

**T.C.  
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKİNEZYANIN YAPRAK VE ÇİÇEK EKSTRAKTLARININ  
ANTİKANSER VE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Khawla Omran Mohamed SHARIF**

**Danışman  
Jüri Üyesi  
Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU  
Prof. Dr. Ekrem GÜREL  
Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKÇİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**KASTAMONU –2019**

## TEZ ONAYI

**Khawla Omran Mohamed SHARİF** tarafından hazırlanan “**Ekinezya Yaprak ve Çiçek Ekstraktlarının Antikanser ve Bazı Biyolojik Özelliklerinin İncelenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU  
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKÇİ  
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ekrem GÜREL  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi



05/08/2019

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Nur BELKAYALI



## TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza  
Khawla Omran Mohamed SHARIF



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### EKİNEZYANIN YAPRAK VE ÇİÇEK EKSTRAKTLARININ ANTİKANSER VE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Khawla Omran Mohamed SHARIF  
Kastamonu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

Ekinezya, birçok ülkede şifalı bir bitki olarak önemli değeri olan geleneksel bir bitkidir. Çoğunlukla immünolojik özellikleriyle solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Bu çalışma, farklı Ekinezya çiçek ve yaprak ekstraktlarının antimikrobiyal, anti-tümör ve DNA koruma etkinlikleri gibi biyolojik etkilerini araştırmak için yapılmıştır. Ekinezya çiçek ve yaprak ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği, 21 gram pozitif ve gram negatif bakteriye karşı etkileri su, metanol ve etil asetat ekstraktları kullanılarak incelenmiştir. Ekstraktların MİK (Minimum inhibitör konsantrasyon) ve MBC (Minimum bakterisit konsantrasyon) değerleri belirlenmiştir. Tüm bakteri suşları, Ekinezya ekstraktlarına karşı duyarlılık sergilerken, metanol ekstraktı, 62.5-125 µg/mL MİK değer aralığı ile tüm mikroorganizmalara karşı önemli MİK sunmuştur. Ayrıca, yaprak ve çiçek özütleri için mükemmel antimikrobiyal aktivite, *Enterococcus faecalis* ATCC 2521 gibi gram pozitif bakterilere karşı tespit edilmiştir. Tüm ekstraktlar için DNA koruma deneyi gerçekleştirilmiştir. Ekinezyanın çiçek ve yaprak ekstraktları iki konsantrasyonda (10 ve 50 mg / mL), herhangi bir DNA koruyucu etki sergilememiştir. HeLa tümör hücre hattına karşı sitotoksikite, çeşitli ekstrakt konsantrasyonlarında 24 ve 48 saat MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. Ekinezyanın metanol ve etil asetat ekstraktları, yüksek sitotoksik etkilerin zamana ve doza bağlı olduğunu göstermiştir. Öte yandan, metanol çiçek ekstraktı 48 saatlik muameleden sonra IC<sub>50</sub> için en düşük konsantrasyon olan 62.5 µg/mL ve 73.03 µg/mL ile en büyük antiproliferatif etkinlik göstermiştir. Özet olarak, bu araştırma Ekinezyanın biyolojik özellikler açısından bakteri ve tümör hücre hatları üzerindeki etkilerine dayanan iyi kalitede bilimsel verilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu ekstraktlar, hastalık tedavisine yönelik ilaç elde etmek için olası bir kaynak olabilir. Bununla birlikte, Ekinezya preparatları için güvenli farmasötik profillerin geliştirilmesi ve kurulması için gelecekte araştırmalar yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Echinacea purpurea*, bitki ekstraktları, DNA koruması, antimikrobiyal aktivite

**2019, 64 Sayfa**  
**Bilim Kodu: 923**

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### EXAMINATION OF ANTICANCER AND SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF LEAF AND FLOWER EXTRACTS OF ECHINACEA

Khawla Omran Mohamed SHARIF  
Kastamonu University  
Institute of Science  
Department of Genetics and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

Echinacea is a traditional plant which has significant value as a medicinal herb in several countries. It is mostly utilized based on the immunological properties and particularly in the treatment of respiratory infections. This research study was conducted to investigate the biological effects of different Echinacea flower and leaf extracts for the activities of antimicrobial, anti-tumor and DNA protection. Antimicrobial efficiency of Echinacea flower and leaf extracts were examined utilizing water, methanol and ethyl acetate extracts, which tested against 21 gram positive and gram negative bacteria. The MIC (Minimum inhibitory concentration) and MBC (Minimum bactericidal concentration) values of extracts were determined. All the bacteria strains presented sensitivity to Echinacea extracts, however, the methanol extract presented significant MIC against all the microorganisms with MIC value range 62.5-125 µg/mL. In addition, the excellent antimicrobial activity for the leaf and flower extracts was against the gram-positive bacteria, such as *Enterococcus faecalis* ATCC 2521. A DNA protection assay for all extracts was tested. Echinacea flower and leaf extracts at two concentrations (10 and 50 mg/mL), did not show any DNA protective effect. Cytotoxicity against HeLa tumor-cell line was determined via MTT cell viability test for 24 and 48 hours at diverse extracts concentrations. The methanol and ethyl acetate extracts of Echinacea indicated that high cytotoxic effects depended on time and dose manner. On the other hand, methanol flower extract showed the greatest antiproliferative activity with the smallest concentration of 62.5 µg/mL and 73.03 µg /mL for IC<sub>50</sub> after 48 hours treatment. As a summary, this research study indicated that Echinacea has good quality scientific data for biological properties based on the effects on bacteria and tumor cell lines. This extracts could be a possible source to obtain medicines for disease treatment. However, future researches have been required for the development and establishment of the safe pharmaceuticals profiles for Echinacea preparations.

**Key Words:** *Echinacea purpurea*, plant extracts, DNA protection, antimicrobial activity.

**2019, 64 Pages**

**Science Code: 923**

## TEŞEKKÜR

Öncelikle Danışmanım Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU'na bu çalışmanın her aşamasında vermiş olduğu destek ve yapmış olduğu olağanüstü rehberlikten dolayı saygı ve şükranlarımı sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimi boyunca sağladığı tüm yardım ve rehberlik için Doç.Dr. Yasemin Çelik ALTUNOĞLU'na şükranlarımı sunuyorum.

Yardımları ve işbirliklerinden dolayı Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nün tüm akademik ve idari çalışanlarına ve özellikle laboratuvar çalışmalarında bana sağlamış olduğu muazzam yardım ve benimle paylaştığı değerli tecrübeleri için sınıf arkadaşım Buket USTAOĞLU'na minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Yıllar boyunca bana verdikleri destekler, gösterdikleri sabır ve cesaret verici yaklaşımları için eşim Shaker GHAGHA'ya, bana dualarında daima yer veren anne ve babam başta olmak üzere, ailemin tüm üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana lisansüstü çalışmalarımı yurtdışında sürdürebilme olanağını sunan ülkem Libya'ya, Tripoli Üniversitesi'ne ve Kastamonu Üniversitesi'ne minnet ve şükranlarımı sunuyorum.

Khawla Omran Mohammed SHARIF  
Kastamonu, Ağustos, 2019

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
TEZ ONAYI.....	ii
TAAHHÜTNAME.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
GRAFİKLER DİZİNİ .....	xi
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ .....	xiii
TABLOLAR DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
1.1. <i>Echinacea purpurea</i> 'nın Genel Özellikleri .....	1
1.2. Ekinezyanın Tarihçesi .....	2
1.3. Fitokimyasal Bileşenler .....	3
1.3.1. İmmunostimülant Bitki olarak Ekinezya .....	4
1.3.2. <i>Echinacea purpurea</i> 'nın İmmün Hücre Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi .....	5
1.4. Farmakolojik Aktivite .....	6
1.4.1. Alternatif Tümör Tedavisinde Ekinezya .....	6
1.4.2. Bulaşıcı Hastalıklarda <i>Ekinezya purpurea</i> 'nın Fitomedikini .....	7
1.4.3. Ekstraktların Üst Solunum Enfeksiyonları Üzerine Etkileri .....	7
1.5. Ekinezya'nın Geleneksel Kullanımı .....	7
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE .....	9
2.1. Ekinezyanın Kimyasal İçeriği .....	9
2.2. Antimikrobiyal Etkinlik .....	10
2.3. DNA Koruma .....	10
2.4. Antikanser .....	10
2.5. Çalışmanın Amacı .....	11

3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	12
3.1. Materyaller .....	12
3.1.1. Bitki Materyalleri.....	12
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	12
3.1.3. Araçlar .....	14
3.2. Yöntemler .....	19
3.2.1. Bitki Materyali Ekstraksiyonu .....	19
3.2.2. Bitki Ekstraktının Kimyasal İçeriğinin Tanımlanması.....	19
3.2.3. Antimikrobiyal Etkinlik Testi.....	19
3.2.4. DNA Koruma Testi .....	21
3.2.5. Sitotoksik Aktivite Testi .....	22
4. SONUÇLAR .....	26
4.1. Bitki Ekstraktlarının Bileşimi.....	26
4.2. Antimikrobiyal Etkinliğin Belirlenmesi.....	32
4.3. DNA Koruma Etkinliğinin Belirlenmesi.....	43
4.4. Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi .....	43
5. TARTIŞMA .....	53
6. SONUÇ .....	57
KAYNAKLAR .....	58
ÖZGEÇMİŞ .....	64



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CB2	Kanabinoid Reseptörü Tip 2
EP	<i>Echinacea purpurea</i>
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FBS	Fetal Sığır Serumumu
h	Saat
HCl	Hidroklorür
HPLC-DAD-MS	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Diyot Dizisi Detektörü - Kütle Spektrometresi
IC <sub>50</sub>	% 50 etki seviyesinde inhibitör konsantrasyonu
LAK	Lymphokine Activated Killer
LB	Luria - Bertani
MBC	Minimum Bakteri Öldürücü Konsantrasyon
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MTT	3- [4,5-dimetiltiazol-2-yl] -2,5-difeniltetrazolyum
NK	Doğal Öldürücü
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
URIs	Üst Solunum Enfeksiyonları
WBCs	Beyaz Kan Hücreleri

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. <i>E. purpurea</i> 'nın birkaç sekonder metabolitinin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 4.1. Ekinezya çiçeği ve yaprak ekstraktlarının DNA koruma analizi 50 mg/mL .....	43
Şekil 4.2. Beş doz Ekinezya çiçeği ekstraktı ile muameleden sonra 24 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin hücre sel morfolojisi .....	44
Şekil 4.3. Beş doz Ekinezya çiçeği ekstraktı ile muameleden sonra 48 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin hücre sel morfolojisi .....	44
Şekil 4.4. Beş doz Ekinezya yaprağı ekstraktı ile muameleden sonra 24 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin hücre sel morfolojisi .....	45
Şekil 4.5. Beş doz Ekinezya yaprağı ekstraktı ile muameleden sonra 48 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin hücre sel morfolojisi .....	45

## GRAFİKLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Grafik 4.1. Çiçek su ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği .....	38
Grafik 4.2. Yaprak su ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği .....	38
Grafik 4.3. Çiçek metanol ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği .....	39
Grafik 4.4. Yaprak metanol ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği .....	39
Grafik 4.5. Çiçek etil asetat ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği .....	40
Grafik 4.6. Yaprak etil asetat ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği.....	40
Grafik 4.7. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya su çiçeği ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi .....	46
Grafik 4.8. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya su çiçeği ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi .....	46
Grafik 4.9. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçeği metanol ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	47
Grafik 4.10. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçeği metanol ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	47
Grafik 4.11. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçeği etil ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	48
Grafik 4.12. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçeği etil ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	48
Grafik 4.13. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı su ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	49
Grafik 4.14. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı su ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	49

Grafik 4.15. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı metanol ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	50
Grafik 4.16. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı metanol ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	50
Grafik 4.17. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı etil asetat ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	51
Grafik 4.18. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı etil asetat ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC <sub>50</sub> analizi.....	51



## FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Fotoğraf 1.1. Ekinezya mor koniçiçeği bitkisi .....	2
Fotoğraf 3.1. Ultraviyole Görünür Spektrofotometre .....	14
Fotoğraf 3.2. 96 hücreli mikrotiter plakalar .....	15
Fotoğraf 3.3. Santrifüj .....	16
Fotoğraf 3.4. Elektroforez .....	16
Fotoğraf 3.5. Çalkalayıcı .....	17
Fotoğraf 3.6. % 5 karbondioksit içeren inkübatör .....	18
Fotoğraf 3.7. Hemasitometre sayımı için ters mikroskop .....	18
Fotoğraf 3.8. Bakteriyel süspansiyonların McFarland konsantrasyonu ile ayarlanması .....	21
Fotoğraf 3.9. HeLa hücreleri içeren üç ortam plakası .....	23
Fotoğraf 3.10. Hücreler, çeşitli çiçek ve yaprak Ekinezya ekstraktları dozlarından 100 µL ile muamele edilmiştir .....	24
Fotoğraf 3.11. MTT tahlili, HeLa hücrelerine 48 saat inkübe edilen ekstraktlar için asit ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek uygulanmıştır .....	25
Fotoğraf 4.1. Bazı bakteri suşlarına karşı Ekinezya ekstraktları için MBC sonuçları (a) çiçek H <sub>2</sub> O ekstraktı (b) yaprak H <sub>2</sub> O ekstraktı (c) çiçek metanol ekstraktı (d) yaprak metanol ekstraktı (e) çiçek etil asetat ekstraktı (f) yaprak etil asetat ekstraktı .....	42

## TABLULAR DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 3.1. Farklı bakteri türleri listesi.....	12
Tablo 4.1. <i>E.purpurea</i> 'nın analiz edilen ekstraktlarında bulunan bileşiklerin karakterizasyonu .....	29
Tablo 4.2. <i>E. purpurea</i> 'daki ana bileşiklerin miktarının belirlenmesi .....	31
Tablo 4.3. Bulyon mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen Ekinezya çiçek suyu ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri.....	32
Tablo 4.4. Bulyon mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen Ekinezya yaprak suyu ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri .....	33
Tablo 4.5. Bulyon mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen Ekinezya çiçek metanol ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri .....	34
Tablo 4.6. Bulyon mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen Ekinezya yaprak metanol ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri.....	35
Tablo 4.7. Bulyon mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen Ekinezya çiçek etil ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri.....	36
Tablo 4.8. Bulyon mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen Ekinezya yaprak etil ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri.....	37
Tablo 4.9. Ekinezya ekstraktları ile HeLa hücrelerinin hücre canlılığı (IC50: yüzde elli etki seviyesinde inhibitör konsantrasyon) üzerindeki etkileri.....	52

# 1. GİRİŞ

## 1.1. *Echinacea purpurea*'nın Genel Özellikleri

Geleneksel bitkisel ilaçlar, vücudun hastalığa karşı direncini güçlendirmek için bağışıklık çerçevesinin bileşenleri üzerindeki etkilerle çeşitli tedaviler sağlıyor gibi görünmektedir. Bitkisel tedavi veya bitkisel ilaçlar, bitkilerin, bitki parçalarının, bitkilerden elde edilen maddelerin terapötik kullanımının yaygın olarak tamamlayıcı bir ilaç şekli olarak değerlendirilmesidir (Chez and Jonas, 1997). Aslında, Ekinezya, çeşitli şartlar için spesifik tıbbi özelliklere sahip, en çok kullanılan şifalı bitkilerden biri olarak olup, günümüzde Ekinezya ürünleri, birçok gelişmiş ülkede en çok satılan bitkisel preparatlar arasındadır. Dahası, çeşitli Ekinezya türleri çiçeklerinden, yapraklarından ve köklerinden tıbbi ürünler elde etmek için kullanılır. Ek olarak, bitkisel ilaçlar olarak üç çeşit Ekinezya kullanılır: *Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallid*, *Echinacea purpurea*. Ayrıca, üç Ekinezya türünün kök ve yer üstü preparatlarının tümü, immün uyarıcılar yoluyla pazarlanmaktadır.

*Echinacea purpurea* (L.) Moench, dünyanın değerli ve tanınmış şifalı bitkilerinden biridir. *Asteraceae* familyasına ait ve aynı zamanda Amerikan koni çiçeği olarak da bilinen otsu bir çiçekli bitki türüdür. Bu bitki, türler içinde en yaygın şekilde yetiştirilen terapötik bitkidir (McKeown, 1999) ve temel olarak hem üst hem de alt solunum sistemlerinde bulaşıcı hastalıklar için kemoterapinin yanı sıra kemo ayırıcı olarak da kullanılmaktadır (Grimm ve Müller, 1999; Patel ve ark., 2008). Bu tür geleneksel olarak diş ağrısı, bağırsak ağrısı, cilt hastalıkları, yılan ısırığı, nöbetler, kronik artrit ve tümörü tedavi etmek için kullanılmıştır (Grimm ve Müller, 1999). Ekinezyanın, çoğunlukla antimikrobiyal olduğu söylenen aktif maddelerin karmaşık bir karışımına sahip olduğu biliniyor iken, diğer maddelerin insan immün çerçevesi üzerinde etkileri olduğu düşünülmektedir. Alkamidler, kafeik asit türevleri ve polisakaritler, bitkinin önemli bileşenleri olarak değerlendirilir. Ayrıca, birçok araştırma alkamidlerin Ekinezya ekstraktlarının immünomodülatör aktivitesinde *in vitro* ve *in vivo* olarak bulunduğunu göstermiştir (Gertsch ve ark., 2004). Ayrıca, çeşitli Ekinezyalarda bulunan kafeik asit, bitki ekstraktının doğrulanması ve kalite

kontrolü için kullanılabilir. Polisakaritler, bitki preparatlarının anti-enflamatuar etkisinde çok önemli bir işlev görmektedir (Laasonen ve ark., 2002).

Ekinezya çok yıllık bir bitkidir, yani genellikle birkaç yıl hayatta kalır. Olgunlaştığında, yaklaşık 1-2 metre (otuz ila altmış santimetre) uzunluğundadır. Türüne bağlı olarak, büyük mor ila pembe çiçekleri olup, biraz dikenlidir. Tohumun başı (koni) çiçeğin merkezinde olup, sivri ve koyu kahverengi ile kırmızı renktedir. Bitkinin formu Fotoğraf 1.1'de gösterilmektedir.



Fotoğraf 1.1. Ekinezya mor koniçiçeği bitkisi

## 1.2. Ekinezyanın Tarihçesi

Kuzey Amerika'nın endemik bitkisi, ilk kez Büyük Ovalar Bölgesi'ndeki Amerikan yerlileri tarafından kullanılan ve sonunda Beyaz yerleşimciler tarafından benimsenen Ekinezyadır. Ayrıca, bitki Kanada ve Avrupa'da yetişmektedir. Ekinezya preparatları, genellikle, Avrupa ve Kuzey Amerika'da en yaygın şekilde kullanılan besin takviyeleri arasında bulunan bitkisel immünostimülanlar veya "soğuk savaşçıları" olarak adlandırılmaktadır (Pepping, 1999). Ekinezya içeren ürünler, Almanya'da üst seviyelerde popülerliğe sahip olup, harici yara tedavisi için kullanılmasının yanında solunum ve idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılmaktadır (Tarleton, 1997). Ek olarak, şu anda piyasada sekiz yüzden fazla



Ekinezya içeren ürün bulunmaktadır (Rudolf ve ark., 1990). Alman doktorlar yılda üç milyondan fazla Ekinezya içeren reçete yazmaktadırlar (Keller, 1991). Ayrıca, bazı antibiyotiklerin çok sayıda temel bakterilere karşı işe yaramaması, Ekinezyaya olan ilginin son zamanlarda artmasına neden olmuştur.

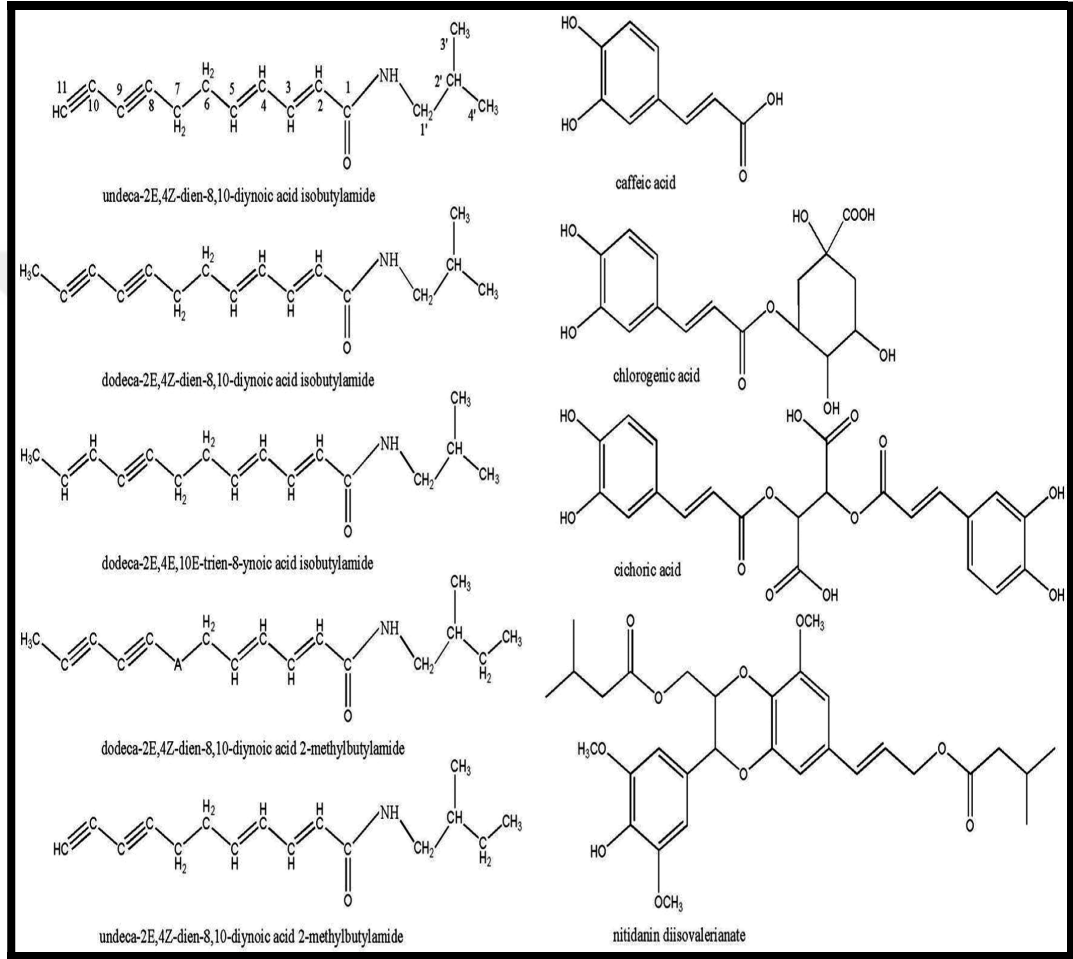
Ekinezya, vücutta enflamasyonu azaltan kimyasalları aktive ediyor görünmektedir ve bu durum soğuk algınlığı ve grip semptomlarını en aza indirebilmektedir. Ayrıca, ticari Ekinezya ürünleri, çeşitli coğrafi bölgelerden elde edilen ham ilaçlardan bir tane daha içerebilmektedir. Aynı zamanda, örneğin tentürler, çaylar, kapsüller ve parenteral preparasyonlar dâhil olmak üzere birkaç dozaj formunda da mevcuttur. Ayrıca, çeşitli Ekinezya ürünlerindeki fitokimyasal çeşitlilik, farmakolojik ve klinik araştırma bulgularını yorumlamayı zorlaştırmaktadır. Aslında, bilinen Ekinezya adı altında satılan çeşitli bitki preparatları kompozisyonda önemli farklılıklar gösterebilmektedir. Ek olarak, bu varyasyonlar temel olarak, çeşitli preparatların yanı sıra örneğin, goldenseal ve askorbik asit gibi diğer maddeleri de içermekle birlikte, çeşitli Ekinezya türlerini içermektedir (Block ve Mead, 2003).

