flavonoidler, karotenoidler gibi antioksidanlar yüksek seviyelerde uygulansalar bile $\text{OH}^\bullet$ radikalini *in vivo* olarak uzaklaştırmaları pek olası değildir. Bu nedenle antioksidanlar $\text{OH}^\bullet$ radikalinin verdiği zararı ya onun prekürsör formlarını bloke edip uzaklaştırarak ya da süperoksit ve hidrojen peroksit formları için ihtiyaç duydukları metal iyonlarını bağlayıp değiştirerek karşılamaya çalışırlar (31).

$\text{OH}^\bullet$ radikali ile hidrojen verilmesi ayrıca, canlılar için önemli bir reaksiyon olan lipid peroksidasyonunu da başlatır (Şekil 2.5) (32).

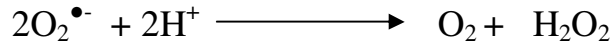


Şekil 2.5. Hidroksil radikali ile H çıkartılması ve lipid peroksidasyonunun başlaması

2.5.2.2. Oksijen Türevi Serbest Olmayan Radikaller

2.5.2.2.1. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit radikali son derece güçlü bir oksitleyici ajan olsa da nisbeten yavaş reaksiyon verir. Kimyasal olarak radikal özellik göstermez ancak serbest radikal kimyasında önemli rol oynar. $\text{O}_2^{\bullet-}$ in dismutasyon reaksiyonu ile ya da doğrudan oksijenin indirgenmesi ile meydana gelir (Şekil 2.6) (34).



Şekil 2.6. Süperoksit anyonunun dismutasyonu

Hidrojen peroksit radikali, flavin koenzim katalizli reaksiyonlarda, kinonların oksidasyonunda, sülfidril içeren bileşiklerin oksidasyonlarında ve süperoksit dismutaz aktivitesi sırasında oluşur. Bununla beraber hücrelerde hidrojen peroksit oluşumunun en önemli kaynağı mitokondrilerdeki elektron taşıma zinciridir. Buna göre canlı dokunun her bir gramında dakikada 82 nmol hidrojen peroksit üretimi olur. Yani bir memelinin gözlerindeki hidrojen peroksit miktarı konsantrasyonu mikromolar cinsinden ölçüldüğünde soluduğu havadaki ile aynı seviyelerdedir (36).

Hidrojen peroksit radikali moleküler yapısı bakımından suya oldukça benzemektedir. Hücre içi ve dışında yayılabilir özellik gösterir (35). Ayrıca bazı metabolik rollere de sahip olan bu radikal tiroid bezleri tarafından fiziksel homeostasiyi sağlamak amacıyla kullanılır (31).

2.5.2.2.2. Singlet O₂

Oksijen molekülünün daha reaktif bir türü olan singlet O₂'ler moleküler oksijenin enerji alması ile oluşurlar. Ömrü oldukça kısadır ancak bu süre zarar verici etki yaratmak için oldukça yeterli bir süredir (34, 36).

Singlet O₂, çoklu doymamış yağ asitleri, hidrokarbonlar ve kolestrollerle reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir (36). Göz retinası sürekli ve yoğun şekilde ışığa maruz kalır. Retinada bulunan retinal pigmentin ışığa maruziyeti ile bu bölgede yoğun olarak bulunan doymamış lipitlere O₂'nin atak yapması singlet O₂ üretilmesine neden olur ve retinanın önemli derecede harabiyeti ile sonuçlanır. Ayrıca singlet O₂'lerin biyolojik olarak önemli olan proteinlerle ve metiyonin, triptofan, histidin ve sistein gibi amino asitlerin kalıntıları ile reaksiyon vermesi de önemli hasarlar oluşturur (34).

Tablo 2.3. Reaktif Oksijen Türleri (35)

Radikal türler	Radikal olmayan türler
Moleküler oksijen, O_2	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Süperoksit, $O_2^{\bullet-}$	Hipoklorik asit, $HOCl$
Hidroksil, $\bullet OH$	Ozon, O_3
Peroksil, $RO_2^{\bullet}$	Singlet oksijen, $^1\Delta_g$
Alkoksil, $RO^{\bullet}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Hidroksiperoksil, $HO_2^{\bullet}$	

2.5.2.3. Oksijen Türevi Olmayan Reaktif Azot Türleri

2.5.2.3.1. Nitrojen oksit

Nitrik oksitin canlı organizmalarda hem fizyolojik hem de patolojik birçok görevi vardır. Buna rağmen kolaylıkla serbest radikal olaylarına katılabilmektedir. Nitrik oksit aynı süperoksit radikali gibi limitli olarak reaktivite gösterir. Yani hidroksil radikali gibi bütün biyolojik moleküllerle reaksiyona girmez. Önemli fizyolojik görevlerinin yanı sıra aşırılık durumunda toksik etki gösterir (35).

Yaşayan organizmalarda başlıca nitrik asit sentetaz tarafından sentezlenir. Oksijene ihtiyaç vardır ve 4 temel ko-faktörü; FAD, FMN, tetrahidrobiopterin ve HEM'dir (35).

2.5.2.3.2. Peroksinitrit

Peroksinitrit, nitrik oksitten veya süperoksit anyon radikalinden meydana gelip, -SH gruplarını kolaylıkla hasara uğratabilmesi nedeniyle tehlikeli olmaktadır. Peroksinitritin protein yapılarını ve mitokondrial elektron taşıma sistemindeki bazı enzimlerin yapılarını bozduğu, ayrıca DNA da kırılmalara yol açtığı bilinmektedir. Çok çabuk bozularak kendisinden çok daha tehlikeli olabilecek hidroksil radikaline dönüşür (32).

Tablo 2.4. Reaktif Nitrojen Türleri (35)

Radikal türler	Nitrik oksit (NO [•]) ve nitrojen dioksit (NO [•] ₂)
Radikal olmayan türler	Nitrik asit (HNO ₃), dinitrojen trioksit (N ₂ O ₃), dinitrojen tetraoksit (N ₂ O ₄), peroksinitrit (ONOO ⁻), peroksinitrik asit (ONOOH), alkil peroksinitriller (ROONO), Nitroksil anyonu (NO ⁻), Nitroksil katyonu (NO ⁺), nitril klorit

2.5.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres antioksidanların tamamen veya kısmen eksik olması durumunda meydana gelen antioksidan dengesizliğidir. Sağlıklı bir organizmada üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) antioksidan mekanizmalar tarafından oldukça mükemmel olarak denge halinde tutulurlar. Bu dengenin bozulması durumunda oksidatif stres durumu ortaya çıkar. Örnek olarak antioksidan savunma enzimlerinin mutasyonlardan etkilenmesi ve miktarının azalması veya ROS/RNS üretim miktarının oksijen molekülünü yükseltmesi ya da ROS/RNS üretmek için metabolize edilmiş toksinlerin artması gibi durumlarda oksidatif stres meydana gelir. Bunun yanı sıra iyonize radyasyon, ilaç yan etkileri veya toksik kimyasallar, geçiş elementlerinin aşırı derecede kullanılabilir olması gibi durumlarda oksidatif strese neden olan diğer ekzojen kaynaklı olaylardır (35, 37).

Tablo 2.5. Oksidatif strese neden olan faktörler

Ekzojen Faktörler	Endojen faktörler
1. Diyetel • çoklu doymamış yağ asitlerince beslenme • alkol • hayvansal proteinlerce zengin beslenme • aşırı demir ve bakır alınması • az sebze ve meyve yenmesi	• bilinçsiz yapılan veya yetersiz fiziksel egzersiz • stres • yaşlılık • doku hasarı ve kronik hastalıklar (damar tıkanıklığı, kanser, kronik enflamasyon, iskemi gibi) • diyetel antioksidanların sağlanmasını etkileyen olumsuz koşullar
2. Çevresel • sigara dumanı • hava kirliliği (O₃, NO₂, SO₂) • diğer kirleticiler (Asbest, Pestisitler) • radyasyon	

2.5.4. Lipit Peroksidasyon

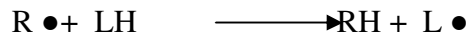
Oksidasyon olayı oksijen moleküllerinin hidrojen alarak, oksijen ekleyerek ya da elektron alarak diğer molekülleri okside etmesi olayıdır. Bu olayın ardından oksidanlar ve serbest radikaller oluşur ki bu radikaller tıpkı bir makine gibi hücre hücre, doku doku vücudun bozulmasına neden olur (30).

Hücre membranlarını oluşturan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu insan vücudunda sıklıkla rastlanan bir durumdur. Oksijen molekülünün doğrudan lipit molekülü ile reaksiyonuna otooksidasyon denir. Bu olay oksidasyon başladıktan sonra kendi kendini tetikleyen bir olaydır. Lipitlerle reaksiyona giren oksijenin oksidasyon ve peroksidasyon terimlerini kullanarak açıklanması aşamasında otooksidasyon; eksternal bir indükleyen olmadan lipit sisteminde olan oksidasyon, peroksidasyon ise lipit sisteminde peroksil kısım tarafından indüklenen oksidasyon olarak tanımlanabilir. Oksidasyon ise oksijenle reaksiyona giren lipitler anlamında kullanılan genel bir terimdir (31).

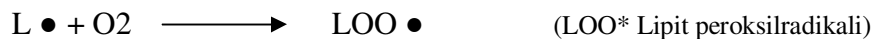
2.5.4.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması

Lipit peroksidasyonu üç temel aşamada incelenmektedir.

Serbest radikal, bir yağ asidinin (LH) metilen kısmından bir hidrojen atomu kopararak lipit radikalini oluşturur. Bu safha lipit peroksidasyonu, **başlama safhası** olarak bilinir (33).



Bu reaksiyonu serbest radikallerden başka değişik demir-oksijen kompleksleri de başlatabilir ve reaksiyon mevcut olan okside olmamış yağ asitleri ve oksijen kaynakları tükeninceye kadar devam edebilir (30). Lipit radikaline O₂ ilavesi ile lipit peroksil radikali oluşmaktadır. Bu aşamada **çoğalma safhası** başlamaktadır (32).

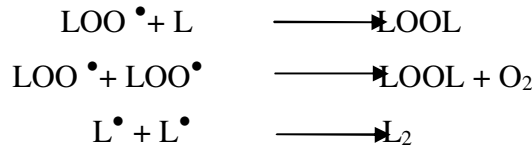


Oluşan lipit peroksil radikali başka yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni lipit radikallerini oluştururken kendisi de lipit hidroperoksiti haline geçer. Lipit peroksil radikalleri sadece yağ asitleri ile etkileşime girmekle kalmaz aynı zamanda karbonhidratlar ve peptitler gibi diğer biyolojik moleküllerle de reaksiyona girerek yapılarını bozarlar (32).



Lipit hidroperoksiti, lipit peroksidasyon olayının ilk oluşan kararlı bileşiğidir ve Fe^{+2} ve Cu^+ gibi geçiş elementlerinin varlığında kolaylıkla bozulabilmektedir. Lipit hidroperoksitleri oksidasyon düzeyini belirlemede de kullanılır (32).

Sonlanma aşamasında iki serbest radikal birbirleri ile reaksiyona girerek radikal olmayan ürünlere dönüşürler (35).



2.5.5. Antioksidanlar ve Savunma Mekanizmaları

Antioksidanların tanımlanması çeşitli şekillerde olmaktadır. Genel terim olarak antioksidanlar lipit peroksidasyonunu engelleyen inhibitörler olarak belirtilirler. Halliwell ve ark'na göre, antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda okside edici ajanlarla karşılaştıklarında bu ajanlarla yarışarak substratın oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır (31).

Antioksidanlar etkilerini başlıca şu şekillerde gösterirler:

1. Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığı ile veya doğrudan temizlenmesi
2. Reaktif oksijen türlerinin baskılama yoluyla engellenmesi
3. Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi (32).

Antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir;

1) Yapılarına göre

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

2) Kaynaklarına göre

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

3) Çözünürlüklerine göre

- a) Suda çözünenler
- b) Lipitlerde çözünenler

4) Yerleşimlerine göre

- a) Hücre içinde bulunanlar
- b) Ekstraselüler sıvılarda bulunanlar (38).

Canlı organizmada normal metabolizma sırasında ya da patolojik yollarla ortaya çıkan serbest radikallerin oksidatif strese neden olmadan antioksidanlar aracılığıyla ortadan kaldırılması aşamasında çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (35).

Antioksidan savunma mekanizmalarını kısaca özetleyecek olursak;

- a) Ajanlar serbest radikalleri ve diğer reaktif türlerini katalitik olarak uzaklaştırırlar. Süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimleri bu kısımda yer alır.
- b) Demir, bakır ve hem gibi pro-oksidanların varlığında proteinler yapar. Transferrinler, heptaglobinler, hemopeksinler ve metalloproteinler bu kısımda yer alır.
- c) Proteinler farklı mekanizmalarla biyomolekülleri oksidatif hasara karşı korurlar.
- d) Küçük moleküllü ajanlar reaktif oksijen ve reaktif azot türlerini (ROS/RNS) süpürürler. Glutasyon, askorbik asit ve α - tokoferol örnek olarak verilebilir (33).

Biyolojik sistemlerdeki antioksidan savunma sistemi elemanları aşağıdaki Tablo 2.6'da verilmiştir (32).

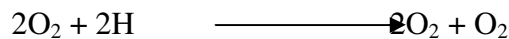
Tablo 2.6. Antioksidan savunma sistemi elemanları (34)

Enzimatik antioksidanlar	Enzimatik olmayan antioksidanlar
Birincil olanlar Süperoksit dismutaz Se bağımlı glutatyon peroksidaz Glutatyon S- transferaz Katalaz	Vitamin E Vitamin C Glutatyon Flavonoitler Butillenmiş hidroksianizol Butillenmiş hidroksitoluen Ebselen
İkincil olanlar NADPH- kinon oksidoretüktaz Glutatyon S-transferaz Epokist hidrolaz UDP- Glukuronil transferaz Sulfonil transferaz Glutatyon redüktaz Glukoz -6- fosfat dehidrogenaz 6-fofoglukonat dehidrogenaz İzositrat dehidrogenaz GSSG ve Konjugat taşıyıcılar	β - karoten Ürat Seruloplazmin Transferin Albumin Haptogloblin Likopen Metallotiyonein Bilirubin Ubikinon Deferoksamin Melatonin Sistein Ferritin Mannitol Oksipurinol Probukol

2.5.5.1. Enzimatik Olan Koruyucu Sistemler

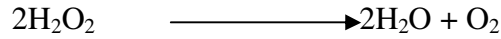
Süperoksit dismutaz (SOD)

Hücre membranlarında ve DNA üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak hasar yapan süperoksit anyon radikalinin aerobik organizmalarda ortamdan uzaklaştırılmasının hayati önemi vardır. Süperoksit anyon radikalinin organizmadan uzaklaştırılması işleminden sorumlu olan süperoksit dismutaz enzimidir. 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) (80). Bu enzim süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit radikaline dönüştürerek etkisiz hale getirir (35).



Katalaz (CAT)

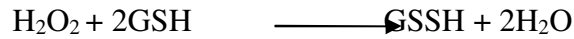
H₂O₂ biyolojik sistemler için zararlıdır ve •HO oluşumunu arttırmaktadır. Bu yüzden oluşan H₂O₂'nin uzaklaştırılması hücreler için gereklidir. Bu amaçla hücre içinde H₂O₂'yi yıkan enzimlerden birisi de katalazdır (34).



Genellikle peroksizomlarda, sitozolde ve mikrozomal fraksiyonlarda da az da olsa bulunmaktadır (39).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidazlar selenoenzimlerdir yani fonksiyonları bu minerallerin varlığına bağlıdır. Herbir glutasyon peroksidaz enzimi 4 selenyum atomu içerir (29). Bu enzim hidrojen peroksitin suya dönüşmesinden sorumludur. Glutasyon peroksidaz bu reaksiyon sonucu yükseltgenmiş glutatyonla dönüşür (35).



Glutasyon peroksidazın bazı tipleri yalnızca sitozolde bulunmaktadır. Bununla beraber diğer tiplerinin membran üzerinde koruyucu etkileri vardır. Bu enzim aynı zamanda mitokondride de bulunmaktadır (31).

2.5.5.2. Enzimatik Olmayan Koruyucu Sistemler

Enzimatik olmayan koruyucu ajanlar ekzojen ve endojen kaynaklı olabilirler. Bunlardan en önemlileri C vitamini, E vitamini, fenolik bileşikler ve karotenoidlerdir (32).

E Vitamini

E vitamini tokoferol yapısında olup ilk olarak 1922 yılında izole edilmiştir. α , β , γ ve δ olarak adlandırılan 4 tokoferol karışımıdır. Doğada dağılımı en geniş ve biyolojik aktivitesi en yüksek olan α -tokoferol'dür. Bu nedenle güçlü bir antioksidandır. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif olan kısmını oluşturur (34).

α - tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Özellikle mitokondri ve mikrozom gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Bitkisel yağlar ve tohumlar zengin E vitamini kaynaklarıdır (34).

E vitamini hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma elemanıdır. E vitamini $O_2^{\bullet-}$, $\bullet HO$, singlet O_2 , lipid peroksi radikallerini ve diğer radikalleri temizler (34).

C Vitamini

C vitamini suda çözünebilir, optikçe aktif, beyaz kristalize bir madde olup genellikle askorbik asit olarak bilinmektedir. Güçlü bir antioksidan olarak doğada yaygın halde bulunur. Vücutta sentezlenemez ve diyetle dışarıdan alınır (40).

C vitamini hücrede birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır (34). Askorbik asit, E vitamini ile birlikte Düşük Yoğunluklu Lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu engellemektedir. C vitamini bazı durumlarda prooksidan özellik gösterir. Ortamda C vitamini ile birlikte Fe^{+3} iyonları da varsa C vitamini bu iyonları Fe^{+2} formuna indirger. Fe^{+2} iyonları ise hidrojen peroksit ile etkileşime girerek süperoksit radikalının oluşmasına neden olur ve prooksidan özellik bu şekilde ortaya çıkar (35).

Karotenoitler

A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten en önemli karotenoitlerdendir. Bitkilerdeki kloroplast membranının bir bileşenidir. Son derece güçlü bir singlet O_2 temizleyicisi olup ayrıca $\bullet HO$, peroksi ve alkoksi radikalleriyle de doğrudan reaksiyon vererek lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebilir (34).

β -karoten sahip olduğu uzun konjuge çifte bağlarından dolayı radikal ataklar için oldukça mükemmel bir substrattır. Işığa maruz kaldıklarında derhal parçalanırlar. Bu nedenle çeşitli antioksidan deneylerinde oksidasyona bağlı olarak ışık ve renge bağlı oluşan absorpsanlar kullanılarak aktivite ölçümü yapılır (31).

β -karoten şartlara bağlı olarak hem antioksidan hem de prooksidan özellikler gösterebilir. Tokoferollerle birlikte lipid peroksidasyonunun inhibisyonunda sinerjistik etki gösterebilir (31).

Polifenoller

Aromatik halkasında bir ya da daha fazla hidroksil grubu taşıyan maddeler fenolik maddelerdir. Fenolik maddelerin bir araya gelmesi ile polifenolik maddeler oluşur.

Polifenollerden antioksidan etkisi C ve E vitamininden bile daha güçlü olan bir grup vardır ki, bu grup flavonoidler olarak adlandırılır ve C6-C3-C6 yapısına sahiptirler. Bitkilerde genellikle glikozit halinde bulunmaktadır. Flavonoidler serbest radikal süpürücü etkileri yanında metallerle şelat oluşturarak muhtemel serbest radikal oluşumlarının da önüne geçerler (32).

Ürik asit

İnsan dokuları ürat oksitaz içermez ve bu nedenle purin metabolizmasında son ürün olarak ürik asit oluşur. Ürik asit singlet O_2 , peroksil radikalleri, $\bullet HO$, ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve *in vivo* antioksidan olarak kabul edilir (34).

Melatonin

Melatonin $\bullet HO$ temizleyen güçlü bir antioksidandır. Lipofilik bir madde olduğu için kan-beyin bariyeride dahil olmak üzere bir çok kompartımana girerek geniş bir alanda antioksidan aktivite gösterir. Bu özelliği ile diğer antioksidanlara karşı üstünlük sağlamaktadır. Diğer bazı antioksidanlar gibi prooksidan özellik göstermez (34).

Ubikinon

Ubikinon lipofilik bir antioksidandır ve soya yağı ile balık başlıca doğal kaynaklarıdır. En önemli ubikinon, ubikinon-10 (koenzim-Q) dur. Çok güçlü bir antioksidan değilse de E vitamini gibi güçlü bir antioksidan maddenin rejenerasyonunda rol oynar (32).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN MATERYAL VE KİMYASAL MADDELER

3.1.1. Bitkisel Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılan *Helianthemum canum* (L.) Baumg Kayseri'nin Pınarbaşı ilçesinden 2013-2014 yılı Mayıs-Haziran aylarında çiçeklenme mevsiminde toplandı. Bitkinin herbaryum örnekleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (AEF 26340) ve Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Herbaryumu'nda (ERCH Toplayıcı no: 1001) muhafaza edilmektedir.



Şekil 3.1. *H. canum* türünün herbaryum örneği

3.1.2. Kimyasal Maddeler

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

3.1.3. Kullanılan Aletler

Santrifüj cihazı (Nüve ST 402)

Ultrasonik banyo (Elma S 100H Elmasonic)

Vorteks karıştırıcı (Velp scientifica)

pH metre (Inolab pH 720 WTW)

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Cihazı (Agilent Technologies 1200 Series)

Mantolu ısıtıcı (Wise TERM)

Mikroskop (Zeiss Primo Star)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)

Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy HT)

Taramalı Elektron Mikroskobu (Leo 440, Polaron SC7620 Sputter Coater)

3.2. MORFOLOJİK VE ANATOMİK ÇALIŞMALAR

Morfolojik çalışmada yaprak ve çiçek örneklerinin elemanlarının Zeiss Stereo Microscop Discovery V8'e bağlı çizim tüpü kullanılarak mikroskop görüntüleri fotoğraflandı ve ayrıntılı olarak çizimleri yapıldı.

Anatomik çalışma için türün yaprak yüzeysel ve enine kesitleri, yaprak sapı (petiyol) enine kesiti ile gövde enine kesitleri alınarak Sartur (41) ve kloralhidrat reaktifleri ile, müsilaaj teşhisi içinde toz numune üzerinden çini mürekkebi ile preperatları hazırlandı. Daha sonra 4×, 10× büyütme ile genel ve 40× büyütme ile de anatomik görüntüleri için ışık mikroskobuna bağlı ZEISS Primostar 415500 tam otomatik fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğrafları çekildi.

Ayrıca Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-Scanning Electron Microscopy) ile herbaryum materyalinden alınan yaprağın alt ve üst yüzeyleri, çiçek ve çiçeğin ovaryum ile stamen kısımları, üzerinde iki taraflı yapıştırıcı bant bulunan metal numune taşıyıcı olan stap üzerine ve binoküler mikroskop altına yerleştirildi. Örneklerin iletken duruma geçebilmesi ve elektron mikroskop ekranında görüntü verebilmesi için altınla kaplandı.

İncelenen yaprakların genel görünüşleri ile yüzey ayrıntılarını (stoma, damarlanma, tüyler gibi) ve çiçek (pedisel, sepal, petal, ovaryum, stamen) örneklerinin elemanlarını gösteren mikrofotoğraflar Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (TAUM)'da bulunan LEO 440 Polaron SC7620 Sputter Coater marka taramalı elektron mikroskobunda (SEM) fotoğraflandı.