### **1.3. Fitokimyasal Bileşenler**

Aslında, Ekinezya'nın kimyasal bileşenlerinin bazıları bağışıklık sisteminin güçlü uyarıcılarıdır ve önemli bir terapötik değer sağlamaktadır. Ekinezya bileşenlerindeki türler ile bitki kısımları arasında çeşitli farklılıklar vardır. Bunun yanı sıra, genellikle Ekinezya'nın etkinliğinden tek bir bileşenin tamamen sorumlu olmadığına inanılmaktadır (Matthias ve ark., 2004). Bunun yerine, çeşitli ikincil metabolit sınıfları ayrılıp ve *Echinacea purpurea* abstraktlarında tanımlanmıştır. Ek olarak, alkamidler, kafeik asit türevleri ve Polisakaritler, Şekil 1.1'de gösterilen, bitkinin üç temel bileşen grubunu oluşturmaktadır. Ayrıca, bunları HPV gibi eşzamanlı veya ayrı ayrı analiz etmek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır (Spelman ve ark., 2009; Manček ve Kreft, 2005).

*Ekinezya purpurea* alkamidleri esasen polar olmayan ekstraktlardan arındırılmıştır ve çoğunlukla bitkinin sapında konsantredir. Bitkinin toprak üstünde yetişen tipleri normalde bir alkamid kaynağı olarak görülmez. Şekil 1.1'e göre, bileşenleri bir amid kısmı boyunca anizobutilamid ve 2-metilbutilamid parçasına sahip olan birkaç

etilenik ve asetilenik bağ içerir (Hohmann ve ark., 2011). Bitkinin kutup ekstraktları tipik olarak polisakaritler ve glikoproteinler içeren daha fazla kutup metaboliti içerir (Barnes ve ark., 2005). Ek olarak, diğer bileşikler, örneğin, hinik asit, flavonoidler, alkaloidler, fenolik asitler ve amidler bitkiden ayrılmıştır (Bohlmann ve Hoffmann, 1983).



Şekil 1.1. *E. purpurea* 'nın birkaç sekonder metabolitinin kimyasal yapısı

### 1.3.1. İmmünostimülant Bitki olarak Ekinezya

Aslında, bitkinin immünostimülant aktivitesi veya preparatları üç mekanizmaya neden olur: fagositozun yeniden aktivasyonu, fibroblastların impulsu ve lökositlerin mobilitesinin artmasıyla ortaya çıkan solunum aktivitesinin artırılması (Organization, 1999). Bu nedenle, doğuştan gelen bağışıklık, bitki uygulaması yoluyla iyileştirilir ve bağışıklık sistemi, hücre aktivasyonu yoluyla patojenik enfeksiyonlara karşı korunur. Ayrıca, kronik bulaşıcı hastalıkların yanı sıra üst ve alt

solunum yolu enfeksiyonları gibi çeşitli bulaşıcı hastalıkların önlemleri ve ilaç tedavisi için de uygundur (Patel ve ark., 2008).

Ekinezya'nın kökleri, bitkilerinin kompleks kimyasal oluşumu, immünoestimülator ve anti-enflamatuvar faaliyetlerden sorumlu olduğu düşünölen alkamidleri, ketoalkenleri, polisakaritleri, kafeik asit türevlerini ve glikoproteinleri içerir. Ek olarak, alkamidlerin, kannabinoid reseptörü sınıf iki (CB2) üzerinde etkileyici olduğu gösterilmiştir ve bu, immünomodölatör özellikleri için potansiyel bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir (Chicca ve ark., 2009).

### **1.3.2. *Echinacea purpurea*'nın İmmün Hücre Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi**

Çok sayıda bilimsel çalışma, Ekinezya preparatlarının, bağışıklık çerçevesi ile ilgili enfekte olmamış insan hücrelerinde hücresel genlerin ekspresyonuna etki ettiğini belgelemiştir. Ayrıca, NK hücrelerinde ve hücre yüzeyinin antijenindeki değişiklikler, *Echinacea purpurea* ile işlenmiş insanlardan alınan kan hücreleri ile karakterize edilmişti (See ve ark., 1997). Ek olarak, bazı çalışmalar da ticari bir Ekinezya ürünüyle ilaç alımını takiben defalarca alınan insan kanı örneklerinde mRNA'ların ve çok sayıda sitokin geninin proteinlerinin tanınmasında ekspresyon seviyelerinde değişiklikler olduğunu belirlemişlerdir (Randolph ve ark., 2003).

İmmün terapinin ana amacı, immünolojik hücrelerin aktivitesini, neoplastik hücreler veya enfeksiyöz ajanlar olarak doğrudan lokal temas paylaşımında katalize etmektir (Wolf ve ark., 1994). Ayrıca, bitki ekstarktlarının birçoğu, elde edilen bir bağışıklık olarak hümorali doğrudan etkiler, diğer taraftan hücresel doğal bağışıklığı arttırdığı görölmektedir. Bu nedenle, hümorale immünite değişiklikleri, lenfosit B üzerindeki mitojenik etkileri gerektirecektir, proliferasyonu artıracak ve spesifik tiplerde antikorların üretilmesini sağlayacaktır. Ayrıca, hücresel bağışıklık değişiklikleri, doğal öldürücü hücrelerin (NK), lenfokinle aktiveleştirilen öldürücünün (LAK), makrofajın, fagositlerin aktivitesinin, ayrıca spesifik T - lenfositlerin alt grupların çoğalmasının sayısı ve aktivitesi ile ölçölen fitomedik araştırma çalışmalarında en popüler sonuçtur. *Echinacea purpurea* tedavisi, beyaz kan hücrelerinde (WBC'ler), nötrofillerde, monositlerde, kemirgenlerde total protein ve gama globölinin yanı sıra büyük bir artışa neden olmuştur (Sharma ve ark., 2010).

## 1.4. Farmakolojik Aktivite

*In vitro* ve *in vivo* çalışmalara dayanarak, Ekinezya türlerinin farmakolojik aktiviteleri üzerine önemli bilimsel çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, bazı çalışmalar Ekinezya preparatlarının immünomodülatör aktivitesini incelemeye odaklanmış olsa da, antioksidan özelliklerin yanı sıra antifungal, antiviral, antienflamatuvar gibi diğer aktiviteler de araştırılmıştır. Ayrıca, bağışıklık çerçevesi üzerindeki etkiler, bu diğer uygulamaların birçoğunda işlev görebilmektedir. Bir polisakarit miktarı izole edilmiş ve bunların immün çerçeve üzerindeki farmakolojik etkileri analiz edilmiştir. Ek olarak, yüksek molekül ağırlıklı polisakarit heteroksilan, fagositozu aktive etme kabiliyetine sahiptir. Bu nedenle, diğer polisakarit arabinogalaktan, interlökin-1 ve interferon beta-2 makrofaj seviyelerini arttıran tümör nekroz faktörü (TNF) salınımı üretmektedir. Ek olarak, benzer şekilde chicoric asidin alkilamid ve glikozitleri fagositozu artırır. Ayrıca, Isobutylamide, Ekinezyaya keskin bir koku ve farklı tat veren alkilamidler arasındadır (Tyler, 1994).

### 1.4.1. Alternatif Tümör Tedavisinde Ekinezya

Çeşitli araştırmalar, bitkisel ilaçların kullanımının yüzde elli dördünü oluşturduğu tamamlayıcı ve alternatif tedavilerden faydalanan tümör hastalarının oranının yüzde seksen olduğunu göstermektedir.

Aslında, Ekinezya en çok kullanılan bitkisel ürünlerden biridir (Bernstein ve Grasso, 2001). Ekinezya, Batı alternatif tıp yöntemleri uygulayıcıları tarafından önerilmektedir. Örneğin, lenf akışını arttırmak için her gün birkaç kapsül Ekinezya alınması, bir web sitesinde bir naturopatik doktor tarafından önerilmiştir (Richardson ve ark. 2000). Ayrıca, bir diğer naturopatik doktoru, prostat tümörü için, genel olarak, temizleme yolu ile karakterize edilen, aksi takdirde vücudun tuhaf maddelerini, örneğin patojenik organizmaları atabilecek, diğer birçok şifalı otu tavsiye etmiştir. Ek olarak, başka bir web sitesi Ekinezyanın vücudun bağışıklık sistemini tümörlerle savaşmak üzere harekete geçirebilecek şifalı bitkilerden olduğunu ve temizleyici özelliğini belirtmektedir (Boushey ve ark., 2001).

#### **1.4.2. Bulaşıcı Hastalıklarda *Echinacea purpurea*'nın Fitomedikini**

Bazı Ekinezya ekstraktları açıkça mikrobiyolojik hedeflerle özel olarak etkileşime girme yeteneğine sahip bileşikleri içermektedir (Pleschka ve ark., 2009). Ayrıca, bu ekstraktlar, epitel hücrelerinin çeşitli sinyal yollarını etkileyebilir ve virüsü veya bakteri kaynaklı sitokinleri ve kemokinlerin salgılanmasını önleyebilir. Ayrıca pulmoner semptomlardan sorumlu olan enflamatuar araçlardır. Buna ilaveten, Ekinezya, sitotoksik olmayan dozlarda solunum enfeksiyonları ve birçok patojenik solunum bakterisine karşı doğrudan bakteri öldürücü etki yoluyla dahil olan birçok virüse karşı spesifik virüsidal aktivite için kullanılır. Ek olarak, Ekinezya ekstraktları, epitelyal hücrelerin ve dokuların farklı mikroorganizmalara proinflamatuar reaksiyonunun ters çevrilmesi ile mikrobiyal patojenlerle ve evcil hayvanlarla ilgili diğer insanlarda deaktivasyonu için faydalı olabilir.

#### **1.4.3. Ekstraktların Üst Solunum Enfeksiyonları Üzerine Etkileri**

Aslında, *E. purpurea*'dan gelen sıvı ekstraktları, soğuk algınlığı ve diğer URI'leri hafifletmek için kullanılmıştır. Tedavi analizleri, Ekinezya ilacı gerektiren URI'lerin süresi ve ciddiyetinde önemli bir düşüş göstermiştir (Bauer, 1998). Ekinezya'nın düzenli kullanımı, önleme alanında URI riskini azaltır. Giles ve ark., (2000), hem tedavi hem de önleme tasarımları gerektiren sistematik bir tıbbi inceleme makalesi yayınlamıştır (Giles ve ark., 2000). Ek olarak, *Echinacea purpurea*'nın toprağın üstündeki kısımları ve kökleri, influenza virüsüne karşı yükselen antiviral (virusidal) aktivitesi göstermiş ve bir enfeksiyon başlangıcı sırasında ve enfekte olmuş hücrelerden virüs aktarımı sırasında virüsle birincil temas sırasında etki edebilmektedir.

#### **1.5. Ekinezya'nın Geleneksel Kullanımı**

Ekinezya türlerinden *Echinacea pallida*, *Echinacea angustifolia* ve *Echinacea purpurea*, tıbbi amaçlar için kullanılmıştır. Aslında, her bir bitkisel tür için birkaç bileşenli hafif değişiklikler dışında aynıdır. Öte yandan bileşenler, köklerde, yapraklarda ve bütün bitkilerde bulunan aktif bileşiklere göre değişir. Amerikan yerlilerinin çoğu, soğuk algınlığı, diş ağrısı, yılan ısırıkları, baş ağrısı ve yara

enfeksiyonları gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için *Echinacea purpurea* tıbbi preparatını kullanmıştır. Ekinezya en etkili antioksidandır ve immün artırıcı etkileri vardır (Mishima ve ark. 2004). Ekinezya'nın kökleri yılan zehirlenmesi, kan zehirlenmesi, sifiliz, cilt hastalığını tedavi etmek için kullanılır. *Echinacea purpurea* genellikle kronik solunum yolu enfeksiyonlarını ve alt idrar yollarını (viral ve bakteriyel orijinli) tedavi etmek için kullanılır. *Echinacea purpurea* polisakariti her zaman bakterileri öldürmek için kullanılır, örneğin *Staphylococcus* türlerinde. Ek olarak, *Echinacea purpurea* 'nın bitki hücre kültürlerinden yüksek molekül ağırlıklı saflaştırılmış bir polisakarit olan arabinogalaktan, tümör hücrelerine ve mikroorganizmalara karşı sitotoksikite etkilerini aktive etme potansiyeline sahiptir (Chevallier ve ark., 1996).

## 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

### 2.1. Ekinezyanın Kimyasal İçeriği

Birçok araştırmaya göre, yaygın olarak izobütülamid ve 2- metilbütülamid parçaları olan on alkamid, bitki sapının n-heksan damıtılmasından serbest başarı elde etmektedir (Rudolf Bauer ve ark., 1988). Kromatografik yaklaşımlar kullanılarak, Ekinezya kökü kloroform özü bir bağlayıcıya ek olarak, 1  $\beta$ - hidroksi - 4 (15), 5E, 10 (14) -germacatriendeki bazı alkamidler izobütülamid Ekinezya ve 2 - metilbütülamid kısımları ile saflaştırılıp ve izole edilmektedir (Hohmann ve ark., 2011).

İzobütülamidler yoluyla ayrılmış alkamidler yapılarında çoğunlukla 2,4- dienoik asit içermektedir (Barnes ve ark., 2005). Yüksek performanslı bir sıvı kromatografi sonuçları - diyot yer detektörü - kütle spektrometresi (HPLC - DAD - MS) köklerinin ve bitki hava parçalarının analizleri, depolama durumlarının ve ekstraksiyonun yaklaşımlarının hinik asit ve alkamid türevlerinin türevlerini etkileyebileceğini göstermektedir (Luo ve ark., 2003).

*E. purpurea* bölümlerinde, örneğin kök ve yer üstü bölümlerinde alkamidlerin ve nikotik asidin içeriği çeşitli örneklerde analiz edilmiştir. Ayrıca, sonuçlar yüksek kaliteli kökün 6 mg / g'dan fazla alkamid içerdiğini, kök ve yer üstü kısımları için de chicoric asit içeriğinin 15 mg / g'den fazla olarak kabul edildiğini göstermiştir. Ek olarak, her zaman bitkinin yer üstünde kalan bölümleri bir alkamid kaynağı olarak değerlendirilmemektedir. Reklam pazarı için, minimum bir standart seviye olarak alkamidler için üç mg / g ve ayrıca kikirik asit için beş mg / g olarak kabul edilebilirdir. Ayrıca, polisakaritler ve poliasetilenler, glikoproteinler ile birlikte, benzer şekilde bitkinin yer üstü bölümlerinden de elde edilebilmektedir (Wills ve Stuart, 1999).

### 2.2. Antimikrobiyal Etkinlik

Aslında, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*' a karşı antibakteriyel aktivite, *E. purpurea* kök ekstraktı da

dâhil olmak üzere çoklu bitkisel preparat için gösterilmiştir. Bununla birlikte, deneysel literatür antibakteriyel etkilerin, bileşenlerden birine atfedilebileceğini belirtmektedir (Westendorf, 1982).

Locatelli ve arkadaşları (2018), yirmi bir tür bakteriye karşı disk difüzyon yaklaşımı kullanarak *Asphodeline liburnica* kökü ekstraktları için antimikrobiyal değerlendirme yapmışlardır. Ek olarak, *A. liburnica* kökü ekstraktlarının antiseptik aktivitesi, *Sarcina lutea* (ATCC 9341) suşlarına karşı sadece yüz mg ekstrakt olarak bulunmuştur (Locatelli ve ark. 2018).

### **2.3. DNA Koruma**

Meslektaşımızın çalışmasında, DNA koruma deneyi, *Bidens tripartita* ekstraktlarının iki farklı konsantrasyonda (5 ve 10 mg / mL) etkisinin saptanması için Fenton'un oksidatif bir ajan olarak reaksiyonundan yararlanarak plazmid vektör pUC19 üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüm *Bidens tripartita* ekstraktlarının, pUC19 plazmidinin aşırı sargılı formunu yüzde yetmiş ile koruduğunu bulmuşlardır (Uysal ve ark., 2017).

Bir diğer çalışmada ise, Fenton'un tepkisini kullanan tüm kinolin türevlerine karşı bir DNA koruma testi uygulanmıştır. Ayrıca, sentezlenen bileşikler de çeşitli biyolojik aktiviteler açısından incelenmiştir. Ek olarak, iki bileşiğin DNA'ya bağlanma için büyük kapasiteye sahip olduğu, diğer çeşitli bileşiklerin ise incelenen konsantrasyonların hiçbirinde gerekli plazmid DNA'sı boyunca koruyucu bir aktivite göstermediği bulunmuştur (Jaballah ve ark., 2018).

### **2.4. Antikanser**

Hücre kültürlerinden elde edilen *E. purpurea* bitkisinin bir polisakarit fraksiyonunun, tümör kemoterapisinin olumsuz etkilerini en aza indirmeye üzerindeki etkilerini, lökovorin, etoposid ve ayrıca 5-floroürasil palyatif tedavi alan ileri gastrik tümör yoluyla hastalarda araştırıldığı ortaya konan birçok araştırma vardır (Melchart ve ark., 2002). Bu deneysel araştırmaların Ekinezya aracılığıyla sayısız olumlu bulguyu belgelemiş olmasına rağmen, gözlemlenen araştırma bilgilerinin doğasının



tasarlanması ve bu nedenle bu alanda daha fazla deneysel araştırma yapılması gerektiğinden kesin bir sonuç çıkarılamamıştır.

Başka bir araştırma, bitki ekstraktının iki gün sonra konsantrasyona bağlı durumlarda hem insan kolonu tümör hücre hatları Caco-2'yi hem de HCT-116'yı inhibe ettiğini belgelemiştir. Ayrıca, chicoric asit, apoptozun moleküler mekanizması yoluyla farz edilen HCT-116 hücre hattında telomeraz aktivitesini en aza indirmiştir (Tsai ve ark., 2012).

Ayrıca, üç çeşitten elde edilen n-heksan özü bitki kökleri, anti-tümörün potansiyel etkisi göstermiştir. Aslında, tüm 3 çeşit, doza ve zamana bağlı bir yaklaşımda hücrelerin canlılığını en aza indirmiştir (Chicca ve ark., 2007).

Yerlikaya ve arkadaşları, *O. natrix* sitotoksik maddenin, MTT hücresi canlılığı tahlili ile belirlenen HeLa hücreleri ve PC3 hücreleri üzerinde etki ettiğini belgelemiştir (Yerlikaya ve ark., 2017).

## **2.5. Çalışmanın Amacı**

Bu araştırma çalışması, Ekinezya'nın yaprak ve çiçeği için anti-tümör, antimikrobiyal ve farklı ekstraktların (su, metanol ve etil asetat) DNA korumasını incelemek için tasarlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Bitki Materyalleri

Ekinezya çiçeği ve yaprakları Türkiye'den toplanmıştır.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

###### Antimikrobiyal etkinlik için kullanılan kimyasallar

- Dezenfeksiyon için %70 etanol kullanılmıştır.
- Bakteri üremesi için besin maddesi agarı ve LB besiyeri (Luria-Bertani) kullanılmıştır.
- Numune seyreltimi için DMSO (dimetil sülfoksit) ve distile su kullanılmıştır.

###### Bakteriyel Suşlar

Bakteriyel suşlar, Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. Ekinezya ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği, gram pozitif ve negatif olanlar dâhil yirmi bir bakteri suşuna karşı incelenmiştir. Bu bakteriler, Tablo 3.1'de sunulan şekilde gram boyamaya göre sınıflandırılmıştır.

Tablo 3.1. Farklı bakteri türleri listesi

No	Mikroorganizmanın adı	Gram türü
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	(+)
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	(+)
3	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	(-)
4	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 10015	(+)
5	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	(+)
6	<i>Salmonella typhimurium</i> NRRLE 4463	(-)
7	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 1501	(-)
8	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	(-)
9	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25212	(+)

Tablo 3.1'in devamı

10	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(+)
11	<i>Proteus vulgaris</i>	(-)
12	<i>Escherichia coli</i>	(-)
13	<i>Serratia marcescens</i>	(-)
14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(+)
15	<i>Staphylococcus alpha haemolyticus</i>	(+)
16	<i>Enterococcus faecium</i>	(+)
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)
18	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	(+)
19	<i>Enterococcus durans</i>	(+)
20	<i>Salmonella kentucky</i>	(-)
21	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	(-)

### DNA Koruma Etkinliği için Kullanılan Kimyasallar

- Thermo Fisher Scientific Gene JET Plazmid Miniprep Kiti (süspansiyon çözeltisi; lizis çözeltisi; nötrleştirme çözeltisi) ve ilave olarak yıkama çözeltisi ve elüsyon tamponu
- Fenton reaktifi (0.03 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0.088 g askorbik asit; ve 0.12976 gr FeCl<sub>3</sub>)
- 0.8 % 1X TAE buffer ile karıştırmış agaroz jeli
- Tüm karışıma eklenen DNA yükleme boyası

### Hücre Kültürü için Kullanılan Kimyasallar

Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü tarafından sağlanan HeLa (servikal tümör hücre çizgisi), % 1 penisilin-streptomisin (Pen-Strep), % 10'luk fetal sığır serumu (FBS) ve % 1 esansiyel olmayan amino asit içeren Dulbecco'nun modifiye eagle Besiyerinde (DMEM) kültüre edildi. Ek olarak, hücreleri yüzeyden çıkarmak için fosfat tamponlu salin (PBS) ve tripsin kullanılmıştır. Ekstrakt hazırlanması için saf DMSO ve 1/10 DMSO ve ayrıca, (250 ml FBS; 49.750 ml DMEM; 0.025 gm MTT tozu) içeren MTT çözeltisi, yüzde üç sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 40 mM HCl / izopropanol de kullanılmıştır.

### 3.1.3. Araçlar

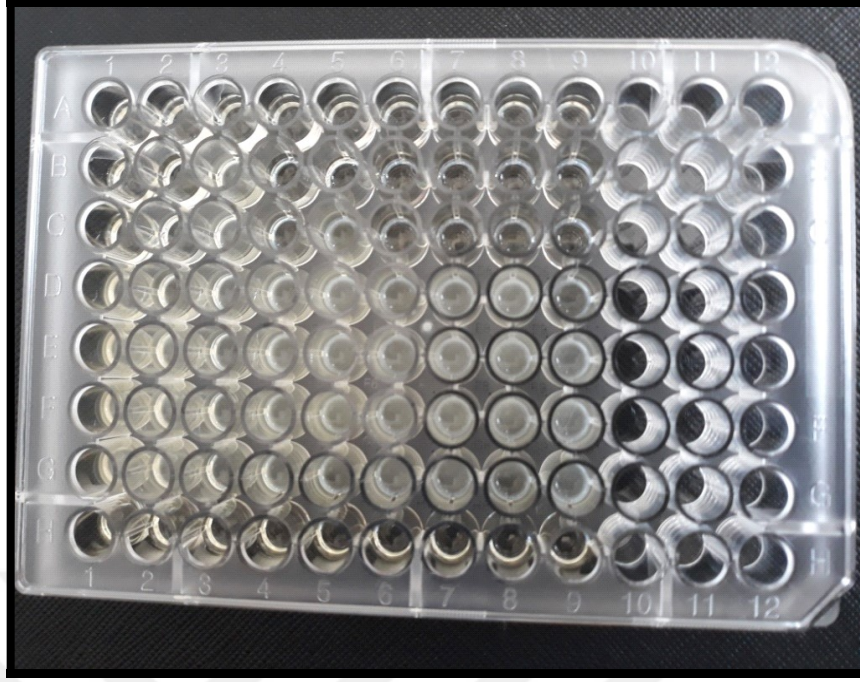
#### Antimikrobiyal etkinlik için kullanılan araçlar

- Steril petri kapları
- Steril iğne
- Pipet (Eppendorf, Almanya)
- Mikropipet uçları (100 µl ve 1000 µl)
- Steril cam tüpler
- 96 hücreli mikrotiter plakalar (Fotoğraf 3.2)
- Eppendorf tüpü (Isolab, Almanya)
- Otoklav
- Güvenlik kabini
- McFarland cihazı
- İnkübatör (Nuve, Türkiye)
- Çalkalayıcı (Biosan, Letonya)
- Spektrofotometre (Fotoğraf 3.1) (Thermo Scientific, Multiskan Go-Finlandiya)

#### Antimikrobiyal etkinlik için kullanılan araçların fotoğrafları



Fotoğraf 3.1. Ultraviyole Görünür Spektrofotometre



Fotoğraf 3.2. 96 hücreli mikrotiter plakalar

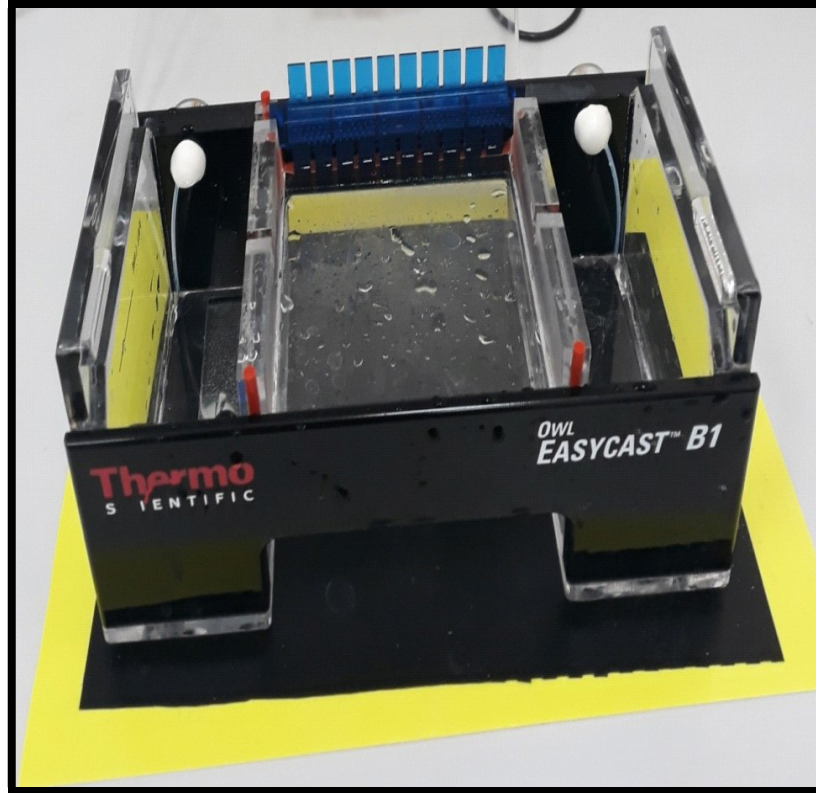
### **DNA Koruma Etkinliği için Kullanılan Araçlar**

- Eppendorf tüpü (Isolab, Almanya)
- Pipette (Eppendorf, Almanya)
- Gene JET Döndürme Sütunları (Thermo scientific-ABD)
- İnkübatör (Nuve, Türkiye)
- Santrifüj (Fotoğraf 3.3) (Hettich, Fransa)
- Mikro santrifüj (Star lab, Kore)
- Spektrofotometre (Thermo scientific, Multiskan Go, Finlandiya)
- Elektroforez (Fotoğraf 3.4) (Thermo scientific, ABD)
- Çalkalayıcı (Fotoğraf 3.5) (Biosan, Letonya)

## DNA Koruma Etkinliği için Kullanılan Araçların Fotoğrafları



Fotoğraf 3.3. Santrifüj



Fotoğraf 3.4. Elektroferez



Fotoğraf 3.5. Çalkalayıcı

### Hücre Kültürü için Kullanılan Araçlar

- Serolojik pipet
- Steril Petri Kapları
- İnkübatör (Fotoğraf 3.6) (Nuve, Türkiye)
- 96-hücreli plakalar
- Hücre sıyırıcı
- Santrifüj (Hettich, Fransa)
- Pipet (Eppendorf, Almanya)
- Ters mikroskop (Fotoğraf 3.7)
- Hemositometrik
- Çalkalayıcı (Biosan, Letonya)
- Mikroplaka Spektrofotometresi (Thermo Scientific, Multiskan Go, Finlandiya)



Fotoğraf 3.6. % 5 karbondioksit içeren inkübatör



Fotoğraf 3.7. Hemasitometre sayımı için ters mikroskop



## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Bitki Materyali Ekstraksiyonu

Su, metanol ve etil asetat ekstraktları elde etmek için, havayla kurutulan parçacıklar (10 g) bir gün boyunca 25°C oda sıcaklığında 200 mL bu çözücülerle yumuşatılmıştır. Ayrıca, döner buharlaştırıcı, ekstraktları 40°C'de yoğunlaştırmak için kullanılmıştır. Su ekstraktını elde etmek için, toz haline getirilmiş numuneler yarım saat boyunca 250 mL damıtılmış su ile kaynatılmıştır. Bunun yanında, bir sulu ekstrakt iki gün boyunca filtre ve liyofilize edilmiş (- 80°C) ve tüm ekstraktlar, kullanılabildiği kadar 4 ° C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Ek olarak, her 100 mL'lik ekstrakt, deneye başlarken 900 mL DMSO içerisinde çözündürülmüştür.

### 3.2.2. Bitki Ekstraktının Kimyasal İçeriğinin Tanımlanması

Bu deneysel çalışma, bir G1315B diyot dizisi detektörü (Agilent Techy) içeren bir Agilent Serisi 1100 HPLC çerçevesi ve bir elektrosprey arayüzü vasıtasıyla bir iyon tuzağı kütle spektrometresi (Esquire 6000, Bruker Daltonics) ile yapılan Kromatografik analizlerle gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, ayırma bir Luna Omega Polar C18 analitik kolonunda (150 x 3.0 mm; ve beş µm parçacık büyüklüğü) her ikisi de Phenomenex'ten satın alınmış bir Polar C18 Security Guard kartuşuyla (4 x 3,0 mm) yapılmıştır. Ayrıca, kromatografik ve kütle spektrometrik koşulları daha önce tarif edilmiştir (Llorent-Martínez ve ark. 2018). Ek olarak, bileşik sınıflandırma kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmiş ve niceliklendirme amacıyla UV kullanılmıştır.

### 3.2.3. Antimikrobiyal Etkinlik Testi

Minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) belirlemek için mikrodilüsyon yaklaşımı kullanılmıştır ve birkaç bakteri suşuna karşı antimikrobiyal etkiniği kontrol etmek için su, metanol, etil-asetat gibi farklı Ekinezya ekstraktlarının yaprak ve çiçeklerine yönelik *in vitro* olarak uygulanan minimum bakteri öldürücü konsantrasyon (MBC) yöntemi tercih edilmiştir.

## **Kültür Ortamının Hazırlanması**

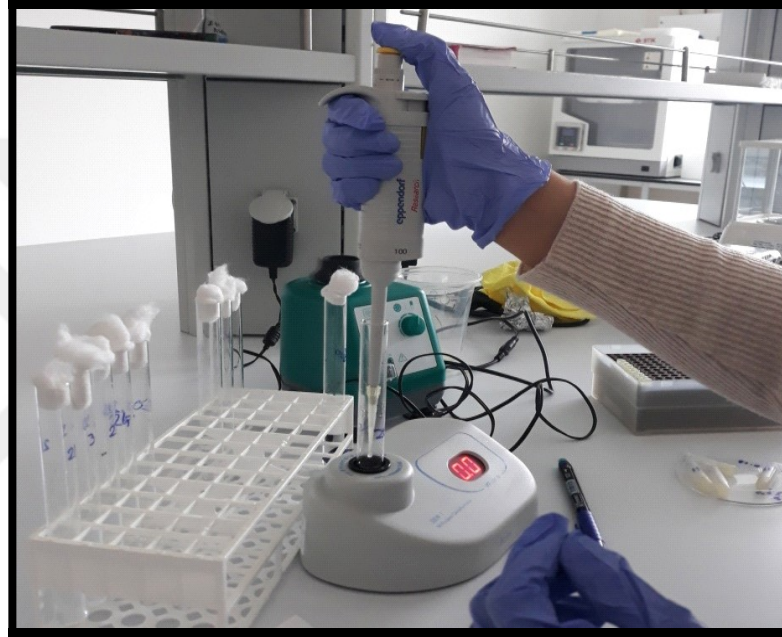
Ortam, talimatlara göre hazırlanmıştır. Kısaca, 23 g besin agarı 1000 mL damıtılmış su içinde çözülmüş ve otoklavda 121°C'de sterilize edilmiş ve 15 dakika boyunca hava ağırlığı ile sterilize edilmiştir. Tüm ortam 45-60°C'ye soğutulmuş ve 25 mL'si bir petri kabına doldurulmuş ve kirlenmeyi önlemek için güvenlik kabini içinde oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır. Bakterilerin Petri kaplarına sterilize edilmiş iğne ile kültürlenerek 37 ° C'de bir gün kuluçkada bırakılmıştır.

Daha sonra, 25 g 1 litre damıtılmış suda çözülmüş ve besin agarıyla aynı adımları takip eden talimatlara göre hazırlanan LB besiyerinde yenilenmişlerdir. Bir mL LB besiyeri, eppendorf tüpüne pipet kullanarak ilave edilmiş ve sterilize iğne ile toplandıktan sonra bakteri kolonilerine transfer edilmiştir. Numuneler bakteri sayısına göre numaralandırıldı ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

## **Minimum inhibitör konsantrasyonun ve minimum bakterisidal konsantrasyonun belirlenmesi**

96 hücreli mikrotiter plakalar kullanılarak seri seyreltme tekniği ile gerçekleştirilen mikrodilüsyon yaklaşımı gerçekleştirilmiştir. Bütün bakteri türleri otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra 10 mL damıtılmış su içeren numaralı cam tüplerde kullanılmıştır. Aslında, pipet kullanılarak Fotoğraf 3.8'de gösterildiği gibi konsantrasyon 0,5 McFarland standart bulanıklık ayarı için bakteri süspansiyonlara ve kontrol olarak saf suya eklenmiştir. Kontaminasyonu önlemek için camlar kapatılmıştır. 6 plaka, bir plakanın spesifik ekstrakte karşılık geldiği harfler ve sayılarla etiketlenmiştir. Örneğin, B1 çiçek su ekstraktı anlamına gelmektedir. Her hücre, LB bulyonundan 100 µg / mL ve çeşitli konsantrasyonlara (500, 250, 125,62.5, 31.25, 15.62 µg / mL) kadar 100 µg / mL seyreltilmiş ekstrakt içermektedir. İlk hücrede 500 µg / mL ile başlanmış ve seri seyreltmeden 100 µg / mL, arka arkaya altı kuyucuğa aktarılmıştır, sadece besiyeri içeren negatif kontrol hariç, inokülümünden 10 mL ile karıştırılmıştır. Pozitif kontrol ise ortam ve bakterilerden oluşturulmuştur. Son olarak, plakalar steril bir plaka ile kaplanmış ve bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Ayrıca, mikroorganizmaların büyümesini engelleyen en düşük bitki özü konsantrasyonunu temsil eden MİK değerleri ile MBC

ise alt kültür yaklaşımı ile belirlenmiştir (Karaman ve ark., 2003). Ek olarak, bu hücrelerden elde edilen numunelerden oluşturulan alt kültürler gözle görülür bir bulanıklık göstermemişlerdir, aksi halde taze hazırlanmış besin agarı plakalarında MİK tahlillerinde büyüme meydana gelmiştir. Aslında, bir günlük inkübasyondan sonra, MBC ekstraktın düşük konsantrasyon derecesi olarak kabul edilmiştir. Bu, kullanılan agar plaka yüzeyinde herhangi bir büyümeye izin vermediğini göstermektedir. (Sen ve Batra 2012).



Fotoğraf 3.8. Bakteriyel süspansiyonların McFarland konsantrasyonu ile ayarlanması

#### 3.2.4. DNA Koruma Testi

Ekinezya ekstraktlarını DNA koruması, pUC19 plazmidi (pDNA) kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca, Thermo Scientific Gen jet Plazmid Miniprep Kiti ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. Bunun yanında, Fenton'un reaktif reaksiyonu, Ekinezya yaprağı ve çiçek ekstraktlarının DNA koruma etkinliğini analiz etmek için kullanılmıştır. Fenton reaksiyonunun karışımı, 0.03 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.088 g askorbik asit ve 0.12976 g FeCl<sub>3</sub>'ten oluşturulmuştur. Aslında, analiz reaksiyonu, iki farklı konsantrasyonda (10 ve 50 mg / mL) 5 µL Fenton reaksiyon karışımı, bir 1µL pDNA 320 ng ve beş 1 µL bitki Ekinezya ekstraktından meydana gelmiştir. Nihai reaksiyon karışımı hacmi, distile su kullanılarak 20 µL'ye çıkarılmıştır. Ayrıca, 14 µL distile sudan, 5 µL Fenton'ın 1 µL pDNA 320 ng ile reaktifinden oluşan pozitif kontrol elde

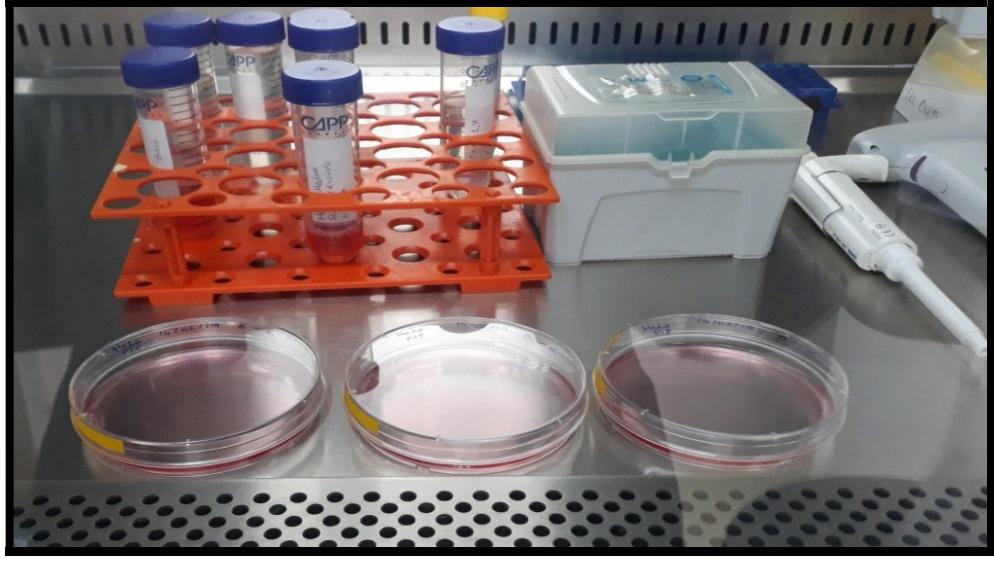
edilmiştir. Negatif kontrol sadece 1 µL pDNA 320 ng ve 19 µL distile sudan elde edilmiştir. Ayrıca hazırlanan karışımlar, 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ek olarak, inkübasyondan sonra, 4 µl yükleme boyası bütün karışımlarla karıştırılmış ve 50 mL 1X TAE tamponu ve 2.5 µl kırmızı güvenli nükleik asit lekelemesi ile 0.4 gr agaroz jeli üzerinde gerçekleştirilmiştir (Yerlikaya ve ark., 2017). Ayrıca, numuneden 24 µL, 45 dakika boyunca 100 voltluk her elektroforez bandına ilave edilmiştir. DNA bandının yoğunlukları, jel resim analiz yazılımı (Quantum, Vision-Capt., Vilber Lourmat SAS, Fransa) kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.2.5. Sitotoksik Aktivite Testi

#### Hücre Kültürü Bakımı

HeLa (servikal tümör hücre hattı) hücreleri, % 50 µL % 1 penisilin-streptomisin (Pen-Strep), % 5 10% 10 (FBS) fetal bovin serumu ve % 100 1% 1 alt amino asit içeren 50 mL DMEM çözeltilisinde kültürlenmiştir. Ortam - 4 °C'de sabitlenmiştir. Ek olarak, HeLa hücre hatları, hücre çoğalması % 80'e ulaşana getirene kadar 37 ° C'de % 5 karbon dioksit seviyesinde bir inkübatörde yetiştirilmiştir. Ayrıca, deney hücrelerinin büyümesi 96 hücreli hücre kültürünün plakalarına yerleştirilmiş ve steril petri kaplarında stok hücrelerin çoğalması yapılmıştır. Ek olarak, logaritmik hücrelerin büyüme evresi sırasında, tohumlanma yapılmış ve deney için alt kültürlenme gerçekleştirilmiştir.

Plakalarda konflüans meydana geldiğinde, hücreler, 2 mL PBS ile yıkanmış ve 37 ° C'de beş dakika 2 mL 1X tripsin ile işlenmiş ve sıyrılmıştır. Santrifüjleme, hücreleri 2.000 rpm'de beş dakika boyunca çöktmek için kullanılmıştır. Tüm ortam süspansiyon haline getirildikten sonra, Fotoğraf 3.9 da gösterildiği gibi üç plakaya bölünmüşlerdir. HeLa hücreleri, 37°C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren bir inkübatörde 7 mL ortam içeren plakalarda yetiştirilmiştir. Stok hazırlama için, hücreler -80°C'de dondurucu ortamda tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.



Fotoğraf 3.9. HeLa hücreleri içeren üç ortam plakası

### **Bitki Ekstraksiyonunun Hazırlanması**

Seyreltme yoluyla 1 mg / ml'lik ekstakt konsantrasyonu elde edilmiştir. Su ekstaktı 1/10 DMSO / su içinde çözülmüş, metanol ve etil asetat ekstaktları 1/10 DMSO ve saf DMSO içinde çözülmüştür. Ek olarak, sterilize edilmiş filtre çözülmüş özler üzerinde gerçekleştirilmiş ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

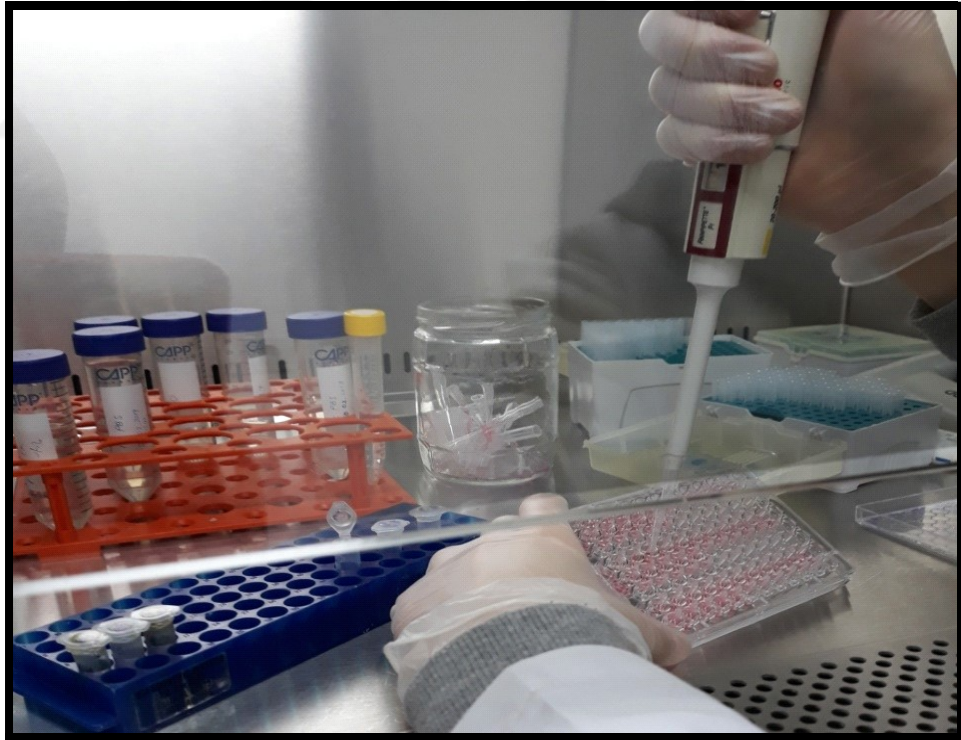
### **MTT Tabanlı Sitotoksisite Testi**

On bin HeLa tümör hücresi, 96 hücresi plakalara ekilmiş, hemositometrik, 5  $\mu\text{L}$  seyreltilmiş hücreleri 45  $\mu\text{L}$  PBS ile hesaplamak için kullanılmış, daha sonra büyümeleri için 24 saat her çukura 100  $\mu\text{L}$  eklenmiştir. Konflüans gerçekleştikten sonra hücreler, aşağıdaki Fotoğraf 3.10'da gösterildiği gibi farklı dozlarda çiçek ve yaprak Ekinezya ekstraktlarından (1000, 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) 100  $\mu\text{L}$  ile muamele edilmiş ve 24 saat ve 48 saat inkübe edilmiştir. Seri konsantrasyonun son hacmi her bir hücrede 100  $\mu\text{L}$ 'dir, bu süreç üç kez tekrarlanmıştır. Ekinezya ekstaktı muamelesinden sonra, ortam aspire edilmiş ve 100 mL MTT çözeltisi (250 ml FBS, 49.750 ml DMEM, 0.025 g MTT tozu) ile değiştirilmiştir. Plakalar dört saat  $37^{\circ}\text{C}$ 'de % 5  $\text{CO}_2$ 'de inkübe edilmiştir. MTT içeren ortam aspire edilmiş ve 10  $\mu\text{L}$  % 3 SDS ilave edildi ve 15 dakika çalkalayıcıda tutulmuş, MTT-formazan kristallerini eritmek için 50  $\mu\text{L}$  40 mM HCl / izopropanol çözeltisi ilave edilmiştir

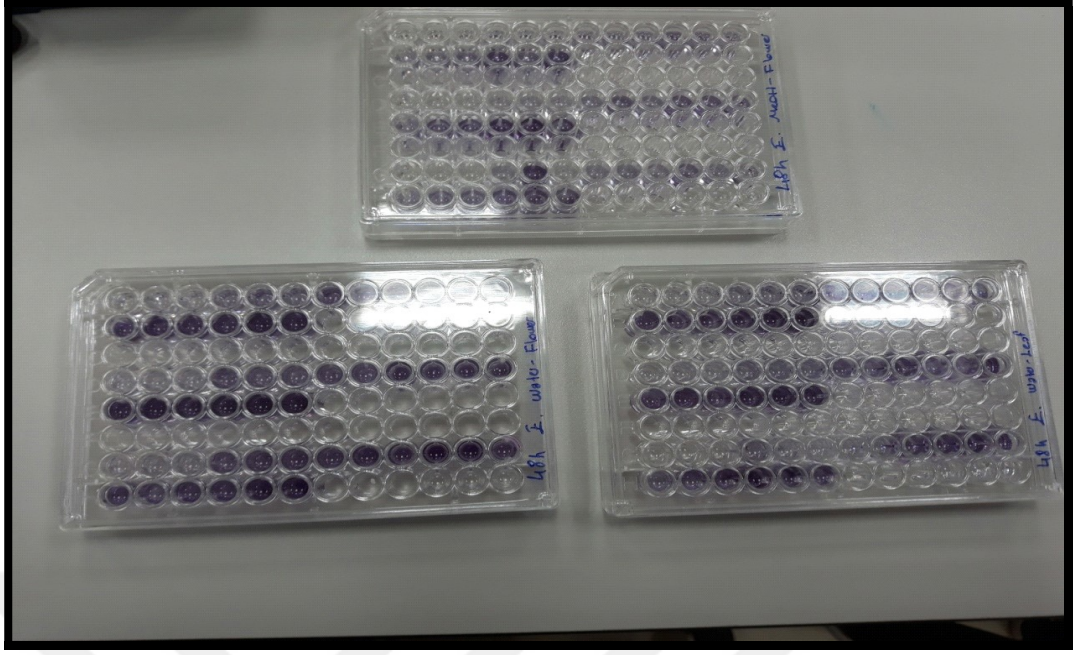
(Yerlikaya ve ark., 2017). Çözelti karıştırılmış ve hücrede 30 µL bırakılmıştır. Yüz seksen µL seyreltme çözeltisi (4,4 mL% 3 SDS + 22 mL 40 mM HCl / izopropanol) eklenmiştir. Aşağıdaki Fotoğraf 3.11, formazan kristallerinin mor rengini göstermektedir. Absorbans, mikropılaka spektrofotometresi. (Multiskan Go; Thermo Scientific; ABD) kullanılarak 570 nm'de belgelenmiştir.