3.3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölümde *H. canum* toprak üstü kısımları kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemleri, ekstrele yapılan miktar tayini, kompozisyon analizleri, antioksidan, antimikrobiyal ve anti-amibik aktivite çalışmaları hakkında bilgi verilmektedir.

3.3.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

H. canum bitkisinin, doğrudan güneş ışığı almayan ve hafif hava akımının olduğu bir ortamda kurutulmuş toprak üstü kısımları kaba toz edildikten sonra bir kısmı (100 g) % 70'lik metanolle çalkalayıcı su banyosunda üç gün boyunca (hergün çözücü değiştirilerek) ekstre edildikten sonra filtre kağıdından süzülerek rotavaporda yoğunlaştırıldı. Diğer bir kısmı da (100 g) geri çeviren soğutucuda bir saat boyunca kaynatılarak su ekstresi elde edildi. Filtre kağıdıyla süzildikten sonra rotavaporda yoğunlaştırıldı. Tüm ekstratlar liyofilize edildi ve analiz anına kadar -18°C' de saklandı.

3.3.2. Etken Madde Gruplarının Teşhis Reaksiyonları

Türün içerdiği etken madde gruplarının saptanması için standart genel teşhis reaksiyonları uygulanmıştır (42).

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Etanol, Sülfürik asit (Merck), Sodyum karbonat (Merck), Glasiyal asetik asit (Merck), Kurşun asetat (Horosan Kimya), Klorofom (Merck), Demir III klorür (Panreac), Mg tozu (Riedle), Amonyak (Ak Kimya), Hidroklorik asit (Birpa), Sodyum hidroksit (Carlo Erba), Amil alkol (Merck), Pikrik asit (Panreac), Bromlu su (Merck), Benzen (Merck), Dragendorff Reaktifi, Mayer Reaktifi, Bouchardat Reaktifi, Hager Reaktifi, Baljet Reaktifi, Stiasny Reaktifi, Tuzlu jelatin çözeltisi.

3.3.2.1. Alkaloit Teşhisi

Bitkinin toz edilmiş toprak üstü kısımlarından 0,5 g alınarak, 20 mL %5 oranında H₂SO₄ taşıyan % 70'lik etanolle 5 dakika karıştırılarak su banyosu üzerinde kaynatıldı, soğutuldu ve çökmeye bırakıldı. Süzildikten sonra ekstreten iki ayrı tüpe 1-2 mL alınarak üzerine Dragendorff ve Mayer reaktifi damlatıldı. Çökelti meydana gelip gelmediği kontrol edildi. Bir çökelti varsa bu, alkaloit veya proteik yapıdaki maddelerden kaynaklanıyor olabilmektedir. Ekstre derişik amonyak çözeltisi ile alkalilendirildi. Kloroform (2 katı hacmi kadar) ile ayırma hunisinde ekstre edildi ve kloroformlu tabaka bir erlene alındı. Bu tabaka daha sonra bir ayırma hunisine alındı ve

15 mL % 10'luk asetik asit çözeltisi ile ekstre edildi. Asetik asitli faz 4'e ayrıldı. Aşağıdaki deneyler yapıldı:

- a) Hager Reaktifi ile sarı billuri çökelti verir.
- b) Bouchardat Reaktifi ile esmer kırmızı çökelti verir.
- c) Dragendorff Reaktifi ile turuncu çökelti verir.
- d) Mayer Reaktifi ile süt rengi çökelek verir. Reaktifin fazlası oluşan çökeltiyi çözer, bu nedenle dikkatle eklenmelidir.

Bu deneylerin pozitif sonuç vermesi, numunedeki alkaloit varlığını gösterir.

3.3.2.2. Kardiotonik Glikozit Teşhisi

Şeker Molekülüne Bağlı Renk Reaksiyonu

Bu gruptaki reaksiyonlar 2-dezoksiozlar için (D-digitoksoz, L-oleandroz) spesifiktir.

a) Keller-Kiliani Reaksiyonu: 1g kaba toz edilmiş numune 10 mL % 70'lik alkolle iki dakika kaynatıldı, soğuduktan sonra pamuktan süzüldü. Süzüntüye 10 mL su ve 5 damla doymuş bazik kurşun asetat çözeltisi eklendi. (Çökelti ya da hafif bulanıklık oluşur). Böylece klorofilden ve diğer pigmentlerden kurtarıldı, tekrar süzüldü. Süzüntü ayırma hunisinde 10 mL kloroform ile ekstre edildi (kuvvetli çalkalanmalı). Kloroform tabakası (altta) bir kapsülde kuruluğa kadar uçuruldu. Kapsüldeki bakiye 3 mL asetik asitte (içinde 1 damla % 5'lik FeCl_3 çözeltisi taşıyan) çözüldü. Bu çözelti tüpe alındı ve üzerine 3 mL derişik H_2SO_4 tüp hafifçe eğilerek dikkatle eklendi (tabakalandırma yapacak şekilde). Numunede kardiotonik glikozitlerin varlığı halinde önce iki sıvı arasında esmer kırmızı bir tabaka (L-oleandroz) oluşur. Zamanla asetik asit tabakası yeşilimtrak mavi bir renk (Gitoksigenin) alır.

b) Pesez Reaksiyonu: 2-dezoksiozların ksantidrol ile HCl'li ortamda kırmızı renk vermesi esasına dayanır.

5 mL analiz çözeltisi su banyosunda uçuruldu. Bakiye üzerine 3 mL % 0.1'lik metanollü ksantidrol çözeltisi ilave edildi, tekrar uçuruldu. Çözeltiyi bir damla 3 N HCl damlatılıp su banyosunda ısıtılmasıyla kırmızı bir renk meydana gelmesi gerekmektedir.

Aglikon Kısımına Dayanan Renk Reaksiyonu

Kardenolitlerin 5'li lakton halkası, aromatik polinitro bileşikleri ile alkali ortamda renkli bir katım bileşiği verir. Bufadienolitler bu reaksiyonları vermezler.

1 g kaba toz edilmiş numune tüpe alındı. 10 mL kloroform:etanol (4:1) eklendi. En az 45 dakika ara sıra çalkalanarak maserasyona tabi tutuldu. Maserasyon sonunda sıvı kısım bir pamuktan süzülerek ayrıldı.

- Süzüntünün 2 mL'si üzerine 0.5 mL Baljet Reaktifi, ardından 2 damla %20'lik NaOH çözeltisi eklendi. Kardiotonik glikozit varlığında turuncu-kırmızı renk meydana gelir.
- Süzüntünün 2 mL'si kapsülde uçuruldu. Bakiye üzerine Kedde Reaktifi ve 2 damla % 20'lik NaOH çözeltisi eklendiğinde oluşan erguvani kırmızı renk yine kardiotonik glikozitlerin varlığını gösterir.

(Baljet Reaktifi: Pikrik asit çözeltisi)

(Kedde Reaktifi: 3.5 dinitrobenzoik asit)

3.3.2.3. Saponozit Teşhisi

a) Köpürme deneyi: 0.5 g toz edilmiş numune 10 mL sıcak su ile beraber bir deney tüpüne konuldu. Soğuduktan sonra takriben 10 sn kadar kuvvetle çalkalandı. Saponin varlığında en az 10 dakika sabit kalan 1-10 cm yüksekliğinde ve üzerine 1-2 damla 2N HCl ilavesiyle kaybolmayan bir köpük tabakası meydana gelir.

b) Salkowski Reaksiyonu: 0.5 g numune bir deney tüpünde 5 mL % 3'lük H₂SO₄ ile su banyosunda beş dakika dikkatle kaynatılarak hidroliz edildi. Sıcakken süzüldü ve süzüntü soğutulduktan sonra ayırma hunisinde süzüntüye eşit hacimde kloroform ile ekstre edildi. Kloroformlu kısım ayrılarak 2 deney tüpüne eşit olarak bölündü;

Birinci deney tüpünde yaklaşık 2 mL kloroformlu kısım, 1-2 damla derişik H₂SO₄ ile tabakalandırıldı. Sarı renkli bir halka oluştu. Daha sonra çalkalamakla veya bekletmekle kloroform tabakasının kan kırmızısı renk alması steroidal sapogenollerin varlığını gösterir.

c) Lieberman-Burchard Reaksiyonu: İkinci tüpteki yaklaşık 2 mL kloroformlu kısım porselen kapsül içinde su banyosu üzerinde kuruluğa kadar uçuruldu. Sonra 1 mL glasiyel asetik asit eklenerek bakiye çözöldü. Deney tüpüne alınan çözelti 1-2 damla

derişik H_2SO_4 ile tabakalandırıldı. İki tabakanın temas yüzeyinde önce mor sonra mavi bir halka görülür. Daha sonra renk yeşile döner ve yayılır (Doymamış ve hidroksilli triterpen ve steroidler, glasiyel asetik asit ve sülfirik asit ile kırmızı, mavi veya yeşil renk verirler. Terpenoit saponinler pembe veya mor, steroid saponinler ise mavi-yeşil renk verdiklerinden bu iki grubun ayırımı mümkündür).

d) Brieskorn-Briner Reaksiyonu: 0.5 g numune deney tüpünde 5 mL % 3'lük H_2SO_4 ile su banyosunda beş dakika dikkatle kaynatılarak hidroliz edildi. Sıcakken süzöldü ve süzüntü soğuduktan sonra ayırma hunisinde süzüntüye eşit hacimde kloroform ile ekstre edildi. Kloroformlu kısım iki kapsüle eşit olarak bölündü. Birinci kapsülde kuruluğa kadar uçurulan ekstrenin üzerine 1-2 damla klorosülfonik asit ilave edildiğinde triterpenik sapogenoller kırmızı renk verirler.

e) Anisaldehit Sülfirik Asit Deneyi: Diğer kapsülde kuruluğa kadar uçurulan kloroformlu ekstre üzerine anisaldehit-sülfirik asit reaktifi damlatıldığında pembeden mora kadar değişen renkler gözlenir. Gerekirse kapsül su banyosunda hafifçe ısıtılır.

Reaktif: 1 mL anisaldehit, 1 mL metanol ve 0.1 mL derişik sülfirik asit karışımında eritilir. Taze hazırlanmalıdır (Aromatik aldehitler: Anisaldehit, vanilin ve diğer aromatik aldehitlerin kuvvetli mineral asitleri; yani sülfirik, fosforik, perklorik asitler içindeki çözeltileri, aglikonlar ile renkli ürünler verirler).

f) Triterpenik Saponinlerin İTK ile Teşhisi:

Adsorban: 0.25 mm kalınlığında Silikajel GF₂₅₄ ile kaplanmış ve aktive edilmiş plaklar kullanıldı.

Çözücü Sistemi: Kloroform:Gl. Asetik asit:Metanol:Su (60:32:12:8)

Belirteç: Vanilin-sülfirik asit reaktifi püskürtöldü. (1-2 dakika 120°C'de ısıtıldı). Saponozitler gün ışığında pembe-viole lekeler halinde belirir.

Numune çözeltisi: Toz edilmiş 1g *H. canum*, 10 dakika 5 mL % 70'lik etanolle ekstre edildi. Elde edilen ekstre süzölerek kuruluğa kadar uçuruldu. 2 mL kloroform-metanol (1:1) karışımında çözümlenerek plağa tatbik edildi.

3.3.2.4. Flavonozit Teşhisi

Siyanidin Reaksiyonu (Shibata R.): Flavon, flavonol ve flavanon taşıyan numunelerin sulu etanollü ekstrelerinin, hidroklorik asitli ortamda Mg metali varlığında, turuncu, kırmızı veya mor bir renk alması esasına dayanır. Flavonlar turuncu, flavonoller kırmızı, flavanonlar ise bu reaksiyonla mor renk verirler. Reaksiyon kromon halkası üzerinden yürüyen bir reaksiyon olduğu için auron, kalkon, dihidrokalkon, izoflavonlar bu reaksiyonla pozitif sonuç vermezler (43).

1 g toz edilmiş numune 10 mL su ile su banyosunda 10 dakika ekstre edildi ve süzüldü. Bir kapsüle süzüntüden 5 mL alındı ve üzerine 5 mL etanollü hidroklorik asit karışımı (etanol-der. HCl-su 1:1:1 *h/h*) ile son olarak 5-6 adet Magnezyum metali ilave edildi. Oluşan renge ve renk şiddetine göre numunedeki flavonoit tipi hakkında yorum yapıldı.

3.3.2.5. Antosiyanozit Teşhisi

Deneyin esas antosiyaninlerin seyreltik asitlerle kırmızı, alkalilerle mavi-mor renk vermesine dayanır. 1 g numune 20 mL etanol-su (1:1) karışımı ile su banyosu üzerinde ekstre edildi, pamuktan süzüldü ve süzüntü 4'e ayrıldı:

- a) 3 mL süzüntü üzerine seyreltik hidroklorik asit ilavesiyle kırmızı renk artar.
- b) 3 mL süzüntü üzerine önce sodyum hidroksit çözeltisinden koyulur, mavi bir renk meydana gelir, bu çözelti üzerine derişik HCl ilavesiyle renk kırmızıya döner.
- c) 3 mL süzüntü üzerine 2 mL amil alkol ilave edilir (tüpün kenarından tabakalandırma yapacak şekilde), genellikle alkol tabakası renksiz kalır, çünkü antosiyanin glikozitleri amil alkolde çözünmezler. Sulu etanollü tabaka ise pembe-violeedir.
- d) 10 mL süzüntüye, 1 mL derişik hidroklorik asit ilave edilip çalkalanır. Amil alkol renklendirilir. Çünkü hidroliz olan antosiyanin glikozitlerinin aglikonları, amil alkolde çözünür.

3.3.2.6. Siyanogenetik Heterozit Teşhisi

2 g toz haldeki numune deney tüpüne konularak üzerine 0.5 mL su ve birkaç damla ksilen eklendi. Bant halinde kesilmiş bir parça filtre kağıdı sodyum pikrat çözeltisine batırıldı. Ayrı bir filtre kağıdı arasına konarak sodyum pikratın fazlası emdirildi. Bu

bant tüpün ağzına (bir kısmı ağzına bir kısmı dışarıda kalacak şekilde) pamuk yardımıyla sıkıştırıldı (filtre kağıdının tüpün içinde kalan kısmının droğa değmemesine dikkat edilmelidir). Tüp 30 dakika, 30°C'lik etüvde tutularak enzimlerle hidrolizi çabuklaştırıldı. Hidrosiyamik asitin çıkışına bağlı olarak sarı renkli sodyum pikrat tuğla kırmızısı renge dönerse (=sodyum izopurpurat) siyanogenetik heterozit varlığından şüphe edilir. Deney sonucunda kırmızı renk almış kağıda % 10'luk asetik asit çözeltisinden birkaç damla ilave edilince renk sabit kalıyorsa siyanogenetik heterozit var demektir.

3.3.2.7. Tanen Teşhisi

5 g numune üzerine 100 mL kaynar su eklendi, 5 dakika su banyosu üzerinde bekletildi, soğutuldu, süzüldü ve 100 mL'ye tamamlandı. Bu şekilde hazırlanan infüzyon (% 5) aşağıdaki deneylerde kullanıldı.

- 5 mL infüzyon üzerine 2 mL tuzlu jelatin çözeltisi eklendiğinde oluşan krem renkli çökelek, tanenlerin varlığını gösterir. Kateşik ve gallik türevlerin teşhisi için aşağıdaki deney yapılır.
- 5 mL infüzyon üzerine seyreltik FeCl_3 (% 5) çözeltisinden 3 damla eklendiğinde mavi-siyah bir renk veya çökelek oluşursa gallik tanen, esmer zeytin yeşili bir renk veya çökelek oluşursa kateşik tanenin varlığını gösterir.
- Kateşik ve gallik tanenlerin birlikte bulundukları durumda ise ayırma aşağıdaki deneyle yapılır:

10 mL infüzyon üzerine 5 mL klorhidrik asitli formol (Stiasny Reaktif) konur. Karışım 80°C'ye kadar ısıtılır. Parçalar halindeki çökelek, numunede kateşik tanen bulunduğunu gösterir. Süzüntüden 3 mL alınır. Sodyum asetat ilavesi ile doyurulur. Doymuş çözelti üzerine 3 damla seyreltik FeCl_3 (% 5) çözeltisi konulur. Oluşan mavi-siyah renk veya çökelek gallik tanenin varlığını gösterir.

3.3.2.8. Kumarin Teşhisi

Toz edilmiş bitki kısımlarından 1 g alınarak üzerine 10 mL 1 N H_2SO_4 ilave edildi. Geri çeviren soğutucu altında 10 dakika kaynatıldı ve sıcakken süzüldü. Süzüntü ayırma hunisinde 15 mL kloroformla çalkalandı. Kloroformlu faz ayrıldı, bunun 5 mL'si üzerine, 5 mL % 10' luk amonyak çözeltisi ilave edilerek çalkalandı. Çözelti 5 dakika

bekletildikten sonra amonyaklı fazın UV 366 nm’ de floresans verip vermediği kontrol edildi (44).

3.3.2.9. Uçucu Yağ Teşhisi

Literatüre göre *Helianthemum* cinsi üzerinde çok az kimyasal çalışma vardır. Uçucu yağ ise sadece *H.kahiricum* (Del.) türü üzerinde çalışılmıştır (45).

H. canum bitkisinin toprak üstü kısımlarından 100 g kullanılarak, uçucu yağ elde etmek üzere Avrupa Farmakopesi’ne uygun Clavenger düzeneği kurulmuş ve hidrodistilasyon yöntemi ile uçucu yağ elde edilmiştir. Yağın analizi, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında yer alan Gaz Kromatografisi (GC) ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile yapılmıştır.

GK analiz şartları:

Cihaz	: Agilent 6890N GC
Kolon	: Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, 0.25 µm film kalınlığı)
Taşıyıcı gaz	: Helyum (0.8 mL/dk)
Dedektör	: AID
Split oranı	: 40:1
Sıcaklıklar	
Enjeksiyon	: 250°C
Dedektör	: 300°C
Sıcaklık Programı	: 60°C-10dk//4°C/dk//220°C -10dk//1°C /dk//240°C
Enjeksiyon Miktarı	: 1 µL

GK/KS analiz şartları:

Cihaz	: Agilent 5975 GC-MSD
Kolon	: Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, 0.25 mm film kalınlığı)
Taşıyıcı gaz	: Helyum (0.8 mL/dk)
Split oranı	: 40:1
Sıcaklıklar	
Enjeksiyon	: 250°C
Dedektör	: 300°C

Sıcaklık Programı : 60°C-10dk//4°C/dk//220°C -10dk//1°C /dk//240°C

Elektron enerjisi : 70 eV

Mass Kütle Aralığı : 35-450 m/z

3.3.3. Kompozisyon Analizleri

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

3.3.3.1. Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı (46). 6 mL distile su içeren 10 mL'lik kap içerisine 100 μ L örnek çözeltisi ve 500 μ L Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. Bir dakika sonra 1.5 mL % 20'lik sulu Na_2CO_3 ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 25°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm'de absorbansı ölçüldü ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Bütün ölçümler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler verildi.

3.3.3.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit analizi Zhishen ve ark (1999)'nın çalışmalarında kullandıkları metot modifiye edilerek yapıldı (47). Buna göre 1 mL ekstre $t=0$. dakikada 0,3 mL % 5'lik NaNO_2 çözeltisi ile karıştırıldı, $t=5$. dakika'da 0,3 mL % 10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ilavesinden sonra, $t=6$. dakika'da 2 mL 1 M NaOH çözeltisi eklendi ve 2,4 mL su ilave edilerek karıştırıldı. 510 nm'de köre karşı absorbans ölçüldü. Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoit miktarları kateşine eşdeğer olarak hesaplandı. Bütün ölçümler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler verildi.

3.3.3.3. Toplam Flavonol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonol miktarları rutine eşdeğer olarak hesaplandı (48). 2 mL ekstre (10g/L), 2 mL etanolik alüminyum triklorit (20 g/L) ve 6 mL sodyum asetat (50 g/L) karıştırıldıktan sonra 20°C de 2.5 saat bekletildi ve 440 nm'de ölçüm yapıldı. Toplam fenolik madde miktarı rutine eşdeğer olarak hesaplandı. Bütün ölçümler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler verildi.

3.3.3.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analiz

YBSK analiz şartları:

Cihaz : Agilent sıvı kromatografisi sistemi

Dedektör : PDA dedektör (200-500 nm arası)

Kolon : C18 analytical column (25cm x0,46 5µm partikülçapı)

Sıcaklık : Oda sıcaklığı

Akım hızı : 1 mL/dak

Hareketli faz : A) % 0,5'lik ortofosforik asit (H₃PO₄), B) Asetonitril (ACN)

Gradient akış :

Zaman (dk)	Hareketli faz A (%)	Hareketli faz B (%)
0	100	0
3	100	0
10	92	8
15	92	8
20	60	40
22	60	40
25	55	45
30	45	55
35	30	70

YBSK'da ayrılan bileşiklerin tutunma zamanları ve UV spektrumları standartlarla karşılaştırılarak tanımlanmıştır.

3.3.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

3.3.4.1. Demir(II) Şelat (Kelat) Aktivite

Demir (II) iyonlarının ekstrelerle kelasyonu Carter (1971)'e göre yapıldı (49). 200 µL ekstre çözeltisi 100 µL 2,0 mM sulu FeCl₂ ve 900 µL metanol karıştırıldı. Kontrol çözeltileri ya pozitif kontrolleri içerir ya da ekstreleri içermez. Reaksiyon karışımının 5 dakikalık inkübasyonundan sonra reaksiyon 400 µL 5,0 mM ferrozin çözeltisi ile hızlandırıldı ve 10 dakikalık bekleme süresinden sonra absorbans 562 nm' de okundu. Demir kelasyon aktivitesi kontrolün absorbansı (A_k) ve örnek absorbansı (A_ö)

kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı ve Na₂EDTA'ya eşdeğer (mg_{Na2EDTA}/g_{örnek}) verildi. Deneyler üç paralel olarak çalışıldı, ortalama değerler verildi.

$$[(A_k - A_0) / A_k] \times 100$$

3.3.4.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin DPPH[•] radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.'nın metoduna (1999) göre yapılmıştır (50). Tris-HCl tamponu (50 nM, p.H 7.4) ve 1mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH[•]) ile karıştırıldı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontroller (BHT, BHA, kateşin, kersetin ve gallik asit) kullanıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm'de okundu. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. IC₅₀ değerleri nonlinear regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon 7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplandı. Deneyler üç paralel olarak çalışıldı ve ortalama değerler verildi.