### **Yarı-Maksimum İnhibitör Konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) Tayini**

HeLa servikal tümör hücrelerinde Ekinezya'nın (su, metanol ve etil asetat) ekstraktlarının IC<sub>50</sub>'sini belirlemek için MTT hücre canlılık test analizi gerçekleştirilmiştir. IC<sub>50</sub> değeri, bir Graph Pad Prism 7.00 programı aracılığıyla bir sigmoidal doz-cevap eğrisi için bilgiler kullanılarak hesaplanmıştır. Ek olarak, IC<sub>50</sub> değerleri (yüzde elli etki seviyesinde engelleyici konsantrasyon) Tablo 4.9'da gösterilmiştir.



Fotoğraf 3.10. Hücreler, çeşitli çiçek ve yaprak Ekinezya ekstraktları dozlarından 100 µL ile muamele edilmiştir



Fotoğraf 3.11. MTT tahlili, HeLa hücrelerine 48 saat inkübe edilen ekstraktlar için asit ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek uygulanmıştır

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Bitki Ekstraktlarının Bileşimi

Aslında, bu araştırma, kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit, isorhamnetin, kaempferol, kersetin ve rutin gibi analitik standartları olan bileşiklerin tanımlanmalarına dayanmaktadır. Genel olarak, sınıflandırma aşağıda Tablo 4.1'de sunulan parçalanmış moleküler iyonları ve kütle parçalanmalarını kullanarak kütle spektrumlarına dayandırılmıştır. Aşağıda belirlenen bileşikler için kısa açıklamalar yapılmıştır.

#### 1. Fenolik Asitler

Aslında bileşik iki,  $m/z$  153'de dihidroksibenzoik asit verecek şekilde 162 Da (heksosid) nötr kaybı göstermiş, daha sonra yukarıda belirtilen heksosid ile karakterize edilmiştir.

Bununla birlikte, bileşik üç,  $m/z$  311'de,  $m/z$  149'da zirvede (tartarik asit),  $m/z$  179 ve 139'da (kafeik asit) fragman iyonlarına ek olarak ayrıştırılmış moleküler iyon göstermiş, sonuç olarak caffeoyltartarik asit (kaftarik asit) olarak kabul edilmiştir (Barros ve ark., 2013). Ek olarak, 162 Da (caffeoyl), sekiz ve dokuz bileşikleri, Ekinezyada yaygın olan dikaffeoyltartarik aside karşılık gelmiştir. Bu nedenle, bileşik dokuz, düzenli olarak en bol bulunan doğal bileşik olan kronik asit (2,3-O-dikaffeoyltartarik asit) olarak karakterize edilmiş, diğer taraftan bileşik sekiz, izomer, mezo-kronik asit olarak tanımlanmıştır (Lee ve Scagel, 2013).

Ek olarak, bileşik onbeş [M-H]  $m/z$  457'in yanı sıra kafeik asit, kumarin asit ( $m/z$  163 ve 119) caffeoil, koumaroil kısımlarına karşılık gelen bir fragmentasyon paterni göstermiş ve tartarik aside ek olarak  $m/z$  295, 163 ve aynı zamanda 119'da MSn fragman iyonları vasıtasıyla 146 Da (koumaroil), 162 Da (caffeoil) nötr kaybı sergilemiştir.



Bununla birlikte, bileşik altı, analitik standart yoluyla ve karşılaştırma yoluyla klorojenik asit olarak tanımlanmıştır. Bileşik on altı ve on dokuz,  $m/z$  515'te ayrıştırılmış moleküler iyon ve  $m/z$  353'te baz tepe noktası yoluyla sırasıyla 3,5-dikaffeoilkinik asit ve 4,5-dikaffeoilkinik asit olarak tanımlanmıştır (Clifford ve ark., 2005).

Bileşik on beşin fragmantasyonu, kafeik asit, kumarik asit ve tartarik asit kısımlarının mevcudiyeti ile tutarlı çıkmış, bu nedenle koumaroilkafeoil tartarik asit (koumaroil-kaftaik asit) olarak kategorize edilmiştir. Benzer şekilde, bileşik on sekiz, feruloilkafeoil tartarik asit olarak sınıflandırılmıştır (Ma ve ark., 2014).

## 2. Flavonoidler

Genel olarak, bileşik on ve on bir, 308 Da (rutin) ve 162 Da (heksosid) 'in  $m/z$  301'de kersetin verimine karşı nötr kaybı görmüş, bu nedenle sırasıyla rutin (kersetin-3-O-rutinosid) ve Kersetin O-heksosid olarak sınıflandırılmıştır. Ek olarak, kesin tanımlama için analitik bir rutin standardı da kullanılmıştır.

Bununla birlikte, üç kaempferol glikozit, örneğin, rutinosid, heksosid kısımları ve  $m/z$  285'te kaempferol varlığına dayalı bileşik 12, 13 ve 17' ye ait bileşikler kategorize edilmiştir. Son bir nokta olarak, bileşik on dört, bir izorhamnetin ( $m/z$  315  $\rightarrow$  300) rutinosid ile karakterize edilmiştir.

## 3. Diğer Bileşikler

Aslında,  $m/z$  341'de [M-H] - olan bileşik 162 Da' da (heksosid) nötr kaybına uğramış ve  $m/z$  179;161; 173; 119; 113 'de fragman iyonları sergilemiş, heksosid kısımlarının bir sonucu olarak, bir disakarit (iki heksosid kısmı) olarak sınıflandırılmıştır. Ek olarak, dördüncü ve beşinci bileşikler ayrıca heksosid parçakarı da sergilemişler ve geçici olarak türevler olarak nitelendirilmişlerdir.

Öte yandan, bileşik yedi, literatür bilgilerine dayanarak, geçici olarak benzil alkol heksoz pentoz olarak sınıflandırılmıştır (Bystrom ve ark., 2008).

Ayrıca, HAE metanol hariç tüm ekstraktlarında iki oksilipin sınıflandırılmıştır. Ek olarak, bileşik otuz beş ve otuz sekiz, trihidroksi-oktadekenoik asidin yanı sıra okso-dihidroksi-oktadekenoik aside karşılık gelmiştir (Van Hoyweghen ve ark., 2014).

#### 4. Fenolik Miktar Tayini

Kafeik asit, klorojenik asit, kaempferol, kersetin ve rutin gibi en çok kullanılan bileşiklerin (yarı) miktarının belirlenmesi için aşağıdaki standartlar kullanılmıştır. Deneysel olarak, bu çalışmada 0.2-50 mg mL<sup>-1</sup> aralığında kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Fenolik asitler ve flavonoidler, her bir kimyasal familyaya karşılık gelen analitik standart kullanılarak sırasıyla 320 ve 350 nm'de ölçülmüştür. Ek olarak, toplam bireysel fenolik içerik (TIPC), ölçülen fenolik bileşiklerin toplamı olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, sonuçlar Tablo 4.2'de sunulmaktadır.

Aslında, fenolik asitler çiçek ekstraktlarının yanı sıra çiçeklerde Toplam fenolik miktarının (TIPC) yüzde doksanından fazlasını temsil etmektedir. TIPC hem çiçeklerde hem de yaprak ekstraktlarında aynı olduğu görünse de, yapraklarda biraz daha yüksek orandadır. En bol miktarda bulunan bileşikler, yaprak ekstraktlarında gözlenen en yüksek konsantrasyonlarla dikaffeoil tartarik asitlerdir (bileşikler sekiz ve dokuz).

*E. purpurea*'nın toprak üstündeki kısımlarıyla ilgili bir çalışmada (Konar ve ark., 2014), 0.3 ve 0.0016 mg g<sup>-1</sup> DE'den düşük kafetarik asit ve klorojenik asit konsantrasyonları belgelenmiştir. Ancak bu araştırma çalışmasında, analiz edilen ekstraktlarda her iki bileşik de belirlenmiştir. Ek olarak, burada gözlenen kronik asit ve izomerinin seviyeleri daha önce *E. purpurea*'da belgelenen konsantrasyonlar aralığındadır (Wills and Stuart, 1999).

Tablo 4.1. *E.purpurea*'nın analiz edilen ekstraktlarında bulunan bileşiklerin karakterizasyonu

No.	$t_R$ (min)	[M-H] <sup>-</sup> $m/z$	$m/z$ (% baz tepe)	Belirlenen Tanımlama	Çiçek	Yaprak
1	1,7	341	MS <sup>2</sup> [341]: 179 (100), 161 (26), 143 (48); 131 (6); 119 (89); 113 (30)	Disakkarit	✓	✓
2	3,7	315	MS <sup>2</sup> [315]: 153 (100); 109 (14)	Dihidroksibenzoik asit heksosid		✓
3	6,1	311	MS <sup>2</sup> [311]: 179 (54); 149 (100); 135 (3)	Kaftarik asit	✓	✓
4	6,9	349	MS <sup>2</sup> [349]: 187 (56), 179 (100), 161 (98), 143 (63), 119 (56), 113 (27)	Heksoz türevi	✓	✓
5	7,5	349	MS <sup>2</sup> [349]: 187 (52); 179 (80); 161 (100); 143 (33); 119 (50); 113 (38)	Heksoz türevi	✓	✓
6	8,7	353	MS <sup>2</sup> [353]: 191 (100)	Klorojenik asit	✓	✓
7	9,7	401	MS <sup>2</sup> [401]: 269 (100), 161 (13)  MS <sup>3</sup> [401→269]: 161 (100)	Benzil alkol heksoz pentoz	✓	✓
8	15,7	473	MS <sup>2</sup> [473]: 311 (100); 293 (76); 179 (16); 149 (16)  MS <sup>3</sup> [473→311]: 179 (46); 149 (100); 135 (6)	<i>Meso</i> -chicoric asit	✓	✓
9	19,2	473	MS <sup>2</sup> [473]: 311 (100); 293 (49); 179 (8); 149 (19)  MS <sup>3</sup> [473→311]: 179 (36); 149 (100); 135 (7)	Chicoric asit	✓	✓
10	19,6	609	MS <sup>2</sup> [609]: 301 (100)  MS <sup>3</sup> [609→301]: 271 (57); 255 (36), 179 (100); 151 (55)	Rutin	✓	✓

Tablo 4.1'in devamı

11	20,9	463	MS <sup>2</sup> [463]: 301 (100) MS <sup>3</sup> [463→301]: 179 (100); 151 (45)	Kersetin- <i>O</i> -hexoside	✓	
12	21,5	593	MS <sup>2</sup> [593]: 285 (100); 284 (48) MS <sup>3</sup> [593→285]: 257 (39), 255 (100), 241 (49), 227 (35)	Kaempferol- <i>O</i> -rutinosit	✓	✓
13	22,9	593	MS <sup>2</sup> [593]: 285 (100) MS <sup>3</sup> [593→285]: 257 (100)	Kaempferol- <i>O</i> -rutinosit	✓	✓
14	22,9	623	MS <sup>2</sup> [623]: 315 (100) MS <sup>3</sup> [623→315]: 300 (100), 271 (19)	Isorhamnetin- <i>O</i> -rutinosit	✓	✓
15	23,9	457	MS <sup>2</sup> [457]: 311 (8), 295 (100), 293 (55), 163 (11) MS <sup>3</sup> [457→295]: 219 (32), 163 (100) MS <sup>4</sup> [457→295→163]: 119 (100)	Coumaroyl caffeoyl tartarik asit	✓	✓
16	24,2	515	MS <sup>2</sup> [515]: 353 (100), 191 (12) MS <sup>3</sup> [515→353]: 191 (100), 179 (39), 173 (11), 135 (14)	3,5- dikaffeoilkinik asit	✓	
17	24,2	447	MS <sup>2</sup> [447]: 285 (100) MS <sup>3</sup> [447→285]: 255 (100)	Kaempferol- <i>O</i> -hexoside	✓	
18	25,3	487	MS <sup>2</sup> [487]: 325 (100), 307 (47), 293 (45), 193 (33), 179 (33) MS <sup>3</sup> [487→325]: 193 (100) MS <sup>4</sup> [487→325→193]: 149 (100), 134 (97)	Feruloil Caffeoyl Tartarik asit	✓	✓

Tablo 4.1'in devamı

19	25,9	515	MS <sup>2</sup> [515]: 353 (100) MS <sup>3</sup> [515→353]: 191 (39), 179 (48), 173 (100), 135 (26)	4,5- dikaffeoilkinik asit	✓	
20	30,3	387	MS <sup>2</sup> [387]: 225 (12), 207 (100), 163 (52)	Bilinmeyen	✓	✓
21	39,2	327	MS <sup>2</sup> [327]: 291 (67), 229 (91), 211 (42), 171 (100)	Okso-dihidroksi- oktadekenoik asit		✓
22	40,6	329	MS <sup>2</sup> [329]: 311 (26), 229 (88), 211 (66), 171 (100)	Trihidroksi- oktadekenoik asit	✓	✓

Tablo 4.2. *E. purpurea*'daki ana bileşiklerin miktarının belirlenmesi

N°	Standartlar	mg/g DE	
		Çiçek	Yaprak
<i>Fenolik asitler</i>			
3	Kaftarik asit	0,65 ± 0,04	0,61 ± 0,04
6	Klorojenik asit	0,47 ± 0,03	0,17 ± 0,01
8	<i>Meso</i> -chicoric asit	2,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1
9	Chicoric asit	4,2 ± 0,2	4,9 ± 0,2
15	Coumaroyl caffeoyl tartarik asit	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,02
18	Feruloil Caffeoyl Tartarik asit	0,45 ± 0,03	0,54 ± 0,03
19	dikaffeoilkinik asit	0,36 ± 0,02	---
<b>Toplam</b>		<b>8,5 ± 0,2</b>	<b>9,2 ± 0,2</b>
<i>Flavonoidler</i>			
10	Rutin	0,133 ± 0,008	0,31 ± 0,02
11	Kersetin- <i>O</i> -Heks	0,038 ± 0,003	---
12	Kaempferol- <i>O</i> -Rut	0,16 ± 0,01	0,126 ± 0,007
13+14	Kaempferol- <i>O</i> -Rut + Isorhamnetin- <i>O</i> -Rut	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,01
<b>Toplam</b>		<b>0,52 ± 0,02</b>	<b>0,66 ± 0,02</b>
<b>TIPC</b>		<b>9,0 ± 0,2</b>	<b>9,9 ± 0,2</b>

Rut=rutinosit; Hex=hexoside

#### 4.2. Antimikrobiyal Etkinliğin Belirlenmesi

Ekinezya çiçek ve yaprak ekstraktlarının antimikrobiyal değerlendirilmesi, 21 adet gram pozitif ve negatif bakteriye karşı, mikrodilüsyon yöntemi ile yapılmıştır. Testte kullanılan tüm bakteriler, farklı konsantrasyonlardaki Ekinezya ekstraktlarına duyarlılık göstermiştir ve metanol ekstraktı diğerlerinden daha etkili olmuştur.

Tablo 4.3. Mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen Ekinezya çiçek suyu ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri

No	Mikroorganizmalar	Çiçek su ekstraktı	
		MBC µg/mL	MİK µg/mL
1	<i>S. aureus</i>	500	125
2	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	500	62,5
3	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	500	125
4	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 10015	500	125
5	<i>S. lutea</i> ATCC 9341	250	125
6	<i>S. typhimurium</i> NRRLE 4463	500	125
7	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 1501	500	125
8	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	500	125
9	<i>E. faecalis</i> ATCC 25212	250	62,5
10	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	500
11	<i>P. vulgaris</i>	250	250
12	<i>E. coli</i>	250	250
13	<i>Serratia marcescens</i>	250	250
14	<i>S. epidermidis</i>	250	250
15	<i>S. alpha haemolyticus</i>	125	125
16	<i>E. faecium</i>	250	250
17	<i>P. aeruginosa</i>	250	250
18	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	250	250
19	<i>E. durans</i>	500	250
20	<i>Salmonella kentucky</i>	500	250
21	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	500	500

Tablo 4.4. Mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen *Ekinezya* yaprak suyu ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri

No	Mikroorganizmalar	Yaprak su ekstraktı	
		MBC µg/mL	MİK µg/mL
1	<i>S. aureus</i>	500	125
2	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	250	62,5
3	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	500	125
4	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 10015	500	125
5	<i>S. lutea</i> ATCC 9341	250	62,5
6	<i>S. typhimurium</i> NRRLE 4463	500	125
7	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 1501	500	125
8	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	500	62,5
9	<i>E. faecalis</i> ATCC 25212	500	62,5
10	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	500
11	<i>P. vulgaris</i>	250	250
12	<i>E. coli</i>	500	500
13	<i>Serratia marcescens</i>	500	500
14	<i>S. epidermidis</i>	500	500
15	<i>S. alpha haemolyticus</i>	250	250
16	<i>E. faecium</i>	500	500
17	<i>P. aeruginosa</i>	500	500
18	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	250	250
19	<i>E. durans</i>	250	250
20	<i>Salmonella kentucky</i>	500	250
21	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	500	250

Tablo 4.5. Mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen Ekinezya çiçek metanol ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri

No	Mikroorganizmalar	Çiçek Metanol ekstraktı	
		MBC µg/mL	MİK µg/mL
1	<i>S. aureus</i>	500	125
2	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	500	125
3	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	500	125
4	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 10015	500	125
5	<i>S. lutea</i> ATCC 9341	250	125
6	<i>S. typhimurium</i> NRRLE 4463	500	125
7	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 1501	500	125
8	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	500	125
9	<i>E. faecalis</i> ATCC 25212	250	62,5
10	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	125	125
11	<i>P. vulgaris</i>	125	125
12	<i>E. coli</i>	125	125
13	<i>Serratia marcescens</i>	125	125
14	<i>S. epidermidis</i>	125	125
15	<i>S. alpha haemolyticus</i>	125	125
16	<i>E. faecium</i>	125	125
17	<i>P. aeruginosa</i>	62,5	62,5
18	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	125	125
19	<i>E. durans</i>	125	125
20	<i>Salmonella kentucky</i>	125	62,5
21	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	62,5	62,5



Tablo 4.6. Mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen *Ekinezya* yaprak metanol ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri

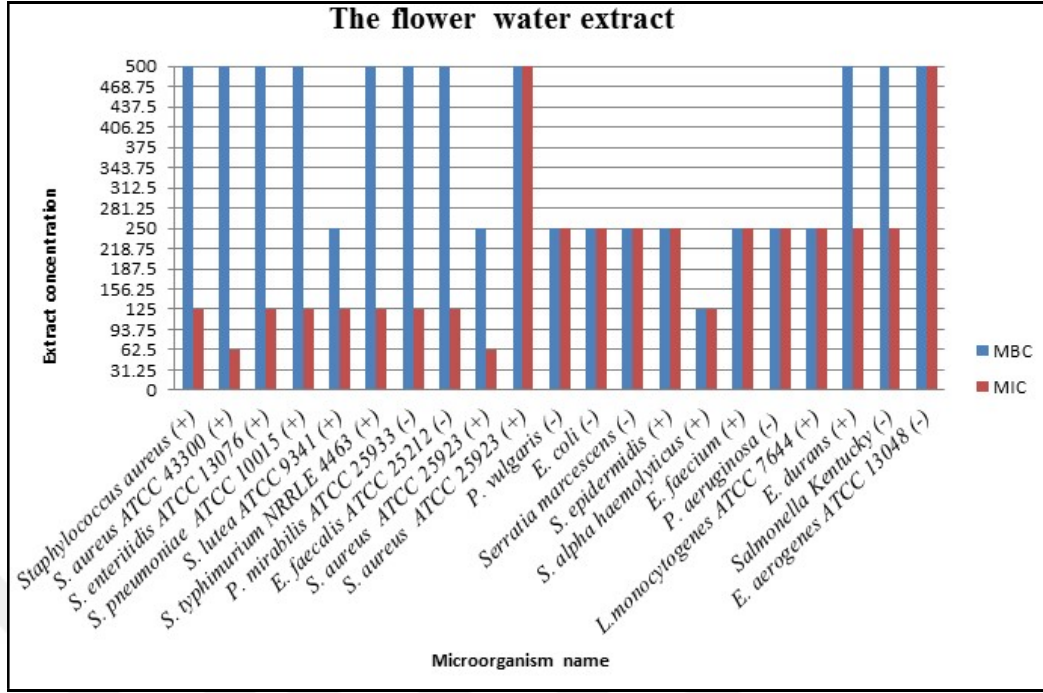
No	Mikroorganizmalar	Yaprak Metanol ekstraktı	
		MBC $\mu\text{g/mL}$	MİK $\mu\text{g/mL}$
1	<i>S. aureus</i>	500	62,5
2	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	250	125
3	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	500	125
4	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 10015	500	125
5	<i>S. lutea</i> ATCC 9341	250	125
6	<i>S. typhimurium</i> NRRLE 4463	500	125
7	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 1501	500	125
8	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	250	125
9	<i>E. faecalis</i> ATCC 25212	125	62,5
10	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	250	125
11	<i>P. vulgaris</i>	125	62,5
12	<i>E. coli</i>	125	62,5
13	<i>Serratia marcescens</i>	62.5	62,5
14	<i>S. epidermidis</i>	125	125
15	<i>S. alpha haemolyticus</i>	125	62,5
16	<i>E. faecium</i>	62.5	62,5
17	<i>P. aeruginosa</i>	125	62,5
18	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	125	62,5
19	<i>E. durans</i>	125	62,5
20	<i>Salmonella kentucky</i>	125	125
21	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	125	125

Tablo 4.7. Mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen Ekinezya çiçek etil ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri

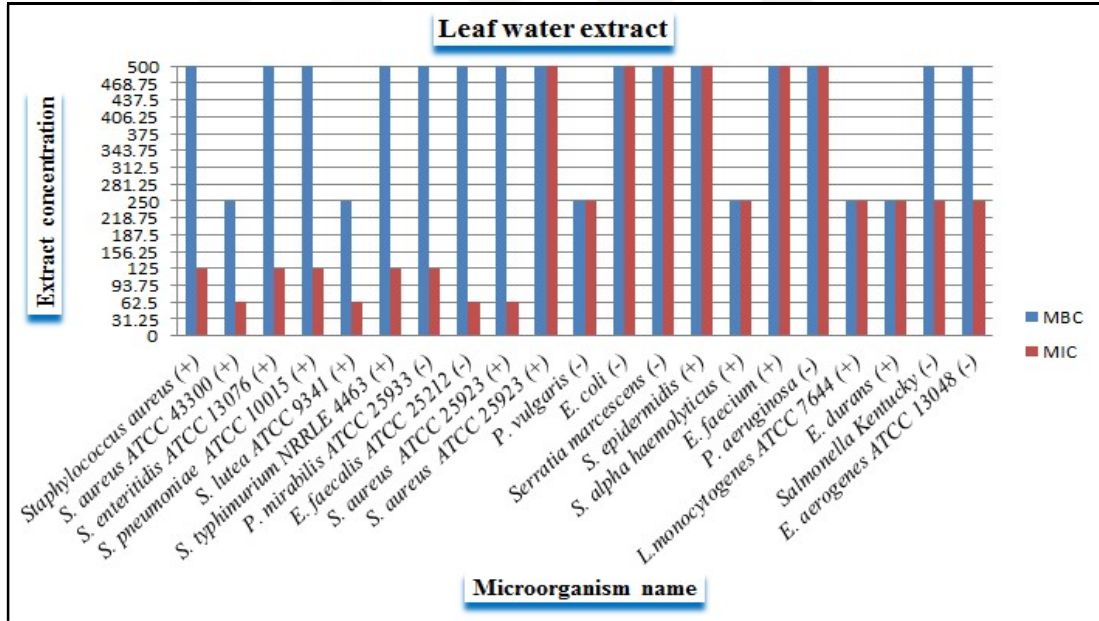
No	Mikroorganizmalar	Çiçek Etil Ekstraktı	
		MBC µg/mL	MİK µg/mL
1	<i>S. aureus</i>	250	62,5
2	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	500	125
3	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	500	125
4	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 10015	500	125
5	<i>S. lutea</i> ATCC 9341	500	125
6	<i>S. typhimurium</i> NRRLE 4463	500	125
7	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 1501	500	125
8	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	500	62,5
9	<i>E. faecalis</i> ATCC 25212	500	62,5
10	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	125	62,5
11	<i>P. vulgaris</i>	250	62,5
12	<i>E. coli</i>	125	125
13	<i>Serratia marcescens</i>	250	125
14	<i>S. epidermidis</i>	250	125
15	<i>S. alpha haemolyticus</i>	500	62,5
16	<i>E. faecium</i>	250	125
17	<i>P. aeruginosa</i>	250	125
18	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	500	125
19	<i>E. durans</i>	250	125
20	<i>Salmonella kentucky</i>	250	125
21	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	125	125

Tablo 4.8. Mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen *Ekinezya* yaprak etil ekstraktının bakterilere karşı MBC ve MİK değerleri

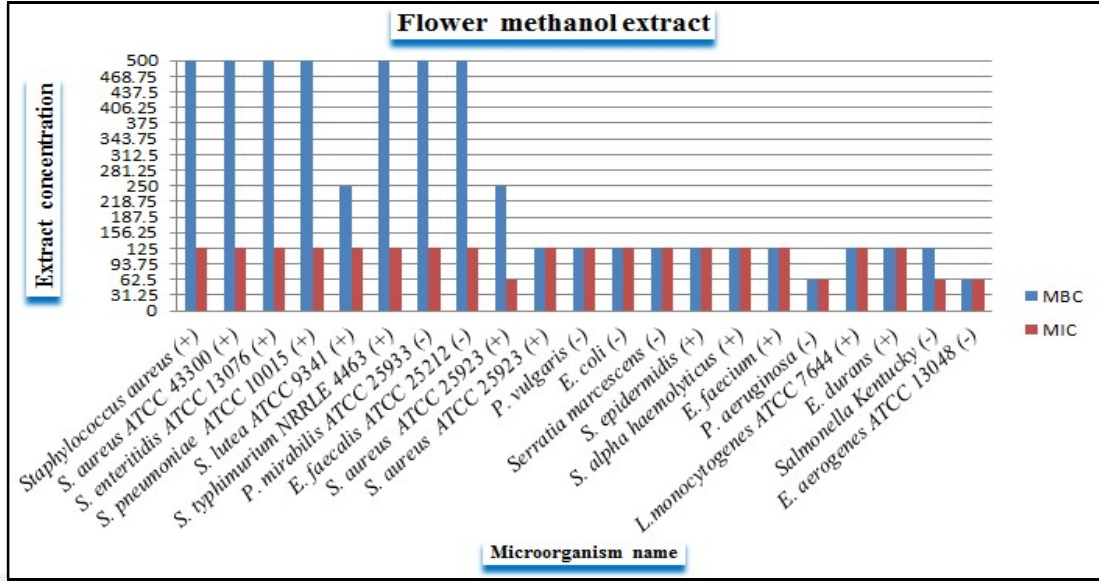
No	Mikroorganizmalar	Yaprak Etil Ekstraktı	
		MBC µg/mL	MİK µg/mL
1	<i>S. aureus</i>	500	125
2	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	500	62,5
3	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	500	125
4	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 10015	500	125
5	<i>S. lutea</i> ATCC 9341	500	125
6	<i>S. typhimurium</i> NRRLE 4463	500	125
7	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 1501	250	125
8	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	500	125
9	<i>E. faecalis</i> ATCC 25212	62.5	62,5
10	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	250
11	<i>P. vulgaris</i>	250	125
12	<i>E. coli</i>	250	62,5
13	<i>Serratia marcescens</i>	500	125
14	<i>S. epidermidis</i>	500	125
15	<i>S. alpha haemolyticus</i>	250	125
16	<i>E. faecium</i>	500	250
17	<i>P. aeruginosa</i>	500	125
18	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	500	125
19	<i>E. durans</i>	250	250
20	<i>Salmonella kentucky</i>	250	125
21	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	250	125



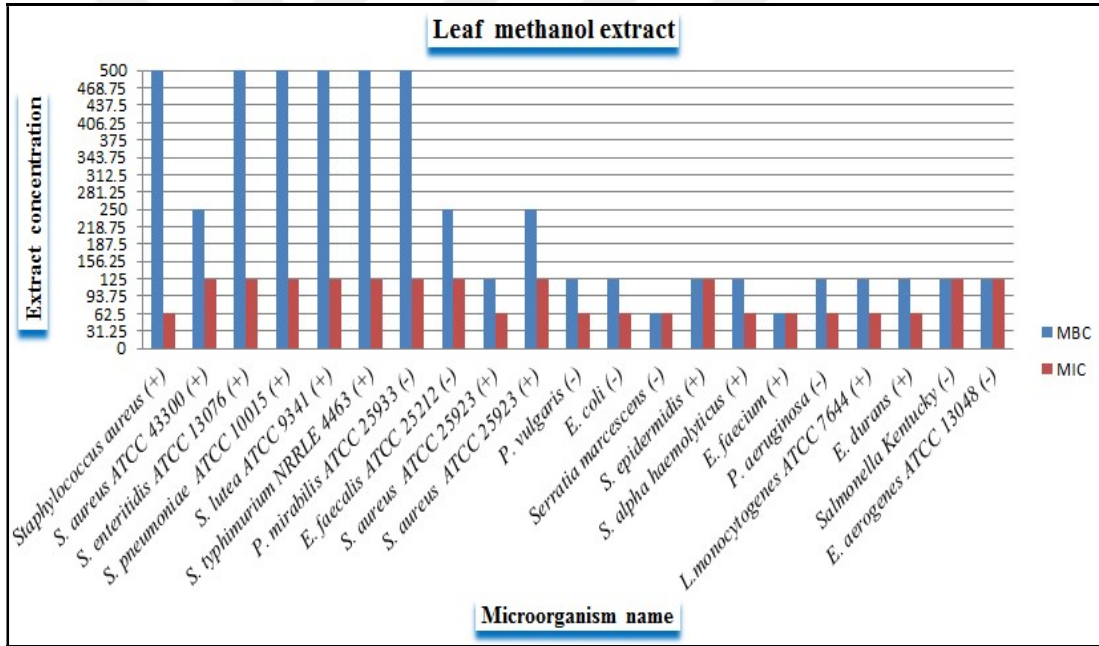
Grafik 4.1. Çiçek su ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği



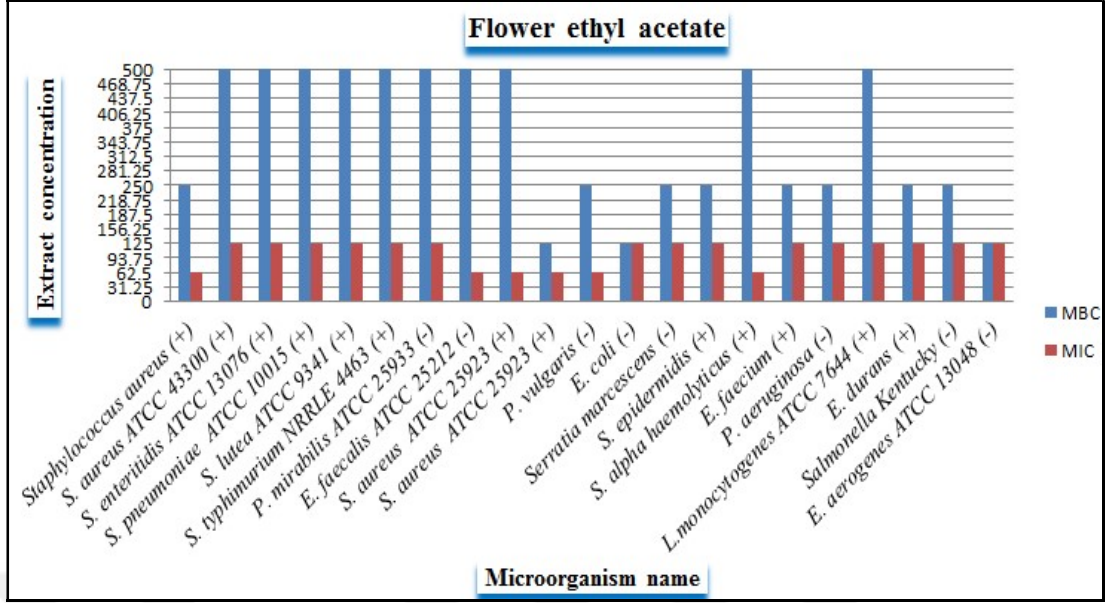
Grafik 4.2. Yaprak su ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği



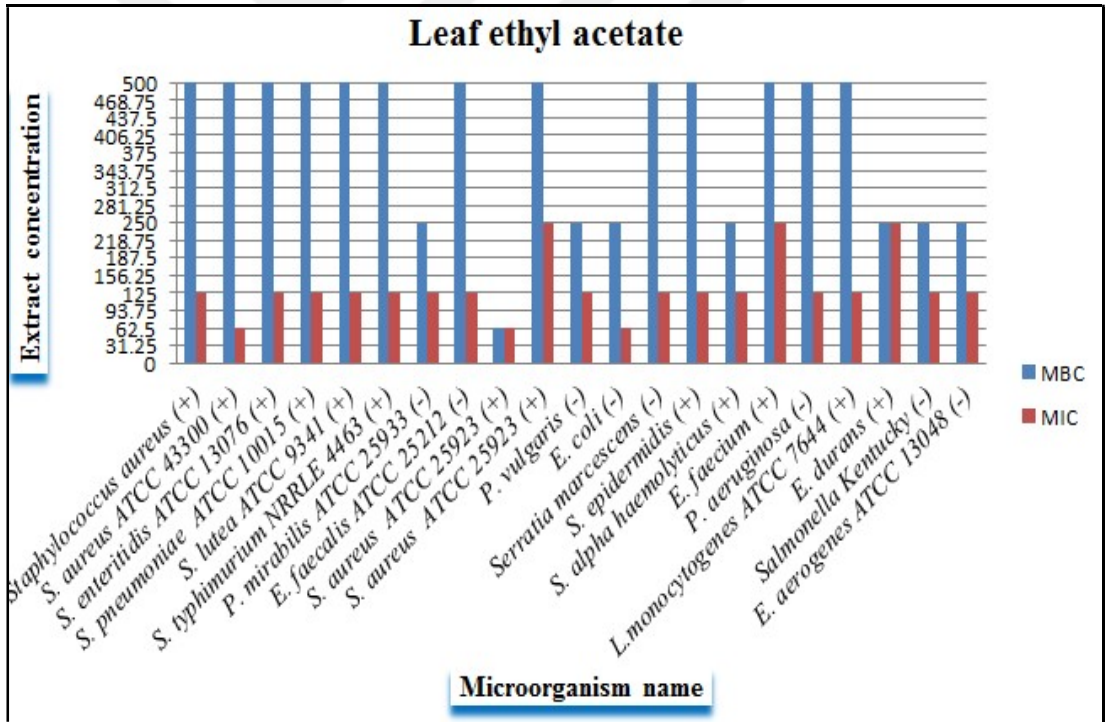
Grafik 4.3. Çiçek metanol ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği



Grafik 4.4. Yaprak metanol ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği



Grafik 4.5. Çiçek etil asetat ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği



Grafik 4.6. Yaprak etil asetat ekstraktının bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği

Ekinezya çiçek su ekstaktının 62.5 µg/mL MİK konsantrasyonunda mükemmel antimikrobiyal etkinliği gram pozitif bakterilere karşı belirlenmiştir (*S. aureus* ATCC 43300 ve *E. faecalis* ATCC 25212). Bu duyarlı bakterilerin çiçek su ekstraktına yönelik MBC değerleri, Tablo 4.3'te gösterildiği gibi sırasıyla 500 µg/mL ve 125 µg/mL idi.

MİK değeri 62.5 µg/mL olan yaprak su ekstraktı için en savunmasız bakteri, üç gram pozitif bakteri (*S. aureus* ATCC 43300, *S. lutea* ATCC 9341 ve *E. faecalis* ATCC 25212) ve bir gram negatif bakteri *P. mirabilis* ATCC 25933'e karşıydı. Bu bakteriler için MBC değerleri Tablo 4.4'te gösterildiği gibi 250-500 µg/mL aralığındaydı.

Bununla birlikte, çiçek metanol ekstraktı, 62.5 ug / mL inhibitör konsantrasyonunda gram pozitif bakteri *E. faecalis* ATCC 25212'ye ve gram negatif bakteri (*P. aeruginosa*, *Salmonella kentucky*, *E. aerogenes* ATCC 13048) 'ye karşı antimikrobiyal etkinlik sergilemiştir. MBC değerleri Tablo 4.5'de gösterildiği gibi sırasıyla 250 µg/mL, 62.5 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL idi.

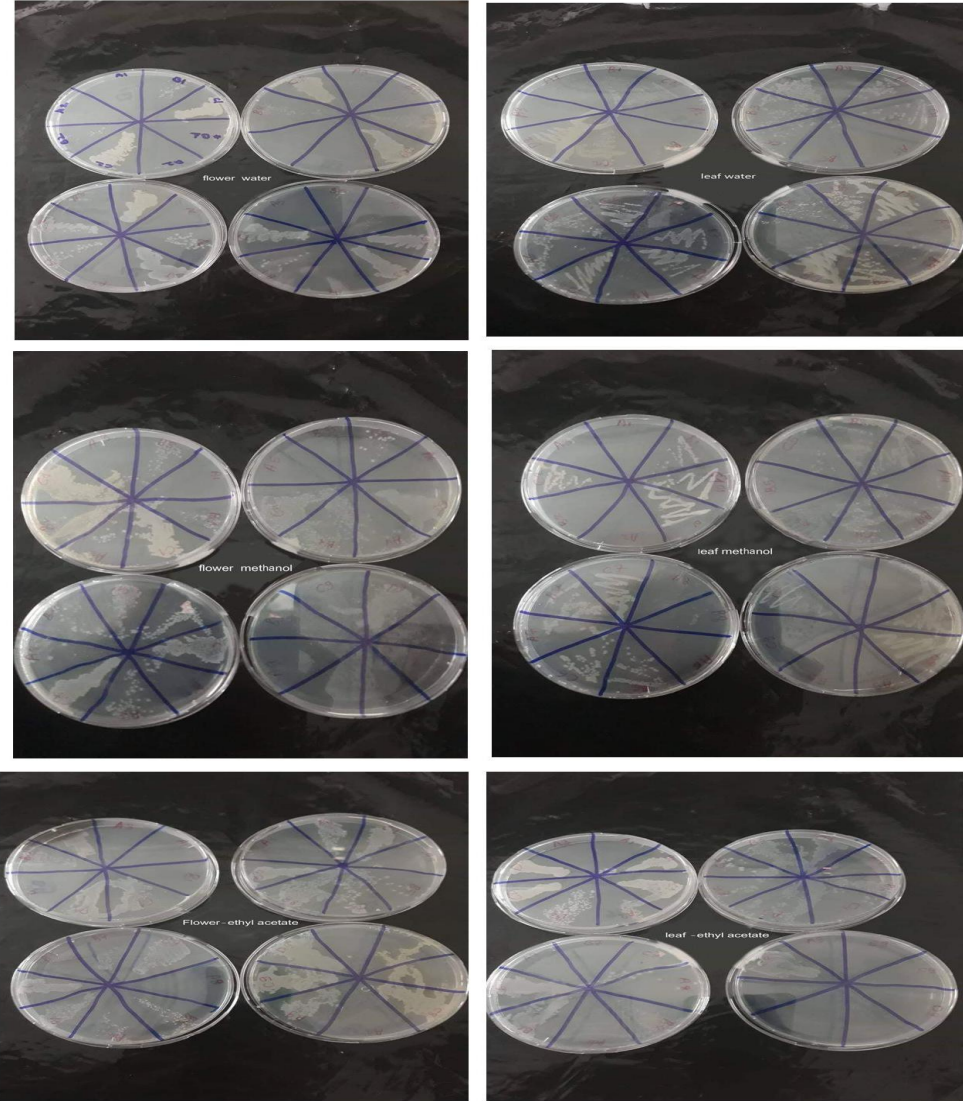
MİK değeri 62.5 µg / mL ile yaprak metanol ekstresi için en duyarlı bakteri altı gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus*, *E. faecalis* ATCC 25212, *S. alfa haemolyticus*, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *E. durans*) ve dört gram negatif bakteridir (*P. vulgaris*, *E. Coli*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*). Bununla birlikte MBC değerleri, Tablo 4.6'da gösterildiği gibi 62.5-500 µg/mL aralığındaydı.

Çiçek etil asetat ekstraktı, 62.5 µg/mL'de gram pozitif ve negatif bakterilere (*Staphylococcus aureus*; *E. faecalis* ATCC 25212; *S. aureus* ATCC 25923; *S. alpha haemolyticus*; *P. mirabilis* ATCC 25933 ve *P. vulgaris*) karşı iyi antibakteriyel etkinlik göstermiştir. MBC değerleri aralığı, Tablo 4.7'de gösterildiği gibi 125-500 µg/mL idi.

Ayrıca, yaprak etil asetat ekstraktı gram negatif bakterilere (*E. coli*) ve iki gram pozitif bakteriye (*S. aureus* ATCC 43300 ve *E. faecalis* ATCC 25212) karşı 62.5 µg/mL MİK değeri ile antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. MBC değerleri Tablo 4.8'de gösterildiği gibi sırasıyla 250 µg/mL, 500 µg/mL, 62.5 µg/mL bulunmuştur.

Minimum inhibisyon konsantrasyon değeri 62.5 µg/mL'nin, Ekinezya çiçeği ve yaprağının tüm ekstraktları için 21 gram pozitif ve negatif bakteriden 16'sına karşı antimikrobiyal etkinkliği gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, *E. faecalis* ATCC 25212 bakteri, bir gram pozitifdir ve diğer bakteri suşları birbirinden farklı duyarlılığa sahipken 62.5 µg/mL MİK değerinde Ekinezya yaprağı ve çiçeğinin tüm ekstraktlarına (su, metanol ve etil asetat) en duyarlı olanıdır.

Ek olarak, metanol ekstraktının test edilen tüm bakteriler için MİK değeri aralığı 62.5-125 µg/mL ile daha fazla antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, su ve etil asetat aralığı sırasıyla 62.5-500 µg/mL ve 62.5-250 µg/mL bulunmuştur. Dahası, 62.5 µg/mL MBC değeri ayrıca birkaç bakteri suşuna karşı metanol ekstraktından elde edilmiştir. MBC sonuçları Fotoğraf 4.1'de gösterilmektedir.

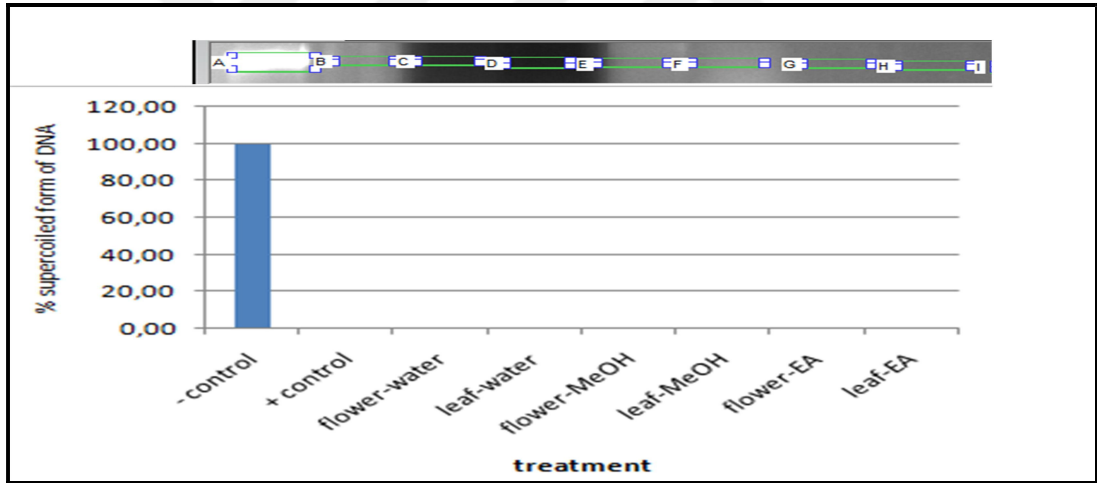


Fotoğraf 4.1. Bazı bakteri suşlarına karşı Ekinizya ekstraktları için MBC sonuçları (a) çiçek H<sub>2</sub>O ekstraktı (b) yaprak H<sub>2</sub>O ekstraktı (c) çiçek metanol ekstraktı (d) yaprak metanol ekstraktı (e) çiçek etil asetat ekstraktı (f) yaprak etil asetat ekstraktı



### 4.3. DNA Koruma Etkinliğinin Belirlenmesi

Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonları gibi oksidatif işlemlerin neden olduğu reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması DNA zararına, çeşitli insan tümörlerine ve nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır (Valko ve ark., 2007). Ek olarak, bu çalışmada Ekinezya çiçeğinin ve yaprak ekstraktlarının koruyucu etkisi, Fenton'un oksidatif stres olarak reaksiyonunu kullanarak pUC19 vektörü üzerinde analiz edilmiştir. Ayrıca, bunun hidroksil radikalleri yoluyla DNA içeren hücresel bileşenler üzerinde zararlı bir etkisi vardır. Ekinezya'nın çiçek ve yaprak ekstraktları iki konsantrasyon (10 ve 50 mg/mL) açısından test edilmiştir. Tüm ekstraktlar, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, test edilen Ekinezya konsantrasyonlarının hiçbirinde plazmid DNA ile koruyucu bir etkinlik göstermemiştir.