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

3.3.4.3. β -Karoten / Linoleik Asit Birlikte Oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi β -karoten soldurma deneyine göre yapıldı (51, 52). Tween 20 (1200 mg) ve linoleik asit (120 mg) tartılıp kloroformla yıkanarak bir kaba alındı daha sonra bu kaba 1.2 mL β -karoten (1 mg/mL kloroform içerisinde) eklendi ve karışımdaki kloroform rotavoporda uçurularak uzaklaştırıldı. 300 mL distile su eklenerek yavaşça karıştırıldı. Kontrol, standart ve örnekler konulmadan aynı prosedürle hazırlandı. Kontrol ve örneklerin şahitleri ise aynı şekilde β -karotensiz olarak ayrıca hazırlandı. Ekstreler, standartlar ve kontroller hazırlanan emülsiyonlarla beraber tüplere aktarıldı ve 470 nm'de spektrofotometrede ölçümleri alındı. Daha sonra tüplerdeki bu örnekler otooksidasyon için 50°C'de 105 dakika su banyosunda bekletildi ve her 15 dakikada bir ölçüm yapılarak solma derecesi izlendi. Deneyler üç paralel olarak çalışıldı ve ortalama değerler verildi.

$$AA\% = [1 - (Abs^0_{\text{örnek}} - Abs^{105}_{\text{örnek}}) / (Abs^0_{\text{kontrol}} - Abs^{105}_{\text{kontrol}})] \times 100$$

3.3.4.4. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS^{•+}) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkilerine bakıldı (53). ABTS^{•+} radikali (7 mM) ABTS' in sulu çözeltisi ile K₂S₂O₈ (2.45 mM son konsantrasyon)'un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirildi ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm'de 0.700 (±0.030) olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltileri (10 µL) karıştırıldı ve 734 nm'de bir dakikalık aralıklarla 15 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC: Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi) hesaplandı. Deneyler üç paralel olarak çalışıldı ve ortalama değerler verildi.

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

Ekstrelerin hidroksil radikalini süpürücü etkilerine bakıldı (54). Sığır beyin ekstresi (Bovine brain extract, Folch VII) 10 mM PBS (pH 7.4) ile karıştırılıp buz banyosu içerisinde şeffaf bir süspansiyon olana kadar (5mg/ mL fosfolipit lipozomu) tutuldu. 0.2 mL lipozom (beyin ekstresi), 0.5 mL PBS tamponu, 0.1 mL 1 mM FeCl₃ ve 0.1 mL ekstre çözeltisi ile karıştırıldı. Peroksidasyon reaksiyonunu hızlandırmak için 0.1 mL askorbat çözeltisi ilave edildi. Karışım 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra öncelikle 50 µL % 2'lik (a/h) butillenmiş hidroksi toluen (BHA, etanol içerisinde) daha sonra da 1 mL % 2.8 (a/h) trikloroasetik asit (TCA) 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 bütanolle ekstre edildi. Bütanol fazlarının absorbansı 532 nm'de okundu. İnhibisyon yüzdeleri aşağıdaki formülle hesaplandı. Deneyler üç paralel olarak çalışıldı ve ortalama değerler verildi.

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

3.3.5. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Antimikrobiyal maddeler; mikroorganizmaların gelişmesini durdurucu veya öldürücü ajanlardır. Antimikrobiyal maddede olması gereken en önemli özellik ise seçici toksisitedir. Antimikrobiyallere bakteriyel direnç tayini, enfeksiyonların yönetiminin önemli bir parçasıdır. Kirby Bauer standardize disk difüzyon yöntemi ve sıvı mikrodilüsyon testleri, yeni otomatik yöntemlerden önce ve hala laboratuvarlarda

kullanılan klasik yöntemlerdendir. Bir antimikrobiyal bileşik, bilinen bir konsantrasyonda 6 mm'lik filtre kağıdına emdirilir, bu disk bir Mueller-Hinton (MH) agar üzerine yerleştirilir. Antimikrobiyalın agar içine nüfuzu başlar (55). Bu amaçla öncesinde MH agar yüzeyine test edilecek olan mikroorganizmanın ekimi yapılmalıdır. Yaklaşık olarak 18 saat sonunda disk çevresinde oluşan inhibisyon zonu ile antimikrobiyalın direnç, orta duyarlılık ya da duyarlılık kriterine karar verilir. Antimikrobik disk duyarlılık testleri için geçerli yorumlamalar, Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü kurallarına göre değerlendirilmektedir (CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute) (56). Minimal inhibitör konsantrasyon değerlerini belirlemek amacı ile de sıvı mikrodilüsyon testi steril mikropate kullanılarak çalışılır. Disk difüzyon testinde belirtilen bitki ekstre konsantrasyonlarında 10^5 Mc Farland olarak standardize edilmiş olan bakteri süspansiyonları CLSI standartlarına uygun olarak Müller Hinton sıvı besiyeri kullanılarak dilüe edilir. Bitki ekstraları ve standart bakteri süspansiyonları eklenerek, üremenin olmadığı kuyucuğun tespit edilmesiyle sonuçlandırılır (56).

Çalışmamızda *H. canum*'un metanol ve su ekstralarının antimikrobiyal aktivitesini tespit edebilmek amacıyla sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri uygulandı. Disk difüzyon yönteminin temeli standart mikroorganizmaların üreyebileceği agar plak besiyeri yüzeyine yayılarak yapılan ekim üzerine belirli standartlarda bitki ekstraları emdirilmiş disklerin yerleştirilmesi, bir süre 37°C'de bekletildikten sonra disk etrafında oluşan inhibisyon bölgelerinin ölçülmesi ile mikroorganizmaların duyarlılıkları hakkında yargıya varılması esasına dayanır (57).

H. canum'un % 70 metanol ve su ekstraları ile üç farklı standart maddenin (kateşin, gallik asit, kersetin) 2500, 1250, 625, 312.5 µg/mL olmak üzere Dimetil sülfoksit (DMSO)'in % 1'lik çözeltisi ile sulandırılması sonucunda standartlar hazırlandı ve steril boş disklerle (6 mm) 20 µL olmak üzere her bir materyalden emdirilip diskler kuruduktan sonra disk difüzyon yöntemi uygulandı. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde ise bitki ekstralarından 2500 µg/mL' den başlanarak aynı dilüsyonlarda her bir standart bakteri suşu için CLSI standartlarına uygun olarak uygulandı. Deneyler üç paralel olarak çalışıldı ve ortalama değerler verildi. Her iki yöntemde de kullanılan standart Gram (-) bakteri suşları: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* NCTC 8394 ve *Haemophilus influenzae* ATCC 4447'dir.

Gram (+) bakteri suşları: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* NJ-1, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'dir.

3.3.6. Antiamibik Aktivite Çalışmaları

Çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Parazitoloji Laboratuvarından *Acanthamoeba castellanii* ile Ordu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden *Escherichia coli* suşları alınmış ve kültürü yapılarak devamlılığı sağlanmıştır.

Non-nutrient Agar

Kullanım prosedürüne göre hazırlanan EMB besiyerinde, amiplerin besin olarak kullandığı ve Gram (-) bakterilerden olan *Escherichia coli* üretilmiştir.

Acanthamoeba besiyeri

A. Page'in amoeba saline solüsyonu:

- | | |
|---|-----------|
| 1. NaCl | 12,0 mg |
| 2. MgSO ₄ .7H ₂ O | 4,0 mg |
| 3. CaCl | 24,0 mg |
| 4. Na ₂ PO ₄ | 142,0 mg |
| 5. KH ₂ PO ₄ | 136,0 mg |
| 6. Distile su | 1000,0 mL |

Page's solüsyonu amiplerin üremesini engellediği için hazırlanmış olup, hazırlanan solüsyon 100 mL'lik erlenlere alınmış, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmış ve kullanılabileceği kadar 4°C'de saklanmıştır.

B. Besiyerinin Hazırlanması

1.5 gr granüle agar 100 mL Page's solüsyonunda ısıtılarak çözündürülmüş, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmış ve petri kaplarına dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyerleri kullanılabileceği kadar 4°C'de saklanmıştır.

Kültür

Hazırlanan besiyerlerinin üzeri 0,5 mL Page's solüsyonu ile sulandırılmış ve 24 saatlik *E. coli* suşu agarın üzerine yayılmıştır. *A. castellanii* suşlarından alınan örnekler besi

yerlerine ekilmiştir. Ekim yapılan parazitler 72 saat 26°C’de bekletilmiş ve trofozoitler zedelenmeden petri kaplarından Page’s solüsyonu ile toplanmış ve dipte çökelti oluşturmamaları amacıyla 1500 rpm (devir/dakika) de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Trofozoitlerin canlılığını test etmek için % 0.1’lik Eosin kullanılmış ve hemositometre lamında sayılmıştır. Eosini içine alarak boyanan trofozit ölü olarak kabul edilmiştir. Son konsantrasyon 10 x 1105 trofozoit/mL olacak şekilde ayarlanmış ve bekletilmeden kullanılmıştır.

Bitki ekstraktlarının konsantrasyonlarının hazırlanması

Her solüsyonun konsantrasyonu 1, 2, 4, 8, 16 ve 20 mg/mL olacak şekilde 10 mL hazırlanmıştır. Ependorflara hazırlanmış konsantrasyonlarda 1,5 mL bitki özütü eklenmiştir. Her konsantrasyon için bir ependorf tüpü hazırlanmıştır.

Solüsyonların üzerine 200 µL parazit eklenmiş ve 26°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Parazitin canlılığı belirli saatlerde kontrol edilerek not edilmiştir. Bitki özütü eklenmeyen parazit solüsyonu da kontrol olarak aynı ortamda bekletilmiştir.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

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

4. BULGULAR

4.1. MORFOLOJİK VE ANATOMİK ÇALIŞMALAR

Morfolojik çalışmalar, stereomikroskop (ZEISS Primostar 415500) ve taramalı elektron mikroskobu (LEO 440 Polaron SC7620 SputterCoater) ile iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Çiçeklerin ve yaprakların morfolojik özellikleri ayrıntılı olarak incelenmiş, çizimleri yapılmış ve fotoğrafları çekilmiştir. Anatomik çalışma için *H. canum* türünün yaprak yüzeysel ve enine kesitleri, yaprak sapı (petiyol) enine kesitleri ile gövde enine kesitleri alınarak, kloralhidrat ve Sartur reaktifleri ile ayrıca müsilaj için toz numune üzerinden çini mürekkebi ile hazırlanan preparatların fotoğrafları çekilmiştir.

4.1.1. *H. canum* türünün çiçek morfolojisi

Çiçekler 0.9-1.2 mm boyutlarında, pedisel ise yoğun tüyler taşımaktadır. Kaliks açık yeşil renkli, yoğun tüylü ve dışta 2 içte 3 olmak üzere 5 sepalden oluşmuştur. İç sepaller 3-5 mm boyutlarında genişçe ovat, dış sepaller 2-3 mm boyutlarında doğrusal tiptedir. Dıştaki 2 sepal içtekilere göre daha küçüktür. Korolla ise sarı renktedir ve 5 petal taşımaktadır. Petallerin boyutları 4-7 mm olarak ölçülmüştür. Çok sayıda stamen mevcuttur. Ovaryum papilli, üst durumlu ve oldukça yoğun tüy taşımaktadır (Şekil 4.3; Şekil 4.5; Şekil 4.7; Şekil 4.9)

Stereomikroskop görüntüleri ve morfolojik çizimler:



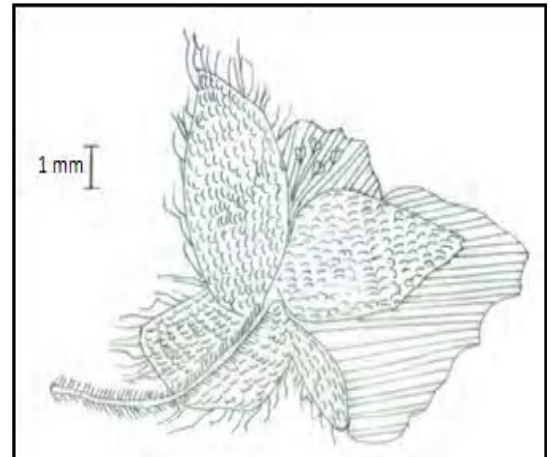
Şekil 4.1. Çiçeğin genel görünüşü (%70'lik alkol örneğinden)



Şekil 4.2. Papillili ovaryum



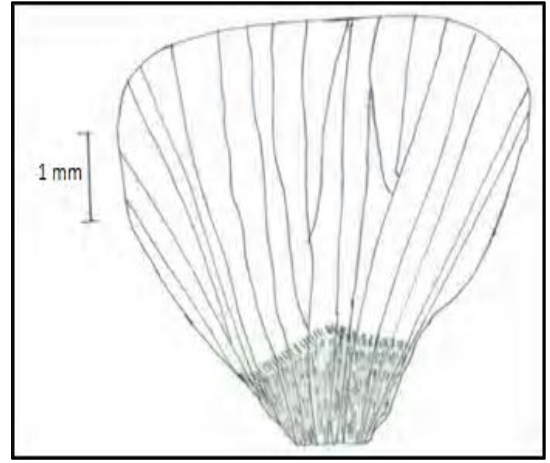
Şekil 4.3. *H. canum* çiçeğinin kaliks ve pediselinde yoğun tüyler (%70'lik alkol örneğinden)



Şekil 4.4. *H. canum* çiçeğinin kaliks ve pediselinde yoğun tüyler



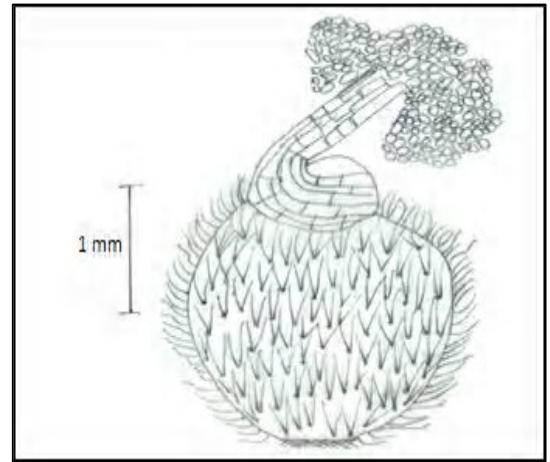
Şekil 4.5. *H. canum* petalinin genel görünüşü



Şekil 4.6. *H. canum* petalinin genel görünüşü morfolojik çizim



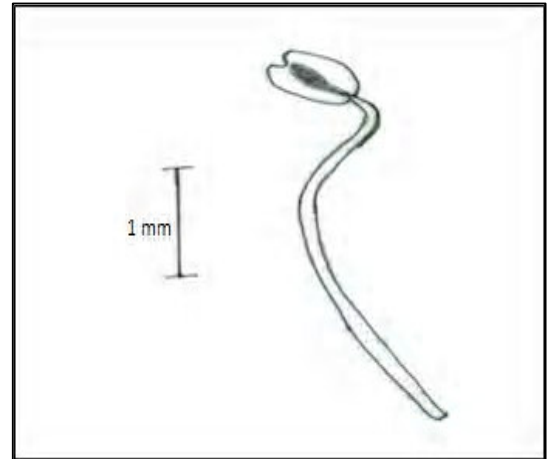
Şekil 4.7. *H. canum* papillili ovaryum (%70'lik alkol örneğinden)



Şekil 4.8. *H. canum* papillili ovaryum morfolojik çizim

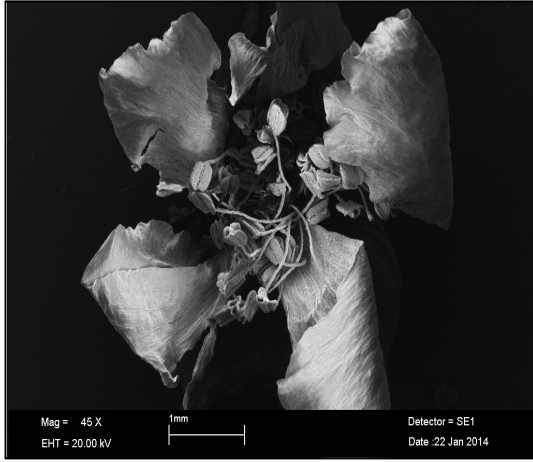


Şekil 4.9. *H. canum* stamen genel görünüşü (%70'lik alkol örneğinden)

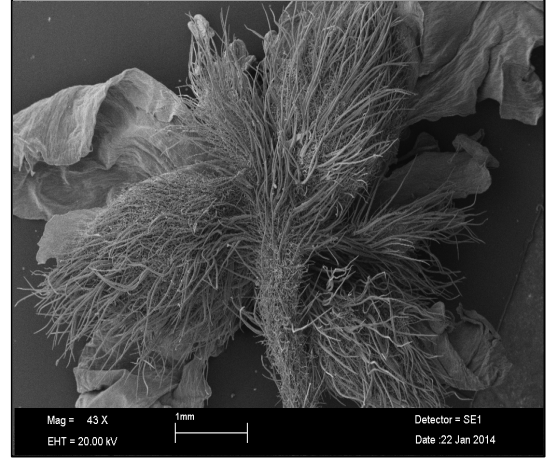


Şekil 4.10. *H. canum* stamen genel görünüşü morfolojik çizim

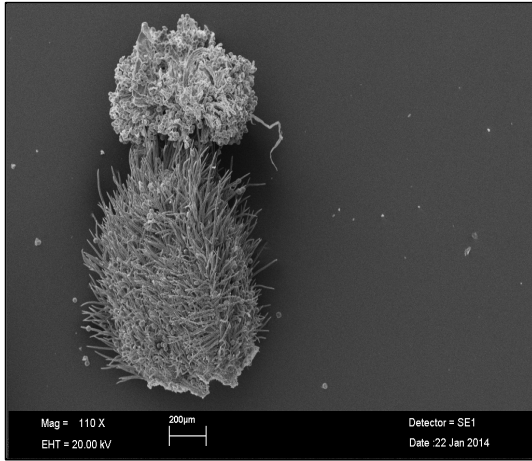
Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (SEM):



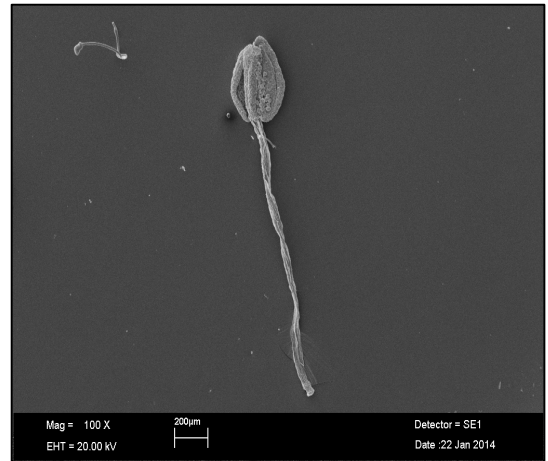
Şekil 4.11. Çiçeğin genel görünüşü



Şekil 4.12. Çiçeğin kaliksinde yoğun tüyler



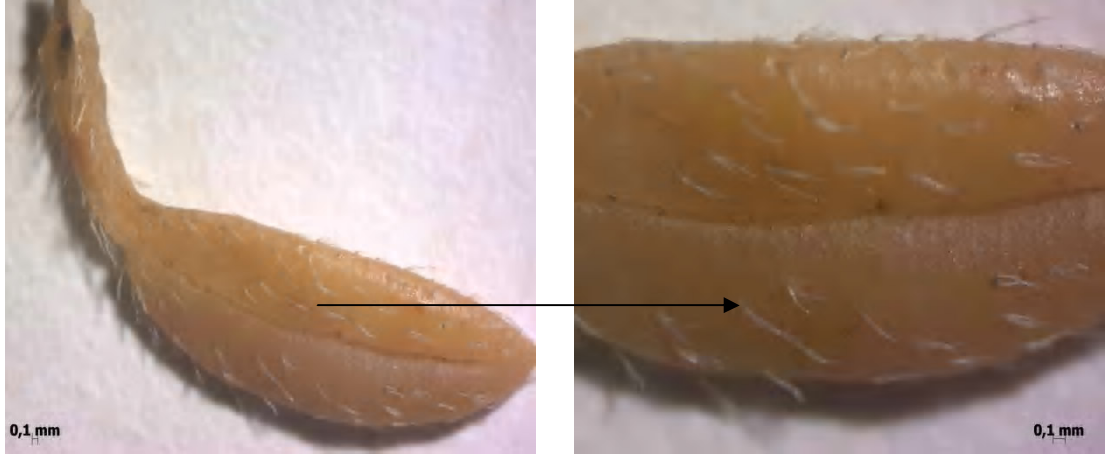
Şekil 4.13. Papilli ovaryum



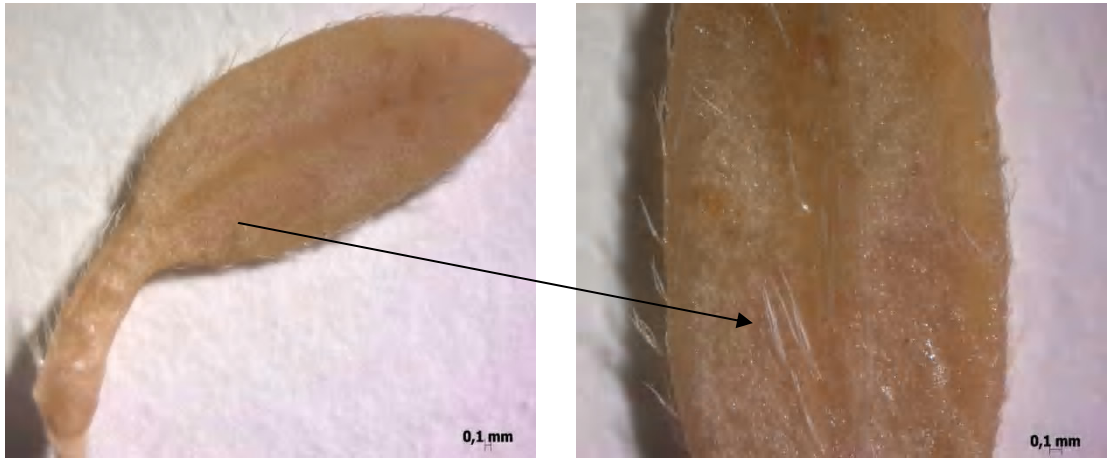
Şekil 4.14. Stamen

4.1.2. *H. canum* türünün yaprak morfolojisi

Yapraklar yeşil renkli, oppozit dizilimli, eliptik-lanseolat, integer (düz) kenarlı, lamina tepesi akut, lamina tabanı akuminat ve 1.5-2.5 cm boyutlarındadır. Taban yaprakları üstteki yapraklara göre daha küçük boyutlardadır. Yaprığın üst yüzeyindeki tüyler alt yüzeye göre çok daha yoğundur. Alt yüzeydeki tüyler genellikle orta damara yakın yerlerde bulunmaktadır. Petiyol 3-5 mm boyutlarındadır.