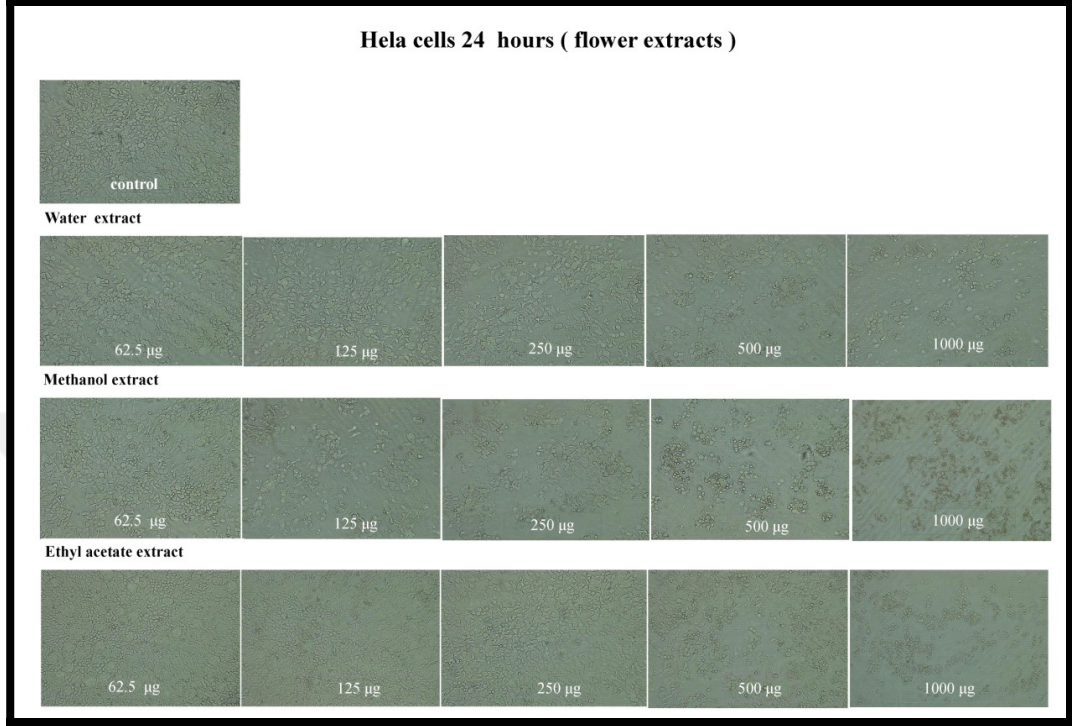


Şekil 4.1. Ekinezya çiçeği ve yaprak ekstraktlarının DNA koruma analizi, 50 mg/mL.

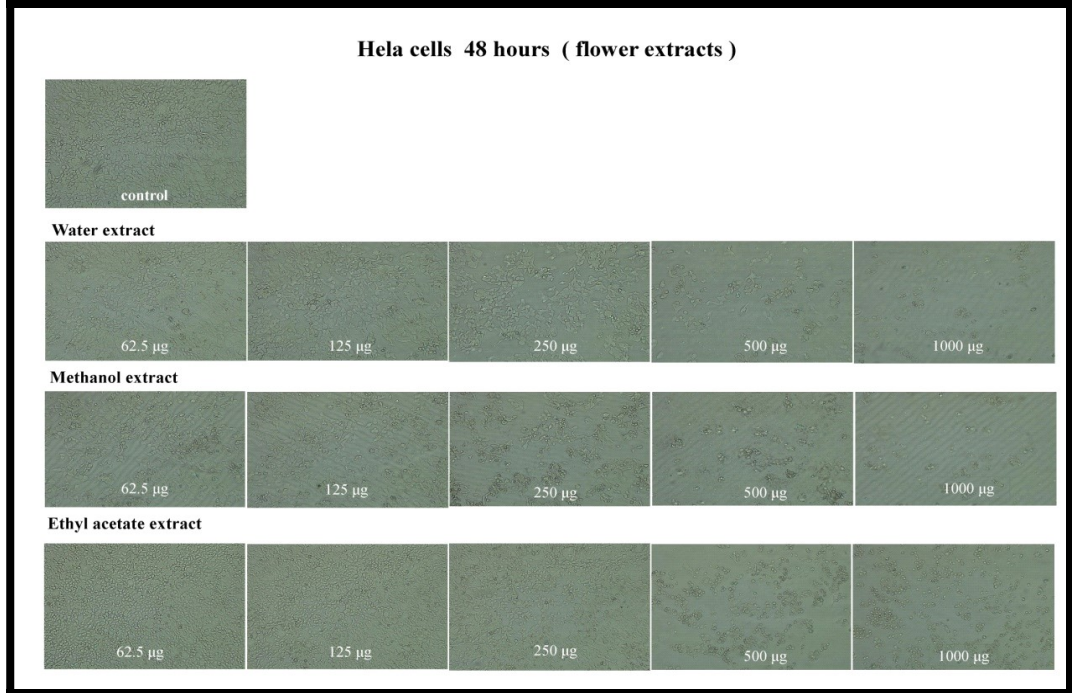
### 4.4. Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

Ekinezya yaprağı ve çiçek ekstraktlarının sitotoksik etkileri, bir MTT hücre canlılığı deneyi kullanılarak HeLa (servikal tümör hücre çizgisi) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, HeLa hücre hatları üzerinde 24-48 saat boyunca beş farklı konsantrasyonda (62.5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) Ekinezya yaprağı ve çiçek ekstraktları kullanılmıştır (Şekil 4.2-4.5). Kontrol hücreleri ekstraktların hiçbirisiyle muamele edilmemiştir. Ek olarak, hücre morfolojisi değişikliklerini tespit etmek için ters mikroskop kullanılmıştır. HeLa hücreleri üzerindeki MTT sonuçlarına göre,

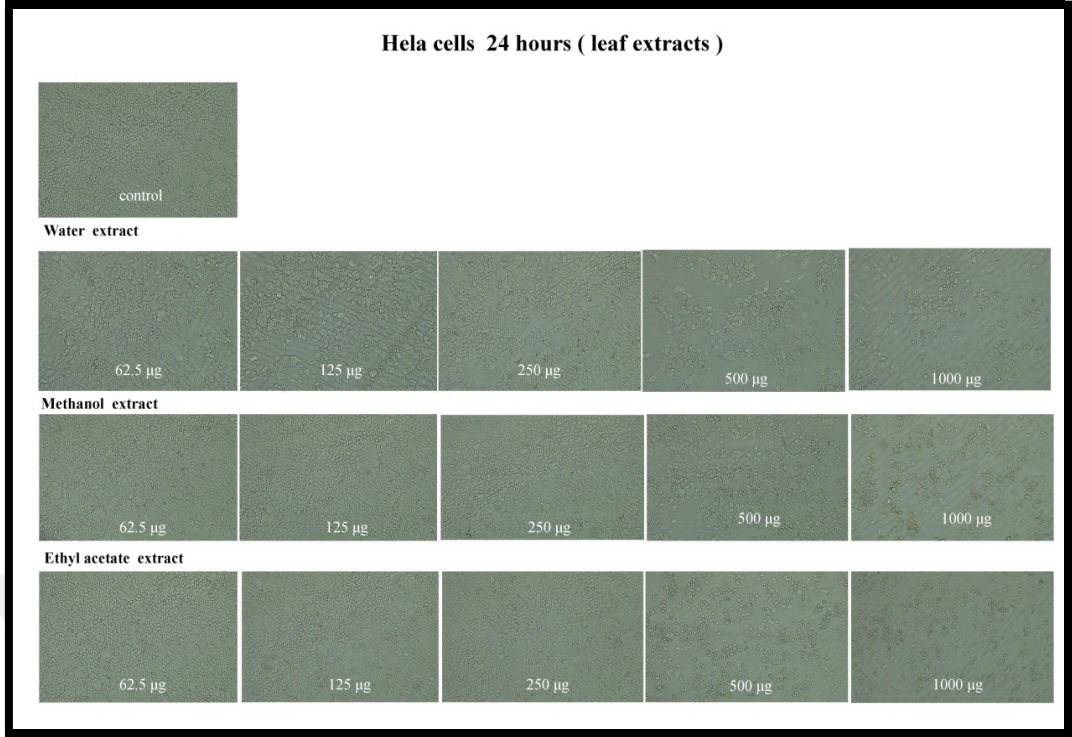
Ekinezya eskraktlarının anti-proliferatif etkilerinin doza ve zamana bağılı olduğu ortaya çıkmıştır.



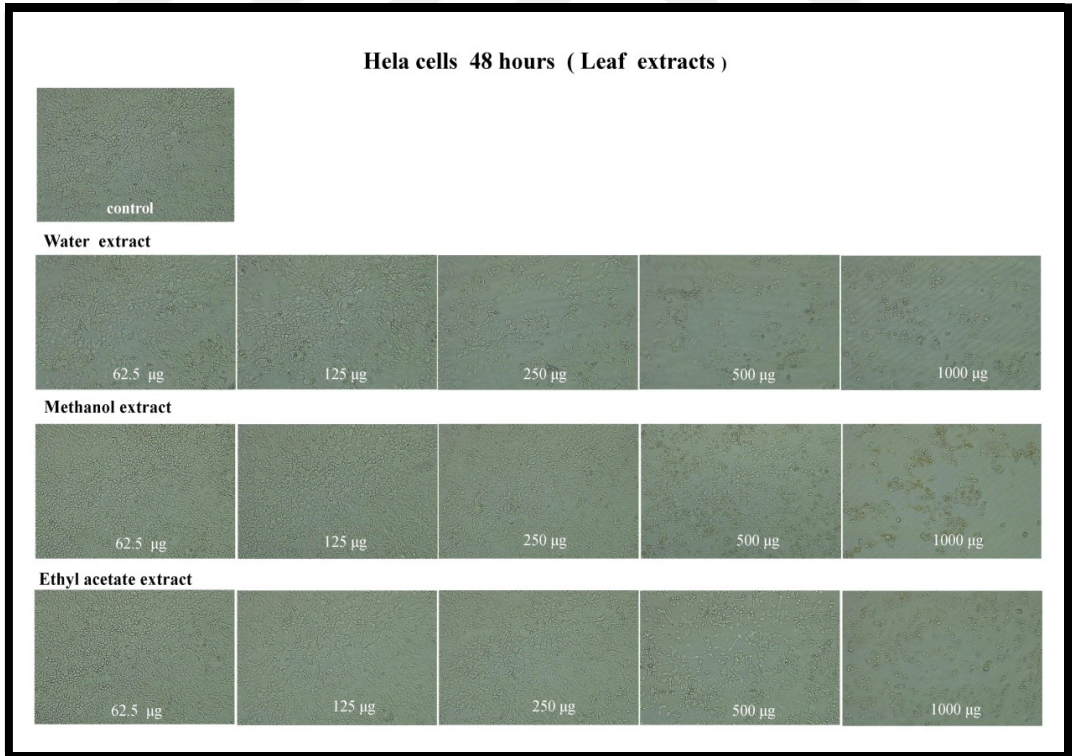
Şekil 4.2. Beş doz Ekinezya çiçeği ekstraktı ile muameleden sonra 24 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin morfolojisi



Şekil 4.3. Beş doz Ekinezya çiçeği ekstraktı ile muameleden sonra 48 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin morfolojisi

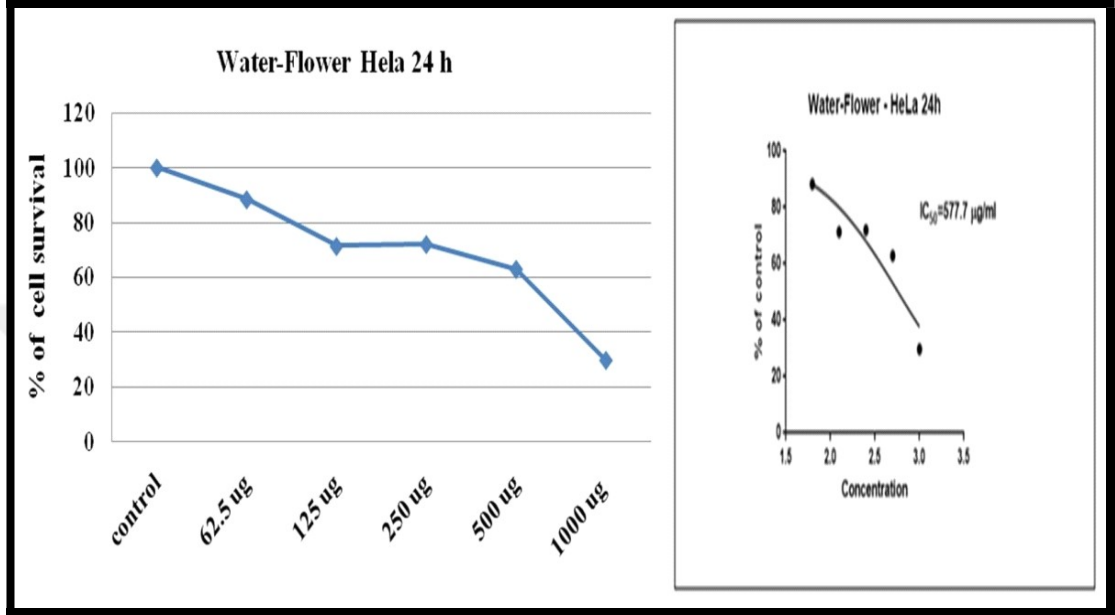


Şekil 4.4. Beş doz Ekinezya yaprağı ekstraktı ile muameleden sonra 24 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin morfolojisi

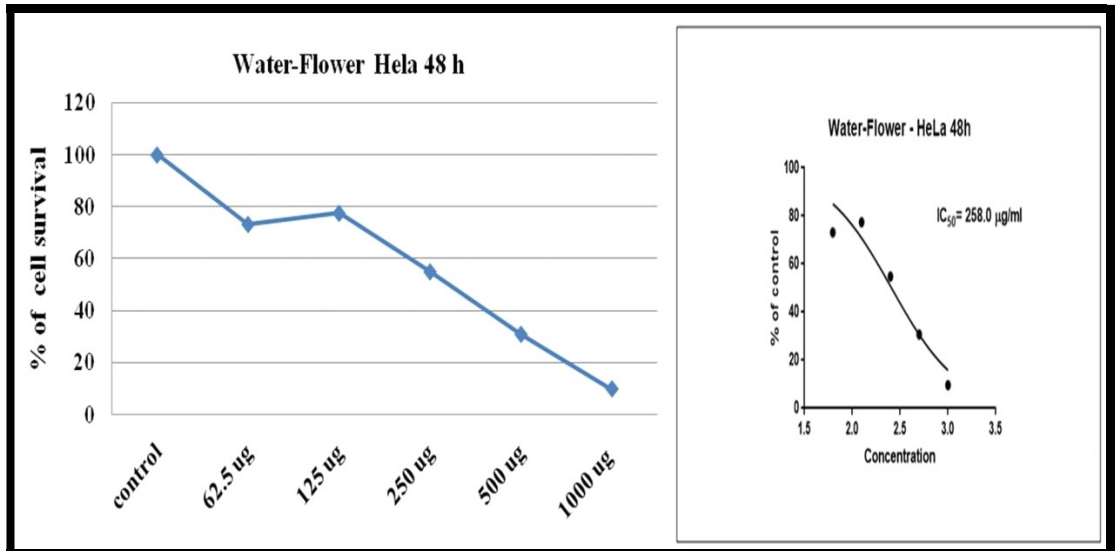


Şekil 4.5. Beş doz Ekinezya yaprağı ekstraktı ile muameleden sonra 48 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin morfolojisi

Ekinezya çiçeği su ekstraktı 62.5 µg/mL konsantrasyonunda, 24 saatte %88, 48 saatte ise %73 anti-proliferatif etkiye neden olmuştur. Ancak, hücrelerin proliferasyonunu Grafik 4.7-4.8'de gösterildiği gibi 48 saat sonra 1000 µg'de %9.7' ye kadar azaltmak için daha yüksek dozlarda (> 62.5 µg) su ekstraktı gerektirmiştir.

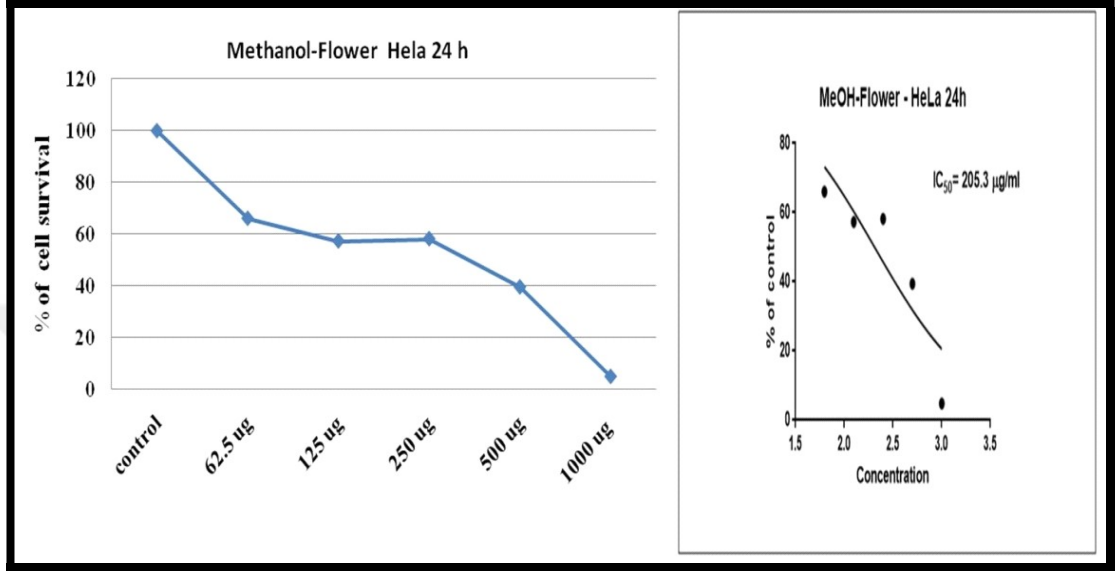


Grafik 4.7. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçek su ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi

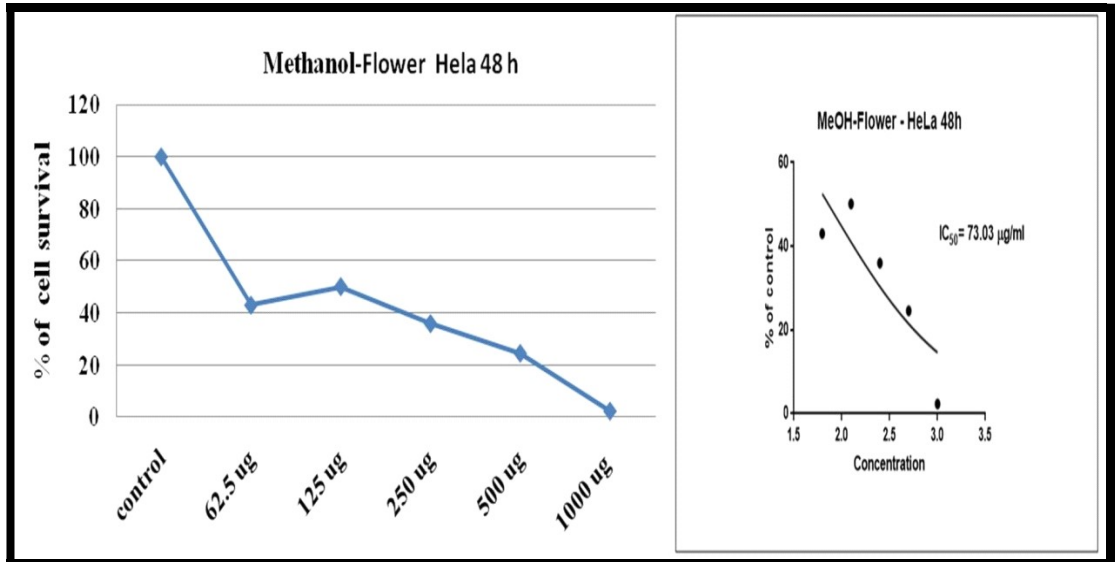


Grafik 4.8. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçek su ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi

Ekinezya çiçeği metanol ekstraktı, sitotoksik aktiviteyi, 24 saatte en düşük konsantrasyonda yaklaşık % 66,12 oranında, yüksek konsantrasyonlu 1000 µg'deki optimum aktiviteye ek olarak göstermiştir. Burada hayatta kalma oranı 24 saat sonra % 4,8 iken ve 48 saat sonra % 2,4'e düşmüştür (Grafik 4.9- 4.10).

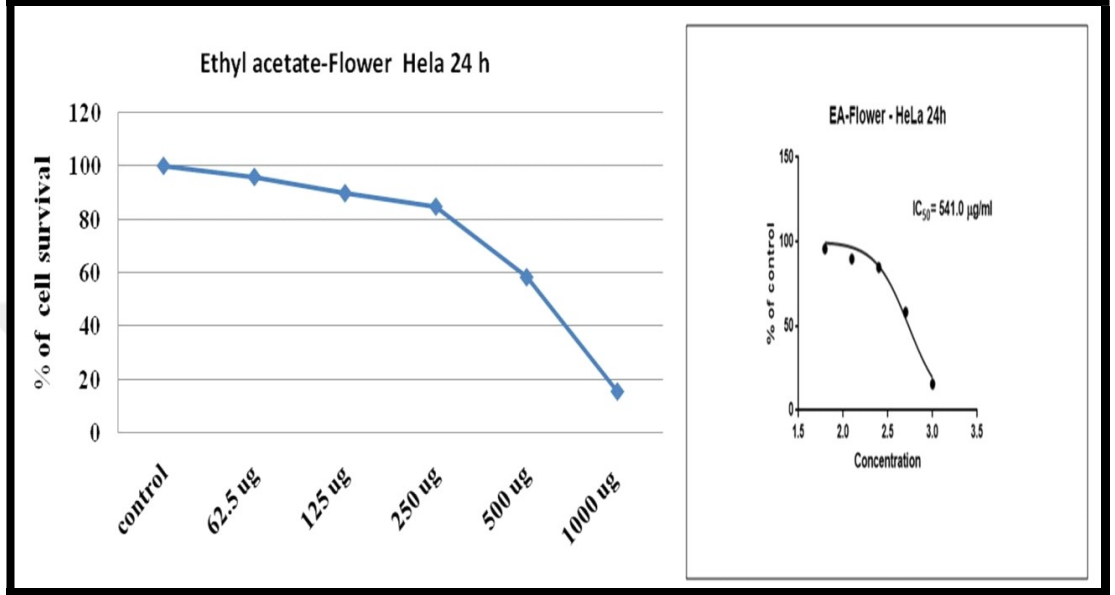


Grafik 4.9. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçeği metanol ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi

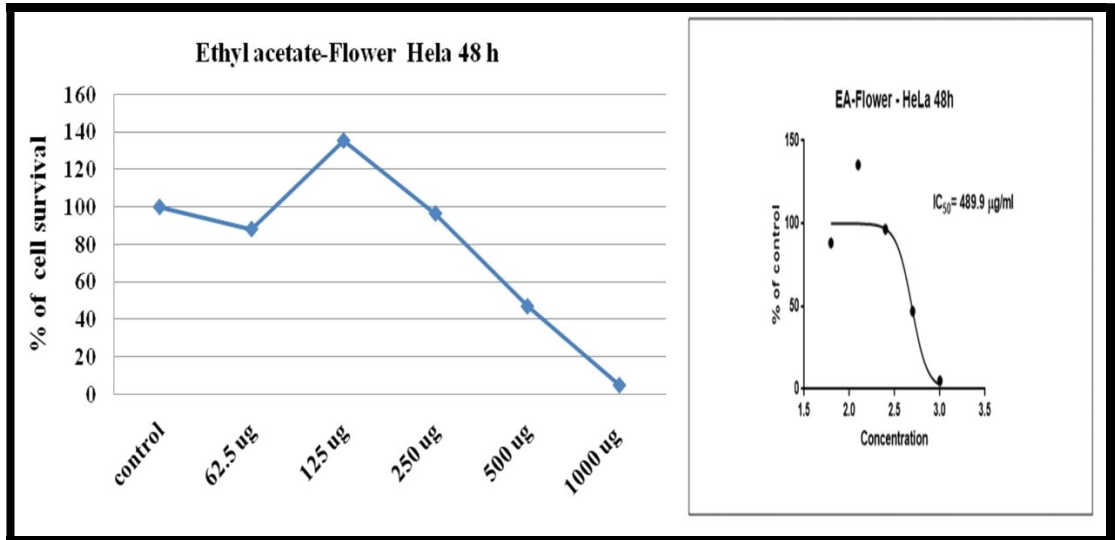


Grafik 4.10. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçeği metanol ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi

Öte yandan, çiçek etil asetat ekstraktı, çiçek metanol ekstraktı ile karşılaştırıldığında, tüm konsantrasyonlarda daha az anti-proliferatif göstermiştir. Ekstrakt 1000 µg'de sırasıyla 24 saat ve 48 saat sonra sırasıyla % 15.6 ve % 5.05 sitotoksik etki göstermiştir (Grafik 4.11-4.12).

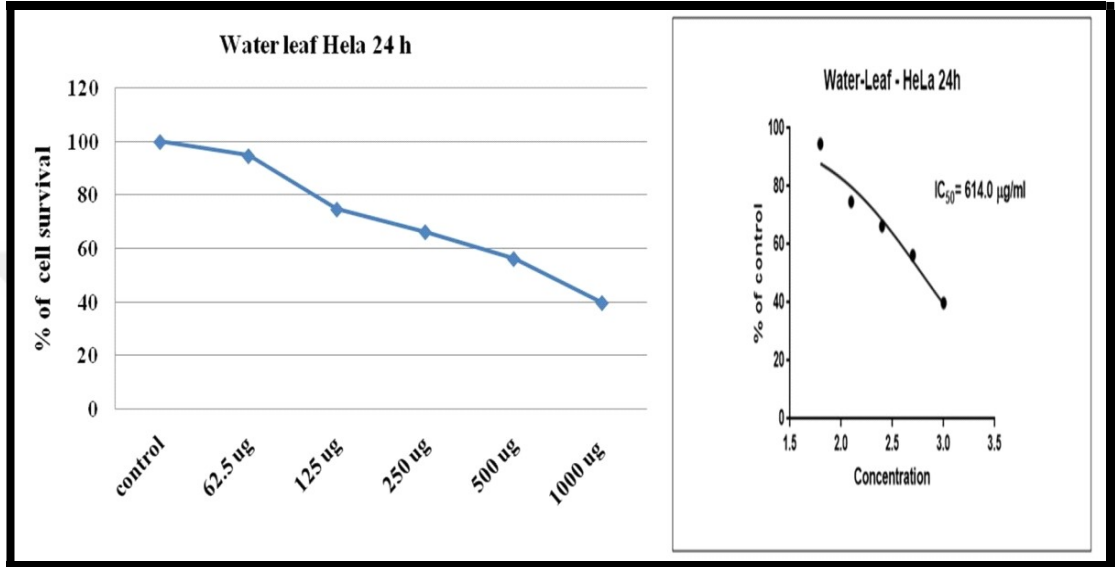


Grafik 4.11. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçeği etil ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi

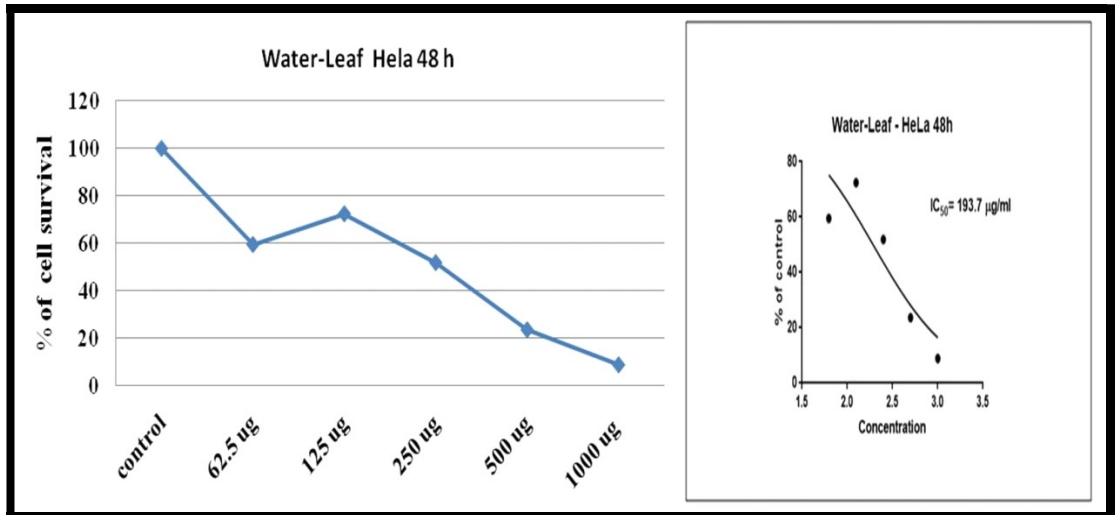


Grafik 4.12. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya çiçeği etil ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi

Yaprak su ekstraktının etkileri, zamana ve ekstrakt konsantrasyonuna bağlı olarak çiçek su ekstraktına benzer çıkmıştır. Ek olarak, düşük hücre proliferasyon seviyeleri 500 µg ile tespit edilmiş, hayatta kalma oranı % 56,3 iken, 1000 µg ekstrakt ile bu oran 24 saat sonra % 39,9'a inmiştir. Ancak, yüksek dozda 48 saat sonra hücre proliferasyonu % 8.9'a düşebilmiştir (Grafik 4.13-4.14).

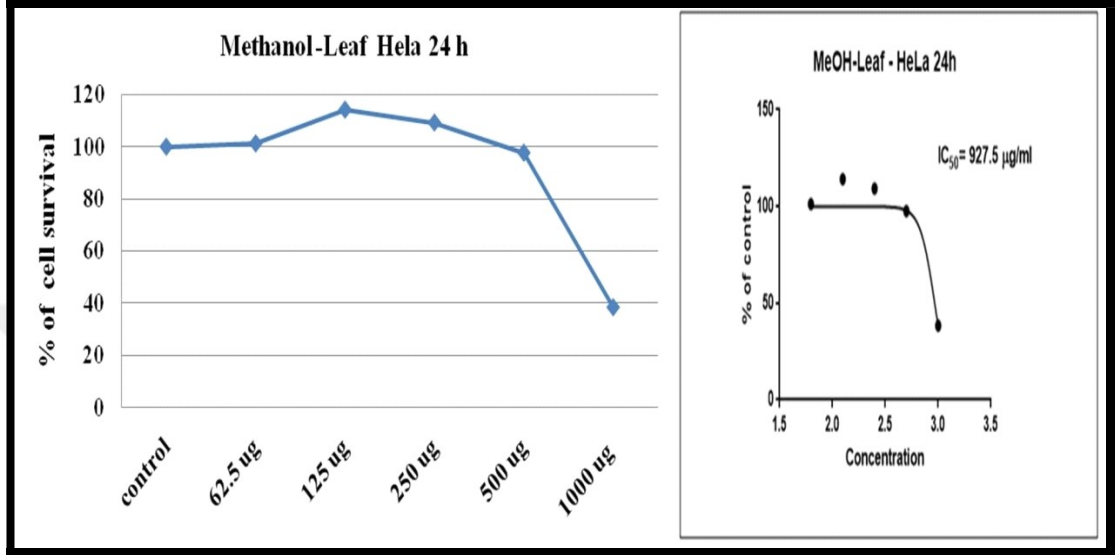


Grafik 4.13. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı su ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi

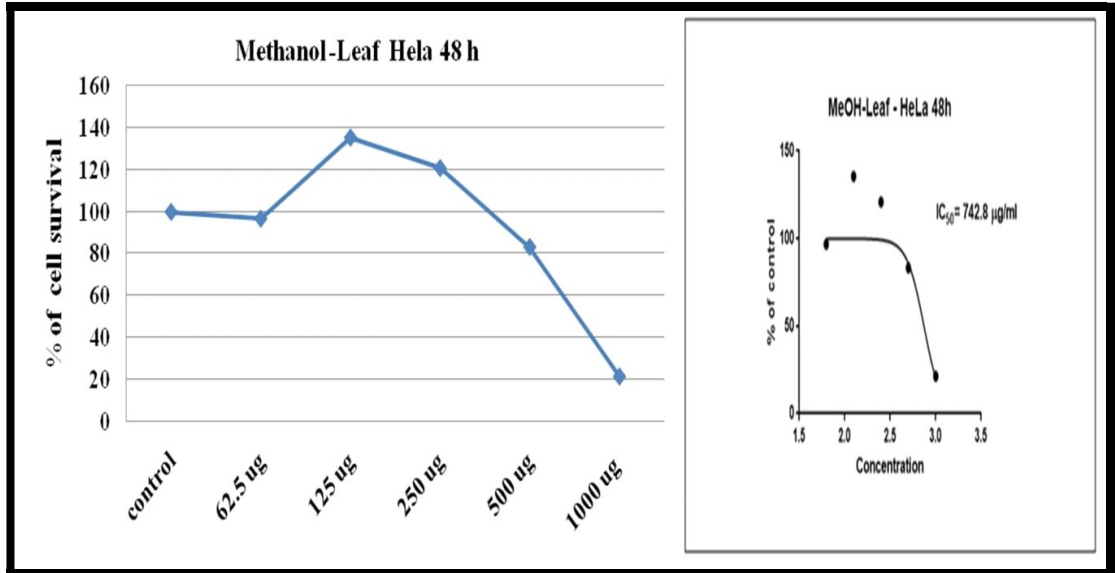


Grafik 4.14. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı su ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi

Buna karşılık, yaprak metanol ekstraktı, 24 ve 48 saatteki kontrol hücre sayısına kıyasla düşük konsantrasyonda herhangi bir sitotoksik aktivite göstermemiştir. Grafik 4.15-4.16'da sunulduğu gibi 1000 µg yüksek konsantrasyonda, 48 saat sonra % 21.4 ile anti-proliferatif etki göstermiştir.



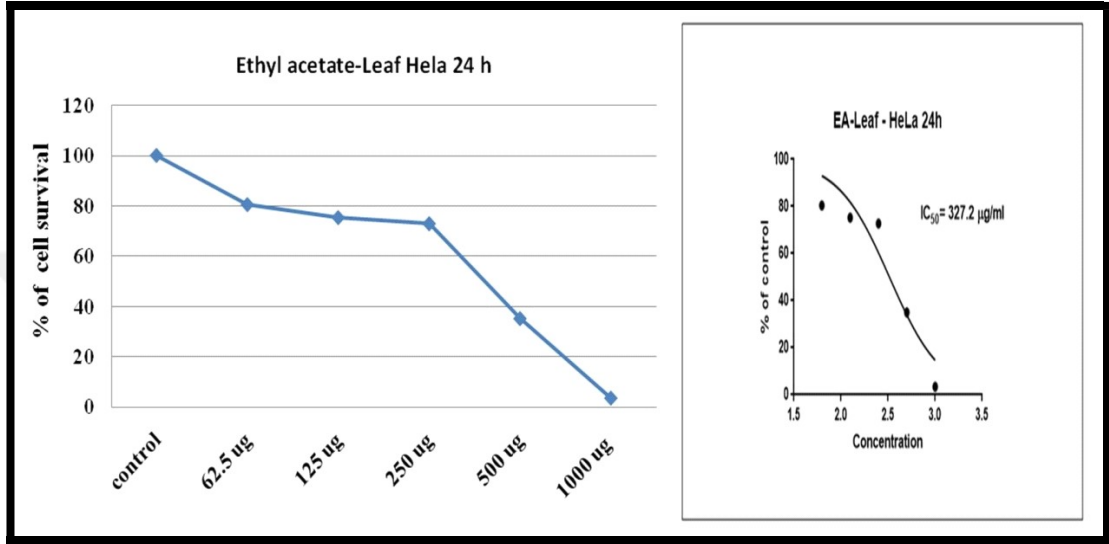
Grafik 4.15. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı metanol ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi



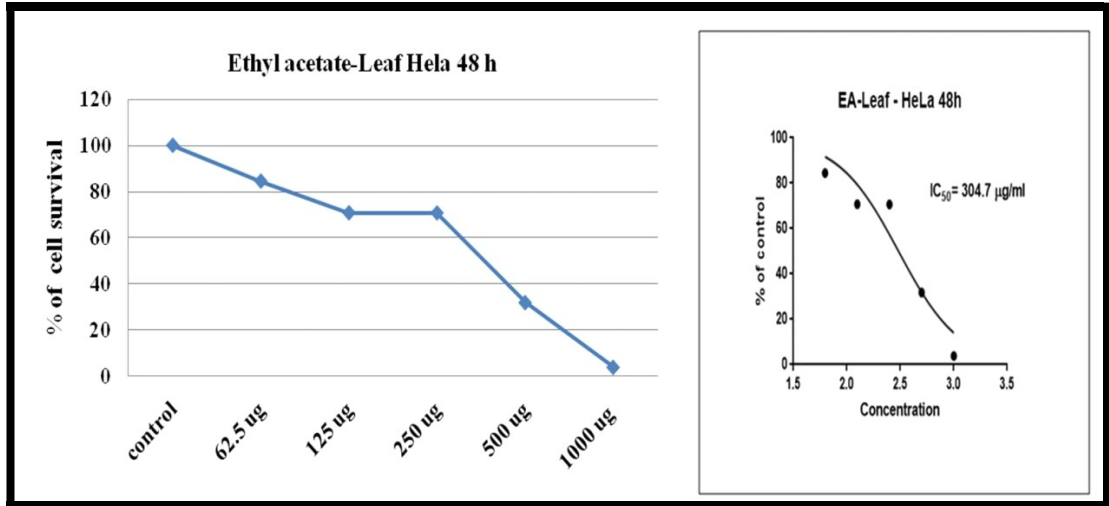
Grafik 4.16. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinezya yaprağı metanol ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi



1000 µg'de HeLa tümör hücrelerinde 24 saat sonra tüm ekstraktlar arasındaki önemli sitotoksik aktivite, yaprak etil asetat ekstraktından elde edilmiştir. 48 saat sonra hücrelerin çoğalması %3,8'e düşürmesine rağmen, Grafik 4.17- 4.18'de gösterildiği gibi çiçek metanol ekstraktından sonra etkilenen ikinci ekstrakt olarak kabul edilmiştir.



Grafik 4.17. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinеzyа yaprağı etil asetat ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi



Grafik 4.18. HeLa tümör hücre hatlarına karşı 48 saat boyunca inkübe edilmiş Ekinеzyа yaprağı etil asetat ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarla muamele sonucunun MTT ve IC<sub>50</sub> analizi

HeLa servikal tümör hücrelerine karşı yarı-maksimum inhibitör konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ), Tablo 4.9'da sunulan her ekstrakt için belirlenmiştir. Ekinezya çiçek ve yaprak ekstraktlarının sitotoksik etkisinin zamana bağlı olduğu ve 48 saat boyunca ekstraktlara maruz kalma süresi ile ilgili etkinin üstün olduğu ve Ekinezya çiçek metanol ekstaktının sitotoksik etki açısından en iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Zamana bağlı olan yöntem, düşük miktarda ekstrakta tümör hücrelerinin çoğalmasını belirler. Her ekstrakt için değerler ölçülmüş ve Grafik 4.7- 4.18'de sunulmuştur.

Tablo 4.9. *Ekinezya ekstraktları ile HeLa hücrelerinin hücre canlılığı ( $IC_{50}$ : yüzde elli etki seviyesinde inhibitör konsantrasyon) üzerindeki etkileri*

HeLa hücreleri için $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Ekstrakt türü	24h	48h
Çiçek su ekstraktı	577,7	258,0
Yaprak su ekstraktı	614,0	193,4
Çiçek metanol ekstraktı	205,3	73,03
Yaprak metanol ekstraktı	927,5	742,8
Çiçek etil asetat ekstraktı	541,0	489,9
Yaprak etil asetat ekstraktı	327,2	304,7

## 5. TARTIŞMA

Bitki âlemi, birçok bitki biyolojik özellikleri bakımından sürekli olarak incelenmesine rağmen, henüz saptanması gereken tıbbi değeri olan maddeleri içeren birçok türü barındırmaktadır (Khan ve Saurabh, 2011). Bitkiler, çeşitli biyolojik aktiviteler aracılığıyla çok çeşitli ikincil metabolitlerin büyük bir kaynağı olduğunu gösterebilir. İmmünomodülatör etkiler, antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antioksidan ve antikanser etkiler bitkilerin başlıca özelliklerinden bazılarıdır. Ekinezya ürünlerinden elde edilen fitokimyasallar, mikroorganizmaların büyümesini kontrol etmek için daha az toksik ve daha etkili ilaçların geliştirilmesinde bir prototip görevi görür (Kumar ve Ramaiah, 2011). Bu bileşikler bakteri, mantar veya virüs gibi insan mikroorganizmalarına karşı önemli terapötik uygulamalara sahiptir. Sonuç olarak, şifalı bitkiler farmasötik ürünlere, nötr ceuticals ve besin takviyeleri içinde kendine yer edinir. Ek olarak, doğal kaynaklardan gelen biyolojik özelliklerin araştırılması büyük ilgi görmektedir ve bu faaliyetler için uygun ajanlar olarak işlev görebilecek bileşiklerin tanınması için çaba gösterilmektedir (Plant ve Azedarach, 2012).

Bu araştırmanın bulguları, Ekinezya çiçek ve yaprağının çeşitli gram pozitif ve gram negatif bakterilerin büyümesini engelleme yeteneğine sahip seri mikrodilüsyon yöntemiyle çeşitli çözücülerde antimikrobiyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada fitokimyasal bileşenler belirlenmiş, ek olarak, Fenton'un pUC19 vektörü üzerindeki reaksiyonunu kullanarak Ekinezya ekstratları için DNA koruma etkinliği test edilmiş ama bir etki tespit edilememiştir. Ayrıca, bu çalışma, ilk kez Ekinezya yaprağı ve çiçek ekstratlarının, doz ve zamana bağlı etkinlik yoluyla servikal tümör hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir.

Bu çalışma, Ekinezya yaprak ve çiçeği için tüm su, metanol ve etil asetat ekstraktlarının insan patojenlerine karşı aktif olduğunu göstermiştir. Öte yandan, metanol ekstraktı, *E. faecalis* ATCC 25212, *Salmonella kentucky* E. aerogenes ATCC 13048, *Staphylococcus aureus*; *S. alpha haemolyticus*; *E. faecium*; *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. durans*, *P. vulgaris*, *E. coli*; *Serratia marcescens*; ve

*P. aeruginosa* gibi gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı en az 62.5-125 µg/mL MİK değeri ile en yüksek inhibitör etkinlik göstermiştir. Ayrıca, çalışma aynı zamanda etil asetat ekstraktının, su ekstraktı ile birlikte orta derecede antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini de ortaya koymuştur. Bu sonuç, metanolün, su ve etanol gibi diğer çözücülere kıyasla tıbbi bitkilerden antimikrobiyal etki elde etmede ekstraktların en iyi çözücüsü olduğunu belgeleyen çalışmalarla da tutarlıdır (Ahmad ve ark., 1998). Benzer bir araştırma, *J. oxycedrus*'un metanol ekstraktının, 24 bakteri türünün 57 suşunun büyümesi üzerinde inhibe edici etkileri olduğunu, MİK ve MBC değerlerine dayanarak ortaya koymuştur (Karaman ve ark., 2003).

Öte yandan, en az MİK değerindeki tüm Ekinezya ekstraktlarına en duyarlı bakteri, gram pozitif olan ve esas olarak idrar yolu enfeksiyonu, zatürre ve yara enfeksiyonundan sorumlu olan *E. faecalis* ATCC 25212'dir. *E. faecalis* izolatları, çoklu ilaç dirençli fenotiplere ve yüksek seviye aminoglikosit direncine sahiptir (Woods ve ark., 2017). Ayrıca, *E. faecalis*, önemli bir insan nozokomiyal patojenidir ve biyofilmleri formüle etme kabiliyeti, kateterle ilişkili kan ve idrar yolu enfeksiyonlarına katkıda bulunur (Kafil ve Mobarez, 2015). Diğer bakteriler duyarlılıklarında farklılıklar göstermiştir. Daha önceki bir çalışmada, hastanede edinilen enfeksiyonların sıklığıyla ortaya çıkan ve ağır pnömونيye neden olan metisiline dirençli (MRSA) suşlar olarak bilinen *Staphylococcus aureus* çalışılmıştır. Bununla birlikte, *E. p*'nin preparasyonları, MRSA'nın ve ayrıca MSSA'nın (metisilin duyarlı *S. aureus*) büyümesi üzerinde nispeten farklı etkilere sahiptir (Rubinstein ve ark., 2008). Ek olarak, bu araştırma, *Staphylococcus aureus*'un *E. p* ekstraktlarına karşı duyarlı olduğu düşünüldüğünde mevcut araştırmalarla uyumludur.

Daha önce yapılan bir başka çalışma, Ekinezya ekstraktlarının, çoğalmaya engel olan ve enflamatuar etkilerin tersini gösteren birçok solunum yolu bakterisine karşı etkisini bildirmiştir. Bir çalışma, *E. p* ekstraktının ticari standardize edilmesinin normalde pulmoner enfeksiyonlarla ilişkili olan *Streptococcus pyogenes*' i ve *Haemophilus influenzae* ve *Legionella pneumophila* üzerindeki bakterisit etkilerini etkisizleştirebileceğini göstermiştir (Sharma ve ark., 2010). Bu sonuçlar, *E. p* ekstraktlarının farklı gram pozitif ve negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği olduğunu gösteren çalışmamızla uyumludur.