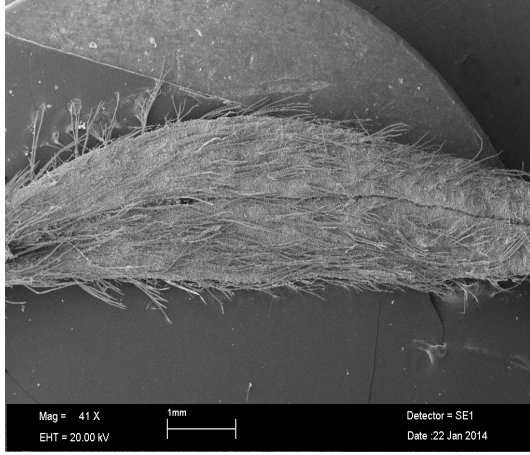
Stereomikroskop görüntüleri:

Şekil 4.15. *H. canum* bitkisinin yaprak üst yüzeyinde tüylerin görünümü (%70'lik alkol örneğinden)

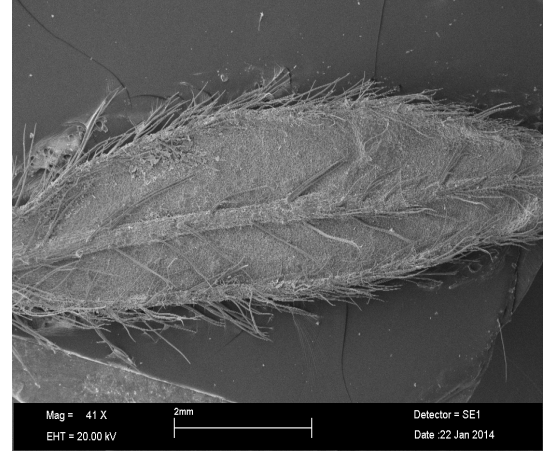


Şekil 4.16. *H. canum* bitkisinin yaprak alt yüzeyinde tüylerin görünümü (%70'lik alkol örneğinden)

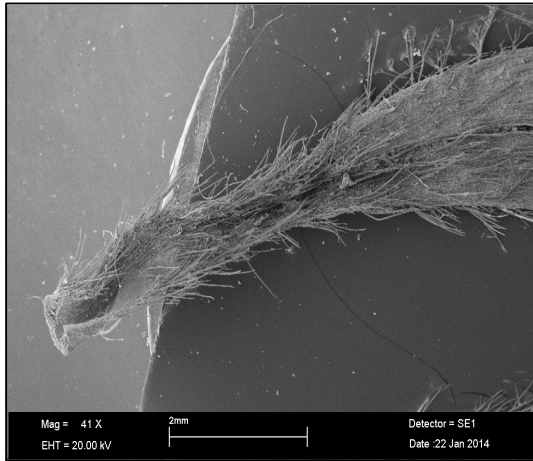
Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (SEM):



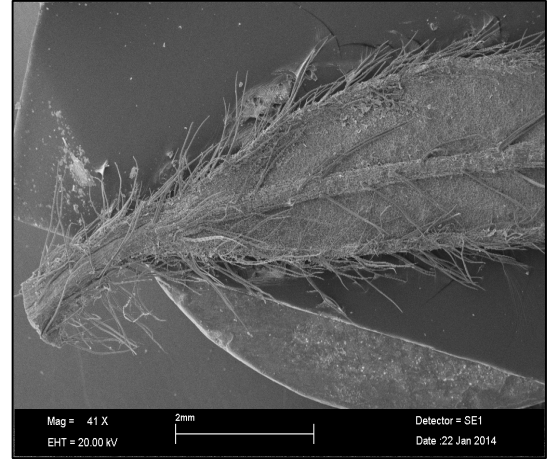
Şekil 4.17. Yaprak üst yüzeyi



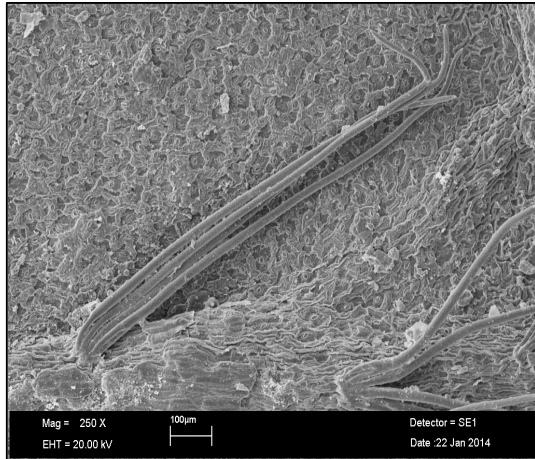
Şekil 4.18. Yaprak alt yüzeyi



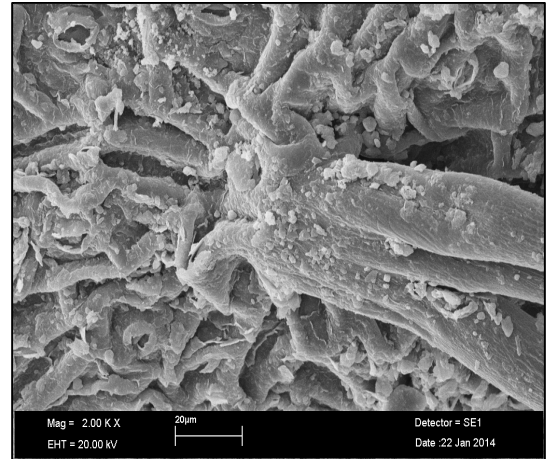
Şekil 4.19. Yaprak üst yüzey petiyolde tüyler



Şekil 4.20. Yaprak alt yüzey petiyolde tüyler



Şekil 4.21. Yaprak üst yüzeyde tüyler



Şekil 4.22. Tüy tabanı

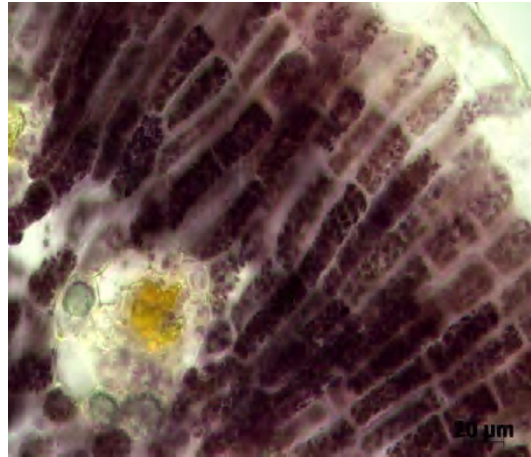
4.1.3. *Helianthemum canum* türünün yaprak anatomisi

4.1.3.1. Yaprak ayası

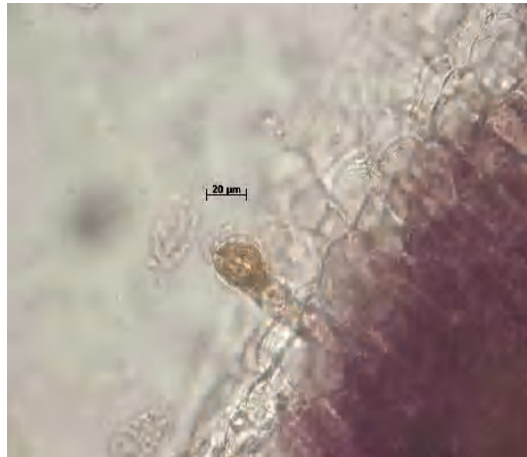
Monofasiyal bir yapraktır. Epidermis ince bir kütikula ile çevrilidir. Kütikulanın hemen altında tek sıralı dikdörtgenimsi epiderma hücreleri mevcuttur. Üst epidermanın hemen altında yer alan palizat parankima hücreleri 3-5 sıralı ve hücreler arası boşlukları oldukça azdır. Alt palizat parankima hücreleri ise 2-3 sıralıdır. Sünger parankiması ise farklı şekillerde olup, üst ve alt palizat parankima hücreleri arasında dar bir alanda bulunmaktadır. Alt epidermis hücreleri ise tek sıralı ve üst epiderma hücrelerine benzer biçimde sıralanmıştır. Mezofilde bulunan iletim demetleri etrafında ve palizat parankimasında yer yer druz kristalleri görülmüştür.



Şekil 4.23. Yaprak ayası enine kesiti



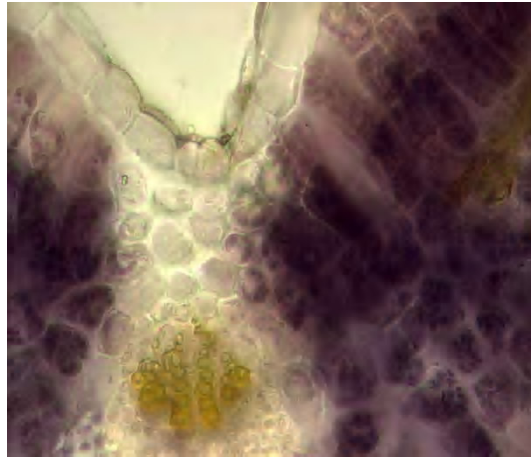
Şekil 4.24. Yaprak ayası enine kesitinde palizat parankiması, iletim demeti ve druzlar



Şekil 4.25. Yaprak ayası enine kesitinde kapitat salgı tüyü

4.1.3.2. Yaprak orta damarının enine kesiti

Üst epiderma hücreleri tek sıralıdır. Üst epidermanın hemen altında tek sıralı kollenkima hücreleri yer alır. Merkezi iletim demeti üst epidermaya yakın tarafta ksilem, alt epidermaya yakın tarafta floem olacak şekilde konumlanmıştır. Sklerenkima dokusu floem'in altında bulunur. Alt epidermanın hemen sonrasında ise kollenkima hücreleri 3-5 sıralı olarak bulunur.



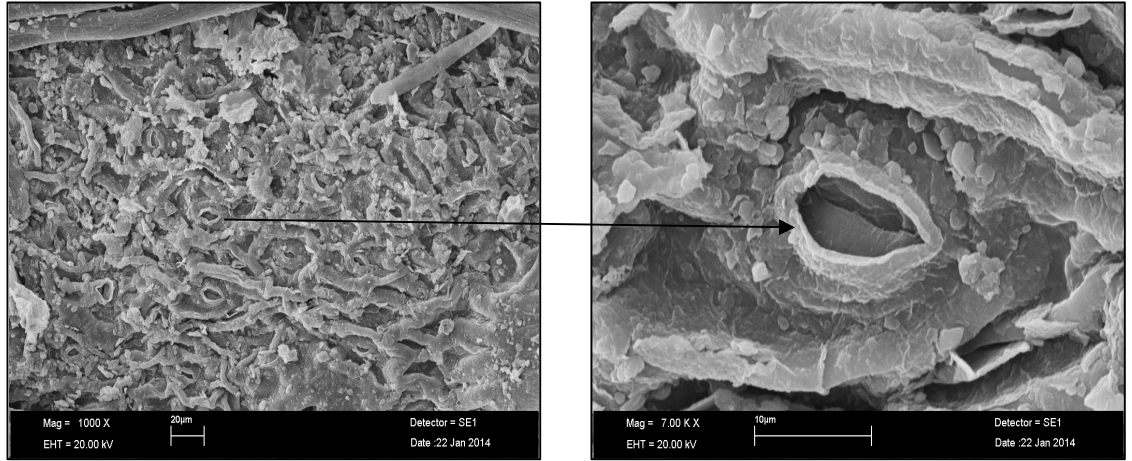
Şekil 4.26. Yaprak orta damarı enine kesit

4.1.3.3. Yaprak üst ve alt epiderması

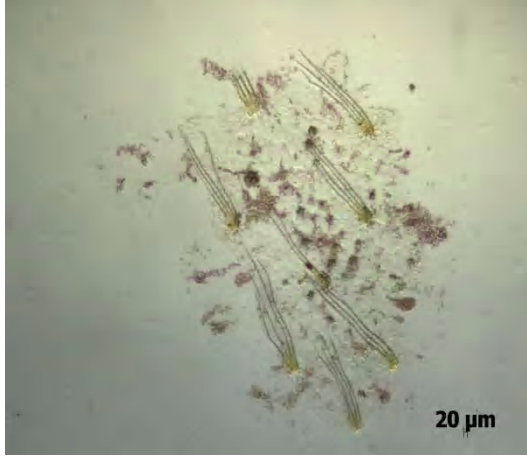
Alt ve üst epiderma hücreleri düzensiz şekilli ve orta kalınlıkta hücre duvarına sahiptir. Her iki epidermadan alınan yüzeysel kesitlerde epiderma hücreleri altında yuvarlak şekilli palizat parankiması görülmüştür. Druz kristalleri bazen tek bazen diziler halinde parankima hücreleri arasında bulunmaktadır. Stoma komşu hücreleri diğer epiderma hücrelerinden genellikle farklılık göstermediği için *Ranunculaceae* tipi anomositik stomaya sahiptir. Stomalar genellikle 4-5 komşu hücrelidir. Stoma komşu hücreleri hafif kıvrımlı ve düzensiz bir yapıya sahiptir. Alt epidermada stomalar üst epidermaya göre çok daha seyrekler. Ayrıca yine üst epidermada alt epidermaya göre daha yoğun halde bulunan; tek hücreli, dar, ince, ligninleşmiş çeperli, tepesi küt ya da sivri ve tek çukurlaşmış tabandan dallanan örtü tüyleri mevcuttur. Üst ve alt epidermadaki örtü tüylerinin yapısı aynıdır. Sapı ve başı tek hücreli kapitat salgı tüyleri hem alt hem de üst epidermada nadir olarak tespit edilmiştir. Kesitlerde genel olarak küçük yağ damlalarına da rastlanmıştır.



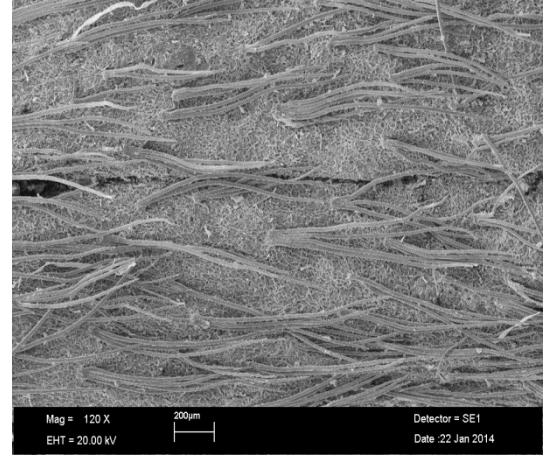
Şekil 4.27. Yaprak üst epidermada stomalar



Şekil 4.28. Yaprak üst epidermada stomalar (SEM)



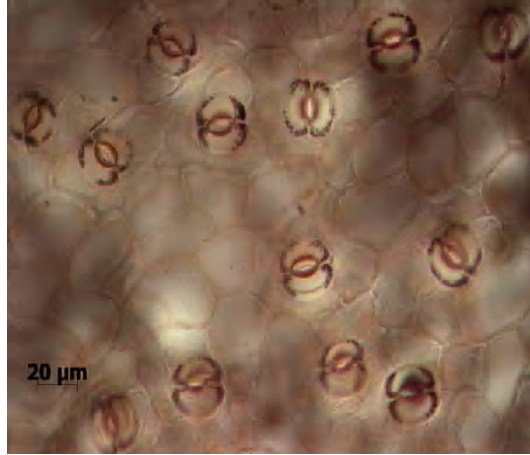
Şekil 4.29. Yaprak üst epidermada tüyler



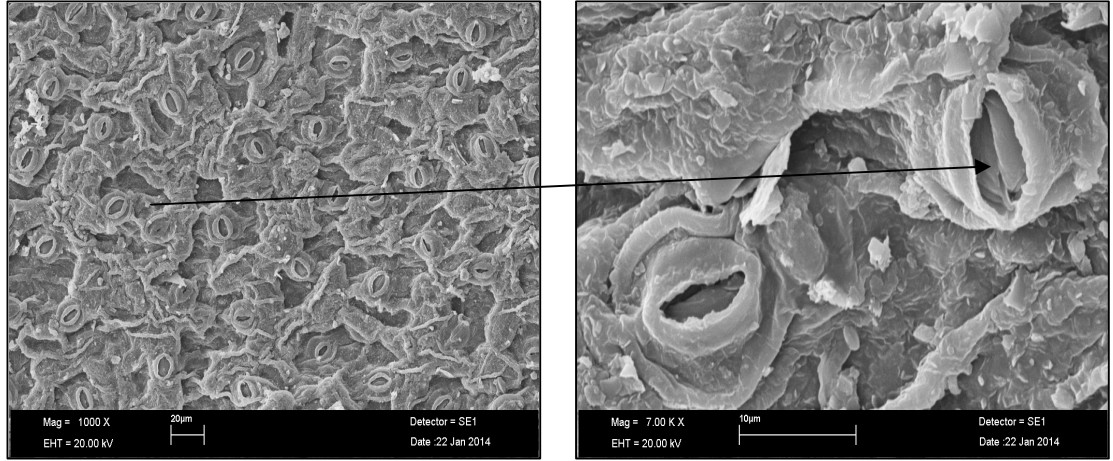
Şekil 4.30. Yaprak üst epidermada tüyler (SEM)



Şekil 4.31. Tüy tabanı karakteristik sarı lekeli



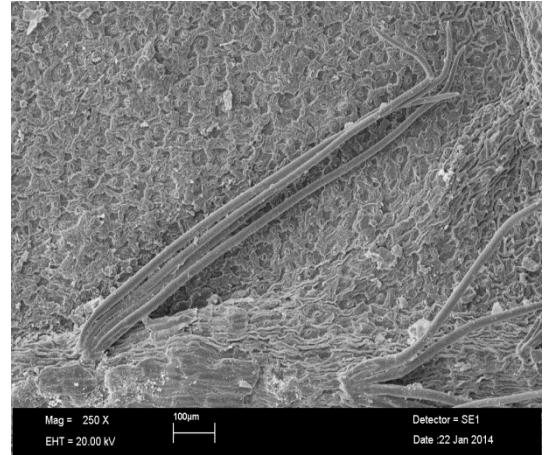
Şekil 4.32. Yaprak alt epidermada stomalar



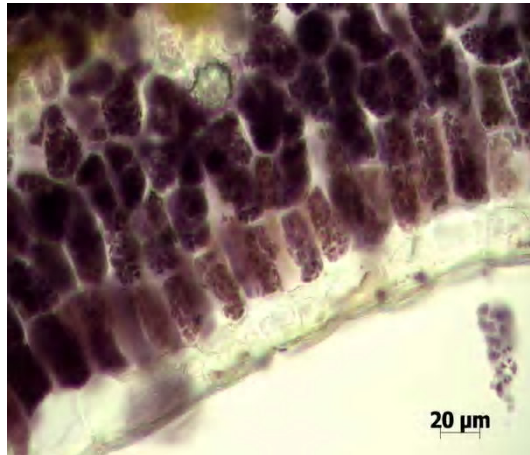
Şekil 4.33. Yaprak alt epidermada stomalar (SEM)



Şekil 4.34. Yaprak alt epidermada örtü tüyleri



Şekil 4.35. Yaprak alt epidermada tüyler (SEM)



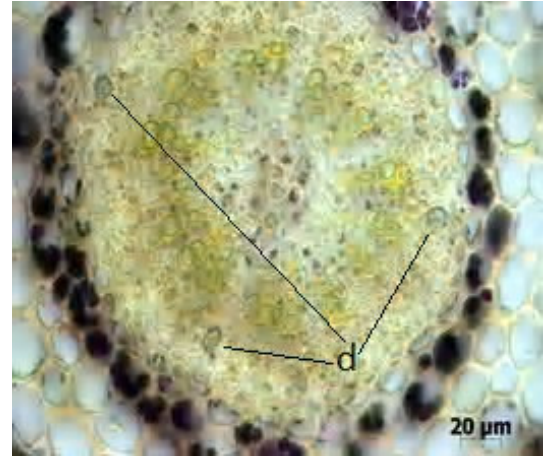
Şekil 4.36. Yaprak enine kesitinde sünger ve palizat parankimalarının genel görüntüsü (mezofil)

4.1.3.4. Petiyol Enine Kesiti

Enine kesitte yuvarlak şekillidir. Epidermis hücreleri hafif köşeli, irili ufaklı tek sıra halinde dizilmiştir. Epidermisin hemen altında 1-2 sıralı klorenkima hücreleri bulunur. Klorenkima hücrelerinin hemen altında düzensiz şekilli parankima hücreleri mevcuttur. Ortada iletim demetleri tek sıralı endodermis ile çevrilidir. Endodermisin hemen altında sklerenkimatik doku daire şeklinde floemi çevrelemiştir. Floem'in iç kısmında ise ksilem dar ışınsal yapıda bulunmaktadır.



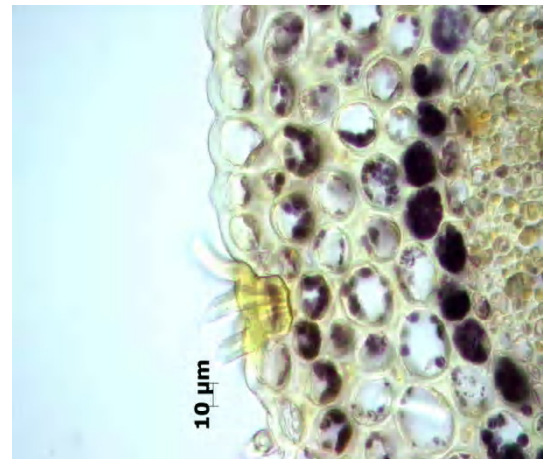
Şekil 4.37. Petiyol enine kesiti şematik görüntü



Şekil 4.38. İletim demetlerinde druz kristalleri d:druz



Şekil 4.39. Petiyol enine kesitinde örtü tüyleri



Şekil 4.40. Petiyol enine kesitte parenkima hücrelerinde nişasta taneleri

4.1.4. *H. canum* Türünün Gövde Anatomisi

Gövde enine kesitte yuvarlak şekillidir. En dışta ince bir kütikula tabakası mevcuttur. Tek tabandan dallanan bol örtü tüyleri ile kaplanmıştır. Nadirde olsa salgı tüyleri görülmüştür. Tek sıralı epidermis tabakası irili ufaklı düzensiz hücrelerden oluşur. Epidermanın hemen altında yer yer 1-2 sıralı kollenkima hücreleri veya 2-3 sıralı klorenkima hücreleri bulunmaktadır. Klorenkimanın hemen altında 2-3 sıralı irili ufaklı parankima hücreleri vardır. Parankima hücreleri üzerinde bol miktarda druz kristallerine, ara ara da billur kristallerine rastlanmıştır. Basit billur kristalleri sferik olarakta görülmektedir. Parankima hücrelerinin altında tek sıralı endodermis tabakası bulunur. Endodermisin altında yer yer 1-2 sıralı sklerenkima tabakası gözlenmiştir. Bu tabakanın altında ise floem tabakası mevcuttur. Ksilem ışınal olarak dizilmiştir. Öz bölgesinde de düzensiz parankimatik hücreler ve kristaller bulunur.



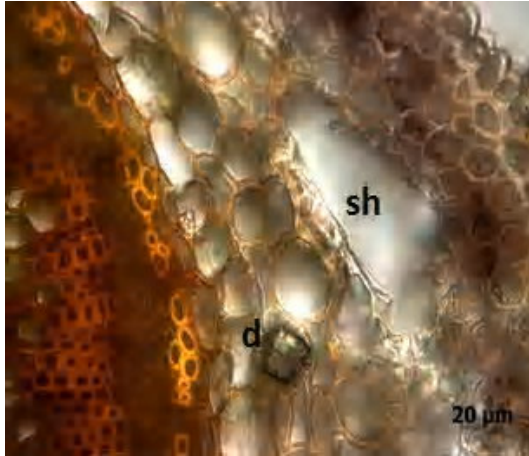
Şekil 4.41. Gövde enine kesiti şematik görüntü



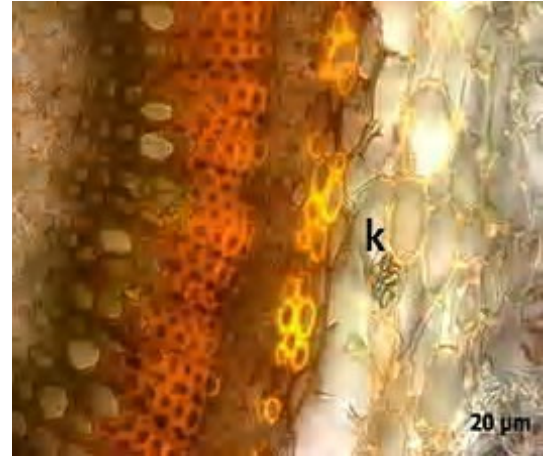
Şekil 4.42. Gövde enine kesitte örtü tüyleri



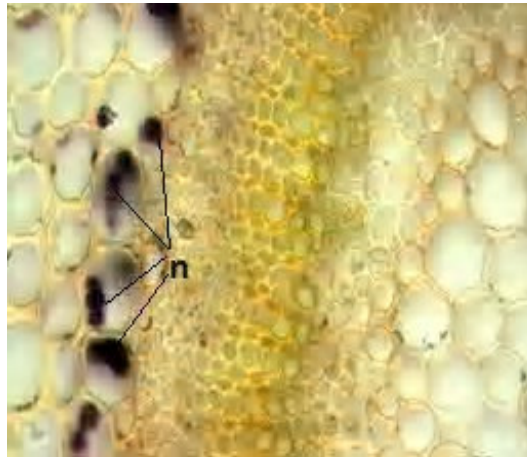
Şekil 4.43. Gövde enine kesitte örtü tüyleri



Şekil 4.44. Gövde enine kesitinde parankimada druz kristali ve salgı hücresi **sh**: salgı hücresi, **d**: druz



Şekil 4.45. Gövde enine kesitinde parankima hücrelerinde kristaller **k**: kristal



Şekil 4.46. Gövde enine kesitinde parankimada nişasta taneleri **n**: nişasta taneleri

4.2. ESKTRELERİN HAZIRLANIŞI, SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOGRAFIK BİLEŞİM ANALİZLERİ

4.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

H. canum bitkisinin toprak üstü kısımları değirmende kaba toz edilerek ekstraksiyon için hazır edildi. Aktivite ve kimyasal çalışmalarda kullanılmak üzere iki tip ekstre hazırlandı. Geri çeviren soğutucu altında su ekstresi ve çalkalayıcı su banyosunda üç gün süre ile bekletilerek % 70'lik metanol ekstresi hazırlandı. Ekstreler çözücülerden uzaklaştırıldıktan sonra antioksidan, antimikrobiyal, antiamibik aktivite ve kompozisyon analizlerinde kullanılmak üzere hazır hale getirildi. Elde edilen ekstre verimleri Tablo 4.3' de verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi bitki ekstralarında en yüksek verim metanol ekstresinden elde edilmiştir.

4.2.2. Ana Etken Madde Gruplarının Teşhis Reaksiyonları

Teşhis reaksiyonları için *H. canum* bitkisinin toprak üstü kısımları kabaca toz haline getirilerek deneylerde kullanılmış ve sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

4.2.2.1. Alkaloid Teşhisi

Yapılan deneyler sonucunda, numune Hager, Bouchardat, Dragendorf ve Mayer reaktifleri ile çökelti vermediği için negatif sonuç gözlenmiştir. Bitkide alkaloid yoktur.

4.2.2.2. Kardiyotonik Glikozit Teşhisi

Yapılan deneyler sonucunda numune beklenen renkleri vermediği için negatif sonuç gözlenmiştir. Bitkide kardiyotonik glikozitler yoktur.

4.2.2.3. Saponozit Teşhisi

a) Köpürme Deneyi: Yapılan deney sonucunda beklenen köpük tabakası meydana gelmemiştir.

b) Salkowski Reaksiyonu: Yapılan deney sonucunda kloroform tabakasının kırmızı renk alması steroidal sapogenollerin varlığını ispatlamıştır.

c) Lieberman-Burchard Reaksiyonu: Yapılan deney sonucunda gözlenen yeşil renkli tabaka, steroid saponinin varlığını ispatlamıştır.

d) Brieskorn-Briner Reaksiyonu: Yapılan deney sonucunda beklenen kırmızı renk gözlenmediği için negatif sonuç vermiştir. Bitkide triterpenik sapogenol yoktur.

e) Anisaldehit Sülfürik Asit Deneyi: Yapılan deney sonucunda numuneye damlatılan anisaldehit-sülfürik asit reaktifi pembe-mor renk verdiği için pozitif sonuç gözlenmiştir.

f) Triterpenik Saponinlerin İTK ile Teşhisi: Yapılan İTK sonucunda numune beklenen renkleri vermediği için negatif sonuç gözlenmiştir. Bitkide triterpenik saponin yoktur.

4.2.2.4. Flavonozit Teşhisi

Yapılan deney sonucunda gözlenen turuncu renk, numunede flavon olduğunu ispatlamıştır (flavon: turuncu flavonol:kırmızı flavonon: mor).

4.2.2.5. Antosiyanozit Teşhisi

Yapılan deney sonucunda numune beklenen renkleri vermediği için negatif sonuç gözlenmiştir. Bitkide antosiyanozit yoktur.

4.2.2.6. Siyanogenetik Heterozit Teşhisi

Yapılan deneyler sonucunda numune beklenen rengi vermediği için negatif sonuç gözlenmiştir. Bitkide siyanogenetik heterozit yoktur.

4.2.2.7. Tanen Teşhisi

Yapılan deneyler sonucu oluşan krem renkli çökelek, numunede tanenin varlığını ispatlamıştır. Daha sonraki analizde gözlenen esmer zeytin yeşili renk ise bitkideki tanenin, kateşik tanen olduğunu göstermiştir.

4.2.2.8. Kumarin Teşhisi

Numune UV 366 nm’de floresans vermediği için negatif sonuç gözlenmiştir.

Tablo 4.1. *H. canum* bitkisinde teşhis edilen madde grupları

Alkaloit Teşhisi	Kardiotonik Glikozit Teşhisi	Saponozit Teşhisi	Flavonozit Teşhisi	Antosiyanozit Teşhisi	Siyanogenetik Heterozit Teşhisi	Tanen Teşhisi	Kumarin Teşhisi
-	-	+	+	-	-	+	-

4.2.2.9. Uçucu Yağ Teşhisi

H. canum'un toprak üstü kısımlarından Clavenger düzeneği ile yapılan hidrodistilasyonu sonucunda % 0.01 verim elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağın GK / GK-KS ile analizleri yapılmış, ayrılan bileşiklerin relatif yüzdeleri AID kromatogramlarından hesaplanmış ve uçucu bileşiklerin tanımlanması *n*-alkanlar serilerinin relatif tutunma indeksleriyle (RRI) karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Bilgisayar eşleştirmeleri ticari kütüphanelerin yanı sıra (Wiley GCMS Library, MassFinder 3 Library) standart bileşikler ve içeriği bilinen yağlar kullanılarak oluşturulan “Başer Library of Essential Oil Constituents” kütüphanesi ile diğer veriler kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. *H. canum*'un uçucu yağının kimyasal bileşimi

RRI	Bileşik	%
1032	α -Pinen	0.5
1076	Kamfen	0.3
1118	β -Pinen	tr
1174	Mirsen	0.4
1203	Limonen	0.2
1213	1,8-Sineol	0.4
1246	(Z)- β -Osime	0.2
1255	γ -Terpinen	0.1
1266	(E)- β -Osime	2.8
1400	Nonanal	0.3
1532	Kamfor	0.9
1591	Bornil asetat	0.8
1612	β -Karyofillen	2.2
1668	(Z)- β -Farnesen	2.0
1687	α -Humulen	0.5
1704	γ -Muurolen	0.1

1706	α -Terpineol	0.1
1719	Borneol	0.1
1726	Germakren D	2.9
1741	β -Bisabolen	1.1
1742	β -Selinen	0.2
1755	Bisiklogermakren	1.1
1765	Geranil asetat	tr
1773	δ -Cadinene	0.9
1776	γ -Cadinen	1.8
1815	2-Tridekanon	0.4
1849	Kalamenen	0.3
1868	(<i>E</i>)-Geranil aseton	0.6
1958	(<i>E</i>)- β -iyonon	0.6
2008	Karyofillen oksit	2.6
2050	(<i>E</i>)-Nerolidol	0.6
2080	1,10- <i>diepi</i> -Cubenol	1.6
2122	Hedycaryol	0.9
2200	α -Guaiol	0.6
2131	Hekzahidrofarnesil aseton	0.4
<u>2144</u>	<u>Spathulenol</u>	<u>4.0</u>
<u>2187</u>	<u>T-Kadinol</u>	<u>6.5</u>
2226	Metil heksadekanoat (=metil palmitate)	0.6
2250	α -Eudesmol	0.8
2257	β -Eudesmol	1.9
<u>2296</u>	<u>Miristisin</u>	<u>29.4</u>
<u>2298</u>	<u>Dekanoik asit</u>	<u>3.6</u>
2392	Karyofille-2(12),6-dien-5 β -ol	1.1

	(=Caryophyllenol II)	
2503	Dodekanoik asit	2.3
2509	Metil linoleat	0.7
2583	Metil linolenat	1.2
2622	Fitol	0.7
2600	Hekzakosan	1.1
2670	Tetradekanoik asit	1.6
2900	Nonakosan	2.8
<u>2931</u>	<u>Hekzadekanoik asit</u>	<u>5.2</u>
Total. 94.7		

tr: Trace: iz miktar (<0.1%)

4.2.3. Kompozisyon Analizleri

4.2.3.1. Toplam fenol, flavonoit ve flavonol miktar tayinleri

Ekstrelerin toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktar tayinleri deneysel kısımda verilen yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Toplam fenol miktarları gallik asite, toplam flavonoit miktarları kateşine, toplam flavonol miktarları ise rutine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.3’de verilmiştir. Bitkinin % 70’lik metanol ekstresinin, su ekstresine göre fenolik bileşikler ve flavonol bakımından zengin olduğu bulunmuştur. Toplam flavonoit miktarı karşılaştırıldığında ise su ekstresinin % 70’lik metanol ekstresine göre daha zengin olduğu görülmüştür.

Tablo 4.3. Ekstre verimleri, toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları

Ekstreler	Verim [%]	Toplam Fenolikler [mgGAE/g ekstre]	Toplam Flavonoitler [mgCA/g ekstre]	Toplam Flavonoller [mgRE/g ekstre]
%70 Metanol	17.74	366,325±11,966*	42,839±0,182*	24.507±0.171*
Su	4.83	280,554±4,377*	43,655±0,819*	17,423±0.142*

*ortalama ± SD

4.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Analizi

Ekstrelerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) sistemi ile yapılan analizlerinde PDA dedektör kullanılmış ve miktar tayinleri hidroksibenzoik asit türevleri için 280 nm’de, hidroksisinnamik asit türevleri için 320 nm’de ve flavonoidler için ise 360 nm’de yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4’de verilmiştir.

Ekstreler içerisinde gallik asit, 3,5-di-OH-benzoik asit, 3,4-di-OH benzoik asit, metil gallat, 4-OH-benzoik asit, luteolin, apigenin-7-*O*-glukozit, luteolin-7-*O*-glukozit ve izoramnetin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Gallik asit, metil gallat, 3,5-di-OH-benzoik asit, 3,4-di-OH benzoik asit ve 4-OH-benzoik asit 280 nm’de; luteolin, luteolin-7-*O*-glukozit, apigenin-7-*O*-glukozit ve izoramnetin 360 nm’de analiz edilmişlerdir. Ekstrelerin içerisindeki tanımlanan bu bileşiklerin miktarları standart maddelerden hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.5). Maddelerin tanımlanmasında hem tutunma zamanları hem de UV spektrumları kullanılmıştır.

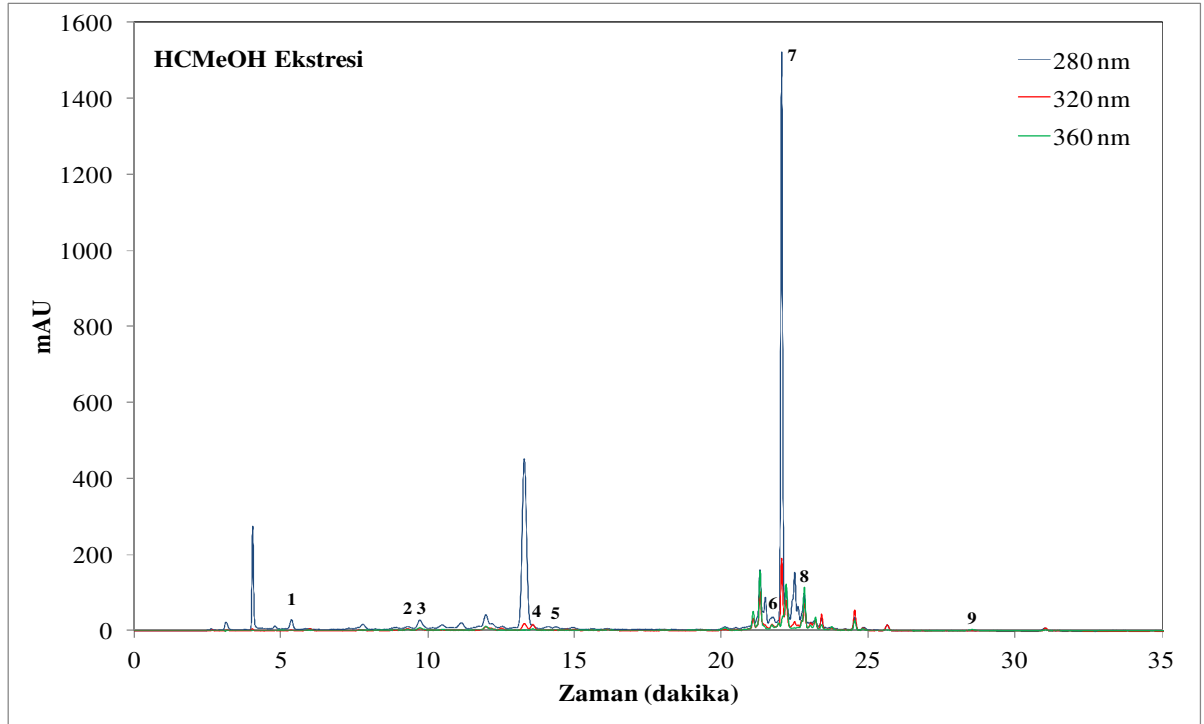
Tablo 4.4. *Helianthemum canum* ekstrelerinin YBSK sonuçları (mg/g)

No	Standart maddeler	MeOH ekstresi	Su ekstresi
1	Gallik asit	1.263 ± 0.007*	19.119 ± 0.045
2	3,5-di-OH-benzoik asit	6.669 ± 0.423	23.088 ± 0.171
3	3,4-di-OH benzoik asit	4.013 ± 0.218	2.521 ± 0.035
4	Metil gallat	0.179 ± 0.000	0.634 ± 0.011
5	4-OH-benzoik asit	0.858 ± 0.020	0.278 ± 0.034
6	Apigenin-7- <i>O</i> -glikozit	0.413 ± 0.017	0.358 ± 0.013
7	Luteolin-7- <i>O</i> -glikozit	0.931 ± 0.068	2.902 ± 0.005
8	Luteolin	4.868 ± 0.031	0.685 ± 0.006
9	İzoramnetin	0.444 ± 0.004	0.260 ± 0.000

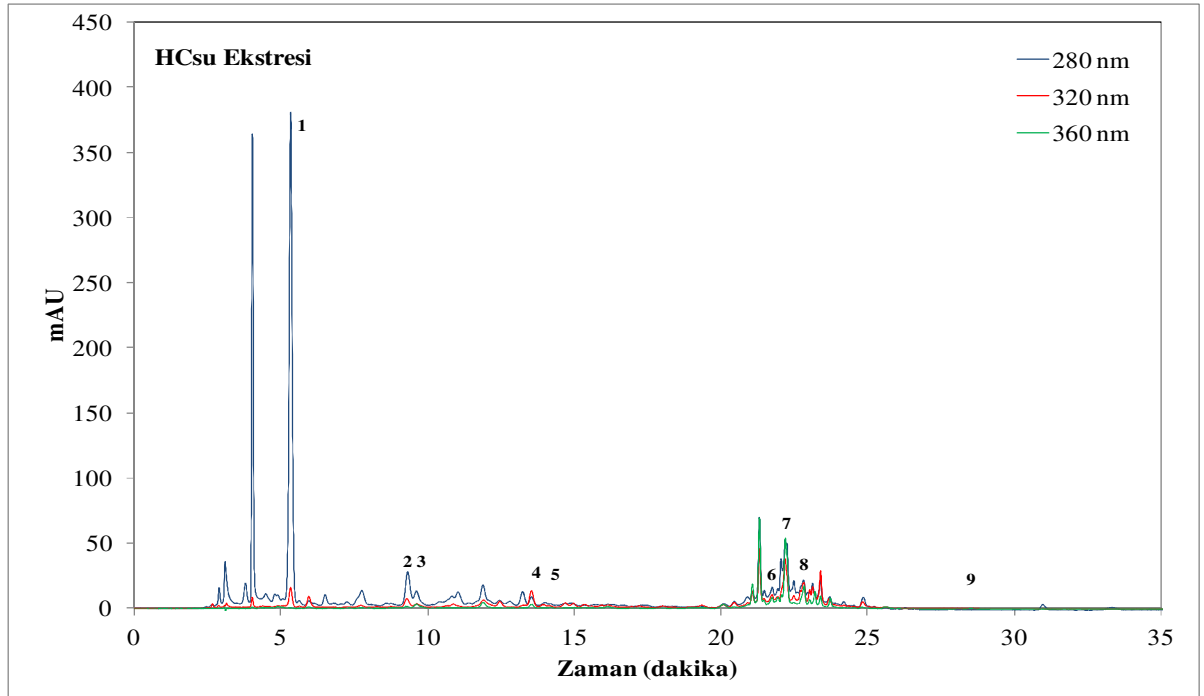
*ortalama± SD

Tablo 4.5. Standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

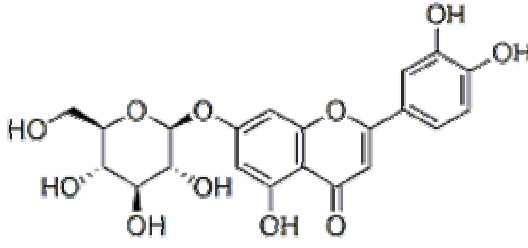
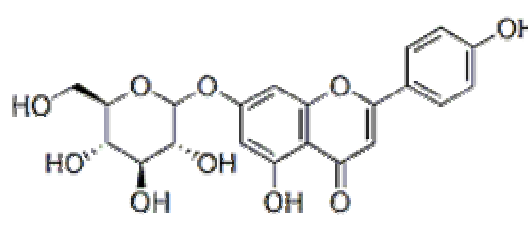
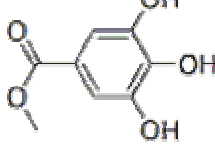
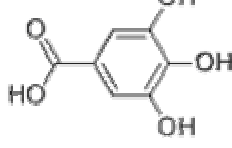
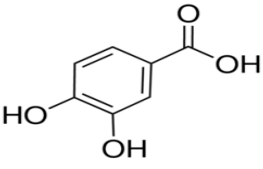
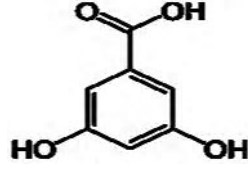
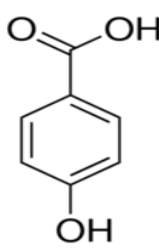
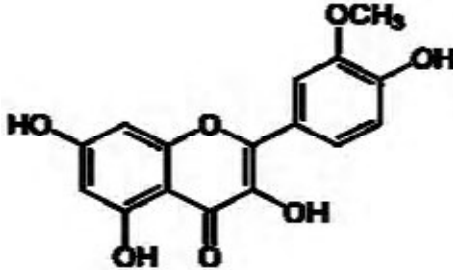
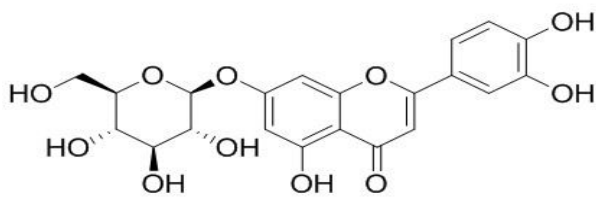
Standart Maddeler	Kalibrasyon Denklemi [$y=ax+b$]	Korelasyon Katsayısı [<i>r</i>]
Gallik asit	$y= 14083 x +24,15$	0,998
3,5-di-OH-benzoik asit	$y= 1214 x + 10,37$	0,991
3,4-di-OH benzoik asit	$y= 8220 x - 67,55$	0,994
Metil gallat	$y= 14336 x - 25,6$	0,999
4-OH-benzoik asit	$y= 7706 x + 4,567$	0,998
Apigenin-7- <i>O</i> -glikozit	$y= 91,47 x + 2,924$	0,998
Luteolin-7- <i>O</i> -glikozit	$y= 11837 x + 23,85$	0,999
Luteolin	$y= 95,45 x + 32,30$	0,999
İzoramnetin	$y= 15078 x - 39,22$	0,999



Şekil 4.47. *H. canum* metanol ekstresine ait YBSK kromatogramı



Şekil 4.48. *H. canum* su ekstresine ait YBSK kromatogramı

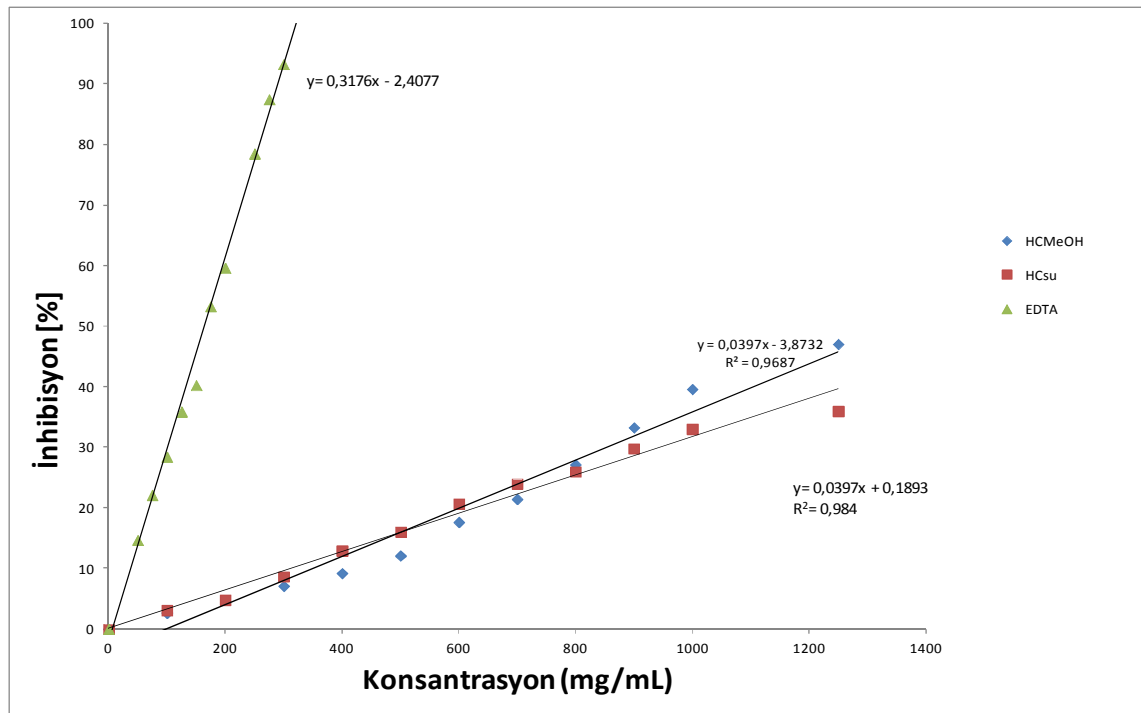
 Luteolin	 Apigenin-7-O-glikozit
 Metil gallat	 Gallik asit
 3,4-di-OH benzoik asit	 3,5-di-OH-benzoik asit
 4-OH-benzoik asit	 İzoramnetin
 Luteolin-7-O-glukozit	

Şekil 4.49. *H. canum*'un bileşiminde tespit edilen maddelerin kimyasal formülleri

4.3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

4.3.1. Demir(II) şelat (kelat) aktivite

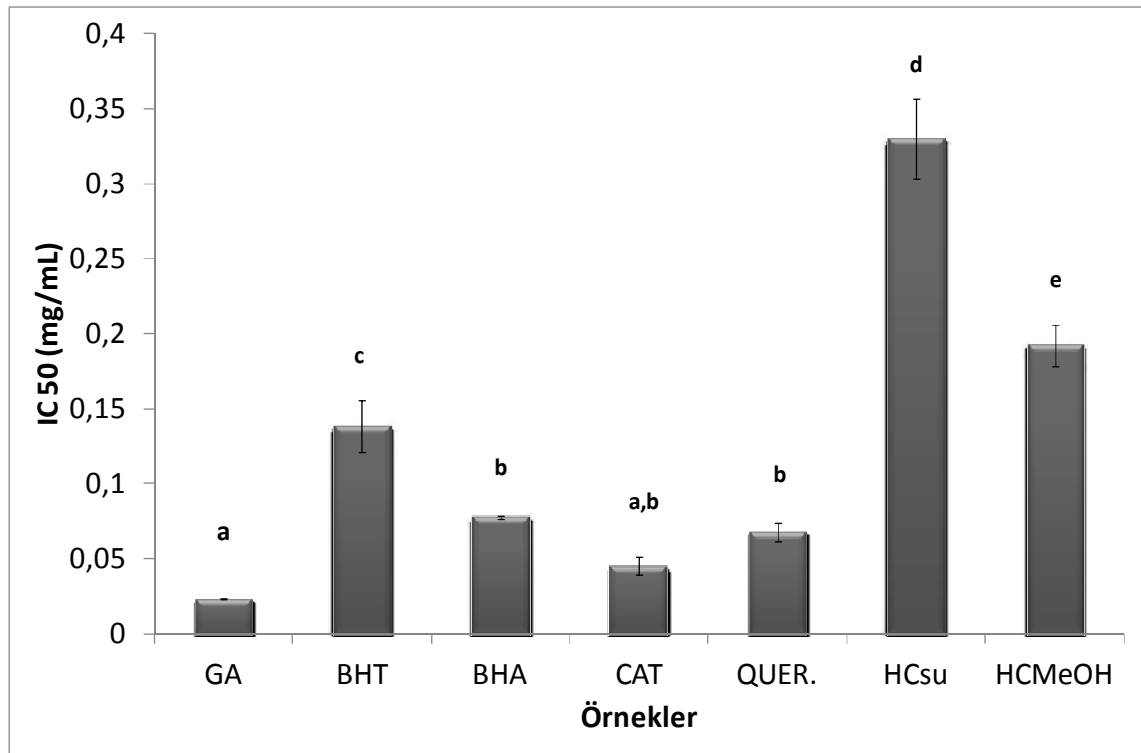
İki değerlikli geçiş metal iyonları oksidatif prosesin katalizlenmesinde, hidroksil radikallerinin formasyonunda, Fenton kimyası ve hidroperoksit dekompozisyonu gibi reaksiyonlarında önemli rol oynarlar (58). Bu prosesler demirin şelasyonu ve deaktivasyonu ile sonlandırılabilir. Bu nedenle, ekstrelerin demir(II) iyonlarının şelasyonuna etkileri incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.50’de verilmiştir. Su ve metanol ekstreleri demir(II) iyonunun şelasyonu üzerine etki göstermişlerdir. Bu ekstrelerin içerisinde bulunan flavonoidler bu etkiden sorumlu bileşiklerdir. Flavonoidler yapılarındaki yan aromatik halka üzerindeki hidroksil grupları aracılığıyla demiri bağlayarak bu etkiyi göstermektedir. Her iki ekstre de EDTA kadar aktif bulunamamıştır.



Şekil 4.50. *H. canum* ekstrelerinin ve standartların demir(II) şelat aktivitesi. **EDTA:** Etilen Diamin Tetra Asetik asit, **HCMeOH:** *H. canum* metanol ekstresi, **HCSu:** *H. canum* su ekstresi

4.3.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikalini süpürücü etki tayini

Vücuttan zararlı ve hastalık yapıcı radikallerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH[•] radikali kullanılmıştır. Her iki ekstre de DPPH[•] radikalini fizyolojik pH'da konsantrasyona bağlı olarak süpürmüşlerdir. IC₅₀ değerleri, radikalın % 50'sini süpürebilecek gerekli konsantrasyon olarak tanımlanır. Küçük değer yüksek aktiviteyi gösterir. Ekstrelerin IC₅₀ değerleri hazırlanan doğrusal olmayan eğriler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.51'de verilmiştir.

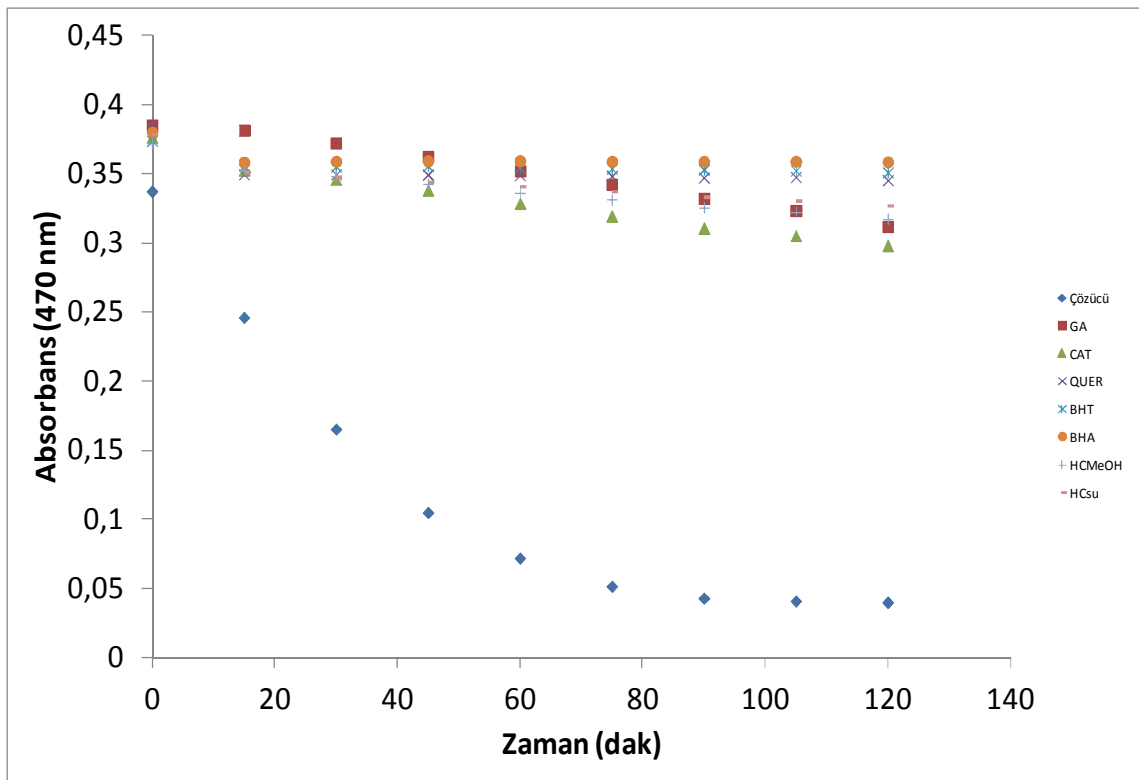


Şekil 4.51. *H. canum* ekstrelerinin ve standartların DPPH[•] radikali süpürücü etkileri. [Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-d) arası aynı harflerle belirtilmiş barlar $p>0,05$ ' den farklı değildir.] **GA:** gallik asit, **BHT:** bütil hidroksi toluen, **BHA:** bütil hidroksi anizol, **CAT:** kateşin, **QUER:** kersetin, **HCsu:** *H. canum* su ekstresi, **HCMeOH:** *H. canum* metanol ekstresi.

Şekil 4.51'e göre *H. canum*'un %70'lik metanol ekstresi su ekstresine göre daha aktif bulunmuştur ancak bitkiden elde edilen hiçbir ekstrenin kullanılan pozitif kontroller kadar etkili süpürücü etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Ekstrelerin bileşiminde bulunan gallik asitin IC₅₀ değeri ise $0,167 \pm 0,002$ mg/mL olarak bulunmuştur.

4.3.3. β -Karoten / linoleik asit birlikte oksidasyonu inhibe edici etki tayini

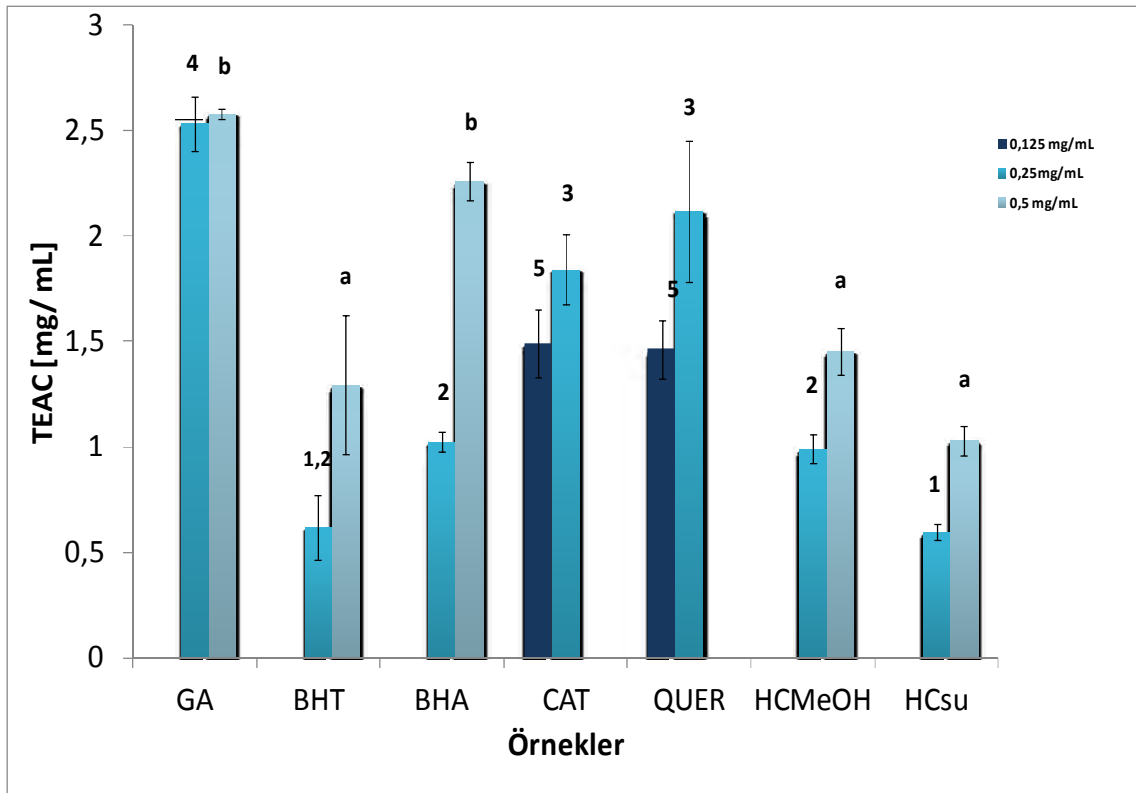
Gıda lipitleri ve hücre membranları oksidatif ajanlarla kolaylıkla okside olabilen doymamış yağ asitlerini (linoleik ve araşidonik asitler) içerirler. Bu nedenle doymamış yağ asitleri üzerinden yapılan oksidasyon deneyleri önem taşımaktadır. Beta-karoten/linoleik asit soldurma deneyi özellikle hücre duvarındaki ve gıdalardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun tanımlanmasında sıklıkla kullanılır. *H. canum* ekstrelerinin β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu engelleme dereceleri Şekil 4.52’de verilmiştir. Görüldüğü gibi elde edilen ekstreler belli oranlarda inhibitör aktivite göstermiştir. % 70’lik metanol ve su ekstreleri, hemen hemen benzer aktivite göstermiş olup, kateşin ve gallik asitten daha aktif bulunuk; BHT ve BHA kadar etkili bulunamamışlardır. Ekstrelerin aktivitesi zamana bağlı olarak değişim göstermemiştir.



Şekil 4.52. *H. canum* ekstrelerinin ve standartların β -karoten-linoleik asit peroksidasyonuna etkileri. **GA:** gallik asit, **CAT:** kateşin, **QUER:** kersetin, **BHT:** bütıl hidroksi toluen, **BHA:** bütıl hidroksi anizol, **HCMeOH:** *H.canum* metanol ekstresi, **HCSu:** *H.canum* su ekstresi.

4.3.4. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS⁺•) radikalini süpürücü etki tayini

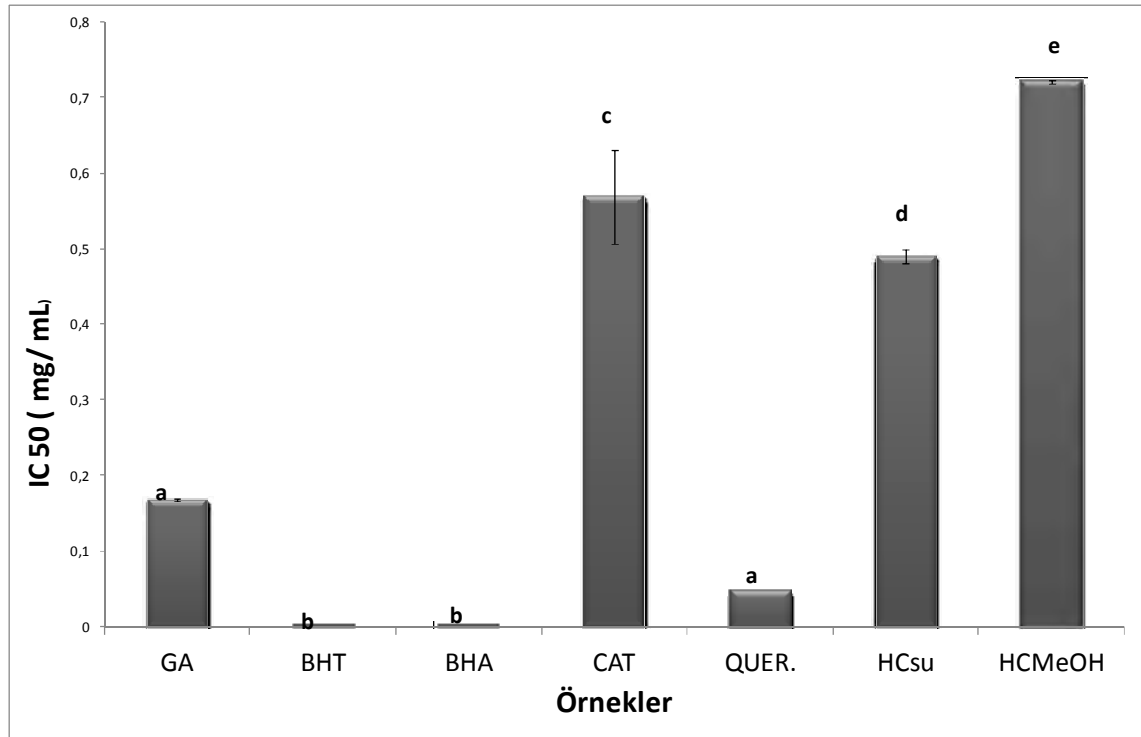
Bu yöntem mavi/yeşil renkli bir bileşik olan ABTS⁺• radikali katyonu tarafından antioksidatif maddelerin miktarının spektroskopik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile; flavonoidler, hidrosisinnamik asitler, karetenoidler gibi hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar ölçülebilmektedir. Tüm ekstraktların ABTS⁺• radikalini süpürücü etkileri değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.53'de verilmiştir. En yüksek aktivite % 70 metanol ekstresinde gözlenirken, su ekstresinde aktivite daha düşük tespit edilmiştir. Ekstrelerin pozitif kontroller kadar yüksek aktivite gösteremediği belirlenmiştir.



Şekil 4.53. *H. canum* ekstraktlarının ve standartların ABTS⁺• radikalini süpürücü etkileri. [(a-b) ve (1-4) arası aynı harflerle ve rakamlarla belirtilmiş barlar $p>0,05$ ' den farklı değildir]. **GA:** gallik asit, **BHT:** bütil hidroksi toluen, **BHA:** bütil hidroksi anizol **CAT:** kateşin **QUER:** kersetin **HCMeOH:** *H.canum* metanol ekstresi **HCSu:** *H.canum* su ekstresi.

4.3.5. Askorbat-Fe (III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun inhibisyonu

Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin fosfolipitler, biyolojik olarak önemli moleküllerdir ve hidroksil radikali kaynaklı bozulmaya açıktırlar. Ayrıca lipitlerin oksidatif bozulması yağlarca zengin ürünlerin acılaşmasının da temelini oluşturur. Bu nedenle bu oksidatif hasarı engelleyici yeni doğal maddelerin bulunması önem kazanmıştır. Bovine-brain kaynaklı fosfolipit lipozomlarının askorbat-Fe(III)-katalizli hidroksil radikalli bozunmasında, hidroksil radikalini süpürücü etki esasına göre fizyolojik pH da TBA-reaktif bileşiklerin formasyonunun inhibisyonu ölçülür. Bu metotla yapılan deney sonucunda Şekil 4.54’de de görüldüğü gibi su ekstresi standart olarak kullanılan kateşin ve % 70 metanol ekstresinden daha aktif bulunmuştur.



Şekil 4.54. *H. canum* ekstrelerinin ve standartların fosfolipit peroksidasyonunu inhibisyonu. [Ortalama olarak verilen değerler $\pm$ %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-f) arası aynı harflerle belirtilmiş barlar $p>0,05$ ’ den farklı değildir]. **GA:** gallik asit, **BHT:** bütıl hidroksi toluen, **BHA:** bütıl hidroksi anizol, **CAT:** kateşin, **QUER:** kersetin, **HCMeOH:** *H.canum* metanol ekstresi, **HCSu:** *H.canum* su ekstresi.

4.4. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

H. canum bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarıyla Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de belirtilen 10 farklı standart suş kullanılarak, CLSI standartları doğrultusunda, antimikrobiyal aktiviteyi analiz etmek amaçlı mikro dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle çalışılmıştır. Metanol ekstresi; idrar yolları enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* ve üst solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan *H. influenzae*’ya karşı orta derecede inhibitör etki gösterirken su ekstresi sadece *H. influenzae*’ye karşı orta derecede etki göstermiştir. Geniş spektrumlu olarak her iki ekstre de gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olan *Bacillus cereus* ATCC 11778 ve göz enfeksiyonlarına neden olan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakterilerine karşı iyi derecede antibakteriyel aktivite göstermiştir. Standartlardan kateşin ise; *Haemophilus influenzae* ATCC 4447’ ve tifo etkeni olan *Salmonella typhi* NCTC 8394 bakterileri üzerine inhibitör etki göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşlarına karşı ise, her iki ekstre ve standartlar etkili bulunamamıştır.

Tablo 4.6. *H. canum* metanol, su ekstraktları ve standartların minimum inhibisyon konsantrasyonu metoduna göre antimikrobiyal aktivite sonuçları

Kullanılan Patojen Mikrorganizmalar	Ekstreler ve Standartlar				
	HCMcOH	HCSU	GA	KER	KAT
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1250	2500	>2500	1250	>2500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<u>>2500</u>	<u>>2500</u>	<u>>2500</u>	<u>>2500</u>	<u>>2500</u>
<i>E. faecium</i> NJ-1	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	625	1250	2500	1250	>2500
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	625	625	2500	1250	>2500
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<u>>2500</u>	<u>>2500</u>	<u>>2500</u>	<u>>2500</u>	<u>>2500</u>
<i>H. influenzae</i> ATCC 4447	1250	1250	>2500	>2500	625
<i>S. typhi</i> NCTC 8394	>2500	>2500	>2500	>2500	1250

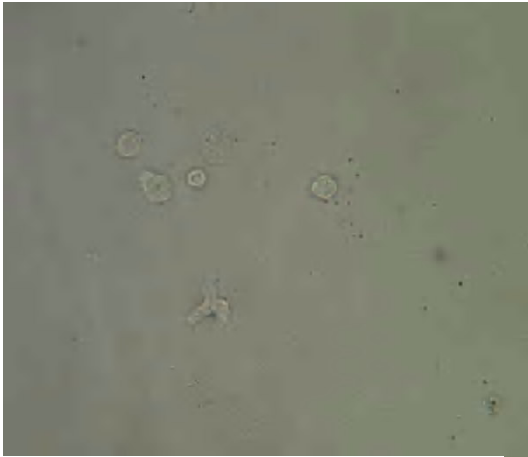
Tablo 4.7. *H. canum* metanol, su ekstreleri ve standartların disk difüzyon metoduna göre antimikrobiyal aktivite sonuçları

Ekstre ve Standartlar	Konsantrasyon $\mu\text{g/ml}$	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Enterococcus faecium</i> NJ-1	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>B.cereus</i> ATCC 11778	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>H. influenza</i> ATCC 4447	<i>S.typhi</i> NCTC8394
HCMeOH	2500	18±0.88	10.0	-	-	-	23±0.88	25±0.88	-	23±0.88	-
	1250	15±0.33	*-	-	-	-	18±0.66	21±0.88	-	19±0.57	-
	625	9±0.33	-	-	-	-	15±0.88	16±0.88	-	14±0.88	-
	312.5	-	-	-	-	-	12±0.66	13±0.57	-	10±0.57	-
HCSU	2500	17±0.88	11±0.57	-	-	-	19±0.88	24±1.15	-	21±1.2	-
	1250	12±1.2	-	-	-	-	15±0.57	20±1.0	-	16±0.88	-
	625	-	-	-	-	-	-	13±1.2	-	11±0.88	-
	312.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	2500	10±0.33	-	-	-	-	17±0.88	17±0.66	-	-	-
	1250	-	-	-	-	-	13±0.57	12±0.88	-	-	-
	625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	312.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KER	2500	22±1.15	14±0.33	-	11 ±0.57	10±0.33	19±1.2	22±0.88	-	-	11±0.33
	1250	16±0.33	9±0.33	-	-	-	16±0.33	19±0.57	-	-	-
	625	11±0.66	-	-	-	-	12±0.66	14±0.88	-	-	-
	312.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KAT	2500	11 ±0.57	9±0.33	-	10±0.33	9±0.33	11±0.33	12±0.33	-	23±1.2	19±0.88
	1250	-	-	-	-	-	-	-	-	17±0.88	15±0.88
	625	-	-	-	-	-	-	-	-	14±0.33	9±0.33
	312.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

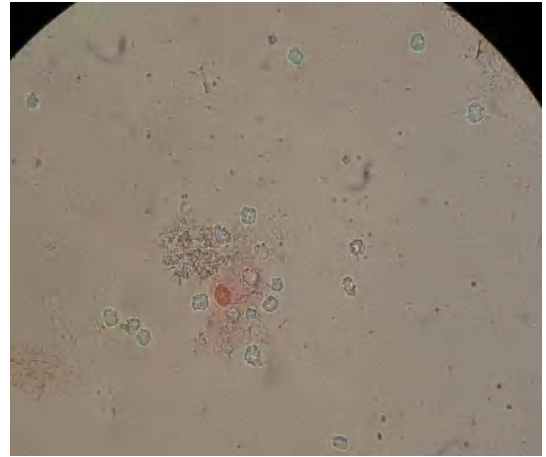
*: inhibisyon yok

4.5. ANTİAMİBİK AKTİVİTE ÇALIŞMASI

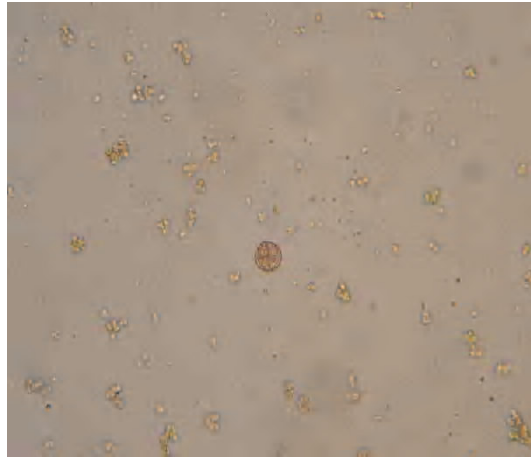
Elde edilen sonuçlara göre *H. canum*'un % 70'lik metanol ekstresinin 20 mg/mL konsantrasyonda 72 saat sonra paraziti öldürebildiği saptanmıştır (Şekil 4.56; Şekil 4.57). Kontrol grubunda ise 72 saat sonrasında da canlı parazite rastlanılmıştır. Eosini almayan tek tük trofozoitlerin ise hareket etmediği gözlemlenmiştir. Ortamdaki parazit sayılarak 100 üzerinden canlı kalan trofozit sayısı orantılanarak Tablo 4.8'de verilmiştir. Bu çalışma *H. canum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen % 70'lik metanol ekstresinin antiamibik etkili olduğu konusunda bir ön çalışma niteliğindedir. Bundan sonraki aşamada dilüsyonlar artırılarak deneylerin üçer kez tekrar edilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca kist formu ve trofozit formu karşılaştırmalı olarak da deney tekrarlanacaktır.



Şekil 4.55. *Acanthamoeba castellanii* trofozoitleri



Şekil 4.56. *Acanthamoeba castellanii* canlı trofozoitler ve kistleri (Eosini alan ölü trofozoit)



Şekil 4.57. *Acanthamoeba castellanii* ölü trofozoit

Tablo 4.8. *H.canum* %70'lik metanol ve su ekstrelerinin antiamibik aktivite sonuçları

Döşe (mg/ml)	1 saat		3 saat		6 saat		24 saat		48 saat		72 saat	
	HCMeOH	HCsu	HCMeOH	HCsu	HCMeOH	HCsu	HCMeOH	HCsu	HCMeOH	HCsu	HCMeOH	HCsu
20	96*	97	96	97	92	96	86	96	60	70	0	40
16	99	99	99	99	92	97	78	97	55	66	1	45
8	99	99	99	99	99	99	88	99	86	85	15	46
4	99	99	99	99	99	99	96	99	95	90	50	50
2	99	99	99	99	99	99	97	99	95	94	52	52
1	99	99	99	99	99	99	97	99	95	95	60	60
0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99

*100 üzerinden lamda sayılan canlı parazit sayısı

5. TARTIŞMA-SONUÇ

Bu tez kapsamında araştırma konumuz olan *H.canum* türünün morfolojik ve anatomik incelenmesi ile *in vitro* antioksidan, antimikrobiyal, antiamibik etkileri ve bu etkilerden sorumlu bileşikleri kantitatif ve kalitatif olarak incelenmiş, ayrıca bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın analizi yapılmıştır. Ülkemizde doğal olarak yetişen *H.canum*'un toprak üstü kısımları üzerinde bu şekilde kapsamlı bir çalışma ilk kez yapılmıştır.

5.1. MORFOLOJİK VE ANATOMİK ÇALIŞMALAR

H. canum türünün yaprak yüzeyel kesitleri ile petiyol ve gövde enine kesitleri alınarak karakteristik özellikleri tespit edilmiştir. Herbaryum örnekleri ve % 70' lik alkol numuneleri kullanılarak hazırlanan preparatlardan bitkinin elemanları ayrıntılı olarak incelenmiş ve bulgular mikrofotograflarla desteklenmiştir.

Araştırma konumuz olan *H. canum* türünün morfolojik deskripsiyonu Davis'in "*Flora of Turkey and the East Aegean Islands*" eserindeki *Helianthemum* cins ve tür özellikleri ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Türkiye Florası'nda *H. canum* türünün iç sepallerinin 3-5 mm olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da aynı boyutlar tespit edilmiş olup, çiçek boyutları ise 0.9-1.2 mm olarak ölçülmüştür. Aynı zamanda Flora'da petaller sarı renkli ve 4-7 mm olarak belirtilmiş olup, bizim bulgularımızla uyumlu olduğu gözlenmiştir (1). Ayrıca bitkinin pedisel ve kaliksinin yoğun tüylü olduğu, çok sayıda stamen içerdiği ve ovaryumunun papilli, tüylü olduğu bizim tarafımızdan tespit edilirken bu bulgulara Flora'da yer verilmemiştir. Yeşilyurt ve arkadaşlarının yaptığı bir

çalışmada *H. germanicopolitanum* Bornm. ve *H. antitauricum* Davis et Coode türlerinin anatomik ve morfolojik özellikleri incelenmiştir. Her iki türünde çiçeklerinin morfolojik özelliklerinin *H. canum* türü ile yakınlık gösterdiği gözlenmiştir (59).

Çalışmamızda *H. canum* türünün yaprakları eliptik-lanseolat olarak bulunmuş ve üstteki yaprakların alttaki yapraklara göre daha büyük boyutlarda olduğu gözlenmiştir. Yeşilyurt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da yaprak özellikleri bakımından bizim türümüz, *H. germanicopolitanum* türü ile benzer özellikleri taşırken, *H. antitauricum* türünün yapraklarıyla farklılık göstermektedir. Petiyol boyutları ise *H. canum*'da 3-5 mm iken *H. germanicopolitanum* ve *H. antitauricum* türlerinde 1-3.5 mm olarak bulunmuştur (59).

H. canum türünün yaprak, petiyol ve gövde anatomisi ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Yaprakları monofasiyal olarak tespit edilmiştir. Familyanın karakteristik özelliklerinden olan örtü tüyleri; tek hücreli, dar, ince, ligninleşmiş çeperli, tepesi küt ya da sivri ve tek çukurlaşmış tabandan dallanmıştır. Yaprak alt epidermada bu tüyler daha seyrek olarak görülmektedir (Şekil 4.15; Şekil 4.16).

H. canum türünün dahil olduğu Cistaceae familyasıyla ilgili Metcalfe'in "Anatomy of the Dicotyledones" adlı eserinde verilen tüy özellikleri, *H. canum* türü ile örtüşmektedir (10).

H. canum türünün yaprak üst epidermasında daha yoğun olmak üzere, her iki yüzeyde de stoma görülmüştür (anomositik). Alt ve üst epiderma hücreleri şekil olarak birbirleriyle benzerdir (Şekil 4.27; Şekil 4.32). Stoma tipi *H. germanicopolitanum* ve *H. antitauricum* türlerindeki stoma tipleri ile aynıdır (57). *H. canum*'da palizat parankiması üst epidermada 3-5 sıralı, alt epidermada ise 2-3 sıralı iken; Yeşilyurt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *H. germanicopolitanum* ve *H. antitauricum* türlerinde palizat parankimasının üst epidermada 2-3 sıralı, alt epidermada 1 sıralı olduğu belirtilmiştir (59).

Metcalfe'in eserinde bazı *Helianthemum* türlerinin epidermis tabakasının müsilağlı olduğundan bahsedilirken; *H. canum*'un epidermisinde müsilağa rastlanmamıştır (10).

H. canum'un hem yaprak mezofil tabakasında hem de gövde parankimatik hücrelerinde kristaller gözlenirken, Yeşilyurt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *H. germanicopolitanum* ve *H. antitauricum* türlerinde kristal varlığından bahsedilmemiştir

(59). Ancak Metcalfe'in eserinde *Helianthemum* türlerinde kümeler halinde kristallerin varlığından bahsedilmiş (10) ve bulgularımız desteklenmiştir (Şekil 4.45).

Gövde morfolojik olarak incelendiğinde yoğun tüylü olduğu görülmüştür. Yapılan anatomik çalışmada gövdeden el ile kesitler alınmış ve mikroskop altında detaylı olarak incelenmiştir. Gövdedeki tüylerin çoğunlukla, uzun ya da kısa, tek hücreli, uçları küt ya da sivri olan örtü tüyleri olduğu tespit edilmiştir. *H. canum*'da gözlenen 1-2 sıralı kollenkima hücreleri veya 2-3 sıralı klorkenima hücreleri, Yeşilyurt ve ark.'nın yaptığı çalışmadaki *Helianthemum* türleri ile karşılaştırıldığında *H. canum* türünden az çok farklılık gösterdiği gözlenmiştir (59). Klorkenimanın hemen altında 2-3 sıralı irili ufaklı parankima hücreleri vardır. Metcalfe'in eserinde *Helianthemum* türlerinde parankima hücrelerinin nadir olarak bulunduğundan bahsedilmiş, klorkenima ve kollenkima tabakası hakkında bir bulguya rastlanmamıştır. Parankimatik hücrelerde ve öz bölgesinde bol miktarda druz kristallerine, ara ara da billur kristallerine rastlanmıştır. Gövde iletim demetleri etrafında gözlemlediğimiz 1-2 sıralı sklerenkima tabakası, Metcalfe'in eseri ile Yeşilyurt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada belirtilen *Helianthemum* türlerinde de tespit edilmiştir. Metcalfe'in eserinde de belirtildiği gibi öz bölgesinin geniş bir alan kaplaması ve ksilem ışınlarının dar bir şekilde konumlanması bizim türümüzde de tespit edilen özelliklerdir (10, 59) (Şekil 4.42; Şekil 4.45).

5.2. UÇUCU YAĞ KOMPOZİSYON ANALİZİ

Bitkinin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile % 0,01 verim elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağın kalitatif ve kantitatif analizi Tablo 4.2' de verilmiş olup Toplam yağın % 94,7'si tayin edilerek 52 bileşik aydınlatılmıştır. *H. canum* türüne ait uçucu yağ analizi ilk defa bu çalışmada yapılmıştır. Ana bileşenler miristisin (% 29,4), T-kadinol (% 6,5), hekzadekanoik asit (% 5,2), spathulenol (% 4,0), dekanik asit (% 3,6) olarak tespit edilmiştir. *H. kahiricum* türüne ait uçucu yağ kompozisyon analizinde de yağ verimi % 0,01 bulunmuş ve ana bileşenler hekzadekanoik asit (% 36,2), tetradekanik asit (% 7,3), linoleik asit (% 6,5) ve dodekanoik asit (% 4,7) olarak bulunmuştur. *H. canum* ve *H. kahiricum* uçucu yağ bileşenlerinin benzer olduğu tespit edilmiştir (45).

5.3. SPEKTROSKOPİK VE KROMATOĞRAFİK BİLEŞİM ANALİZLERİ İLE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ANALİZLERİ

H. canum'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin verimleri % 70'lik metanol ekstresi için % 77,74, su ekstresi için % 4,83'dür. Bitkinin toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam flavonol miktarları spektrofotometrik yöntemle hesaplanmış ve en yüksek toplam fenol miktarı metanol ekstresinde $366,325 \pm 11,966$ mg_{GAE}/g_{ekstre} olarak bulunmuştur. Toplam flavonoit miktarı % 70' lik metanol ve su ekstresinde yaklaşık olarak aynı iken, flavonol miktarı metanol ekstresinde daha fazladır (Tablo 4.3).

Etken madde gruplarının teşhisinde, ekstrelerde kateşik tanen, flavonoit ve steroidal saponin varlığı tespit edilmiştir. *H. kahiricum*'un ise toprak üstü kısmının metanol ekstresi ile yapılan ön araştırmalarda fitokimyasal tarama sonuçlarına göre tanen, flavonoit, glikozit, basit fenolik bileşikler, saponin, steroit ve terpenoitler teşhis edilmiştir (60).

H. lippii'nin toprak üstü kısmının metanol ekstresi ile yapılan ön araştırmalarda fitokimyasal tarama sonuçlarına göre flavonoit, tanen, saponin ve basit fenolik bileşikler bulunurken serbest antrakinon, steroit, terpenoit ve alkaloitler tespit edilememiştir (29).

H. canum türünden elde edilen % 70 metanol ve su ekstresi üzerinde yapılan YBSK analizleri sonucunda, her iki ekstrede de tanımlanan fenolik bileşikler içerisinde, 3,5-di-OH-benzoik asit ana madde olarak tespit edilmiştir. Toplam 3,5-di-OH-benzoik asit miktarı elde edilen % 70 metanol ve su ekstresi toplamında sırasıyla 6,669 ve 23,088 mg/g olarak bulunmuştur (Tablo 4.4). Ayrıca ekstrelerde gallik asit de % 70 metanol ve su ekstresi toplamında sırasıyla 1,263 ve 19,119 mg/g'dır. Ekstrelerde diğer tespit edilen bileşikler; 3,4-di-OH benzoik asit , metil gallat, 4-OH-benzoik asit, apigenin-7-O- glikozit, luteolin-7-O- glikozit, luteolin ve izoramnetindir.

Helianthemum cinsine ait 11 tür ile yapılan bir çalışmada [*H. oelandicum* subsp. *incanum* (L.) Dum. Cours, *H. alypoides* Losa an Rivas Goday, *H. apenninum* (L.) Mill subsp. *cavanillesianum* (Lainz) G. Lopez, *H. asperum* Lag. Ex Dunal, *H. cinereum* (Cav.) Pers. subsp. *rotundifolium* (Dunal) Greuter and Burdet, *H. hirtum* (L.) Mill, *H. marifolium* (L.) Mill subsp. *marifolium*, *H. polygonoides* Peinado, Mart. Parras, Alcaraz and Espuelas, *H. squamatum* (L.) Dum. Cours, *H. syriacum* (Jacq.) Dum. Cours., *H. violaceum* (Cav.) Pers.] türlerde kersetin, kamferol, izoramnetin ve luteolin tespit

edilmiştir. Aynı çalışmada *H. cinereum*, *H. alypoides* ve *H. hirtum* türlerinin yüksek miktarda ellajitanen içerdiği, *H. marifolium*'un ise yüksek miktarlarda gallik asitle karakterize edildiği belirtilmiştir (6). Farklı bir çalışmada ise *H. glomeratum* Lag. türünden kamferol, tilirozit ve epikateşin'in izole edildiği bildirilmiştir (61). *H. glomeratum*'un köklerinden, bitkinin antiamibik ve anti-giardiak etkilerini test etmek amaçlı flavan-3-ol, epigallokateşin ve epigallokateşin gallat'ın izole edildiği bir çalışma mevcuttur (12). Yine *H. glomeratum* ile yapılan bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından tilirozit ve kamferol'e ek olarak astragalin, kersetin ve izokersetin izole edilmiştir (15). Literatürlerde *H. canum* ile yapılmış kimyasal bileşim analizi yoktur ancak çalışılan *Helianthemum* türlerinde ana bileşenler olarak flavonoidlerin ve tanen türevlerinin bulunması bizim sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca ana etken madde gruplarının teşhisinde ekstrelerde kateşik tanen ve flavonoid varlığının teşhis edilmesi sonuçlarımızı doğrulamaktadır.

Gıdalar sık sık proses işlemleri sırasında geçiş özellikli metal kontaminasyonuna maruz kalırlar. İki değerlikli geçiş metal iyonları; oksidatif prosesin katalizlenmesi, hidroksil radikallerinin formasyonu, Fenton kimyası ve hidroperoksit dekompozisyon reaksiyonları gibi olaylarda önemli rol oynarlar. Bu prosesler demirin şelasyonu ve deaktivasyonu ile sonlandırılabilir (62). Bu nedenle, ekstrelerin demir(II) iyonlarının şelasyonuna etkileri incelenmiş ve Na₂EDTA'ya eşdeğer olarak hesaplanmıştır ($\text{mg}_{\text{Na}_2\text{EDTA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$). Sonuçlar şekil 4.50'de verilmiştir. Su ve metanol ekstreleri demir(II) iyonunun şelasyonu üzerine etki göstermişler ancak EDTA kadar aktif bulunamamışlardır. Bu ekstreler içerisinde bulunan flavonoidler bu etkiden sorumlu bileşiklerdir. Flavonoidler yapılarındaki yan aromatik halka üzerindeki hidroksil grupları aracılığıyla demiri bağlayarak bu etkiyi göstermektedir. Ayrıca 3-hidroksi-4-keto veya 5-hidroksi-4-keto grup içeren flavonoidlerin kuvvetli metal şelasyonu aktivitelerinin olduğu ve metallerle stabil kompleksler oluşturdukları literatürlerde kayıtlıdır (63).

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikali, 517 nm'de maksimum absorbanı veren stabil bir radikaldır. Antioksidan özellikli maddeler tarafından elektron ve hidrojen atomu transferi ile DPPH[•] radikali hidrazin türevlerine indirgenir ve absorbanı düşer (64). Ekstrelerin azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH[•] radikalini süpürme kapasiteleri fizyolojik pH da incelenmiş ve sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak (mg/mL) verilmiştir. IC₅₀ değeri azaldıkça aktivite artmaktadır. *H.canum* bitkisinden elde edilen

% 70'lik metanol ve su ekstralarının DPPH[•] radikalini süpürücü etkilerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,19 ve 0,33 mg/mL'dir (Şekil 4.51). Ekstrelerin flavonoit ve tanen türevi bileşikler içermesi antioksidan aktiviteye sahip olduğunun kanıtıdır. Ekstreler kullanılan standartlar kadar aktif bulunamamıştır. Ekstrelerin DPPH[•] radikalini süpürücü etkisi ile toplam fenolik madde içeriği arasında ise yüksek korelasyon bulunmuştur ($y=0,0016x-0,258$; $R^2=1$). *H. kahiricum*'un toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin DPPH[•] radikalini süpürücü etkisinin tayininde IC₅₀ değeri 22,34 µg/mL olarak bulunurken aynı çalışmada standart olarak kullanılan askorbik asitin IC₅₀ değeri ise 13.59 µg/mL olarak bulunmuştur (60). Farklı bir çalışmada *H. lippii*'nin toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinde IC₅₀ değeri 31,17 µg/mL olarak bulunmuştur (29). Cezayir'de yetişen sekiz farklı familyaya dahil tıbbi bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada *H. lippii* türünden elde edilen meyve, yaprak ve gövdeye ait ekstraların de aktivitesi incelenmiştir. Sonuçlara göre *H. lippii*'nin meyve, yaprak ve gövde ekstralarına ait DPPH[•] radikalini süpürücü etkisi tayininde IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,25; 0,47; 0,35 mg/mL'dir (65). Yapılan farklı bir çalışmada *H. kahiricum*'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinden elde edilen diklorometan ve etilasetat fraksiyonlarının DPPH[•] radikalini süpürücü etkisi incelenmiş; standart olarak, BHA, troloks ve vitamin C kullanılmıştır. Diklorometan ekstresinin DPPH[•] radikalini süpürücü etkisinin, kullanılan standartlara göre 5 kat, etilasetat ekstresinin ise 10 kat daha güçlü olduğu belirtilmiştir (66).

Farklı türlerle yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında *Helianthemum* türlerinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları görülmekte; bu da bizim sonuçlarımızı doğrulamaktadır.

Hücre membranlarında bulunan lipidler, linoleik asit ve araşidonik asit gibi oksidasyona oldukça müsait doymamış yağ asitleri bakımından zengindirler (67, 68). Bu nedenle, bu tez kapsamında incelenen ekstraların antioksidan etkileri taranırken lipidlerin oksidasyonuna ait deney ortamlarının kullanılması önemlidir. Bu amaçla en çok kullanılan deney modellerinden birisi β -karoten-linoleik asit soldurma testidir. Linoleik asitin diallilik metilen gruplarından hidrojen eksilmesiyle peroksil serbest radikalleri oluşur ve doymamış β -karoteni oksitler. Ekstrelerin bileşiminde bulunan antioksidan yapılar β -karotenin hidroperoksit tarafından oksidasyonunu minimize ederler.

β -karotenin degridasyon (bozunma) hızı ekstrelerin antioksidan kapasitesine bağlıdır (69). *H. canum* ekstrelerinde oksidasyonu engelleyici etki zamana bağlı olarak incelenmiş ve zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. % 70'lik metanol ve su ekstreleri, hemen hemen benzer aktivite göstermiş olup, kateşin ve gallik asitten daha aktif bulunmuş; BHT ve BHA kadar etkili bulunamamışlardır (Şekil 4.52). Yapılan bir tez çalışmasında *H. lippii* ekstrelerinin β -Karoten / Linoleik Asit Birlikte Oksidasyonu İnhibe Edici Etkisi deneyinde IC_{50} değeri 0.766 ± 0.131 mg/ mL iken, standart olarak kullanılan BHA'nın IC_{50} değeri 0,028 mg/ mL'dir (65). Bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Serbest radikal süpürücü etki testlerinde genellikle DPPH[•] radikali kullanılmaktadır. Fakat bazen çözünürlük ve benzer spektral girişimler nedeniyle aynı radikal kullanılamamaktadır. Alternatif bir radikal olan ABTS^{•+} azot merkezli oldukça stabil bir radikaldir. Bu nedenle ekstrelerin radikal süpürücü etkilerini onaylamak için ABTS^{•+} radikal süpürücü etki testi de yapılmış ve sonuçlar Trolox'a eşdeğer olarak Şekil 4.53' de verilmiştir. Ekstreler iki farklı dozda analiz edilmiştir. Şekil 4.53'e göre metanol ekstresi su ekstresine göre daha aktif bulunmuştur. Tüm ekstre ve standartlarda etki, konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde artış göstermiştir. Metanol ekstresi 0,25 mg/mL konsantrasyonda BHT ve BHA'nın 0,25 mg/mL konsantrasyonu ile aynı aktiviteyi göstermiştir. Ekstrelerin DPPH[•] radikali süpürücü etkileri ile ABTS^{•+} radikali süpürücü etkileri arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ($y = 2,865x + 0,04$; $R^2 = 1$). Ayrıca toplam fenol içeriği ile de yüksek korelasyon bulunmuştur (0,0046-0,695; $R^2 = 1$).

Helianthemum taksasına ait *H. oelandicum* subsp. *incanum*'un da dahil olduğu 11 tür ile yapılan çalışmada ABTS^{•+} radikali süpürücü aktivitede su ekstreleri % 80 metanol ekstrelerinden daha aktif bulunmuştur (6). Farklı bir çalışmada ise *H. ledifolium*'un metanol ve su ekstrelerinin ABTS^{•+} radikali süpürücü etkileri kıyaslandığında metanol ekstresinin süpürücü etkisi $69,8 \pm 6,0$ μ mol TE/g iken su ekstresinde bu değer $40,1 \pm 10,3$ μ mol TE/g'dir. Aynı türde toplam fenol içeriğinde metanol ekstresinde daha fazla bulunmuştur (24).

Lipit peroksidasyonu, reaktif oksijen türlerinin birikmiş etkisi olup biyolojik sistemlerin bozulmasına yol açan bir zincir reaksiyondur. Reaktif serbest radikaller, doymamış yağ asitinin metilen grubundan allilik hidrojen atomu çıkarılması ile reaksiyonu başlatırlar.

Bağların yeniden düzenlenmesi ile devam eden reaksiyon sonucu stabil dien konjugatlar oluşur (70). Bu çalışmada demir(III) ve askorbik asit varlığında fosfolipit esaslı lipozomlar, hızla hidroksil radikal kaynaklı peroksidasyona tabi tutulmuş ve malondialdehit ve benzer aldehitlerin teşekkülü sağlanmıştır. Oluşan bu reaktif aldehitler 2-tiyobarbitürik asit ile reaksiyona sokularak oluşan pembe renk 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Oluşan rengin şiddetinin reaktif aldehit miktarı ile doğru orantılı olması nedeniyle lipit peroksidasyon miktarı ve dolayısıyla test maddelerinin antioksidan etkileri de bu şekilde tayin edilmiştir. *H. canum*’dan elde edilen su ve % 70’lik metanol ekstreleri 2-tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin (TBARS) oluşumunu engelleyerek antioksidan etki göstermişlerdir. Ekstrelerden su ekstresi, metanol ekstresinden ve standart olarak kullanılan kateşinden daha güçlü aktivite göstermiş olup, en aktif (IC₅₀: 0,49 mg/mL) ekstre olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.54). *H. confertum*’un toprak üstü kısımlarının % 80 metanol ekstresine ait *n*-butanol fraksiyonunun, lipit peroksidasyonunu önleyici etkisinin çalışıldığı bir literatürde standart olarak askorbik asit kullanılmıştır. *H. confertum*’un lipit peroksidasyonunu inhibe edici IC₅₀ değeri 242.15 ± 8.25 µg/mL iken, askorbik asitin IC₅₀ değeri 20 ± 1.25 µg/mL olarak bulunmuştur (71).

5.4. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ANALİZİ

H. canum’un metanol ve su ekstreleri ile 10 farklı standart suş kullanılarak, CLSI standartları doğrultusunda antimikrobiyal aktiviteyi analiz etmek amaçlı mikro dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle çalışılmıştır (Tablo 4.6; Tablo4.7).

Bitki ekstrelerinin MİK değerleri 1 mg/mL’den yüksek konsantrasyonlarda olduğunda, iyi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı düşünülür. Bitki ekstreleri için eğer MİK değerleri 100 µg/mL’nin altındaysa yüksek, MİK değeri 100-625 µg/mL aralığında olduğunda ise orta derecede etkili olarak kabul edilir (6). Disk difüzyon metodunda metanol ekstresinin gösterdiği inhibisyon zonlarının ölçüm değerleri su ekstresine göre daha fazla bulunmuştur. Yapılan MİK çalışmasında ise metanol ekstresi; idrar yolları enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* ve üst solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan *H. influenzae*’ya karşı orta derecede inhibitör etki gösterirken su ekstresi sadece *H. influenzae*’ye karşı orta derecede etki göstermiştir. Geniş spektrumlu olarak her iki ekstre de gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olan *Bacillus cereus* ATCC 11778 ve göz enfeksiyonlarına neden olan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakterilerine karşı iyi

derecede antibakteriyel aktivite göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşlarına karşı ise, her iki ekstre ve standartlar etkili bulunamamıştır. Rubio-Moraga ve arkadaşları (2013), İspanya’da halk arasında kullanılan *Helianthemum* türlerinden hazırlanan % 80’lik metanol ekstrelerinin, Gram (+)’lerden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ve Gram (-)’lerden *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella enterica* ATCC 14028 bakterilerine karşı MİK yöntemiyle antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Sonuç olarak çalışılan türlerden *H. hirtum* orta derecede antimikrobiyal aktivite gösterirken; *H. alypoides*, *H. cinereum* subsp. *rotundifolium* ve *H. marifolium* subsp. *marifolium* türlerinin ekstreleri bütün bakteri test suşlarına karşı iyi bir aktivite göstermiştir. *H. syriacum*, *H. squamatum* ve *H. oelandicum* subsp. *incanum* türlerinin ekstreleri ise test edilen konsantrasyonlarda herhangi bir aktivite göstermemiştir. *H. alypoides*, *H. marifolium*, *H. cinereum* türlerinin ekstrelerinin en yüksek fenolik içeriğe sahip olmalarının, güçlü antimikrobiyal aktiviteleriyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Türlerin yüksek ellajitanen içeriği antimikrobiyal özelliği ile ilişkilendirilerek ellajitanenlerin antiseptik, dermatolojik ve antienflamatuar özellikleri vurgulanmıştır (6). *H.kahiricum* toprak üstü kısmından hazırlanan ekstrelerin disk difüzyon yöntemiyle *E. coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) suşları ile *Enterobacter* ESB, *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* CAZR’a karşı antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada; butanol ekstresi çalışılan bütün suşlara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterirken, kloroform ekstresi orta dereceli aktivite göstermiş ve petrol eteri ekstresi inaktif bulunmuştur (26). Farklı bir çalışmada ise *H. lippii* toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. *S.aureus* ATCC 29213’a karşı inhibisyon zon çapı 21 mm iken, *Candida albicans* ATCC 10231’a karşı 20 mm olarak bulunmuştur (29). Tez çalışmamızda bulunan ekstrele ait aktivite sonuçları fenolik içerikle doğru orantılı olup, farklı literatürlerde bulunan sonuçlar ile de uyumludur.

5.5 ANTİAMİBİK AKTİVİTE ANALİZİ

Toprak ve tatlı sularda özgür yaşayan bazı amiplerin insanda ve diğer hayvanlarda ölümcül parazitozlara neden oldukları 1960’lı yılların ikinci yarısından bu yana bilinmektedir. İstemli ya da fırsatçı parazit diye tanımlanan bu amipler bugünkü bilgilerimize göre üç cins içinde yer almaktadırlar: *Naegleria*, *Acanthamoeba* ve

Balamuthia. Bunlardan *Naegleria* ve *Balamuthia* cinslerinde birer, *Acanthamoeba* cinsinde ise birden fazla türün insanda patojen oldukları saptanmıştır (72). *Acanthamoeba*'ların trofozit (enfeksiyon yapıcı) ve kist (çabuk iyileşebilen) olmak üzere iki yaşam evresi vardır. *Acanthamoeba* keratiti, çeşitli *Acanthamoeba* türlerinin neden oldukları bir parazitozudur. Bu durum korneanın amiplerle direkt teması sonucunda gelişir. Travma, kontakt lens kullanımı, bulaşlı suyla korneanın teması hazırlayıcı faktörlerdir. Sağlıklı kişilerde görülür; şiddetli oküler ağrı, enflamasyon, görme bozukluğu ve halka şeklinde stromal infiltrasyon vardır. Zamanla görme bozulur, hatta göz tamamiyle kaybedilebilir. *Acanthamoeba* keratiti en sık olarak *Herpes simplex* keratiti ile karışır. Fakat birincide çok şiddetli baş ağrısı görülürken, ikincisinde bu ağır durum görülmez. Kornea kazıntısından üretmekle ve/veya kesitlerde amibi görerek tanı konur; ekim yapılan plakların 30°C'de inkübe edilmesi gerekir. Tedavide çeşitli ilaçlar denenmiştir. Etkili olanlar arasında propamidine isethionate, ketoconazole ve miconazole ve itraconazole sayılabilir. Lezyonun cerrahi olarak temizlenmesinin; buna ek olarak ağızdan ve lokal olarak miconazole verilmesinin etkili olduğu vurgulanmıştır. *Acanthamoeba* keratitli olgulardan en sık soyutulan türler: *A. castellanii* ve *A. polyphaga*'dır (25).

Bu çalışmada *H. canum* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen % 70'lik metanol ve su ekstraktlarının *in vitro* olarak *Acanthamoeba castellanii* üzerine lethal etkileri araştırılmıştır. *H. canum* metanol ekstresinin 20 mg/mL konsantrasyonda 72 saat sonra *A. castellanii* parazitini öldürebildiği saptanmıştır. Yapılan literatür çalışmasında da şimdiye kadar birçok tıbbi bitkinin *Acanthamoeba*'ya karşı inhibitör etki gösterdiği ve tedavide kullanılabileceği kanıtlanmıştır (73-76). Bir çalışmada *H. lippii* (L.) türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ve etil asetat ekstraktları klorheksidin ile kıyaslandığında *Acanthamoeba castellanii* kisti üzerine güçlü bir *in vitro* lethal etki göstermişlerdir (25). Farklı bir çalışmada ise *H. glomeratum* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia* trofozitlerine karşı güçlü lethal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Türün bu etkisi, bileşimindeki flavonoidlerin (tilirozit ve kamferol), parazitin büyümesini inhibe edici etkisiyle ilişkilendirilmiştir (15). Farklı *Helianthemum* türleri üzerinde yapılan *in vivo*, *in vitro* anti-giardial ve antiprotozoal aktivite çalışmalarında bu türlerin antiparaziter etkili oldukları tespit edilmiştir (12, 16, 61).

Sonuç olarak, *H. canum* ile yapılan çalışmalar da ekstrelerin fenolik bileşik bakımından zengin olduğu ve ana bileşenlerinin flavonoidler ve tanenler olduğu tespit edilmiştir. Yapılan aktivite çalışmalarında flavonoidler ve tanenler bakımından zengin olan % 70 metanol ekstresinin yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde *H. canum* üzerinde gerek anatomi-morfoloji gerekse kimyasal-aktivite çalışmaları bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında bitki tam olarak incelenmiş ve tüm değerler karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Burada verilen tüm sonuçlar *H. canum* bitkisi için **ilk ve orjinaldir**. Bundan sonraki çalışmalarda *H. canum* türü farklı lokasyonlardan toplanacak ve yapılan çalışmalarla Flora'ya katkıda bulunulacaktır. Uçucu yağ analizi sonucu tespit edilen miristin bileşiği üzerinden kemotaksonomi çalışmaları yapılacak, aktivitesi yüksek ekstrelerin bileşimleri daha detaylı olarak incelenecek, aydınlatılamayan bileşikler tanımlanacak ve farklı aktivite çalışmaları yapılacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Vol.1), Edinburgh University Press, Edinburgh, 1972: 506-517.
2. Güner A. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) (1. Baskı). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, İstanbul, Flora Dizisi 1, 2012; 368-371.
3. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi (2. Baskı), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 1999: 373.
4. Choi WC, Kim CS, Hwang SS et al. Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medical Plants and Flavonoits by Assay-Guided Comparison. Plant Sci 2002; 163: 1161- 1168.
5. Evans WC. Trease and Evans Pharmacogsy (Fifteenth Edition), W.B. Saunders Published, Edinburg, 2002: 29.
6. Rubio-Moraga A, Argandona J, Mota B, et al. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. J of Ethnopharmacol 2013; 148: 287-296.
7. Heywood VH, Brummit RK, Culham A, Seberg O. Flowering Plant Families Of The World (revised edition), Firefly Books, Royal Botanic Gardens, Kew England, 2007:100-101.

8. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik Ders Kitabı (4. Baskı). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara 2014; 245.
9. Zomlefer WB. Guide to Flowering Plant Families (first edition), The University of North Carolina Press 1994:110-112.
10. Metcalfe CR, Chalk L. Anatomy of the Dicotyledones. Oxford at the Clarendon Press 1968, (1) 97-102.
11. Yeşilyurt E, Erik S, Doğan C, et al. *Helianthemum salicifolium* (Cistaceae) Üzerinde Taksonomik, Morfolojik, Sitolojik, Palinolojik ve Ekolojik Çalışmalar, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Ege Üniversitesi, İzmir, 2012: 671.
12. Meckes M, Calzada F, Tapia-Contreras A, Cedillo-Rivera R. Antiprotozoal Properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother Res* 1999; 13: 102-105.
13. Meckes M, Torres J, Calzada F, et al. Antibacterial Properties of *Helianthemum glomeratum*, a Plant Used in Maya Traditional Medicine to Treat Diarrhoea. *Phytother Res* 1997; 11: 128-131.
14. Alonso-Castro AJ, Maldonado-Miranda JJ, et al. Medicinal Plants in the Huasteca Potosina, Mexico. *J Ethnopharmacol* 2012; 143: 292-298.
15. Calzada F, Alanis A. Additional Antiprotozoal Flavonol Glycosides of the Aerial Parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother Res* 2007; 21: 78-80.
16. Barbosa E, Calzada F, Campos R. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *J Ethnopharmacol* 2006; 108: 395-397.
17. Bremner P, Rivera D, Calzado MA et al. Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *J Ethnopharmacol* 2009; 124: 295-305.
18. Rigat M, Bonet MA, Garcia S, Garnatje T, Valles J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). *J Ethnopharmacol* 2007; 113: 267-277.
19. Rigat M, Valles J, Iglesias J, Garnatje T. Traditional and alternative natural therapeutic products used in the treatment of respiratory tract infections diseases in

- the eastern Catalan Pyrenees (Iberian Peninsula). *J Ethnopharmacol* 2013; 148: 411-422.
20. Meckes M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jimenez A. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine* 2004; 11: 446-451.
 21. Tawaha K, Alali FQ et al. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem* 2007; 104:1372-1378.
 22. Djeridane A, Hamdi A et al. The *in vitro* evaluation of antioxidative activity, α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clin Res Rev* 2013 (in press).
 23. Sökmen A, Jones BM, Ertürk M. The *in vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1999; 67: 79-86.
 24. Bouzergoune F, Bitam F, Aberkane MC, et al. Preliminary Phytochemical and Antimicrobial Activity Investigations on the Aerial Parts of *Helianthemum kahiricum*. *Chem Nat Compd* 2013; 49: 751-752.
 25. Badria FA, Hetta MH, Sarhan RM, Ezz El-Din HM. Lethal Effects of *Helianthemum lippii* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* Cysts *in vitro*. *Korean J Parasitol* 2014; 52(3): 243-249.
 26. Kaiser J, Yassin M, et al. Anti-malarial drug targets: Screening for inhibitors of 2C-methyl-D- erythritol 4-phosphate synthase (IspC protein) in Mediterranean Plants. *Phytomedicine* 2007; 14: 242-249.
 27. Carvalho Resende MM, Bueno Gardona RG, Carvalho Costa MJ. Preventive use of Bach flower Rescue Remedy in the control of risk factors for cardiovascular disease in rats. *Complement Ther Med* 2014; 22: 719-723.
 28. Barrosa FG, Martinez TF et al. Tannin content of grazing plants of southern Spanish arid lands. *J Arid Environ* 2001; 49: 301-314.
 29. Alsabri SG, Rmeli NB, Zetrini A, et al. Phytochemical, anti-oxidant, anti-microbial, anti-inflammatory and anti-ulcer properties of *Helianthemum lippii*. *J Pharmacogn Phytochem* 2013; 2(2): 86-96.

30. Cooper R. Age- Reversing Free Radical Fighters Antioxidants, Woodland Publishing, Utah 1997: 5-11.
31. Peltoketo A. Oxidation and Its Prevention: *In vitro* Evaluation of the Antioxidant Properties of Natural Phenolic Substances Using The Free Radical DPPH• Method, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Division of Pharmacognosy, Helsinki Finland, 2000: 20.
32. Göger F. *Salvia virgata* Jacq. ve *Salvia halophila* Hedge'nin Antioksidan Etkilerinin ve Bileşimlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2006: 98.
33. Panglossi HV. New Developments in Antioxidants Research, Nova Science Publisher, New York USA, 2006: 1.
34. Aydın A, Sayal A, Işimer A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 2001; 20: 2-70.
35. Bachmayer O. Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Culinary Herbs, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Division of Pharmacognosy, Helsinki, Finland, 2004: 85.
36. Olinescu R, Smith TL. Free Radical in Medical. ISBN 1-56072-869-8, New York 2002: 1-2.
37. Halliwell B. Free Radical Reactions in Human Disease, In Environmental Stressors In Health and Disease, Fuchs J. (Ed.), Marcell Dekker Incorporated, New York, 2001: 3.
38. Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik Gelişim 1998; 11: 342-346.
39. Güneş HV, Başaran A. Hücre Yapısı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik (1), Güler AD (editor), Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir 2006: 11.
40. Mukhopadhyay AK. Antioxidants Natural and Synthetic. ISBN-13: 978-3-938054-05-5. Kiel, Almanya 2006.
41. Çelebioğlu S, Baytop T. A New Reagent for Microscopical Investigation of Plant. Publication of the Institute of Pharmacognosy 1949; 10(19): 301.

42. Sakar MK, Tanker M. Fitokimyasal Analizler (Tanım, Miktar tayini ve İzolasyon). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara 1991.
43. Senthamarai R, Ismail AM, Kiurbha TSV, Balasubramanian P. Pharmacognostical and Phytochemical studies on leaves of *Stephania japonica* Linn. J Chem Pharm Res 2012; 4(3): 1457-1464.
44. Wagner H, Bladt S, et al. Plant Drug Analysis. Springer-Verlag, Berlin 1984; 145-146.
45. Javidnia K, Nasiri A, Miri R, Jamalain A. Composition of the Essential Oil of *Helianthemum kahiricum* Del. from Iran. J Essent Oil Res 2007; 19: 52-53.
46. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventó S RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In Methods in Enzymology, Packer, L. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1999; 299: 152-315.
47. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999; 64: 555–559.
48. Miliuskas G, Venskutonis PR, Van-Beek TA. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. Food Chem 2004; 85: 231-237.
49. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). Anal Biochem 1971; 40: 450–458.
50. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-Radical Scavenging Action of Medicinal Herbs from Ghana *Thonningia Sanguinea* on Experimentally Induced Liver Injuries. General Pharmacol 1999; 32: 661-667.
51. Oomah BD, Mazza G. Flavonoids and Antioxidative Activities in Buckwheat. J Agr Food Chem 1996; 44: 1746-1750.
52. Velioglu YS, Mazza G, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. J Agr Food Chem 1998; 46: 4113-4117.

53. Re R, Pellegrini N, Proteggente A et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Bio Med* 1999; 26: 1231-1237.
54. Aruoma GI, Spencer JPE, Warren QD, Jenner P, Butler P, Halliwell B. Characterization of Food Using Commercial Garlic Antioxidants, *Food Chem* 1997; 60: 149-156.
55. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods, In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, and Pfaller MA (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington, D.C. 2007; 1152-1172.
56. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests; Approved standard-9th ed. CLSI document M2-A9. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006; 26: 1.
57. Bilgehan H. Antimikrobikler ve Mikroorganizmalar. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi III. Baskı. 2002; 145-86.
58. Halliwell B. Antioxidants: The basics – what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 3–20.
59. Yeşilyurt EB, Erik S, Özmen E, Akaydın G. Comparative morphological, palynological and anatomical characteristics of Turkish rare endemics *Helianthemum germanicopolitanum* and *Helianthemum antitauricum* (Cistaceae). *Plant Syst Evol* 2015; 301: 125-137.
60. Alsabri SG, Ebsaim MAM, Mohamed SS, et al. Antiulcer property of Libyan *Helianthemum kahiricum* plant. *J Pharmacogn Phytochem* 2014; 2(5): 80-84.
61. Barbosa E, Calzada F, Campos R. *In vivo* antiulcer activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *J Ethnopharmacol* 2007; 109: 552-554.
62. Şeker Karatoprak G, Tedavide Kullanılan Güney Afrika Kaynaklı *Pelargonium sidoides* DC. Yerine Kullanılabilecek Bir Bitki: *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2015.

63. Shahidi F. Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications, AOCS Press, United States of America, 1997: 98.
64. Bachmayer O. Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Culinary Herbs, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2004: 85.
65. Belyagoubi-Benhammou N, Belyagoubi L, Bekkara FA. Phenolic contents and antioxidant activities *in vitro* of some selected Algerian plants. J Med Plant Res 2014; 8(40): 1198-1207.
66. Khacheba I, Djeridane A, Kameli A, Yousfi M. The Inhibitory Effect of Some Algerian Plants Phenolics Extracts on the Glucosidase and Amylase Activities and Their Antioxidant Activities. Curr Enzyme Inh 2014; 10: 58-67.
67. Braca A, Politi M, Sanogo R, et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Wild and Cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) Leaves. J Agr Food Chem 2003; 51: 6689-6695.
68. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. Antioxidant Properties of Commercial Soft and Hard Winter Wheats (*Triticum aestivum* L.) and Their Milling Fractions. J Sci Food Agr 2006; 86: 477-485.
69. Gaamoune S, Harzallah D, Kada S, et al. The comparison of two tannin extraction methods from *Galium tunetanum* Poiret. and their antioxidant capacities. Der Pharmacia Letter 2014; 6 (1): 114-119.
70. Badmus JA, Adedosu TO, Fatokı JO, et al. Lipid Peroxidation Inhibition and Antiradical Activities of Some Leaf Fractions of *Mangifera indica*. Acta Pol Pharm 2011; 68: 23-29.
71. Djebbari R, Chemam Y, Amrani A, et al. *In vitro* antioxidant activities of *n*-butanol extract of *Helianthemum confertum*. Int J Phytomed 2015; 7: 119-122.
72. Saygı G, Polat Z. Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitozlar (Primer amibik meningoensefalit-Granulomatous Encephalitis-Keratit). C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 2003; 25(3): 140-149.
73. Polat ZA, Tepe B, Vural A. *In vitro* effectiveness of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. Parasitol Res 2007; 101: 1551-1555.

74. Goze I, Alim A, Dag S, Tepe B, Polat ZA. In vitro amoebicidal activity of *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa* on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. J Ocul Pharmacol Ther 2009; 25: 293-298.
75. Chu DM, Miles H, Toney D, Ngyuen C, Marciano-Cabral F. Amoebicidal activity of plant extracts from South east Asia on *Acanthamoeba* spp. Parasitol Res 1998; 84: 746-752.
76. Degerli S, Berk S, Malatyali E, Tepe B. Screening of the *in vitro* amoebicidal activities of *Pastinaca armenea* (Fisch. & C.A. Mey.) and *Inulaoculus-christi* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Parasitol Res 2011; 110: 565-570.

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Neslihan ŞAM GÖKŞEN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 5 Ocak 1990, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Email: goksenneslihan@gmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik ABD, Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Niğde Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Mustafa Eminoglu Anadolu Lisesi, Kayseri	2007

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

- Şam N, Baldemir A. “*Helianthemum canum* (L.) Baumg Bitkisinin Anatomik ve Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi”, 21. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Nevşehir, Türkiye, Mayıs 2014.
- Baldemir A, İlgün S, Şam N. "Anatomical Studies on *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and *A. hirsutiflora* (Buser) Rothm. Native to Turkey", XIV Optima Meeting, ITALYA, 9-15 Eylül 2013.
- Baldemir A, Gökşen N, Ildiz N, Şeker Karatoprak G, Koşar M. "Investigation of Biological Activities and Chemical Analysis of *Helianthemum canum* L. Baumg (Cistaceae)", 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Türkiye, 9-12 Haziran 2015, vol.1, no.P-344, pp.394-395.
- Baldemir A, Demirci B, Şam N, Koşar M. "The Composition of The Essential Oil of *Helianthemum canum* (L.) Baumg Growing in Turkey", 45th International Symposium on Essential Oils, İstanbul, Türkiye, 3-7 Eylül 2014, vol.1, pp.73-73.