Ayrıca, Ekinezyanın farklı türlerinin bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal etkisini gösteren başka çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, *Boscia angustifolia*'nın kök ekstraktlarının (sulu ve kloroform) *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Hassan ve ark., 2006). Ek olarak, *Elaeagnus angustifolia* etil asetat ekstraktı, aynı bakterilere karşı bakteri öldürücü aktivite göstermiştir (Khan ve ark., 2016). Bu sonuçlar, Ekinezya'yı temsil eden çalışmamızın bakteri üremesini önleme yeteneğine sahip olduğunu doğrulamaktadır.

Tanı laboratuvarlarında, mikroorganizmanın bir antimikrobiyal maddeye karşı direncini kanıtlamak ve ayrıca yeni antimikrobiyal ajanların aktivitesini izlemek için minimum inhibe edici konsantrasyonlar gereklidir. MİK genellikle bir organizmaya karşı bir antimikrobiyal ajanın aktivitesinin en temel laboratuvar ölçümü olarak kabul edilir. Klinik olarak, hastanın alacağı antibiyotik miktarını ve kullanılan antibiyotik türünü belirlemek için MİK kullanılmaktadır (Plant ve Azedarach, 2012). Ayrıca, mevcut araştırmada bitki özleri MİK değerleri, tablolarda gösterildiği gibi MBC değerlerine eşit veya daha düşük çıkmıştır. Bu, bitki ekstraktlarının düşük konsantrasyonların yanında bakteriyostatik olduğunu, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda bakteri öldürdüğünü göstermektedir (Maji ve ark., 2010).

Bu çalışma, Ekinezya çiçek ve yaprağın bütün ekstraktlarının (su, metanol ve etilasetat), Şekil 4.1'de gösterildiği gibi DNA korumasında herhangi bir etkinliğe sahip olmadığını göstermiştir. Ekinezya ekstraktlarının iki konsantrasyonunda aşırı sarılmış DNA formunu korumadığı anlaşılmıştır. Bu sonuç, ekstraktlardaki metabolitlerin Fenton reaktifinin DNA korunmasından sorumlu olmadığından olabilir. Fenolik asitler ve flavonoidler gibi ekstraktlarda birkaç önemli bileşen olmasına rağmen, diğer taraftan, DNA'yı koruma kabiliyetleri tespit edilmemiştir.

Ayrıca, bu çalışmanın bulguları, Ekinezya çiçek ve yaprağının metanol ve etilasetat ekstraktlarının, insan servikal tümör hücre hatları üzerinde doza ve zamana bağlı olarak yüksek anti-proliferatif etkinliğine sahip olduğunu ortaya koymuştur. HeLa hücrelerinin yaşama kabiliyeti, ekstraktlarla 48 saat boyunca muamele edildiğinde 24 saate oranla azalmış ve hayatta kalma oranının düşük dozlara kıyasla 1000 µg/mL'de

önemli ölçüde azalmıştır. Sonuçlar, metanol çiçek ekstraktının, 48 saat sonra 73.03 µg/mL IC<sub>50</sub> ile tüm ekstraktlar arasında en düşük konsantrasyon olan 62.5 µg/mL boyunca sitotoksik aktivite göstermiştir. Metanol ekstraktının bu etkisi, Ekinezya çiçeğindeki ve yapraklarındaki kükrik asit varlığı ile açıklanabilir.

Önceki çalışmalarda, *E. purpurea*'nın sulu etanol ekstraktının, insan kolon tümör hücreleri Caco-2 ve HCT-116 üzerinde doza ve zamana bağlı bir şekilde önemli anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Tsai ve ark., 2012). Ek olarak, başka bir çalışma, üç Ekinezya türünden heksan kökü ekstraktlarının, insan pankreas tümörü MIA PaCa-2 ve kolon tümörü COLO320 hücre hatları üzerinde potansiyel anti-tümör etkinliğine sahip olduğunu ve konsantrasyon ve zamana bağlı bir şekilde hücrelerin canlılığının azaldığını ortaya koymuştur (Chicca ve ark., 2007). Bu sonuçlar, HeLa servikal tümör hücre hattının yaşayabilirliğini aynı şekilde azaltan *E. purpurea*'nın etkisini gösteren çalışmamızla tutarlı görünmektedir. Bununla birlikte, farmakolojik *E. purpurea* özelliklerinin çeşitli profillerini oluşturmak için gelecekteki araştırmalara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇ

Bu araştırmanın sonuçları, şifalı bitki Ekinezyanın, birkaç gram pozitif ve negatif bakterinin duyarlılığını sunan antibakteriyel etkinlik dâhil çeşitli biyolojik etkinliklere sahip olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, ekstraktların HeLa servikal tümör hücre hattının hücre canlılığını azaltma kabiliyetini gösteren anti-proliferatif aktivite, konsantrasyona ve zamana bağlıdır. Ekinezyanın aktif bileşiklerinin birçoğu tanımlanmış ve fitokimyasal profil fenolik asitlerin, flavonoidlerin ve diğer bileşiklerin varlığı ortaya konulmuştur.

Verilerimiz Ekinezya yaprağı ve çiçek ekstraktlarının çeşitli hastalıklara karşı bir tedavi olarak farmasötik endüstrilerce geliştirilebilecek antimikrobiyal bileşenler içerdiğini göstermektedir. Ekinezyanın su, metanol ve etil asetat ekstraktları, *E. faecalis* ATCC 25212 gibi test edilmiş bakterilere karşı önemli inhibe edici etkiye sahiptir. Ayrıca, ekstraktlar, anti-tümör doğal ürünlerinin ve *in vitro* kanıtlarının gelişmesini sağlayabilecek servikal tümörlerde önemli sitotoksisteyi indükleyebilir kemoterapötik ajanlar olarak kullanım için uygundur. Bu bulgular, Ekinezya bitkisinin tıbbi onkolojideki potansiyel durumu hakkında uygun bilimsel kanıtlar oluşturmak için başlangıç noktasıdır. Bununla birlikte, tüm Ekinezya ekstraktlarının DNA koruma etkinliği açısından bir veri sağlamadığı görülmüştür. Ekinezyanın kısımlarının özellik profilini belirlemek ve farmakolojik mekanizmaların ve faydaların anlaşılmasını geliştirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ahmad, Iqbal, Zafar Mehmood, and Faiz Mohammad. 1998. "Screening of Some Indian Medicinal Plants for Their Antimicrobial Properties." *Journal of Ethnopharmacology* 62 (2): 183–93.
- Barnes, Joanne, Linda A. Anderson, Simon Gibbons, and J. David Phillipson. 2005. "Echinacea Species (*Echinacea Angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea Pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea Purpurea* (L.) Moench): A Review of Their Chemistry, Pharmacology and Clinical Properties." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57 (8): 929–54. <https://doi.org/10.1211/0022357056127>.
- Barros, Lillian, Montserrat Dueñas, Maria Inês Dias, Maria João Sousa, Celestino Santos-Buelga, and Isabel C F R Ferreira. 2013. "Phenolic Profiles of Cultivated, in Vitro Cultured and Commercial Samples of *Melissa Officinalis* L. Infusions." *Food Chemistry* 136 (1): 1–8.
- Bauer, R. 1998. "Echinacea: Biological Effects and Active Principles." In *ACS Symposium Series*, 691:140–57. American Chemical Society.
- Bauer, Rudolf, Peter Remiger, and Hildebert Wagner. 1988. "Alkamides from the Roots of *Echinacea Purpurea*." *Phytochemistry* 27 (7): 2339–42.
- Bauer, Rudolf, and Hildebert Wagner. 1990. *Echinacea: Handbuch Für Ärzte, Apotheker Und Andere Naturwissenschaftler; Mit 26 Tabellen*. Wiss. Verlag-Ges.
- Bernstein, Bridget J, and Teresita Grasso. 2001. "Prevalence of Complementary and Alternative Medicine Use in Cancer Patients." *Oncology (Williston Park, NY)* 15 (10): 1267–72.
- Block, Keith I, and Mark N Mead. 2003. "Immune System Effects of Echinacea, Ginseng, and Astragalus: A Review." *Integrative Cancer Therapies* 2 (3): 247–67.
- Bohlmann, Ferdinand, and Horst Hoffmann. 1983. "Further Amides from *Echinacea Purpurea*." *Phytochemistry* 22 (5): 1173–75.
- Boushey, Carol J, Ann M Coulston, Cheryl L Rock, and Elaine Monsen. 2001. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*. Elsevier.
- Bystrom, Laura M, Betty A Lewis, Dan L Brown, Eloy Rodriguez, and Ralph L Obendorf. 2008. "Characterisation of Phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and Sugars by GC in *Melicoccus Bijugatus* Jacq. 'Montgomery' Fruits." *Food Chemistry* 111 (4): 1017–24.
- Chevallier, Andrew. 1996. *The Encyclopedia of Medicinal Plants: [A Practical Reference Guide to over 550 Key Herbs & Their Medicinal Uses]*. Dorling Kindersley London, UK.



- Chez, Ronald A, and Wayne B Jonas. 1997. "The Challenge of Complementary and Alternative Medicine." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 177 (5): 1156–61.
- Chicca, Andrea, Barbara Adinolfi, Enrica Martinotti, Stefano Fogli, MARIA CRISTINA Breschi, Federica Pellati, Stefania Benvenuti, and Paola Nieri. 2007. "Cytotoxic Effects of Echinacea Root Hexanic Extracts on Human Cancer Cell Lines." *Journal of Ethnopharmacology* 110 (1): 148–53.
- Chicca, Andrea, Stefan Raduner, Federica Pellati, Thomas Stropfen, Karl-Heinz Altmann, Roland Schoop, and Jürg Gertsch. 2009. "Synergistic Immunomodulatory Effects of N-Alkylamides in Echinacea Purpurea Herbal Extracts." *International Immunopharmacology* 9 (7–8): 850–58.
- Clifford, Michael N, Susan Knight, and Nikolai Kuhnert. 2005. "Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MS N." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (10): 3821–32.
- Gertsch, Juerg, Roland Schoop, Urs Kuenzle, and Andy Suter. 2004. "Echinacea Alkylamides Modulate TNF- $\alpha$  Gene Expression via Cannabinoid Receptor CB2 and Multiple Signal Transduction Pathways." *FEBS Letters* 577 (3): 563–69.
- Giles, Joel T, Cuthbert T Palat III, Susan H Chien, Ziba Gorji Chang, and Daniel T Kennedy. 2000. "Evaluation of Echinacea for Treatment of the Common Cold." *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 20 (6): 690–97.
- Grimm, Wolfram, and Hans-Helge Müller. 1999. "A Randomized Controlled Trial of the Effect of Fluid Extract of Echinacea Purpurea on the Incidence and Severity of Colds and Respiratory Infections." *The American Journal of Medicine* 106 (2): 138–43.
- Hassan, S W, R A Umar, M Lawal, L S Bilbis, B Y Muhammad, and Y U Dabai. 2006. "Evaluation of Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Root Extracts of *Boscia Angustifolia*." *African Journal of Biotechnology* 5 (18).
- Hohmann, Judit, Dóra Rédei, Peter Forgo, Pál Szabó, Tamás F Freund, József Haller, Engin Bojnik, and Sándor Benyhe. 2011. "Alkamides and a Neolignan from Echinacea Purpurea Roots and the Interaction of Alkamides with G-Protein-Coupled Cannabinoid Receptors." *Phytochemistry* 72 (14–15): 1848–53.
- Hoyweghen, Laura Van, Karolien De Bosscher, Guy Haegeman, Dieter Deforce, and Arne Heyerick. 2014. "In Vitro Inhibition of the Transcription Factor NF- $\kappa$ B and Cyclooxygenase by Bamboo Extracts." *Phytotherapy Research* 28 (2): 224–30.
- Jaballah, Hassan, Abdullah Mohammed, Serife Yerlikaya, and Mehmet Cengiz Baloglu. 2018. "AC." <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.04.040>.

- Kafil, Hossein S, and Ashraf M Mobarez. 2015. "Spread of Enterococcal Surface Protein in Antibiotic Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolates from Urinary Tract Infections." *The Open Microbiology Journal* 9: 14.
- Karaman, I, F Şahin, M Güllüce, H Ögütçü, M Şengül, and A Adıgüzel. 2003. "Antimicrobial Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Juniperus Oxycedrus* L." *Journal of Ethnopharmacology* 85 (2–3): 231–35.
- Keller, K. 1991. "Legal Requirements for the Use of Phytopharmaceutical Drugs in the Federal Republic of Germany." *Journal of Ethnopharmacology* 32 (1–3): 225–29.
- Khan, Jahir Alam, and Tewari Saurabh. 2011. "A Study on Antibacterial Properties of *Rosa Indica* against Various Pathogens." *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 10 (9): 2838–46.
- Khan, Shahid Ullah, Arif-ullah Khan, Azhar-ul-Haq Ali Shah, Syed Majid Shah, Sajid Hussain, Mohammad Ayaz, and Sultan Ayaz. 2016. "Heavy Metals Content, Phytochemical Composition, Antimicrobial and Insecticidal Evaluation of *Elaeagnus Angustifolia*." *Toxicology and Industrial Health* 32 (1): 154–61.
- Konar, Nevzat, Sevim Dalabasmaz, Ender Sinan Poyrazoglu, Nevzat Artik, and Ahmet Colak. 2014. "The Determination of the Caffeic Acid Derivatives of *Echinacea Purpurea* Aerial Parts under Various Extraction Conditions by Supercritical Fluid Extraction (SFE)." *The Journal of Supercritical Fluids* 89: 128–36.
- Kumar, K M, and Sudha Ramaiah. 2011. "Pharmacological Importance of *Echinacea Purpurea*." *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2 (4): 304–14.
- Laasonen, Magali, Tero Wennberg, Tuulikki Harmia-Pulkkinen, and Heikki Vuorela. 2002. "Simultaneous Analysis of Alkamides and Caffeic Acid Derivatives for the Identification of *Echinacea Purpurea*, *Echinacea Angustifolia*, *Echinacea Pallida* and *Parthenium Integrifolium* Roots." *Planta Medica* 68 (06): 572–74.
- Lee, Jungmin, and Carolyn F Scagel. 2013. "Chicoric Acid: Chemistry, Distribution, and Production." *Frontiers in Chemistry* 1: 40.
- Llorent-Martínez, Eulogio J, Gokhan Zengin, Devina Lobine, Lucia Molina-García, Adriano Mollica, and Mohamad Fawzi Mahomoodally. 2018. "Phytochemical Characterization, in Vitro and in Silico Approaches for Three *Hypericum* Species." *New Journal of Chemistry* 42 (7): 5204–14.
- Locatelli, Marcello, Serife Yerlikaya, Mehmet Cengiz Baloglu, Gokhan Zengin, Yasemin Celik Altunoglu, Francesco Cacciagrano, Cristina Campestre, Mohamad Fawzi Mahomoodally, and Adriano Mollica. 2018. "Investigations

into the Therapeutic Potential of Asphodeline Liburnica Roots: In Vitro and in Silico Biochemical and Toxicological Perspectives.” *Food and Chemical Toxicology* 120: 172–82.

- Luo, Xu-Biao, Bo Chen, Shou-Zhuo Yao, and Jian-Guo Zeng. 2003. “Simultaneous Analysis of Caffeic Acid Derivatives and Alkamides in Roots and Extracts of *Echinacea Purpurea* by High-Performance Liquid Chromatography–photodiode Array Detection–electrospray Mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography A* 986 (1): 73–81.
- Ma, Yuanyuan, Agnieszka Kosińska-Cagnazzo, William L Kerr, Ryszard Amarowicz, Ruthann B Swanson, and Ronald B Pegg. 2014. “Separation and Characterization of Phenolic Compounds from Dry-Blanched Peanut Skins by Liquid Chromatography–electrospray Ionization Mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography A* 1356: 64–81.
- Maji, S, P Dandapat, D Ojha, C Maity, S K Halder, P K D Mohapatra, T K Pathak, B R Pati, A Samanta, and K C Mondal. 2010. “In Vitro Antimicrobial Potentialities of Different Solvent Extracts of Ethnomedicinal Plants against Clinically Isolated Human Pathogens.” *Journal of Phytology*.
- Manček, Bronja, and Samo Kreft. 2005. “Determination of Cichoric Acid Content in Dried Press Juice of Purple Coneflower (*Echinacea Purpurea*) with Capillary Electrophoresis.” *Talanta* 66 (5): 1094–97.
- Matthias, A, K G Penman, K M Bone, and R P Lehmann. 2004. “Echinacea—what Constituents Are Therapeutically Important.” In *International Congress on Natural Product Research, Phoenix, Arizona*: 43.
- McKeown, Kathleen A. 1999. “A Review of the Taxonomy of the Genus *Echinacea*.” *Perspectives on New Crops and New Uses*, 482–89.
- Melchart, Dieter, Christof Clemm, Bernhard Weber, Thorsten Draczynski, Felege Worku, Klaus Linde, Wolfgang Weidenhammer, Hildebert Wagner, and Reinhard Saller. 2002. “Polysaccharides Isolated from *Echinacea Purpurea* Herba Cell Cultures to Counteract Undesired Effects of Chemotherapy—a Pilot Study.” *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 16 (2): 138–42.
- Mishima, Satoshi, Kiyoto Saito, Hiroe Maruyama, Makoto Inoue, Takenori Yamashita, Torao Ishida, and Yeunhwa Gu. 2004. “Antioxidant and Immuno-Enhancing Effects of *Echinacea Purpurea*.” *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27 (7): 1004–9.
- Organization, World Health. 1999. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*. Vol. 2. World Health Organization.
- Patel, Tanha, Audra Crouch, Kayla Dowless, and David Freier. 2008. “122. Acute Effects of Oral Administration of a Glycerol Extract of *Echinacea Purpurea*

- on Peritoneal Exudate Cells in Female Swiss Mice.” *Brain Behavior and Immunity* 4 (22): 39.
- Pepping, J. 1999. “Echinacea.” *American Journal of Health-System Pharmacy* 56 (2): 121–22.
- Pleschka, Stephan, Michael Stein, Roland Schoop, and James B Hudson. 2009. “Anti-Viral Properties and Mode of Action of Standardized *Echinacea purpurea* Extract against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1, H7N7) and Swine-Origin H1N1 (S-OIV).” *Virology Journal* 6 (1): 197.
- Randolph, R K, K Gellenbeck, K Stonebrook, E Brovelli, Y Qian, D Bankaitis-Davis, and J Cheronis. 2003. “Regulation of Human Immune Gene Expression as Influenced by a Commercial Blended Echinacea Product: Preliminary Studies.” *Experimental Biology and Medicine* 228 (9): 1051–56.
- Richardson, Mary Ann, Tina Sanders, J Lynn Palmer, Anthony Greisinger, and S Eva Singletary. 2000. “Complementary/Alternative Medicine Use in a Comprehensive Cancer Center and the Implications for Oncology.” *Journal of Clinical Oncology* 18 (13): 2505–14.
- Rubinstein, Ethan, Marin H Kollef, and Dilip Nathwani. 2008. “Pneumonia Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*.” *Clinical Infectious Diseases* 46 (Supplement\_5): S378–85.
- See, Darryl M, Nikki Broumand, Lisa Sahl, and Jeremiah G Tilles. 1997. “In Vitro Effects of Echinacea and Ginseng on Natural Killer and Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity in Healthy Subjects and Chronic Fatigue Syndrome or Acquired Immunodeficiency Syndrome Patients.” *Immunopharmacology* 35 (3): 229–35.
- Sen, Antara, and Amla Batra. 2012. “Evaluation of Antimicrobial Activity of Different Solvent Extracts of Medicinal Plant: *Melia Azedarach L.*” *Int J Curr Pharm Res* 4 (2): 67–73.
- Sharma, S M, M Anderson, S R Schoop, and J B Hudson. 2010. “Bactericidal and Anti-Inflammatory Properties of a Standardized Echinacea Extract (Echinaforce®): Dual Actions against Respiratory Bacteria.” *Phytomedicine* 17 (8–9): 563–68.
- Spelman, Kevin, Matthew H Wetschler, and Nadja B Cech. 2009. “Comparison of Alkylamide Yield in Ethanolic Extracts Prepared from Fresh versus Dry *Echinacea purpurea* Utilizing HPLC–ESI-MS.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49 (5): 1141–49.
- Tarleton, A. 1997. “Echinacea Juice for Immune Stimulation—Assessment of Risks and Benefits.” *Austin, TX, American Botanical Council, Herb Clip*, no. 100874.
- Tsai, Yu-Ling, Chien-Chih Chiu, Jeff Yi-Fu Chen, Kung-Chi Chan, and Sheng-Dun Lin. 2012. “Cytotoxic Effects of Echinacea *Purpurea* Flower Extracts and

- Chicoric acid on Human Colon Cancer Cells through Induction of Apoptosis.” *Journal of Ethnopharmacology* 143 (3): 914–19.
- Tyler, Varro E. 1994. *Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals*. Pharmaceutical Products Press (imprint of Haworth Press, Inc.).
- Uysal, Sengul, Asli Ugurlu, Gokhan Zengin, Mehmet Cengiz Baloglu, Yasemin Celik, and Fawzi Mahomoodally. 2017. “Novel in Vitro and in Silico Insights of the Multi-Biological Activities and Chemical Composition of Bidens Tripartita L.” *Food and Chemical Toxicology*, no. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.058>.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T D Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser. 2007. “Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44–84.
- Wills, R B H, and D L Stuart. 1999. “Alkylamide and Chicoric acid Levels in *Echinacea purpurea* Grown in Australia.” *Food Chemistry* 67 (4): 385–88.
- Wolf, H, C Ruedl, and G Wick. 1994. “Can Orally Applied Immunomodulators Improve the Local Defense?” *INFECTIOUS DISEASE AND THERAPY SERIES* 15: 351.
- Woods, Stephanie E, Mia T Lieberman, Francois Lebreton, Elise Trowel, César de la Fuente-Núñez, Joanne Dzink-Fox, Michael S Gilmore, and James G Fox. 2017. “Characterization of Multi-Drug Resistant Enterococcus Faecalis Isolated from Cephalic Recording Chambers in Research Macaques (Macaca Spp.)” *PloS One* 12 (1): e0169293.
- Yerlikaya, Serife, Gokhan Zengin, Adriano Mollica, and Mehmet C Baloglu. 2017. “A Multidirectional Perspective for Novel Functional Products: In Vitro Pharmacological Activities and In Silico Studies on Ononis Natrrix Subsp . Hispanica” 8 (September): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00600>.
- Yerlikaya, Serife, Gokhan Zengin, Adriano Mollica, Mehmet C Baloglu, Yasemin Celik Altunoglu, and Abdurrahman Aktumsek. 2017. “A Multidirectional Perspective for Novel Functional Products: In Vitro Pharmacological Activities and in Silico Studies on Ononis Natrrix Subsp. Hispanica.” *Frontiers in Pharmacology* 8: 600.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Khawla Omran Mohammed  
SHARIF  
Doğum Tarihi ve Yeri : 28.7.1987 Trablus-Libya  
Medeni Durumu : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : koka.malik@gmail.com



## EĞİTİM GEÇMİŞİ

Lise : Om Almomeneen.  
Üniversite : Trablus Üniversitesi, Tıbbi Teknoloji Fakültesi -  
Patoloji Anabilim Dalı.  
Yüksek lisans : Kastamonu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı.