

TC.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK MESLEK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
FARMAKOGNOZİ YÜKSEK LİSANS (TEZLİ) PROGRAMI

***VERBASCUM OBTUSIFOLIUM* HUB.-MOR.
(*SCROPHULARIACEAE*) BİTKİSİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Başak ÖZBİLGİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gamze KÖKDİL

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE-MB (BÖ) 2004-3 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

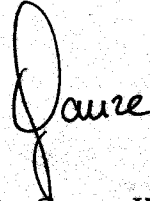
Tez No: 67

MERSİN-2006

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Meslek Bilimleri Anabilim Dalı Farmakognozi Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan '*Verbascum obtusifolium* Hub.-Mor. (*Scrophulariaceae*) Bitkisi Üzerinde Farmakognozیک Araştırmalar' adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi: 10.07.2006



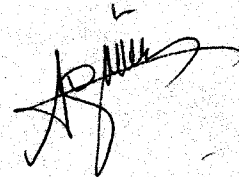
Prof. Dr. Gamze Kökdil

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Eczacılık Meslek Bilimleri Anabilim Dalı
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Şahan Saygı

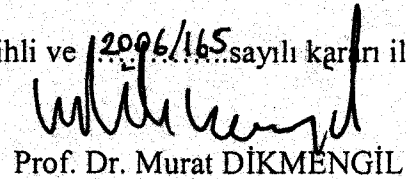
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Toksikoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Ayşegül Güvenç

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Botanik Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez Enstitü Yönetin Kurulunun 12.07.2006 tarihli ve 2006/165 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Murat DİKMENGİL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın bütün aşamalarında derin bilgi birikimi, tecrübesi ve manevi desteği ile sürekli yanımda hissettiğim Sayın Hocam Prof. Dr. Gamze KÖKDİL'e ve hayatımın her anında yanı başımda olan AİLEME sonsuz teşekkürler.

Tez çalışmalarım boyunca her türlü kademede birlikte düşünüp birlikte adım attığım, yardımlaştığım arkadaşım Sevda Güzel'e teşekkürler.

Araştırmalarımın HPLC analizleri kısmında analizlerin yapılabilmesi için laboratuvar imkanlarını istifademize sunan Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç Dr. Serpil Ünyayar'a ve analizlerde teknik bilgilerinden yararlandığımız Dr. Hüseyin Yılmaz'a ve arkadaşım Arş.Gör. Aysin Güzel'e teşekkürler.

Antibakteriyel aktivite çalışmalarım için yardımlarından dolayı Prof. Dr. Gürol Emekdaş'a (Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı) ve sabırlı ve samimi davranışlarıyla Doç.Dr. Nuran Delialioğlu'na (Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı) teşekkür ederim.

Antiviral aktivite çalışmalarım da yardımcı olan Dr. Julia Serkedjieva'ya (Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences) ayrıca Prof. Dr. Aykut Özkul'a (Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi) ve arkadaşım Arş.Gör.Seda Tezcan'a (Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı) teşekkürler.

Antioksidan aktivite çalışmamın gerçekleşmesini sağlayan Doç. Dr. Ayşegül Güvenç'e (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı) teşekkürler.

İlgisi ve samimiyeti ile manevi desteğini hissettiğim bölüm hocam Yrd.Doç.Dr. Sakine Könükol Kaleağası'na teşekkürler.

Çalışma materyalimin teşhisinde yardımlarından dolayı Yrd.Doç.Dr. Ahmet İlcim'e (Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve Yrd.Doç.Dr. Faik Karavelioğlu'na (Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) teşekkür ederim.

Bu araştırmanın gerçekleşmesi için mali destek sağlayan Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
KROMATOGRAMLAR DİZİNİ	ix
KALİBRASYON EĞRİLERİ DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1 Botanik Bilgiler	3
2.1.1 <i>Scrophulariaceae</i> Familyası	3
2.1.2 <i>Verbascum</i> L. Cinsi	3
2.1.3 <i>V. obtusifolium</i> Hub.-Mor.	5
2.2 <i>Verbascum</i> Türlerinin Geleneksel Tıpta Kullanımları	10
2.3 <i>Verbascum</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Fitokimyasal Araştırmalar	11
2.3.1 Saponozitler	11
2.3.2 Flavonoidler	15
2.3.3 İridoidler	17
2.3.4 Fenil Etanoit ve Fenil Propanoit Glikozitleri	19
2.3.5 Steroidal Bileşikler	21
2.3.6 Seskiterpen Asit	22
2.3.7 Makrosiklik Dimer Lakton	22
2.3.8 Alkaloidler	23
2.4 Türkiye’de Yetişen <i>Verbascum</i> Türleri İle İlgili Yapılmış Fitokimyasal Araştırmalar	24
2.5 <i>Verbascum</i> Türleri Üzerindeki Biyolojik Aktivite Araştırmaları	26
2.5.1 Antimikrobiyal Etki	27

2.5.1.1 Antiviral Etki	27
2.5.1.2 Antibakteriyel ve Antifungal Etki	29
2.5.1.3 Türkiye’de Yetişen <i>Verbascum</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Antimikrobiyal Etki Araştırmaları	33
2.5.2 Antioksidan Etki	35
2.5.2.1 Türkiye’de Yetişen <i>Verbascum</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Antioksidan Etki Araştırmaları	37
2.5.3 İmmunomodulator Etki	39
2.5.4 Sitotoksik ve Antitümör Etki	40
2.5.5 Antihepatoma Etki	41
2.5.6 Antiülser Etki	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1 Gereç	42
3.1.1 Bitkisel Materyal	42
3.1.2 Kullanılan Maddeler	42
3.1.3 Kullanılan Cihazlar	43
3.2 Yöntem	44
3.2.1 Fitokimyasal Çalışmalar	44
3.2.1.1 Ekstraksiyon	44
3.2.1.2 Ekstrelerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile Kalitatif ve Kantitatif Analizi	44
3.2.2 Biyoaktivite Çalışmaları	47
3.2.2.1 Antioksidan Etki	47
3.2.2.2 Antimikrobiyal Etki	49
3.2.2.2.1 Antibakteriyel Etki	49
3.2.2.2.2 Antiviral Etki	51
4. BULGULAR	58
4.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile Kalitatif ve Kantitatif Analiz Sonuçları	58
4.2 Antioksidan Etki Çalışmasının Sonuçları	68
4.3 Antimikrobiyal Etki Sonuçları	70
4.3.1 Antibakteriyel Etki Sonuçları	70

4.3.2 Antiviral Etki Sonuçları	71
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	77
7. KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>V. obtusifolium</i> 'un yetiştiği yerler	5
Şekil 2. <i>V. nigrum</i> 'dan elde edilen yeni saponozitler	12
Şekil 3. <i>V. songaricum</i> 'dan izole edilmiş saponozitler	14
Şekil 4. <i>V. phlomoides</i> 'in çiçeklerinden elde edilen saponozitler	14
Şekil 5. <i>V. sinaiticum</i> , <i>V. thapsiforme</i> , <i>V. fruticosum</i> bitkilerinden elde edilen saponozitler	15
Şekil 6. <i>V. sinaiticum</i> 'dan elde edilmiş olan flavonoit	16
Şekil 7. <i>V. thapsiforme</i> 'nin çiçeklerinden izole edilen flavonoit	16
Şekil 8. <i>V. phlomoides</i> 'den elde edilen iridoit glikoziti	17
Şekil 9. <i>V. nigrum</i> 'dan izole edilmiş iridoit glikozitler	18
Şekil 10. <i>V. spinosum</i> 'dan elde edilmiş yeni iridoit bileşik	19
Şekil 11. <i>V. sinuatum</i> 'dan izole edilmiş fenilpropanoit	20
Şekil 12. <i>V. thapsus</i> 'dan elde edilmiş steroidal bileşikler	21
Şekil 13. <i>V. thapsus</i> 'dan elde edilen seskiterpen asit	22
Şekil 14. <i>V. undulatum</i> 'dan elde edilmiş olan makrosiklik lakton	22
Şekil 15. <i>V. pseudonobile</i> 'nin yapraklarından elde edilmiş bazı alkaloitler	23
Şekil 16. <i>V. wiedemannianum</i> 'dan elde edilmiş fenil etanoit glikozitler	24
Şekil 17. <i>V. salviifolium</i> bitkisinden elde edilmiş flavonoit glikozitler	25
Şekil 18. <i>V. lasianthum</i> 'dan elde edilen bileşikler	26
Şekil 19. Morin internal standartının kimyasal formülü	46
Şekil 20. Virüslerin seri seyreltilme işlemi	52
Şekil 21. Ekstrelerin seri seyreltilme işlemi	52
Şekil 22. Plate'lerin genel görünüşü ve platelere uygulanan dilüsyon miktarları	54
Şekil 23. <i>V. obtusifolium</i> topraküstü ve çiçek ekstraktlarının DPPH testi ile yapılan antioksidan etki tayinine ait ince tabaka kromatogramı	69
Şekil 24. MDA ile tiyobarbitürik asitin reaksiyonu	70

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. <i>Scrophulariaceae</i> familyasına ait Türkiye’de yetişen cinsler	4
Tablo 2. Türkiye’de yetişen <i>Verbascum</i> türlerinin “Flora of Turkey and the East Aegean Islands” da ayrılmış olan gruplara göre tür ve endemik tür dağılımı	9
Tablo 3. <i>V. undulatum</i> antibakteriyel etki çalışmasında Magiatis ve arkadaşlarının kullandıkları mikroorganizmalar ve elde edilen test sonuçları	30
Tablo 4. <i>V. leptostychem</i> ekstralarının MIC değerleri	31
Tablo 5. <i>V. sinaiticum</i> ile yapılan antimikrobiyal aktivite test sonuçları	32
Tablo 6. <i>V. gypsicola</i> bitkisiyle yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar ve elde edilmiş sonuçlar	34
Tablo 7. Farklı konsantrasyonlarda verbaskozit ve ekinakozit’in DPPH radikal indirgeme yüzdesi	38
Tablo 8. <i>V. thapsus</i> sulu ekstresinin antihepatoma aktivite test sonuçları	41
Tablo 9. Gradient yönteme göre mobil faz değişimi	45
Tablo 10. NCCLS’de belirtilen, seri sıvı dilüsyon duyarlılık testlerinde kullanılan ekstraların sulandırma şeması	50
Tablo 11. <i>V. obtusifolium</i> toprak üstü ve kaliks metanol ekstralarında bulunan flavonoidlerin % miktarları	68
Tablo 12. <i>V. obtusifolium</i> ekstraları üzerinde tiyobarbitürik asit testi ile yapılan antioksidan etki sonuçları	68
Tablo 13. <i>V. obtusifolium</i> antibakteriyel etki çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar ve elde edilen test sonuçları	71
Tablo 14. <i>Influenza</i> viruslerinin ekstralara duyarlılığı	71
Tablo 15. <i>Herpes simplex</i> virüslerinin ve enfekte virus ürün inhibisyon verimi	72

KROMATOGRAMLAR DİZİNİ

Kromatogram 1. <i>V. obtusifolium</i> topraküstü metanol ekstresinin YBSK kromatogramı	59
Kromatogram 2. Mirsetin standardının YBSK kromatogramı	59
Kromatogram 3. Morin standardının YBSK kromatogramı	60
Kromatogram 4. Luteolol standardının YBSK kromatogramı	60
Kromatogram 5. Kemferol standardının YBSK kromatogramı	61
Kromatogram 6. İzoramnetin standardının YBSK kromatogramı	61
Kromatogram 7. <i>V. obtusifolium</i> topraküstü ekstresi + luteolol standartının YBSK kromatogramı	62
Kromatogram 8. <i>V. obtusifolium</i> topraküstü metanol ekstresi + mirsetin + izoramnetin standartlarının YBSK kromatogramı	62
Kromatogram 9. <i>V. obtusifolium</i> topraküstü metanol ekstresi + kemferol standartının YBSK kromatogramı	63
Kromatogram 10: <i>V. obtusifolium</i> kaliksin metanol ekstresinin YBSK Kromatogramı	63

KALİBRASYON EĞRİLERİ DİZİNİ

Kalibrasyon eğrisi 1. Mirsetinin kimyasal formülü, kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi	64
Kalibrasyon eğrisi 2. Luteololün kimyasal formülü, kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi	65
Kalibrasyon eğrisi 3. Kemferolün kimyasal formülü, kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi	66
Kalibrasyon eğrisi 4. İzoramnetinin kimyasal formülü, kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi	67

ÖZET

Özbilgin B. *Verbascum obtusifolium* Hub.Mor. (*Scrophulariaceae*) Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Programı Yüksek Lisans Tezi, Mersin 2006

Verbascum cinsi yeryüzünde 360 kadar tür ile temsil edilmektedir. Cins ait türler Kuzey yarıkürede ılıman bölgelerde yayılmıştır. Türkiye’de 185’i endemik olmak üzere 233 türü vardır. *V. obtusifolium* türü Güney Anadolu’da yetişen endemik bir türdür.

Bu çalışmada *V. obtusifolium* bitkisinin topraküstü kısmı ve kaliksinden hazırlanan metanol ekstrelerinin YBSK analizleri ile flavonoidleri, kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiştir. Bitkinin topraküstü ve kaliks kısmının metanol ekstrelerinde mirsetin, luteolol, kemferol ve izoramnetin flavonoidleri tespit edilmiştir ve miktar tayinleri yapılmıştır. Toprak üstü kısmın metanol ekstresinde flavonoidlerin % miktarları; mirsetin (0.070267 ± 0.0004807), luteolol (0.071667 ± 0.0002906), kemferol (0.224333 ± 0.0019641) ve izoramnetin (0.023667 ± 0.0014438) olarak saptanmışken kaliksin metanol ekstresinde ise luteolol (0.428867 ± 0.0007055) ve izoramnetin (0.185933 ± 0.0032049) ana flavonoidler olarak belirlenmiştir.

Bitkinin topraküstü kısmın metanollü ve diklorometanlı ekstrelerinin ve kaliksin metanollü ekstresinin antioksidan, antibakteriyel ve antiviral aktiviteleri de incelenmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri iki farklı teknik yapılmıştır. Serbest radikal süpürücü aktiviteyi belirlemek için DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) testi ve lipozom lipid peroksidasyonunu belirlemek için TBA (Tiyobarbitürik asit) testi kullanılmıştır. Bitkinin topraküstü kısmının metanollü ekstresi yüksek aktivite (IC_{50} 0.11 mg/ml), kaliks metanollü ekstresi ise orta aktivite (IC_{50} 1.86 mg/ml) göstermiştir.

Ekstreler makrodilüsyon yöntemi ile *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* bakterileri kullanılarak antibakteriyel aktivite açısından incelenmiştir. Bitkinin metanol ekstresinin *S. aureus*’a karşı düşük etkili olduğu bunun yanında diklorometan ekstresinin *P. aeruginosa* ve *B. subtilis* hariç olmak üzere kullanılan diğer bakterilere hafif etki gösterdiği gözlenmiştir. Çiçek metanol ekstresi ise sadece *B. subtilis*’e karşı etki göstermiştir.

Antiviral çalışma, *Herpes Simplex I* virüs, *Herpes Simplex II* virüs ve *Bovine Herpes* virüsleri kullanılarak, Cytopathogenic Effect (CPE) Reduction ve %50 End Point Titration Technique (EPTT) testleri ile yapılmıştır. Bitkinin toprak üstü kısmının diklorometanlı ekstresi *Herpes Simplex I* ve *Herpes Simplex II* virüsüne karşı yüksek aktivite gösterirken, *Bovine Herpes* virüsüne hiçbir ekstresi aktif bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: *Verbascum obtusifolium*, *Scrophulariaceae*, YBSK, flavonoid, antibakteriyel aktivite, antiviral aktivite, antioksidan aktivite

ABSTRACT

Özbilgin, B., Pharmacognostical Investigation on *Verbascum obtusifolium* Hub.-Mor. (*Scrophulariaceae*), Mersin University, Institute of Health Sciences, Pharmacognosy Program, MSC Thesis, Mersin 2006

The genus *Verbascum* (*Scrophulariaceae*) is represented by more than 360 species, distributed throughout temperate areas of the northern hemisphere. There are 233 *Verbascum* species in Turkey, including 185 endemic species. *V. obtusifolium* Hub.-Mor. is an endemic species grow in a wild South Anatolia. In this study, the methanolic extracts obtained from the aerial parts and calyx of *V. obtusifolium* were studied by reversed phase high performance liquid chromatography. Four flavonoids were identified as myrcetin, luteolol, kaempferol and isorhamnetine in the methanolic extract of aerial parts and calyx. Myrcetin (0.070267 ± 0.0004807), luteolol (0.071667 ± 0.0002906), kaempferol (0.224333 ± 0.001961) and isorhamnetine (0.023667 ± 0.0014438) were detected in the methanolic extract of the aerial parts, whereas luteolol (0.428867 ± 0.0007055), isorhamnetine (0.185933 ± 0.0032049) were determined as the major flavonoids in the calyx extract.

The antioxidant, antibacterial and antiviral activities of the aerial parts and calyx extracts of *V. obtusifolium* were also investigated. The antioxidant activities of the extracts were studied by two different techniques: qualitative DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay to detect the free radical scavenging activity and the TBA assay to detect liposome lipid peroxidation. The methanol extract obtained from aerial parts of the plant showed a strong antioxidant activity (IC_{50} 0.11 mg/ml), while moderate activity (IC_{50} 1.86 mg/ml) was observed in the methanol extract of the calyx with the lipid peroxidation assay method.

The extracts were examined for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* bacteria using macrodilution method. While, the dichloromethane extract of aerial parts were slight effective against all the bacteria except for *P. aeruginosa* and *B. subtilis*, the methanol extract of aerial parts were slight effective against only *S. aureus*. The methanol extracts of calyx parts showed antibacterial activity against only *B. subtilis*.

The antiviral activity of the extracts were determined by Cytopathogenic Effect (CPE) Reduction and %50 End Point Titration Technique (EPTT) tests. While dichloromethane extract of aerial parts was high effective against *Herpes Simplex I* virüs and *Herpes Simplex II* virüs, all extracts were not effective against *Bovine Herpes* virüs.

Keyword: *Verbascum obtusifolium*, *Scrophulariaceae*, HPLC, flavonoid, antibacterial activity, antiviral activity, antioxidant activity

1. GİRİŞ

Verbascum cinsi *Scrophulariaceae* familyasına ait bir cinistir, dünyada 360 kadar tür ile temsil edilmektedir ve bu cinse ait türler Kuzey Yarıkürede ılıman bölgelere yayılmış olup kuru, açık ve kayalık habitatları tercih etmektedir (1,2). *Verbascum* cinsi ülkemizde “sığırkuyruğu, kral şamdani” olarak bilinmektedir ve 185’i endemik olmak üzere 233 türü bulunmaktadır (3, 4, 5).

Dünyada çok tanınan ve kullanılan türler *V. thapsus* L. (İng. “common müllein”), *V. phlomoides* L., *V. thapsiforme* L., (Syn: *V.densiflorum* Schrader), *V. lychnitis* L. (İng. “white müllein”) ve *V. nigrum* L. (İng. “dark müllein”) türleridir (6). **Flos Verbasci** isimli drog bazı *Verbascum* türlerinin, stamenleri ile birlikte toplanıp gölgede kurutulmuş korollasıdır. Bu drog bilhassa *V. phlomoides*, *V. thapsiforme* ve *V. thapsus* türleri ile türlerin grubunda bulunan diğer türlerden elde edilmektedir. Bu türler 50-200 cm yükseklikte, parlak sarı çiçekli, büyük tüylü yapraklı ve iki yıllık bitkilerdir. Dağ ve yol kenarlarında bol olarak bulunmaktadır (7).

Literatür incelendiğinde özellikle çok tanınan türler olan *V. thapsus*, *V. phlomoides*, *V. lychnitis* ve *V. nigrum* olmak üzere diğer *Verbascum* türlerinin de çeşitli araştırmalara konu olduğu görülmektedir. Bu güne dek araştırılan *Verbascum* türlerinde saponozit, flavonoid, iridoit, feniletanoit ve fenilpropanoit glikozitler, steroid, seskiterpen asit, makrosiklik dimer lakton ve alkaloidler gibi sekonder metabolitlerin olduğu saptanmıştır. Bu sekonder metabolit çeşitliliği *Verbascum* türlerinde farklı aktivitelerin olabileceğini ve *Verbascum* türlerinin potansiyel tıbbi bitkiler olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. *Verbascum* türlerinin ekspektoran, diüretik, demulsan, sedatif etkilerinin bulunduğu ve bu etkileri nedeniyle geleneksel olarak dahilen ve haricen kullanılmalarının yanısıra antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiülserojenik, antioksidan, sitotoksik ve antitümör, antihepatoma, immunomodülatör ve antiülserojenik etkilerinin çeşitli araştırmalarla saptanmış olması *Verbascum* türlerini bilimsel açıdan ilgi çekici hale getirmektedir (8, 9).

Birçok *Verbascum* türünün çiçek ve yapraklarının geleneksel tıpta kullanım dökümanlarına Avrupa, Asya, Afrika ve Kuzey Amerika toplumlarında rastlanmıştır. Türkiye’de *V. thapsus*, *V. phlomoides* ve *V. thapsiforme* türleri halk arasında diüretik,

ekspektoran, sedatif etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. Ayrıca tohumları içerisinde bulunan saponozitden dolayı zehirli olduğundan balık avcılığında kullanılmaktadır. Bu özelliğinden dolayı Anadolu'nun kuzeyinde *Verbascum* türlerine "balık bitkisi" adı verilmektedir (10).

Ülkemizde yetişen ve endemik bir *Verbascum* türü olan *V. obtusifolium* Hub.-Mor. bugüne kadar fitokimyasal ve biyolojik açıdan incelenmemiştir. Bu araştırmada *V. obtusifolium* bitkisinin toprak üstü kısımlarının ve çiçeklerinin flavonoidleri açısından fitokimyasal olarak incelenmesi ve bitkinin her iki kısmından farklı polaritedeki ekstraktlarının hazırlanarak antibakteriyel, antiviral ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Botanik Bilgiler

2.1.1 *Scrophulariaceae* Familyası

Spermatophyta bölümünün *Angiospermae* alt bölümü, *Dicotyledonae* sınıfı, *Sympetalae* alt sınıfı *Scrophulariales* takımında yer alan *Scrophulariaceae* familyası kozmopolit bir familya olup, 200'den fazla cins ve 3000 kadar tür içerir. Ülkemizde 30 cins ve 466 türü vardır (2, 11).

Scrophulariaceae familyası bitkileri tek veya çok yıllık, otsu, çalı veya nadiren küçük ağaç, bir kısmı da parazit bitkilerdir. Yapraklar alternan, oppozit veya çevrel dizilişli, basit veya parçalı ve stipulasızdır. Çiçekler hermafrodit, yaprak koltuklarında tek, rasemoz, spika veya panikula. Kaliks 4-5 bilabiata kadar veya bilobat olacak şekilde yarılmış; Korolla gamopetal, genellikle zigomorf ve bilabiat, bazen bir mahmuzlu veya tabanda keseli, bazen hemen hemen aktinomorf; korolla lobları tomurcukta daima imbrikat. Stamenler korollaya yapışık, 4 ve didinam, veya 2, nadiren 5 adettir. Anterler uzunluğuna açılmış veya tepede birleşmiş ve sürekli bir yarık ile açılır. Verimsiz stamenler (staminotlar) (1-3) var veya yok. Ovaryum üst durumlu, uçta bir stilus ile, genellikle yatay bir perde ile 2 gözlü; ovüller çok sayıda veya genellikle şişkin plasenta koltuğunda birkaç tane. Ovaryum nadiren tek gözlü (2 çepersel bifit plasenta ile). Çiçek formülü z. $K_{(4-5)}C_{(4-5)}A_{(4,2)}\underline{G}_{(2)}$ 'dir. Meyve çoğunlukla kapsül bazen açılmayan meyve. Tohumlar çok sayıda (3, 11).

2.1.2 *Verbascum* L. Cinsi

Verbascum cinsi *Scrophulariaceae* familyasının en geniş cinsidir. Türkiye'de 185'i endemik olmak üzere 233 tür ile temsil edilmektedir. Yüzden fazla hibriti bulunmaktadır (3, 4, 5). *Verbascum* adının yaprakların tüylülüğünü anımsatması için kaba tüylü anlamına gelen Latince "barba" kelimesinden türeyen "barbascum"

sözcüğünün değişmesiyle verildiği düşünülmektedir. Cinsin adını Linnaeus vermiştir (9). Familyaya ait Türkiye’de yetişen cinsler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. *Scrophulariaceae* familyasına ait Türkiye’de yetişen cinsler

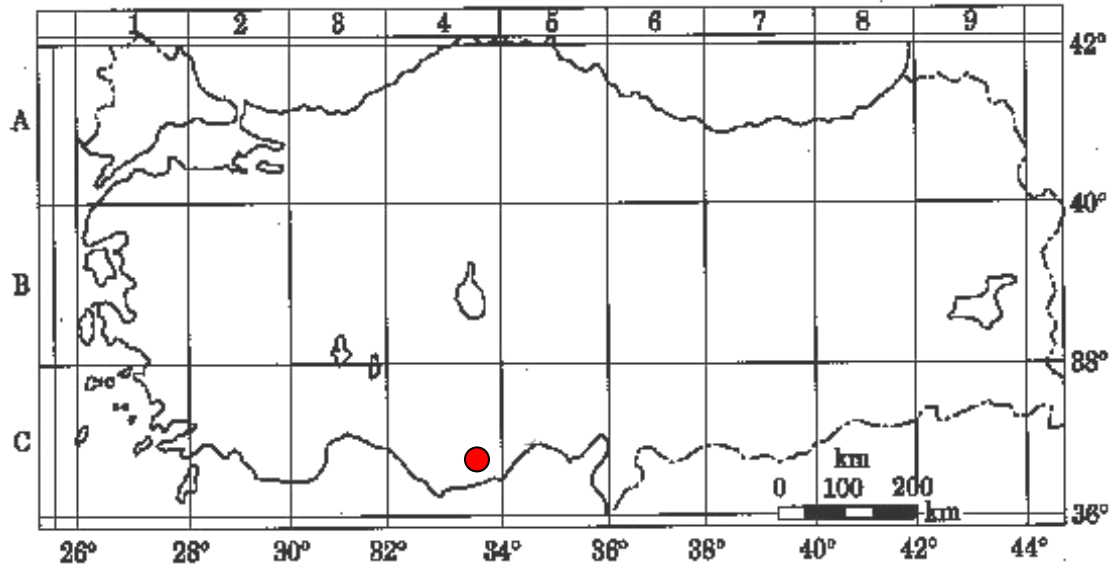
1. <i>Verbascum L.</i>	16. <i>Pseudolysimachion W. Koch</i>
2. <i>Scrophularia L.</i>	17. <i>Veronica L.</i>
3. <i>Anarrhinum Desf.</i>	18. <i>Lagotis Gaertner</i>
4. <i>Antirrhinum L.</i>	19. <i>Wulfenia Jacq.</i>
5. <i>Misopates Rafin.</i>	20. <i>Melampyrum L.</i>
6. <i>Chaenorhinum Reichb.</i>	21. <i>Euphrasia L.</i>
7. <i>Linaria Miller</i>	22. <i>Odontites Ludwig</i>
8. <i>Cymbalaria Hill</i>	23. <i>Parentucellia Viv.</i>
9. <i>Kickxia Dumort.</i>	24. <i>Bellardia All.</i>
10. <i>Dodartia L.</i>	25. <i>Pedicularis L.</i>
11. <i>Gratiola L.</i>	26. <i>Rhinanthus L.</i>
12. <i>Lindernia All.</i>	27. <i>Rhynchosyris Griseb</i>
13. <i>Limosella L.</i>	28. <i>Lesquereuxia Boiss.</i>
14. <i>Digitalis L.</i>	29. <i>Bungea C.A. Meyer</i>
15. <i>Rhamphicarpa Benth.</i>	30. <i>Lathraea L.</i>

Verbascum cinsine ait türler bir, iki veya çok yıllık otsu, nadiren küçük çalı şeklinde olup alternan, çok nadiren oppozit, basit veya parçalı yapraklı, taban yapraklar rozet oluşturmuştur. Bitki çıplak veya guddeli veya guddesiz tüylü, basit veya dallanmış tüylüdür. Çiçekler uçta rasemoz, spika veya panikula durumundadır. Kaliks eşit veya çok nadiren eşit bölünmemiştir. Korolla sarı, nadiren menekşe rengi veya mor, kahverengi veya sarımsı veya mavimsi yeşil; tekerleksi, ± aktinomorf veya bazen zigomorf simetridir. Stamenler 4 veya 5, bazen 4 verimli ve 1 verimsiz; filamentler ince, uzun, yumuşak tüylü, sarımsı veya mor menekşe renkli tüylü, veya nadiren çıplak, hepsi eşit veya öndeki 2 tanesi daha uzun ve daha incedir. Arkadaki (üstteki) 2 veya 3 stamenin anterleri her zaman reniform ve enine olarak ortadan bağlıdır. Öndeki 2 stamen benzer veya ± boyu eninden uzun, boyuna bağlı ve aşağı doğru ilerleyici veya nadiren meyilli bağlıdır. Stilus tek, iplik şeklinde veya hemen hemen çomak şeklinde, stigma yarı küremsi, obovat veya spatulattır. Kapsüller, septumlar boyunca yarılan küremsi, oblong-ovoid veya silindirikdir. Tohumlar çok sayıda ve küçüktür. Türkiye’deki türlerde ters koni- prizma şeklinde, enine çukurludur (3).

2.1.3 *V. obtusifolium* Hub.-Mor.

Çok yıllık, tabanı odunsu, 25-120 cm boyunda, her tarafta çok yoğun kalıcı beyaz tüy örtüsü ile kaplı. Gövdesi gür, silindirik, basit. Taban yapraklar ovat-orbicular, 6-18x3-11 cm, tam veya ince krenulat, obtus, petiol 1-6 cm; gövde yoğun, üsttekiler ovat-eliptik, tabandakiler hemen hemen kordat. Çiçek durumu basit veya tabana yakın kısmı kısa dallanmış, 4-9 çiçek kümesi ile. Brakteler geniş, yaprağa benzer, lanseolat 10-30x3-15 mm. Pedisel yok veya 1 mm, brakteoller linear, 5-10 mm. Kaliks 6-10 mm, orta derecede tomentoz, lopları linear-lanseolat, akut. Korolla sarı, 15-25 mm çapında seyrek saydam tüylü veya saydam tüysüz, seyrek olarak dışta yıldız tüylü. Stamenler 5, anterler reniform, filamentler beyazımsı sarı tüylü, öndeki ikisinin tepeye yakın kısmı çıplak. Kapsül genişçe ovat, 5-6 x 3.5-4.5 mm. Sık yumuşak tüylü, az çok çıplaklaşan. Çiçeklenme zamanı 5-8. aylar arası.

Habitat: Kireç taşlı yamaçlar, *Pinus brutia* ormanları, *Quercus* çalılıkları, makiler, mısır ve nadasa bırakılmış tarlalarda deniz seviyesinden-1000 m'ye kadar yetişir. Endemik. Doğu Akdeniz elementi. *V. linguifolium* türüne yakındır (3). Şekil 1'de *V. obtusifolium*'un yetiştiği yerler görülmektedir.

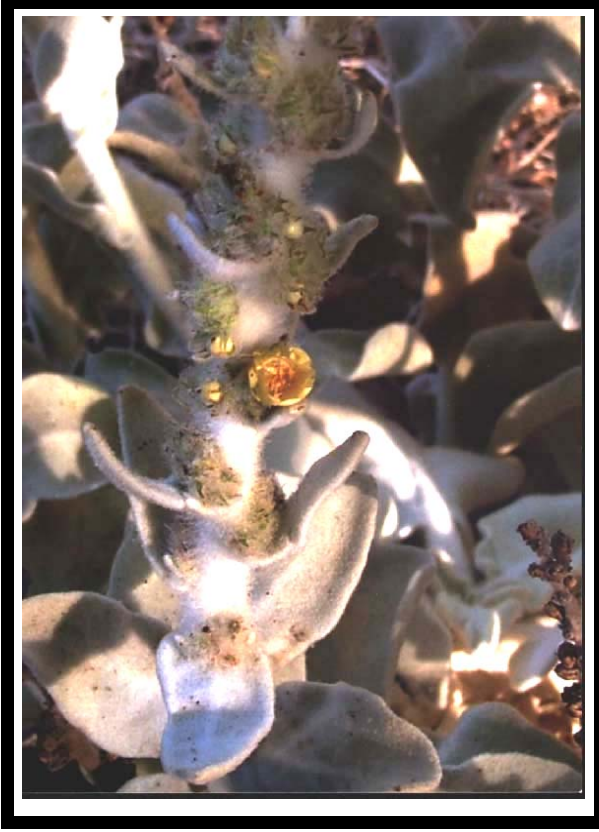


• *V. obtusifolium*

Şekil 1. *V. obtusifolium*'un yetiştiği yerler



V. obtusifolium Hub.-Mor. genel görünüş



V. obtusifolium Hub.-Mor. yakından çiçekli dal



V. obtusifolium Hub.-Mor. dal

Türkiye’de bulunan *Verbascum* türleri, Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Vol.6)’da yer alan tayin anahtarında 13 gruba bölünmüştür. Stamenlerin verimliliği, bitkinin tüylü olup olmadığı varsa bu tüylerin özellikleri, brakteol, anter ve filament özellikleri, pedisellerin uzunlukları gibi kriterler göz önüne alınarak gruplar ayrılmıştır. *Verbascum* cinsi türlerine ait grup ayrımı aşağıdaki gibidir;

1. Verimli stamen 4, 5. stamensiz veya 5. antersiz staminot ile **Grup A**
1. Verimli stamen 5
2. Bitki dallanmış tüysüz; tüyler basit, guddeli veya guddesiz, veya bitki çıplak
2. Bitki en azından kısmen dallanmış tüylü **Grup B**
3. Her brakte koltuğunda tek çiçek ile, nadiren alt brakteler 2 çiçekli
4. Brakteoller yok, nadiren alt brakteler brakteollü **Grup C**
4. Brakteoller var **Grup D**
3. Her brakte koltuğunda 2 veya daha fazla çiçekli, nadiren üst brakteler sadece tek çiçekli
5. Öndeki 2 stamen anteri uzun; uzunluğuna veya meyilli olarak bağlanmış.
Arkadaki 3 stamenin anteri reniform, enine ortadan bağlı **Grup E**
5. Anterlerin hepsi reniform, enine ortadan bağlı
6. Brakteol yok (nadiren tek brakteol var: *V. cedreti*, *V. tauri*) **Grup F**
6. Brakteol var
7. Çiçek kümesi saplı, nadiren sapsız ve o zaman 3-5 brakteollü **Grup G**
7. Çiçek kümesi sapsız, 2 brakteol ile
8. Öndeki 2 anterin konnektifi tüysüz, onların filamentlerinin tepeye yakın kısımları çoğunlukla tüysüz
9. Filament tüyleri mor (bazen aralıklı olarak beyaz veya sarı tüyler) **Grup H**
9. Filament tüyleri beyaz veya sarı **Grup I**
8. Bütün anterlerin konnektifleri yoğun olarak içler papilli, bütün filamentler tam anterlere kadar yünümsü tüylü
10. Filament tüyleri mor **Grup J**
10. Filament tüyleri beyazımsı sarı
11. En uzun pedisel kaliksin $\frac{1}{2}$ 'si veya daha kısa **Grup K**
11. En uzun pedisel kaliksten nadiren daha kısa veya onun kadar, veya daha uzun

12. En uzun pedisel kaliksten biraz uzun

Grup L

12. En uzun pedisel kaliks'in 2 katı veya daha uzun

Grup M

Tablo 2’de Türkiye’de yetişen *Verbascum* türlerinde gruplara göre tür ve endemik tür dağılımı görülmektedir.

Tablo 2. Türkiye’de yetişen *Verbascum* türlerinde gruplara göre tür ve endemik tür dağılımı

<i>Gruplar</i>	<i>Tür Sayısı</i>	<i>Endemik Olan Tür Sayısı</i>
A	27	19
B	12	7
C	27	23
D	7	4
E	17	10
F	21	19
G	13	11
H	14	11
I*	27	24
J	13	10
K	21	17
L	17	16
M	12	10
TOPLAM	228	181

* *V. obtusifolium* 'un içinde bulunduğu grup

Ayrıca Flora of Turkey and the East Aegean Islands’da (Vol. 10 ve 11) 4’ü endemik olmak üzere 5 *Verbascum* türünün de Türkiye’de yetiştiği tespit edilmiştir.

Bu türler;

V. gypsicola * Vural-Aydoğdu

V. basivelatum * Hub.-Mor.

V. pumiliforme * Hub.-Mor.

V. alpigenum C.Koch

V. transolypticum * Hub.-Mor.

* Endemik türler

Bu durumda *Verbascum* cinsi ülkemizde **185**’i endemik olmak üzere toplam **233** tür ile temsil edilmektedir (3, 4, 5).

2.2 *Verbascum* Türlerinin Geleneksel Tıpta Kullanımları

Verbascum türleri yetiştikleri yörelerde geleneksel tıpta uzun yıllar kullanılmış ve halen de kullanılmakta olan bitkilerdir.

V. thapsus, *V. thapsiforme*, *V. phlomoides* gibi türlerin çiçekleri müsilaj taşımaları sebebiyle boğaz irritasyonu ve öksürük tedavisinde kullanılmaktadır. Çiçeklerinden hazırlanan çay günde birkaç kez içilebilmektedir. Ayrıca soğuk algınlığı tedavisi sebebiyle bitki; Almanya'da yayınlanan Commission E monograflarında da yer almaktadır (6).

Kuzey Amerika'da 18 farklı kabile incelenerek yapılan etnobotanik bir çalışma sonucunda bu kabilelerin soğuk algınlığı, öksürük, zafiyet, astım gibi akciğer hastalıklarını, *V. thapsus*'un (İng. common müllein) yapraklarının dekoksilyonunu içerek tedavi ettikleri ortaya çıkmıştır. Antiviral etkisinden dolayı nezle, kabakulak ve ateş gibi hastalıklarda da kullanılmaktadır (12).

V. thapsus diyare, hemoroid, zatürre, ateş, kan toplanması, allerji, migren, tümörlere karşı, nezle, boğaz hastalıkları, deri rahatsızlıkları, bağırsak ve karın ağrılarında kullanılmaktadır. Bitki diüretik etkili olup, üriner sistemde antienflamatuvar etkisinden dolayı kullanılırken sedatif etkisi nedeniyle de kullanılmaktadır. Yaprak ve çiçeklerinin bronşit, kuru öksürük, tüberküloz, astım ve ses kısılması gibi hastalıklarda ekseptoran ve demulsan etkili olduğu bilinmektedir. Bitkinin ekseptoran etkisi içerdiği sapozitlerden kaynaklanmaktadır. *V. thapsus* çiçeklerinden elde edilen yağ, kulak ağrılarında da yardımcı olarak, ayrıca ekzema ve iltihaplı diğer cilt rahatsızlıklarında haricen kullanılmaktadır ve bu yağın astrenjan etkisi olduğu bilinmektedir (8). İsveçli göçmenlerin kolları ve ayakları ağrıdığında *V. thapsus* yapraklarını ağrıyan yerlerine bağladıkları, dizanteri için yaprakların çayını içtikleri, sığırların ölümüne sebep olan kurtların oluşturduğu yaralara bitkinin köklerinin dekoksilyonu enjekte ettikleri kayıtlıdır. Ayrıca Amerika'daki kabileler tarafından bitkinin yaprakları astım için kurutulup sigara olarak içilmiştir (13).

Pieroni ve Quave tarafından, İtalya'nın güneyindeki Lucania bölgesinde yaşayan Ginestra/Zhure ve Castelmezzano topluluklarının geleneksel olarak kullandıkları bitkiler incelenmiştir. Bu çalışmada *V.thapsus* 'un da halk tarafından antitussif amaçla kullanıldığı kayıtlıdır (14).

Avrupa’da yaygın olarak bulunan *V. nigrum* (İng. dark mülleın) ’un çiçek ve yaprakları halk tıbbında ve homeopatide öksürük kesici olarak kullanılmaktadır (15).

V. phlomoıdes türünden elde edilen *Flos Verbasci* drogundan öksürük kesici çay hazırlanıp ekspektoran olarak kullanıldığı literatürde kayıtlıdır (16).

Bazı sığırkuyruğu türlerinin (Türkiye’de yaygın olan *V. sinuatum* L. türü gibi) tohumları taşıdıkları saponozitden dolayı, balıklar için zehirlidir. Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde “Balıkotu” adıyla da tanınan *Verbascum* türleri, meyveli dalları göl ve dere sularına atılarak balıkların öldürölüp yakalanmasında kullanılmaktadır (7).

Ghorbani, İran’ın kuzeyinde Türkmen Sahra bölgesinde çeşitli amaçlarla kullanılan bitkileri ve bu bitkilerin kullanım şekillerini içeren etnobotanik tarama çalışması yapmıştır. Taranan 136 bitkinin 84’ ünün tıbbi kullanımının olduğunu belirtmiştir. Tıbbi amaçlı kullanılan bu bitkilerin içinde *V. grossypinum*’un yılan sokmasına, ishale karşı kullanıldığı ve ayrıca antiseptik özelliğinden dolayı da yararlanıldığı belirtilmiştir (17).

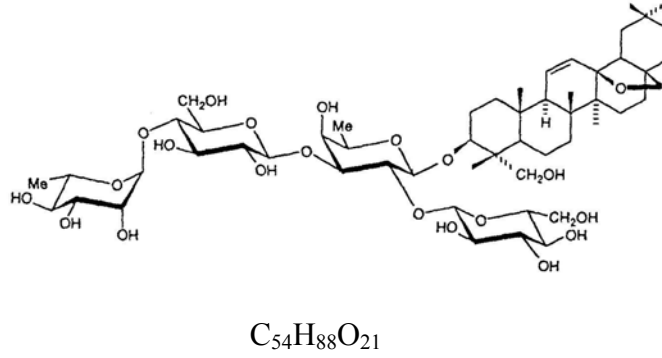
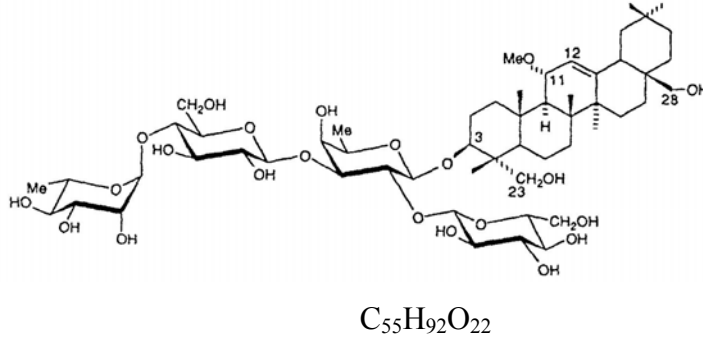
2.3 *Verbascum* Türleri Üzerinde Yapılmış Fitokimyasal Araştırmalar

Geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Verbascum* cinsine ait türler, kimyasal bileşim açısından da incelenmiş bitkilerdir, literatürde bu grup bitkilerde saponozit, flavonoit, iridoit, feniletanoit ve fenil propanoit glikozitler, steroidler, seskiterpen asit, makrosiklik dimer lakton ve alkaloit bulunduğu kayıtlıdır.

2.3.1 Saponozitler

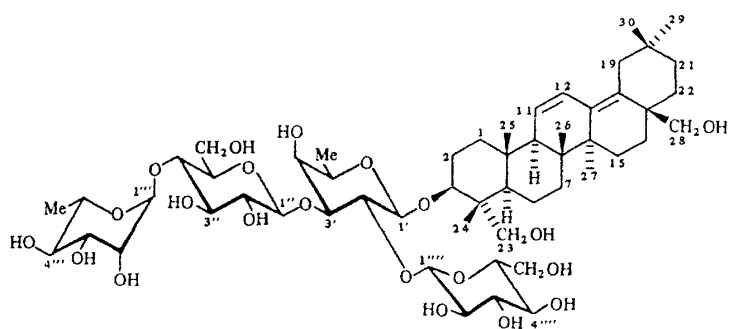
Klimek ve arkadaşları *V. nigrum* çiçeklerinin metanollü ekstresinden $C_{54}H_{88}O_{21}$ ve $C_{55}H_{92}O_{22}$ kapalı formölüne sahip iki yeni triterpen saponozit izole etmişlerdir (Şekil 2). Saponinlerin yapısı kimyasal ve spektral metotlarla tayin edilmiş ve 3-*O*-{[α -L-ramnosil-(1→4)-(β-D-glukopiranozil-(1→3)]-β-D-glukopiranozil]-(1→2)-β-fuko piranozil)-13 β,28-epoksiolean-11-en-3β,23-diol ve 3-*O*-{[α -L-ramnosil-(1→4)-(β-D-glukopiranozil-(1→3)]-β-D-glukopiranozil]-(1→2)-β-fukopiranozil)-11 metoksiolean-12-en-3β,23,28-triol olarak saptanmıştır. Bu bileşiklerden birincisinin yapısı *V.thapsus*

ve *V. lychnitis*'den izole edilmiş olan tapsuin A'ya benzediği, aynı aglikonları ve aynı oz bileşimine sahip oldukları fakat sıralanışın farklı olduğu belirlenmiştir (15).

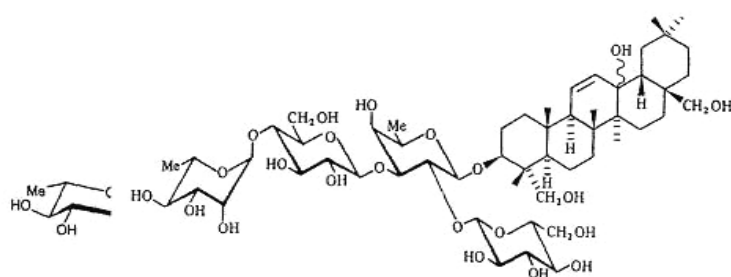


Şekil 2. *V.nigrum*'dan elde edilen yeni saponozitler

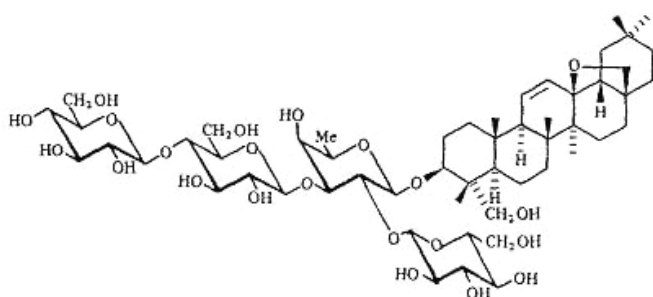
Orta Asya'nın birçok bölgesinde yetişen *V. songaricum* Schrenk. bitkisinin topraküstü kısmının metanollü ekstresinden toplam üç yeni triterpen saponin olan songarosaponin A ($C_{54}H_{88}O_{21}$), B ($C_{54}H_{90}O_{22}$), C ($C_{54}H_{88}O_{22}$) ve songarosaponin D ($C_{54}H_{88}O_{23}$) izole edilmiştir (18, 19). Ayrıca *V. songaricum*'un toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinden ise iki yeni triterpen saponin olan songarosaponin E ($C_{54}H_{88}O_{22}$), songarosaponin F ($C_{54}H_{88}O_{23}$) ve daha önceden de bilinen buddleja saponin I ($C_{54}H_{88}O_{22}$) izole edilmiştir (Şekil 3) (20).



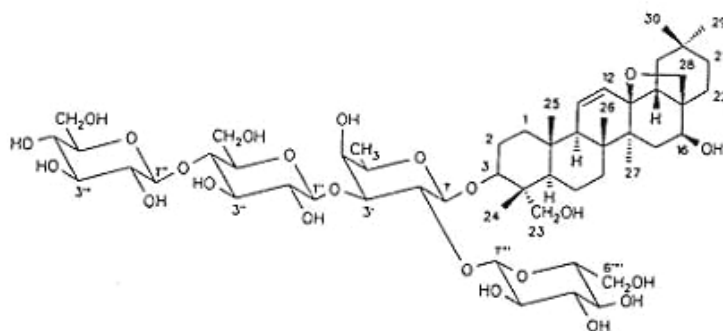
Songarosaponin A



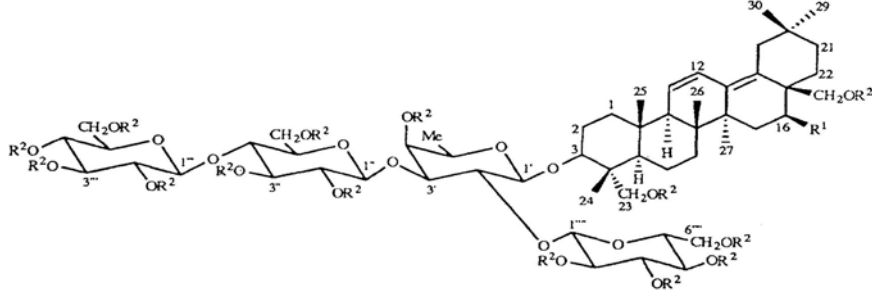
Songarosaponin B



Songarosaponin C



Songarosaponin D

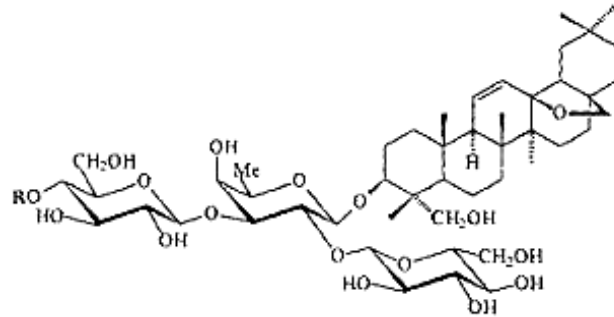


$R_1=H$ $R_2=H$ Songarosaponin E

$R_1=OH$ $R_2=H$ Songaraosaponin F

Şekil 3. *V. songaricum*'dan izole edilmiş saponozitler

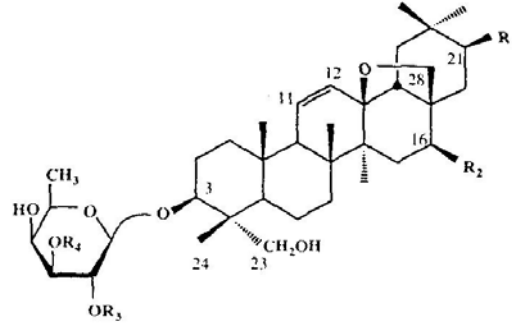
V. phlomoides L. bitkisinin çiçeklerinde, verbaskosaponin A ve B ile yeni bir bileşik olan desramnoverbaskosaponozit adı verilen saponozit izole edilmiştir (Şekil 4) (16).



Verbaskosaponin $R=Rha$, Desramnoverbaskosaponozit $R=H$

Şekil 4. *V. phlomoides*'in çiçeklerinden elde edilen saponozitler

V. sinaiticum Benth., *V. thapsiforme*, *V. fruticosum* Post. bitkilerinin toprak üstü kısımlarının eter ekstresinde bilinen 8 saikosaponin homologunun yanı sıra 13,28-epoksi-olean-11-en iskeletine sahip “mülleinsaponin I-VII” adı verilen 7 yeni saikosaponozit bulunmuştur (Şekil 5) (21).



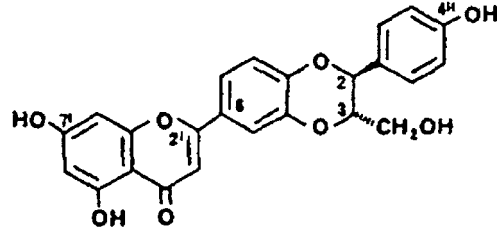
$R_1=H, R_2=H, R_3=H, R_4=Glc$	Mülleinsaponin I
$R_1=H, R_2=H, R_3=H, R_4=Glc(4\leftarrow 1)Rha$	Mülleinsaponin II
$R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4= Glc(4\leftarrow 1)Rha$	Mülleinsaponin III
$R_1=OH, R_2=OH, R_3=Glc, R_4= Glc(4\leftarrow 1)Rha$	Mülleinsaponin IV
$R_1=OAc, R_2=OH, R_3=Glc, R_4= Glc(4\leftarrow 1)Rha$	Mülleinsaponin V
$R_1=H, R_2=OAc, R_3=Glc, R_4= Glc(4\leftarrow 1)Rha$	Mülleinsaponin VI
$R_1=H, R_2=O-Glc, R_3=Glc, R_4= Glc(4\leftarrow 1)Rha$	Mülleinsaponin VII

Şekil 5. *V. sinaiticum*, *V. thapsiforme*, *V. fruticosum* bitkilerinden elde edilen saponozitler

V. thapsus'un kapsüllerinden hazırlanmış olan benzen ve etanol ekstratlarından kromatografik yöntemlerle 4 saponozit izole edilmiştir. Bu bileşikler; tapsuin A, tapsuin B, hidroksitapsuin A ve hidroksitapsuin B'dir (13).

2.3.2 Flavonoidler

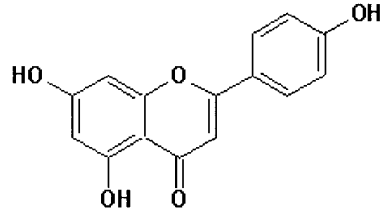
V. sinaiticum'un yaprakları %90'lık etanol ile ekstre edilmiş ve krizoeriol ve luteolin flavonları yanı sıra hidnokarpin ve yeni bir bileşik olan sinaitisin isimli flavonolignanlar izole edilmiştir (Şekil 6). İzole edilen bütün maddeler P-388 hücre kültürüne karşı test edildiğinde doza bağlı sitotoksik etki göstermiştir. Yaprakların etil asetat ekstresinin sitotoksik etkisinin de bu maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir (22).



Sinaitisin

Şekil 6. *V. sinaiticum*'dan elde edilmiş olan flavonoid

V. thapsiforme'nin çiçeklerinden apigenin, luteolin ve kersetin 7-*O*-glukozit, *V. phlomoides* çiçeklerinden ise diosmetin 7-*O*-glukozit (diosmin) izole edilmiştir. Klimek ise *V. lychnitis* çiçeklerinden apigenin, luteolin ve kersetin'in 7-*O*-glukozitleri yanı sıra apigenin-, luteolin- ve kersetin-7-*O*- β -D-glukuronit olarak yapılarını belirlediği 3 flavonoid daha elde edilmiştir. Apigenin- ve luteolin-7-*O*- β -D-glukuronitler *V. nigrum*'un çiçeklerinden de izole edilmiştir (Şekil 7) (23).



Apigenin

Şekil 7. *V. thapsiforme*'nin çiçeklerinden izole edilen flavonoid

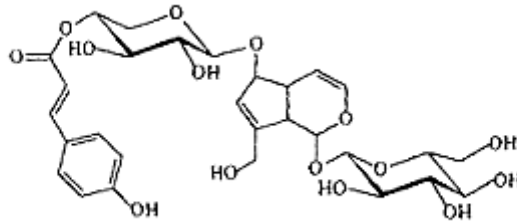
2.3.3 İridoitler

İridoitler özellikle *Scrophulariaceae* familyasında yaygın metabolitlerdir. Okubin ve katalpol *Verbascum* türlerinin en yaygın iridoit glikozitleridir (24).

V. sinuatum'un toprak üstü kısımlarından %90'lık etanolde oda sıcaklığında 2 gün süreyle 2 kez yapılan ekstraksiyon ile elde edilen ekstrenin ana bileşen olarak okubin taşıdığı ve ayrıca harpagin ile dört yeni iridoit glikozit içerdiği saptanmıştır. Bu bileşiklerden birinin yapısı 6-O-β-D-ksilopiranosilokubin olarak tayin edilmiştir (25).

V. nigrum'un toprak üstü kısımları üzerinde yapılan araştırmalar sonucu lateriozit, okubin, sinuatol, nigrozit I ve nigrozit II izole edilmiştir. Ayrıca bitkiden nigrozit III (C₃₀H₃₈O₁₅), nigrozit IV (C₃₁H₄₀O₁₆), nigrozit V (C₃₁H₄₀O₁₆) olarak isimlendirilen okubin türevi yeni bileşikler de izole edilmiş, bitkinin köklerinde ise harpagozit bulunduğu saptanmıştır (Şekil 9) *V. nigrum*'da bulunan 6-O-[3-O-((E)-p-kumaroil)-α-L-ramnopiranozil] okubin, bir diğer tür olan *V. laxum* Filar.&Jaw.'dan da izole edilmiş bir iridoit glikozittir (26).

V. phlomoides bitkisinin çiçeklerinden hazırlanan ekstre p-kumarik asit ile esterleşmiş yeni bir iridoit ester glikoziti olan flomidozit ile bilinen bir bileşik olan spesiozit izole edilmiştir. Verbaskozit ve forsitozit B minör bileşenler olarak izole edilmiştir. Okubin ve katalpol ile bu iki bileşiğin 6-O-ksilozitleri ise yapılan kromatografik analizlerle tespit edilmiştir (Şekil 8) (16).

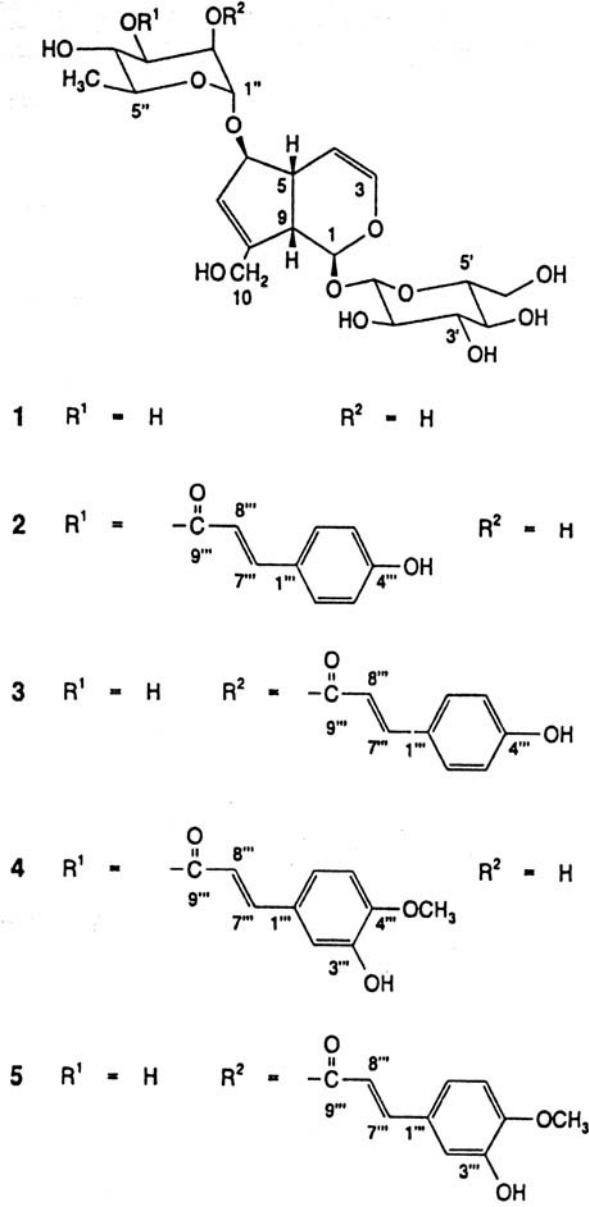


Flomidozit

Şekil 8. *V. phlomoides*'den elde edilen iridoit glikoziti

Yunanistan için endemik bir tür olan *V. spinosum* Lim.'un toprak üstü kısımlarından yeni bir iridoit glikozit olan verbaspinozit izole edilmiş; yapısı 6-O-

[(2''-O-trans-cinnamoil)- α -L-ramnopiranozil]-katalpol olarak aydınlatılmıştır. Buna ek olarak bilinen bileşikler olan okubin, katalpol ve ajujol de izole edilmiştir (Şekil 10) (27).

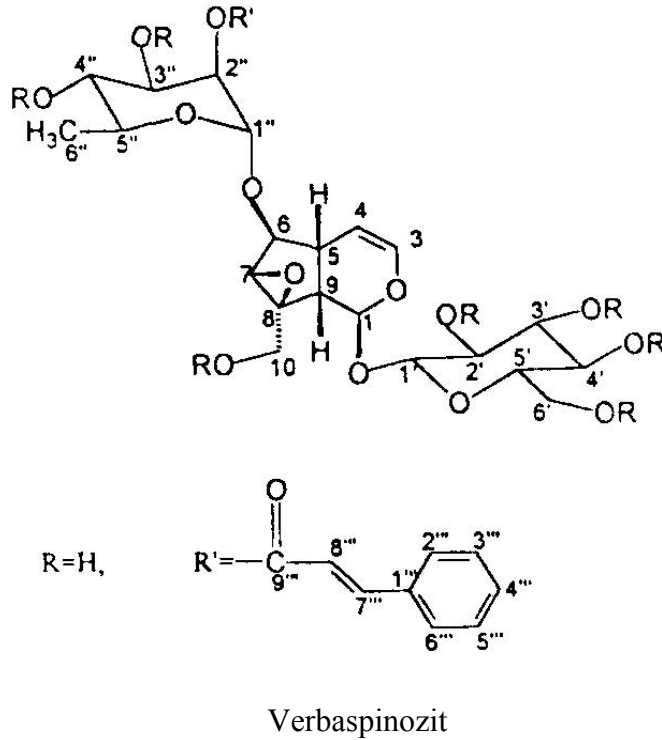


- 1, Sinuatol
- 2, Okubin,
- 3, Nigrozit III
- 4, Nigrozit IV
- 5, Nigrozit V

Şekil 9. *V. nigrum*'dan izole edilmiş iridoit glukozitler

Magiatis ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir araştırmada *V. undulatum* Lam.'ın toprak üstü kısımlarından 6-O- α -L-rhamnopyranozil okubin türevi olan 8 iridoit glikozit izole edilmiştir (28).

V. thapsus ise özellikle yapraklarında harpagozit, harpagit, okubin iridoit glikozitleri taşımaktadır (13).



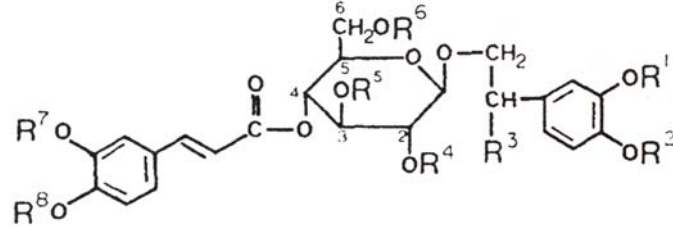
Şekil 10. *V. spinosum*'dan elde edilmiş yeni iridoit bileşik

2.3.4 Fenil Etanoit ve Fenil Propanoit Glikozitleri

Dicotyledonae'de yer alan bitkilerde kafeol esterlerinin dağılımı ile ilgili yapılmış bir çalışmada yaygın bir disakkarit esteri olan verbaskozitin *V. sinuatum* L.'dan izole edildiği belirtilmiştir (Şekil 11) (29).

1992 yılında yapılan bir çalışmada *V. thapsus* bitkisinin sulu çözeltisinden 3 bilinen feniletanoit glikoziti, 4'ü lignan olmak üzere 7 bilinen bileşik, 5 yeni feniletanoit

glikozidi ve bir yeni lignan glukoziti olmak üzere bileşikler izole edilmiş yapıları spektroskopik yöntemlerle tayin edilmiştir (30).



Verbaskozit; R¹, R², R³, R⁴, R⁶, R⁷, R⁸= H, R⁵=Rha

Şekil 11. *V. sinuatum*'dan izole edilmiş fenilpropanoit

V. phlomoides'in çiçeklerinde, düşük konsantrasyonlarda feniletanoit glikozitlerinin kafeik asit esterlerine rastlanırken, fenil etanoitleri daha yüksek konsantrasyonlarda *V. lychnitis*, *V. nigrum* ve *V. thapsiforme* türleri taşımaktadır (16).

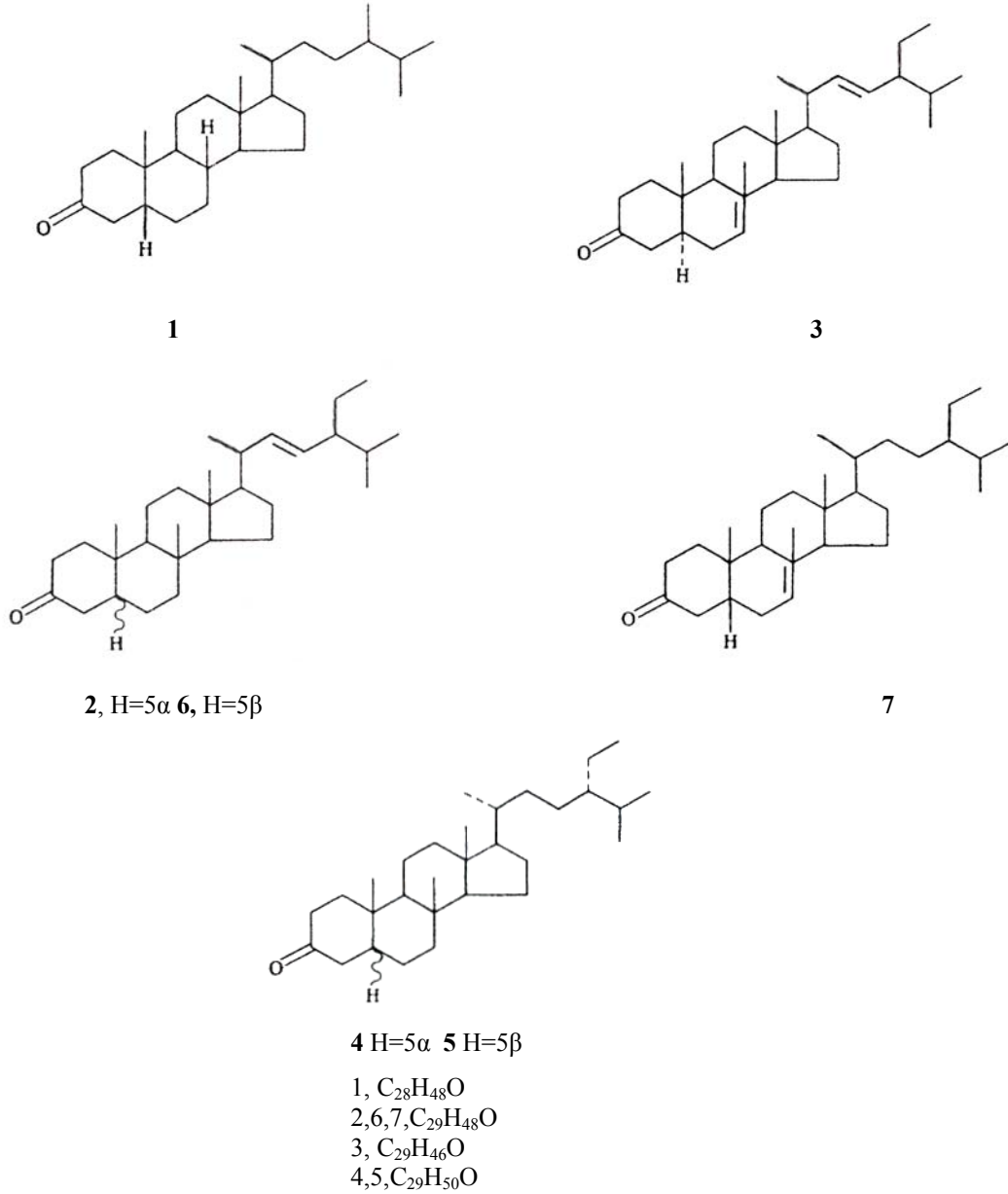
Klimek, *V. lychnitis*'in çiçeklerinin butanollü ekstresinden, kafeik asit ile esterleşmiş feniletanoit triglikoziti olan verbaskozit 6'-0-β-D-apiofuranozit(forsitozit B)'yi izole etmiştir. Bu bileşiğin *V. lychnitis* ve *V. nigrum*'un çiçeklerinde bulunan ana bileşen olduğu, *V. phlomoides* ve *V. thapsiforme* çiçeklerinde ise çok düşük miktarda bulunduğu belirtilmiştir (31).

V. spinosum'un toprak üstü kısımlarından fenilpropanoid glikozitleri olan akteozit, angorozit A ve angorozit C izole edilmiş ve yapıları spektroskopik yöntemlerle tayin edilmiştir (27).

Magiatis ve arkadaşları *V. undulatum*'un topraküstü kısımlarından feniletanoit glikozitleri olan verbaskozit, martinozit, arenariozit ve 6-0-asetil martinozit izole etmişlerdir. Aynı bitkinin köklerinden 3 feniletanoit glikozit, verbaskozit, martinozit ve 2-(3-hydroxy-4-metoksifenil)etanol-1-*O*-α-L-rhamnopyranozil(1→3)-[β-D-ksilopiranozil (1→6)]-(4-ferrulol)-β-D-glukopiranozit izole edilmiştir (28).

2.3.5 Steroidal Bileşikler

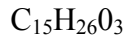
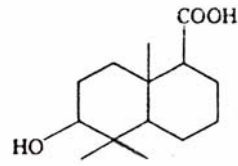
1988'de *V. thapsus*'un etanol ekstresinde 7 adet steron iskeletine sahip bileşik saptanmıştır. (Şekil 12) Bileşikler 3-ketosteron yapısındadır. Ayrıca bitkide sitosterol, ergostan-7-en-3-ol de bulunmaktadır (32).



Şekil 12. *V. thapsus*'dan elde edilmiş steroidal bileşikler

2.3.6 Seskiterpen Asit

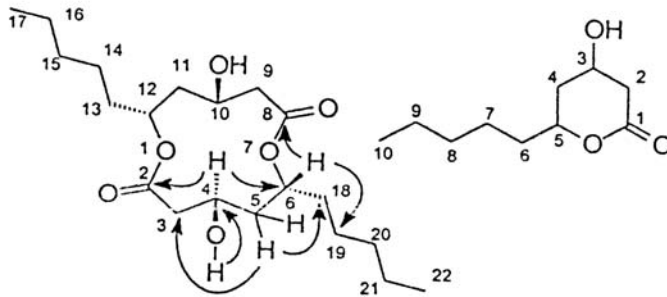
Khuroo ve arkadaşları *V. thapsus*'un etanol ekstresi üzerinde yaptıkları araştırmada ekstre bileşiminde bulunan seskiterpen bileşiğini izole ederek yapısını tanımlamışlardır (Şekil 13) (32).



Şekil 13. *V. thapsus*'dan elde edilen seskiterpen asit

2.3.7 Makrosiklik Dimer Lakton

V. undulatum bitkisinin köklerinden ise bilinen 5 iridoit glikozidi (harpagozit, lateriozit, harpagit, ajugol, okubin) izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Araştırmacılar bitkinin köklerinden yeni bir dimer lakton olan verbalaktonu izole etmişlerdir (Şekil 14). Bileşiğin doğal ürünlerde rastlanan halka sistemleri için yeni olduğu ve 1,7-dioksasiklododekan yapısı taşıdığı belirtilmiştir (28).



Verbalakton

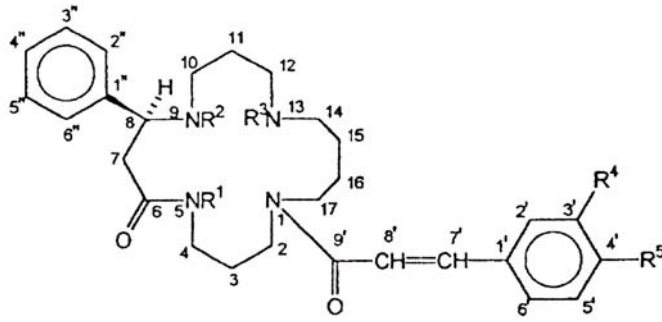
2a: 3R,5R 2b: 3S,5S

2c: 3R,5S 2d: 3S, 5R

Şekil 14. *V. undulatum*'dan elde edilmiş olan makrosiklik lakton

2.3.8 Alkaloitler

Bulgaristan’da yetişen *V. pseudonobile* Stoj. et Stef., yapraklarında %0.6 alkaloit içeren endemik bir türdür. Bitkinin hipotansif ve spazmolitik etkili olduğu bilinmektedir. Preklinik ve klinik çalışmalar sonucu bitki ekstraktı “Verbascan” adında tablet olarak üretilmiştir ve spazmolitik etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Bu ekstraktan 1971 yılında Verbaskin (C₂₉H₃₆N₄O₃) adı verilen kristal bir madde izole edilmiştir. *V. phoenicum* L.ve *V. nigrum*’dan Seifert ve Hesse, verbaskenin isimli spermin alkaloiti elde etmişlerdir. Takip eden araştırmalarda ekstrede verbasin, verbalosin, verbasittrin, izoverbasittrin, verbamekrin, izoverbamekrin, verbametin, (+)-(S)-izoverbametin, (+)-(S)-verbametrin ve (+)-(S)-izoverbametrin gibi makrosiklik spermin alkaloitleri izole edilmiştir. Ayrıca bitkinin yapraklarından verbasikrin, (S)-izoverbasikrin, (S)-verbamekrin ve (S)-izoverbamekrin adında 4 minör alkaloit bulunmuştur. Drandarov ise bitkinin yaprak ekstresinden 17 üyeli makrosiklik lakton alkaloiti olan, verbassenin’in Z izomeri, verballoskenin izole etmiş ve yapısını belirlemiştir (Şekil 15) (33-37).



Verbasin; R¹, R², R³, R⁴, R⁵= H -trans

Verbalosin; R¹, R², R³, R⁴, R⁵= H -cis

Verbasittrin; R¹, R², R³= H R⁴, R⁵= -OCH₃ -trans

İsoverbasittrin; R¹, R², R³= H R⁴, R⁵= -OCH₃ -cis

Verbassenin; R¹, R², R⁴, R⁵= H, R³=-COCH₃-trans

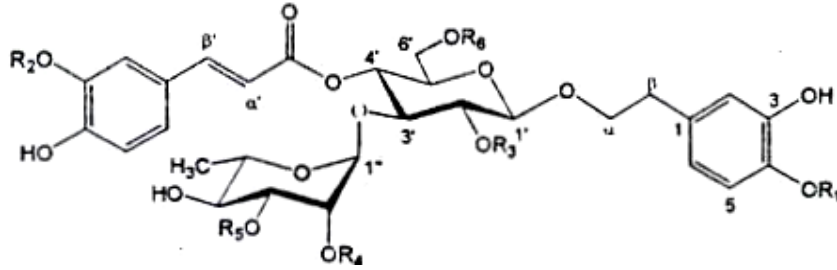
Verballoskenin; R¹, R², R⁴, R⁵= H, R³=-COCH₃-cis

Şekil 15. *V. pseudonobile* ’nin yapraklarından elde edilmiş bazı alkaloitler

2.4 Türkiye’de Yetişen *Verbascum* Türleri İle İlgili Yapılmış Fitokimyasal Araştırmalar

Türkiye’de *Verbascum* cinsi ile ilgili yapılmış bazı fitokimyasal araştırmalar mevcuttur. Bu araştırmalar aşağıda belirtilen türler üzerinde yapılmıştır.

Sivas Yıldızeli’nden toplanan *V. wiedemannianum* Fisch&Mey’un köklerinin metanollü ekstresinden yeni feniletanoit glikozitler olan wiedemanniozit B – E’nin yanı sıra bilinen bileşikler olan 6-*O*-asetilmartinozit(=wiedemanniozit A), verbaskozit, martinozit, ekinakozit ve lökoskeptozit B izole edilmiştir (Şekil 16) (38, 9). Aynı bitkinin toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinde beş iridoit glikozit (okubin, katalpol, ajugol, angelosit, glutinosit), bir non- glikozidik iridoit, rehmaglutin D, iki ursan tip triterpen saponin (rosmatin ve niga-ichigosid F1), sitosterol-3-*O*- β -D-glikopiranozit ve luteolin izole edilmiştir (24).



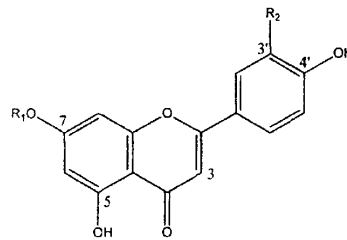
$R_1=Me, R_2=Me, R_3=H, R_4=H, R_5=H, R_6=Ac$	Wiedemanniozit A
$R_1=Me, R_2=Me, R_3=H, R_4=Ac, R_5=Ac, R_6=Ac$	Wiedemanniozit B
$R_1=H, R_2=Me, R_3=H, R_4=H, R_5=H, R_6=\beta$ -glukopiranozil	Wiedemanniozit C
$R_1=H, R_2=Me, R_3=Ac, R_4=H, R_5=H, R_6=\alpha$ -ramnopiranozil	Wiedemanniozit D
$R_1=H, R_2=Me, R_3=Ac, R_4=Ac, R_5=H, R_6=\alpha$ -ramnopiranozil	Wiedemanniozit E

Şekil 16. *V. wiedemannianum*’dan elde edilmiş yeni fenil etanoit glikozitler

Tatlı ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada endemik bir tür olan *V. pterocalycinum* var. *mutense* çiçekleri metanol ile ekstre edilmiş ve bu ekstrenin suda çözünen kısmı üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar sonucu 3 - O - { [α - L-ramnosil - (1→4) - (β - D - glukopiranozil - (1→3)] - [β -D-glukopiranozil-(1→2)]- β -fukopiranozil)-13 β , 28-epoksiolean-11-en-3 β , 23 diol ve 3-O-{ α -L-ramnozil - (1→4) - (β - D glukopiranozil - (1→3)] - [β - D - glukopiranozil - (1→2)] - β -fukopiranozil) - 11 metoksi-olean - 12 - en - 3 β , 23, 28 - triol ve 1 - (β - D - glukopiranozil)-8-hidroksi-3,7-dimetil-okt-2 (E), 6(E)-dienoat maddeleri izole edilmiş ve yapıları spektroskopik yöntemlerle tayin edilmiştir (39).

V. cilicicum Boiss.' un toprak üstü kısımlarından elde edilen metanollü ekstrede 6 iridoid glikoziti izole edilmiştir. Bunlar; katalpol, verbaspinozit, 6-O-(3''-0-trans-sinamoil)- α -L-ramnopiranozilkatalpol),6-O-(4''-O-trans-sinamoil)- α -L-ramnopiranozil katalpol), sakkatozit ve 6 - O - (3'' - O - trans - p - kumaroil) - α - L-ramnopiranosilkatalpol'dur. Yapıları spektroskopik tekniklerle belirlenmiştir (40).

V. salviifolium Boiss. bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstrede dört flavonoid glikozidi, apigenin - 7 - O - β - glukopiranozit (1), luteolin-7-O- β -glukopiranozit (2), luteolin-3'-O- β -glukopiranozit (3), krizoeriyol - 7 - O - β - glukopiranozit (4) izole edilmiştir. Bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle tayin edilmiştir (Şekil 17) (41).

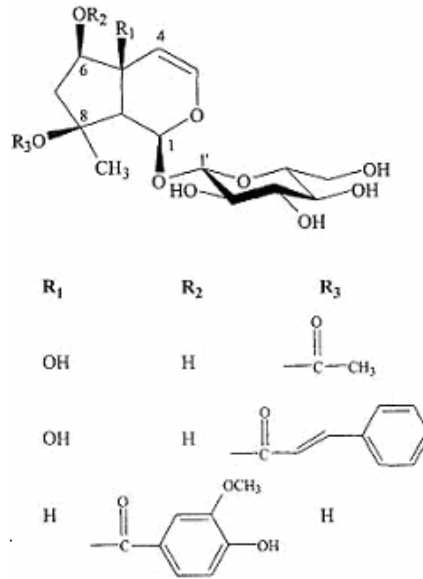


- | | |
|----------|--|
| 1 | R ₁ = β -Glukopiranoz, R ₂ =H |
| 2 | R ₁ = β -Glukopiranoz, R ₂ =OH |
| 3 | R ₁ =H, R ₂ = O- β -Glukopiranoz |
| 4 | R ₁ = β -Glukopiranoz, R ₂ =OCH ₃ |

Şekil 17. *V. salviifolium* bitkisinden elde edilmiş flavonoid glikozitler

V. lasianthum Boiss. bitkisi üzerinde yapılan araştırmalarda 6 iridoit glukozit, 6-0-(α -L-ramnopiranozil)-katalpol, verbaskozit A, pulverulentoit I, buddlejozit A₅, okubin ve undulozit III izole edilmiştir. Aynı bitkinin köklerinde devam eden araştırmalarla 3 iridoit glukozit; 8-0-asetilharpagit, harpagozit ve 6-0-vanilloilajugol ile 2 feniletanoit glukozit verbaskozit (=akteozit) ve poliumozit izole edilmiştir (şekil 18) (42).

Türker ve Gürel *V. thapsus*'un 4 farklı materyalinde saponin miktar tayinlerini HPLC kullanarak yapmış ve genel olarak ticari kaynaklı yaprakların, kapsüllere oranla daha yüksek konsantrasyonda (0.215 mg/g) saponin taşıdığını saptamışlardır (13).



1,8-0- asetilharpagit, Harpagozit, 6-0-vanilloilajugol

şekil 18. *V. lasianthum*'dan elde edilen bileşikler

2.5 *Verbascum* Türleri zerindeki Biyolojik Aktivite Araştırmaları

Literatürde, farklı *Verbascum* türlerinin fitokimyasal açıdan çok sayıda araştırma ile incelendiği, bu kimyasal içerik araştırmalarının yanı sıra aşağıda belirtilen etkiler yönünden de çeşitli araştırmalar yapıldığı görülmektedir.

2.5.1 Antimikrobiyal Etki

Bir çok bakteri türü mukozaya girerek veya deri lezyonlarından sonra deride veya kıl foliküllerinde bakteriyal enfeksiyonlara yol açmakta bu enfeksiyonlar da kıl kökü iltihapları, ülser, bademcik ve orofariks enflamasyonları gibi lokal iltihaplar veya septisemi gibi kan enfeksiyonları olarak ortaya çıkabilmektedir. Bu tür enfeksiyonların tedavisinde geçmişte antibiyotikler kullanılırken bir çok patojenik bakteri bu antibiyotiklere direnç kazanmıştır. Bu patojen mikroorganizmalar *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* ve *Candida albicans* olarak sıralanabilir. Bitkilerde bulunan antimikrobiyal bileşenlerin farklı mekanizmalarla bakterilerin büyümesini inhibe ettiği ve bitkisel preparatların klinik çalışmalarda, bu mikroorganizmalara karşı etkili şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle yüksek bitkilerden hazırlanan preparatlar antibakteriyel ajanlar olarak haricen kullanımda tercih edilmektedir (43, 44).

2.5.1.1 Antiviral Etki

V. thapsiforme'nin çiçeklerinden elde edilen ve içerisinde flavonoit, iridoit, fenolik asit, serbest şekerler, saponozitler, aminoasitler ve müsilaj gibi bileşiklerin bulunduğu sulu infüzyonda (**Flos Verbasci İnfüzyonu (FVI)**) invitro ortamda *Herpes simplex* tip I virüs (HSV-1) ile enfekte edilmiş GMK, Vero hücreleri, CEF (tavuk embriyo fibroblastları) ve RK-13 hücre kültürlerinde toksik olmayan konsantrasyonlarda antiviral aktivitesi incelenmiş ve FVI'nın bu hücrelerde HSV üzerinde antiviral aktivitesinin olduğu belirlenmiştir. FVI'nın inhibitör etkisinin 190 µg/ml'de, vero hücre kültüründe HSV üzerinde %50 inhibitör etkili olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak FVI'nın HSV üzerinde virüsidal etkisi olduğu da görülmüştür. Daha önceki araştırmalarda **Flos Verbasci**'nin dekoksasyonlarının nezle virüsü enfekte edilmiş tavuk embriyo fibroblastlarında (CEF) virüs replikasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (45).

FVI'nın *Herpes simplex* virüsü (HSV-1) yanında, *Fowl plaque* virüsü (FPV)'nin bazı suşlarına ve bazı influenza A ve B suşlarına karşı çeşitli hücre kültürleri kullanarak antiviral aktivitesi araştırılmıştır. FVI'nın, FPV üzerinde virüsidal etkisinin olmadığı

fakat (HSV-1) virüsünü tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda FVI'da bulunan flavonoid, iridoit, fenolik asit, serbest şekerler, saponozitler, aminoasitler ve müsilaj gibi bileşiklerden birinin antiviral etkili olduğu düşünülmektedir, fakat bu bileşiklerden hangisinin bu etkiye sahip olduğu tespit edilememiş, günümüzde bir çok araştırmacı antiviral etkinin bir bileşikten kaynaklanmadığını bunun aksine bu bileşiklerin birbiriyle sinerjik etki göstererek antiviral aktivite gösterdiklerini düşünmektedir (46).

McCutcheon ve arkadaşları 100 metanollü bitki ekstresinin antiviral etkisini araştırmışlardır. Taranan bitkilerden içlerinde *V. thapsus*'un da bulunduğu 12 tür 7 farklı virüse karşı antiviral aktivite göstermiştir. *V. thapsus*'un yapraklarından elde edilen ekstre *Bovine coronavirus* (BCV, *Coronaviridae*), *Bovine herpesvirüs type 1* (BHV1, *Herpesviridae*), *Bovine parainfluenza virus type 3* (BPI3, *Paramyxoviridae*), *Bovine rotavirus* (BRV, *Reoviridae*), *Bovine respiratory syncytial virus* (BRSV, *Paramyxoviridae*), *Vaccinia virus* (*Poxviridae*), *Vesicular stomatitis virus* (VSV, *Rhabdoviridae*) virüslerine karşı test edilmiş ve bitkinin sadece *Bovine herpes virüs type 1*'e karşı kısmen inhibe edici bir antiviral etki gösterdiği tespit edilmiştir (12).

V. phlomisoides; **Flores Verbasci (Flos Verbasci)** drogunun hazırlandığı *Verbascum* türlerinden biri olup bu bitkinin çiçeklerinden hazırlanan Dekoksiyon *Verbasci*'nin A₂ ve B nezle virüsüne karşı etkili olduğu saptanmıştır (16).

Serkedjjeva yaptığı bir çalışmada FVI'nın (**Flos Verbasci Infusion**) nezle virüsü enfekte edilmiş doku kültürlerinde hemaglutinasyonu ve enfeksiyonu azalttığı bulunmuştur. Doğal bileşenleri içeren bitki infüzyonu FVI ile nezle virüslerinin üremesini önleyen en etkili sentetik bileşiklerden olan amandatin türevleri; rimandatin hidroklorit, glutantan-adamantanamin glukoronit (GI) ve onun türevi dGI ve bunlardan oluşan karışımın nezle virüsü enfekte edilmiş tavuk embriyo fibroblast hücre kültürlerinde antiinfluenza etkisi incelenmiştir. Rimandatin hidroklorit infülENZA A virüs enfeksiyonlarında ve nezleden korunmada en etkili ilaçlardan biridir, glutantan-adamantanamin glukoronit ise amantadine göre hücre kültürleri için daha az toksiktir ve birçok infülENZA A virüsünün üremesini inhibe etmektedir. Sentetik ve doğal viral inhibitörlerin kombinasyonu ile antiviral aktivite sırasında bitkisel preparatların daha etkili olması sağlanırken toksik bileşen dozu da azaltılabilmektedir. FVI'nın 1500

$\mu\text{g/mL}$ üzerindeki konsantrasyonlarının tavuk embriyosu fibroblast hücre kültürü için toksik etkili olduğu da görülmüştür (47).

2.5.1.2 Antibakteriyel ve Antifungal Etki

Brantner ve Grein'in yaptığı çalışmada bitki kitaplarından ve geleneksel kullanımlardan yararlanılarak seçilmiş 28 familyaya ait 48 bitki üzerinde antimikrobiyal aktivite çalışması yapılmış ve bu bitkiler içerisinde bulunan *V. phlomooides* bitkisinin çiçeklerinden hazırlanan sulu ekstrenin sık sık hastalıklara neden olan Gram-pozitif bakterilerden; *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144), *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057), *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) gibi ve Gram-negatif bakterilerden; *E.coli* (ATCC 11,229) gibi bakterilere karşı aktivite göstermediği bulunmuştur (43).

McCutcheon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Moerman'ın etnobotanik araştırmalarını içeren 'Medicinal Plants of Native America' adlı kitabından seçtiği ve 96'sı Amerikan yerlilerince antifungal olarak kullanılan içlerinde *V. thapsus*'un da bulunduğu 100 bitkinin 9 mantar türüne karşı antifungal etkileri araştırılmıştır. *V. thapsus*'un yapraklarından hazırlanan metanollü ekstre; *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium tricinctum*, *Microsporum cookerii*, *Microsporum gypseum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma viridae*, *Trichophyton mentagrophytes* funguslarına karşı antifungal etki yönünden test edilmiştir. Çalışmalar sonunda *V. thapsus*'dan hazırlanan ekstrenin muhtemel bir antifungal olduğu ve *Microsporum cookerii* ve *Microsporum gypseum* mikroorganizmalarının büyümesini inhibe ettiği görülmüştür. Sonuç olarak bu bitkinin geleneksel tıpta kullanımı ile antifungal aktivitesi arasında yüksek korelasyon olduğu görülmüştür (48).

V. lychnitis'in (beyaz müllein) kurutulmuş çiçeklerinin butanollü ve metanollü ekstrelerinden feniletanoid triglikozit izole edilmiştir ve kafeik asitle açılmış bu bileşik verbaskozit 6'-O- β -D-apiofuranozit (forsitozit B) olarak isimlendirilmiştir. Forsitozit B bileşiği gibi diğer açılmış fenil etanoit glikozitler antibakteriyel aktivite göstermiştir (31).

Yunanistan'dan toplanmış *V. undulatum*'un köklerinden hazırlanan ekstreden makrosiklik dimer lakton yapısında verbalakton izole edilmiş ve agar dilution metoduyla bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir (Tablo 3). Çalışma sonucunda ekstreya en duyarlı olan bakteriler, Gram (+) bakterilerden, *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis*, Gram (-) bakterilerinden ise *Salmonella enteritidis* olarak tespit edilmiştir (28).

Tablo 3. *V. undulatum* bitkisi üzerinde antibakteriyel etki çalışmasında Magiatis ve arkadaşlarının kullandıkları mikroorganizmalar ve elde edilen sonuçlar

Mikroorganizmalar	Antibakteriyel aktivite (MIC µg/mL)
Gram (+)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	62.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	62.5
<i>Lactobacillus casei</i>	125
Gram (-)	
<i>Escherichia coli</i>	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500
<i>Enterobacter aerogenes</i>	>500
<i>Salmonella enteritidis</i>	125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	250

Barbour ve arkadaşları Lübnan halk tıbbında kullanılan 27 yabancı bitki türünün farklı kısımlarından elde edilen 39 sulu ve 39 metanollü ekstrenin invitro ortamda antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* ve *Candida albicans*'dır. Disk difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) yöntemlerinin kullanıldığı bu araştırmada disk difüzyon yönteminde disklere her bir bitki ekstresinden 10µg ve 20µg uygulanmıştır. *V. leptostychem* yaprak ve çiçeklerinin disklerdeki 10µg ve 20µg'lık ekstrelerin inhibisyon yüzdesi sırasıyla yaprak ekstresinin 22.2 ve 66.6; çiçek ekstresinin ise 11.1 ve 99.9 olduğu bulunmuştur. *V. leptostychem*'un metanollü ekstresinin MIC değerleri *S. enteritidis* için 1/2.5 *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* için ise 1/3.5 aralığında değişmektedir. Her iki yöntemde

metanollü bitki ekstrelerinden içlerinde *V. leptostychem*'un da bulunduğu sadece iki tanesi mikroorganizmaların %99.9'una karşı oldukça etkili bulunmuştur.

Tablo 4. *V. leptostychem* ekstrelerinin MIC değerleri

Mikroorganizmalar	MIC değerleri
<i>Escherichia coli</i>	1/3.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1/3.0
<i>Proteus sp</i>	1/3.0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1/3.0
<i>Salmonella enteritidis</i>	1/2.5
<i>Salmonella typhi</i>	1/3.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1/3.5
<i>Streptococcus faecalis</i>	1/2.5
<i>Candida albicans</i>	1/3.5

Bitkilerin metanollü ekstreleri sulu ekstrelerine göre mikroorganizmalara karşı daha etkilidir. Bu da metanollü çözücülerin bitkideki pek çok etken madde grubunu çözebilmesinden kaynaklanmaktadır. Buna karşılık sulu çözücüler ise sadece antosiyanin, nişasta, tanen, saponin, terpenik bileşikler, polipeptitler ve lektinleri çözebilmektedir (44).

2005 yılında Taged ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada aralarında *V. sinaiticum*'unda bulunduğu Etiyopya'da tıbbi amaçla kullanılan 8 bitki araştırılmıştır. Bitkiler güneşe maruz bırakmadan açık havada kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Ekstreler 100 gram bitkiyi %80'lik metanolde 48 saat maserasyona bırakarak elde edilmiştir. Halk tarafından çeşitli deri hastalıklarında kullanılan bu bitkilerin sulualkolde hazırlanan ekstrelerinin, bu deri hastalıklarına sebep olan çeşitli bakteri ve mantar türleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Test, ekstrenin 100, 50 ve 25 mg/ml konsantrasyonlarında agar diffüzyon metodu kullanılarak yapılmıştır. Testte aşağıdaki organizmalar kullanılmıştır;

Escherichia coli (ATCC 25922)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

Aspergillus niger (ATCC 10535)

Trichophyton mentagrophytes (ATCC 18748)

Candida albicans (Klinik olarak izole edilmiş)

Agar diffüzyon yönteminde içerisine test edilecek ekstrelerin yukarda bahsedilen konsantrasyonları besiyerlerine açılmış 11 mm çapındaki kuyucuklara ayrı ayrı 100 µl konularak bakteriler için olan petriyerler 18-24 saat 37°C, mantarlar için olan petriyerler ise 3 gün 25°C etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bakteriler için gentamisin, mantarlar için ise ketokonazol antibiyotikleri pozitif kontrol olarak kullanılan çalışmaya ait sonuçlar Tablo 5’te verilmiştir. (49).

Tablo 5. *V. sinaiticum* ile yapılan antimikrobiyal aktivite test sonuçları

	Konsantrasyonlar (mg/ml)	<i>E.c.</i>	<i>P.a.</i>	<i>S.a.</i>	<i>A.n.</i>	<i>T.m.</i>	<i>C.a.</i>
		İnhibisyon zonları(mm)					
<i>V.sinaiticum</i>	100	-	20	25	-	-	-
	50	-	18	21	-	-	-
	25	-	16	19	-	-	-
Gentamisin	0.1	22	21	29	TE	TE	TE
Ketokonazol	0.3	TE	TE	TE	-	23	37

E.c.: *Escherichia coli* *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa* *S.a.*: *Staphylococcus aureus*

A.n.: *Aspergillus niger* *T.m.*: *Trichophyton mentagrophytes* *C.a.*: *Candida albicans*

TE:Test edilmemiş

2005 yılında Etiyopya’da halk tarafından kullanılan 67 bitkinin fitokimyasal yapısını, antimikrobiyal etkisini ve halk arasında hangi amaçla tedavide kullanıldığını içeren bir çalışma yapılmıştır. Bu bitkiler arasında *V. sinaiticum*’un yapraklarının metanollü ekstresi ile de çalışılmıştır. Fitokimyasal çalışma sonucunda bitki ekstresinde polifenollere, saponine, glikozit ve/veya karbonhidrata rastlanmıştır. Antimikrobiyal çalışmada kullanılan *Bacillus cereus*, *Neisseria gonorrhoea*, *Streptococcus pyogenus*, *Streptococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexineri*, *Shigella dysentriae*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton violacium* organizmalarından sadece *Neisseria gonorrhoea* karşı antibakterial etkisi gözlenmiştir. Geleneksel kullanımları ise, antihelmentik, cüzam, kızamık, frengi, schistosomiasis üzerinedir (50).

2.5.1.3 Türkiye’de Yetişen *Verbascum* Türleri Üzerinde Yapılmış Antimikrobiyal Etki Araştırmaları

Türkiye’de yetişen ve endemik bir tür olan *V. pterocalycinum* var. *mutense* çiçekleri metanol ile ekstre edilmiş ve bu ekstrenin suda çözünen kısmı üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar sonucu izole edilen bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiş ve poster olarak yayınlanmıştır (39).

Türker ve Camper 2002 yılında *V. thapsus* (common müllein) bitkisinden hazırlanan ve ticari olarak piyasada bulunan çay, tablet ve çiçeklerinden elde edilen yağ ile bitkinin kapsül ve yapraklarından hazırlanan metanollü, etanollü ve sulu ekstreleri kullanılarak antibakteriyel ve antitümör aktivitesini araştırmışlardır. Müllein’in çok eski zamanlardan beri tıbbi amaçla üst solunum yolu enfeksiyonlarında, deri hastalıklarını da içine alan enflamatuvar hastalıklarda ve pek çok tümör tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Türker ve Camper yaptıkları çalışmada Müllein ekstreleri ile piyasada bulunan Müllein ürünlerinin yararlı olup olmadığı ve toksik etkilerinin bulunup bulunmadığını araştırmışlardır. Var olduğu düşünülen yararların saponozitlerden kaynaklandığı üzerinde duran araştırmacılar saponin çözeltileri ile bitkinin sulu ekstresi, alkolle hazırlanan ekstreleri (metanol ve etanol) ile sulu alkollü etkilerini karşılaştırarak incelemişlerdir. Antibakteriyel aktivite çalışmalarında solunum yolları enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalar kullanılmıştır. Bunlar; *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) gibi gram (-) bakteriler ile *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) gibi gram (+) bakterilerdir. *V. thapsus*’un çiçeklerinden hazırlanan yağın *Streptococcus pyogenes* ve *Staphylococcus epidermidis* dışında kullanılan diğer mikroorganizmalarda büyümeyi inhibe ettiği gözlenmiştir. Ticari olarak hazırlanan alkol ekstresi *Klebsiella pneumoniae*’da inhibitör etki göstermiştir. Yapraklardan ticari olarak hazırlanan dekoksijen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Streptococcus pyogenes* dışındaki mikroorganizmalarda, bitki çayı ise sadece *Klebsiella pneumoniae*’da inhibitör etkili olmuştur. Genel olarak bitkiden hazırlanan sulu ekstrelerin antibakteriyel aktivite yönünden diğerlerine göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Yapılan testlerde sulu ekstre *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*’a karşı hassasiyet göstermiştir.

Klebsiella pneumoniae ve *Staphylococcus aureus* solunum yolları hastalıklarına; *Klebsiella pneumonia* idrar yolları hastalıklarına neden olmaktadır. Bu durum *Verbascum thapsus*'un geleneksel tıpta bu tür hastalıkların tedavisinde neden kullanıldığını açıklamaktadır. Yapılan çalışmalar ile sıcak suyla hazırlanan bitki infüzyonlarının ve sıcak suda kaynatılarak hazırlanan dekoksionların en etkili preparatlar olduğu belirlenmiştir. McCutcheon ve arkadaşları tarafından daha önce yapılan çalışmalarda bitkinin metanollü ekstresinin *E.coli*, *Mycobacter phlei* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki gösterdiği, *K. pneumonia*'a karşı ise antibakteriyel aktivite göstermediği bulunmuş iken Türker ve Camper'in yaptığı çalışmalarda metanollü ekstrenin *E. coli*'nin büyümesine etki etmediğini sadece *K. pneumonia*'ya karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini tespit edilmiştir. Bu durum değerlendirilirse ekstre hem gram (+) hem de gram (-) bakterilere karşı aktivite göstermektedir (8).

V. gypsicola Vural-Aydoğdu bitkisinin toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Tablo 6'da görülen mikroorganizmaların kullanıldığı çalışmada disk difüzyon metoduyla P10 (penicilin G (10 unit)), SAM20 (ampicillin 10µg), CTX30 (cefotaxime 30µg), VA30 (vancomycin 30µg), OFX5 (oflaxacin 5µg), TE30 (tetracycline 30µg), NY100 (nystatin 100µg) gibi antibiyotikler ile karşılaştırma yapılarak antimikrobiyal aktivite araştırılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. *V. gypsicola* bitkisiyle yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar ve elde edilmiş sonuçlar

	Mikroorganizmalar / inhibisyon zonu (mm)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Verbascum gypsicola</i>	-	17.6	-	-	-	15.2	10.4	9.6	14.6	15.3	9.2	10.4
Penicilin G (10 unit)	18	13	18	8	10	14	15	10	36	-	-	-
Ampicillin 10µg	12	16	14	10	16	12	21	12	32	-	-	-
Cefotaxime 30µg	10	12	13	54	18	14	11	16	32	-	-	-
Vancomycin 30µg	22	13	22	10	20	18	20	26	34	-	-	-
Oflaxacin 5µg	30	24	28	44	28	30	32	30	28	-	-	-
Tetracycline 30µg	28	26	30	34	26	25	24	28	22	-	-	-
Nystatin 100µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	18	18

1, *Escherichia coli* (ATCC 11230) **2**, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) **3**, *Klebsiella pneumoniae* (UC57) **4**, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) **5**, *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) **6**, *Bacillus cereus* (ATCC 7064) **7**, *Mycobacterium smegmatis* (CCM 2067) **8**, *Listeria monocytogenes* (ATCC15313), **9**, *Micrococcus luteus* (CCM 169) **10**, *Candida albicans* (ATCC 10231) **11**, *Kluyveromyces fragilis* (ATCC 8608) **12**, *Rhodotorula rubra* (DMS 70403)

Sonuç olarak *V. gypsicola* bitkisinden hazırlanan ekstrenin *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram (-) bakterilere karşı aktivite göstermediği buna karşılık *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* ve *Mycobacterium smegmatis* gibi gram (+) bakterilere karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca *V. gypsicola* Vural&Aydoğdu bitkisinin tüm test mayalarına karşı aktivite gösterdiği de belirlenmiştir. Ayrıca *Staphylococcus aureus*'un *V. gypsicola* bitkisinden hazırlanan ekstreye karşı standart antibiyotikler OFX5 ve TE30'la karşılaştırıldığında daha hassas olduğu, benzer şekilde ekstrenin P10, SAM ve CTX30 standart antibiyotikleriyle karşılaştırıldığında ise *Bacillus cereus*'un diğerlerine göre daha hassas olduğu görülmüştür. Ayrıca ekstre *Candida albicans*'a karşı da oldukça güçlü antifungal etki göstermiştir (10).

Meurer-Grimes ve arkadaşlarının 9 *Verbascum* L. türünün kök, çiçek, tohum ve yapraklardan elde edilen ekstreleri ile yaptıkları antimikrobiyal aktivite çalışmasında güçlü bir etki tespit etmişlerdir. Ekstrelerin özellikle gram-pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ve mayalardan *Candida albicans*'a karşı hep etkili olduğu belirlenmiştir (10). Dulger ve Gonuz'un daha önceki çalışmasında *V. olympicum* Boiss., *V. prusianum* Boiss. ve *V. bombyciferum* Boiss. gibi 3 endemik *Verbascum* türünden elde edilen ekstrelerle yapılan aktivite çalışmalarında aynı bakteriler için paralel sonuçlar bulunmuştur. Araştırmalar *Verbascum* türlerinin gram-pozitif bakterilere ve mayalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu durumda genel olarak gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarındaki lipopolisakaritlerden dolayı gram pozitif bakterilere göre ekstrele karşı daha dirençli olduğu sonucuna ulaştırmaktadır (10).

2.5.2 Antioksidan Etki

Süperoksit iyonlar (O_2^-), hidroksil (OH^-) ve nitrikoksit radikalleri (NO^-) gibi serbest radikaller ve hidrojenperoksit (H_2O_2) ve nitrik asit (HNO_2) gibi serbest olmayan radikalleri içeren reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) aktif oksijen ve azotun çeşitli formlarıdır. Yaşayan organizmalarda ROS ve RNS farklı yollardan oluşmaktadır. Normal aerobik solunumda; uyarılmış polimorfonükleer lökositler, makrofajlar ve peroksizomlar hücreler tarafından üretilen antioksidanların büyük bir

kısının ana endojen kaynakları olarak görülmektedir. Bazı eksojen serbest radikallerin kaynağı da sigara, iyonize radyasyon, organik solventler ve pestisitlerdir. Serbest radikaller; yiyeceklerin bozulmasına neden olan lipid peroksidasyonuna da yol açmaktadır. Oksidasyon sadece lipidleri etkilememektedir. ROS ve RNS mutasyona yol açan DNA tahribatlarına da neden olabilmektedir. Buna ek olarak ROS ve RNS; sıtma, kalp hastalıkları, felç, arteriosklerozis, diyabet ve kanser gibi 100'den fazla hastalıkla da ilgili görülmektedir. Aşırı üretildiği zaman ROS doku yaralanmalarına neden olabilmekte iken, doku yaralanmalarının kendisi de ROS oluşumuna neden olabilmektedir. Ama yine de insanları da içine alan tüm aerobik organizmalar; tahribatları ortadan kaldıran, enzimleri onaran veya tahrip olmuş molekülleri onaran, oksidatif tahribata karşı koruyucu antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir. Doğal antioksidan savunma mekanizmaları diyet yoluyla dışardan antioksidan bileşikleri olarak oksidatif tahribatı etkisiz hale getirilebilmektedir. Bu da bu bileşiklerin önemini günümüzde daha da arttırmaktadır. Ama yine de bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi gıdaların işlenmesi sırasında sıklıkla kullanılan sentetik antioksidanların yan etkilerinin olabileceği belirtilmektedir. Diyet yoluyla dışarıdan antioksidanlarca zengin gıdaların alımıyla bir çok hastalığın ortaya çıkışı arasında ters ilişki olduğu da düşünülmektedir. Bu yüzden de doğal antioksidan kaynaklarının bulunması ile ilgili araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Lipid peroksidasyonu zincirleme bir reaksiyondur. Bu reaksiyon reaktif radikalın non-radikalden bir elektron almasıyla başlar ve radikal böylece non-radikale dönüşür. Böylece uyarılan yeni bir radikal oluşmakta ve reaksiyon bu şekilde devam etmektedir. Fenolik bileşende hazır bulunan hidroksil hidrojene bir elektronunu vererek radikali süpürmektedir. Böylece yeni oluşan fenoksi radikali daha önceden oluşan radikale göre daha karardır. Böylece zincir reaksiyonu geciktirilebilmektedir (51).

Son dönemde yapılan araştırmalarda insanların safra kesesinde ve hayvanların safra akıntısında lipid peroksidasyon ürünlerine rastlanmıştır. Safra kesesi duvarında veya karaciğer yağlanması gibi kesin karaciğer hastalıklarının inflamasyonlarında görülen yaygın serbest radikal reaksiyonları; safra bileşiminin değişmesine, safra fonksiyonlarında ciddi karışıklıklara ve en son olarak da safra taşlarının oluşumuna neden olmaktadır. Diyetle alınan doğal antioksidanların karaciğer ve ayrıca safradaki

farklı enzimatik ve non-enzimatik reaksiyonlar yoluyla patolojik serbest radikallere dönüşebildiği hayvan deneyleri ile saptanmıştır (52).

Antioksidan aktiviteye sahip fitokimyasalları içeren türlerden biri olan *V. macrurum* Ten.'in toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinde antioksidan aktivite araştırılmış ve serbest radikal süpürücü etkiye sahip 2,2-difenil-1-pikrilhidrazile (DPPH) karşı antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca Lancimat metoduyla oksidatif bozulma da incelenmiştir. Gıdaların işlenmesi, paketlenmesi ve dağıtımı sırasında meydana gelen ve yiyeceklerin bozulmasından sorumlu olan lipid oksidasyonunun en önemli nedeni serbest radikal aktivitesi sonucu oluşan oksidatif transformasyondur. *V. macrurum*'dan okteozit, martinozit, 6'-*O*- α -L-arabinopiranozil ve 6'-*O*- β -D-ksilopiranozil martinozit gibi 4 fenilpropanoid glikozit ve okubin, ajugol, geniposidik asit, sakkatozit, 3''-*O*-p-kumaroilsinuatol ve 6-*O*-p-kumaroilokubin gibi 6 iridoit izole edilmiştir. Bir polihidroksillenmiş fenilpropanoit glikozit türevi olan okteozit'te diğer bileşiklere göre serbest radikal süpürücü potansiyelin çok yüksek olduğu ve ayçiçek yağının oksidatif eşkimesine karşı en yüksek koruma faktörünü gösterdiği bulunmuştur. Bu bileşik sentetik bir antioksidan olan BHT ile karşılaştırıldığında doğal α -tokoferol açıkça daha yüksektir. Ayrıca bu bileşen nontoksik bir bileşendir. Bu nedenle gıdaların oksidatif ransiditiye karşı doğal yollardan korunmasında okteozit önemli bir bileşiktir (53).

2.5.2.1 Türkiye'de Yetişen *Verbascum* Türleri Üzerinde Yapılmış Antioksidan Etki Araştırmaları

Son yıllarda, muhtemel antioksidan aktivite açısından çeşitli bitki grupları taranmaktadır. Bu gruplar arasında yer alan *Verbascum* türlerinde antioksidan etkiye sahip olanlar bulunmaktadır (54).

Kuzey ve İç Anadolu'da yayılış gösteren ve Sivas Yıldızeli'nden toplanan endemik *V. wiedemannianum* türünün köklerinden hazırlanan metanollü ekstrede radikal süpürücü etki saptanmıştır (38).

Bir başka çalışmada Sivas Yıldızeli'nden toplanan *V. wiedemannianum* türünün köklerinden ve toprak üstü kısımlarından elde edilen metanollü ekstreden 4 yeni bir feniletanoid glikozit olan wiedemanniozit B-E izole edilirken bunlara ek olarak wiedemanniozit A (6-*O*-asetilmartinozit), verbaskozit, martinozit, ekinakozit ve

lökoskeptozit B gibi bilinen 5 bileşik daha izole edilmiş ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazile (DPPH) karşı radikal süpürücü etkisi incelenmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Farklı konsantrasyonlarda verbaskozit ve ekinakozit'in DPPH radikal indirgeme yüzdesi

Bileşikler	Konsantrasyon (μM)					IC_{50} (μM)
	10	25	50	100	200	
Verbaskozit	29.1	38.3	48.6	59.1	60.0	63
Ekinakozit	28.6	27.7	32.6	46.9	59.1	113
Askorbik asit	36.3	38.9	44.6	46.6	59.4	129

Yeni bileşiklerden wiedemanniozit B, C ve bilinen feniletanoit glikozitlerin radikal süpürücü etkiye sahip 2,2-difenil-1-pikrilhidrazile (DPPH) karşı antioksidan özellikte oldukları görülmüştür. Bu nedenle bu bileşikler daha ileri spektroskopik yöntemlerle radikal süpürme kapasiteleri bakımından test edilmiştir. Sadece verbaskozit ve ekinakozitte belirgin bir aktivite görülmüştür. Askorbik asit ise referans bileşik olarak kullanılmıştır (9).

2005 yılında Tepe ve arkadaşları tarafından içerisinde *V.wiedemannianum*'un da bulunduğu 5 bitkinin metanollü ekstrelerinin antioksidan etkisi araştırılmıştır. DPPH-serbest radikal süpürücü, β -karoten/linoleik asit yöntemi ile çalışma sürdürülmüştür. Pozitif kontrol olarak kurkumin ve askorbik asit kullanılmıştır. Sonuç olarak DPPH sistemi ile ($\text{IC}_{50}=117\pm 0.56$) ve β -caroten/linoleik asit sistemi ile (52.5 ± 3.11) yapılan çalışmada *V. wiedemannianum* zayıf antioksidan etki gösterdiği bulunmuştur (54).

Fenolik doğal bileşenler sahip oldukları oksijen radikal süpürücü etkileri nedeniyle potansiyel antioksidan maddeler olarak bilinmektedir. Bu nedenle flavanoidler gibi fenolik doğal bileşenler antioksidan aktivite açısından ilgi çekici fitokimyasallardır. Serbest radikal süpürücü etkiye sahip antioksidanlar özellikle kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma ve kanser hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Bu antioksidan bileşiklerin tespiti için pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden özellikle 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil'in (DPHH) kullanıldığı serbest radikal süpürücü yöntem hem güvenilir hem de kısa sürede sonuç vermesiyle tercih edilmektedir (41).

Flavonoitler gibi fenolik doğal bileşiklerin potansiyel antioksidan maddeler olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Burdur, Yeşilova'dan toplanan *V. salviifolium* Boiss. bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstrede DPPH ile aktif olduğu tespit edilen flavonoitlerin, izolasyonlarının, yapı tayinlerinin ve serbest radikal süpürücü özelliklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bitkiden elde edilen flavonoit glikozidlerden, apigenin-7-O-β-glukopiranozit ve krizoeriyol-7-O-β-glukopiranozit bileşiklerinin antioksidan etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ile aktif olduğu tespit edilen flavonoitler bulunmuş ve bunların radikal süpürücü özellikleri incelenmiştir. Sonuç olarak iki maddenin de serbest radikal süpürücü özelliklerini gösteren DDPH ile yapılan deneylerde önemli antioksidan etkiye sahip oldukları bulunmuştur (41).

İzmir Urla'dan toplanan *V. lasianthum* Boiss' in köklerinden elde edilen metanollü ekstrede 3 iridoit glikozit; 8-O-asetilharpajit, harpogozit ve 6-O-vanilloylajugol izole edilmiştir. Bunlara ek olarak iki feniletanoid glikozit, verbaskozit {=okteozit [β-(3,4- dihidroksifenil)-etil] - (3'-O-α-L-ramnopiranosil)- (4'- O - kaffeol)-β-D-glukopiranozit} ve poliumozit {= [β -(3 - 4 -dihidroksifenil)-etil]-(3'-6'- O-α - L-diramnopiranosil)-(4-O-kaffeol)-β-D-glukopiranozit}'de izole edilmiştir. Bunlardan harpogozit ve poliumozit serbest radikal süpürücü etkiye sahip 2,2-difenil-1-pikrilhidrazile (DPPH) karşı antioksidan etki göstermiştir (42).

2.5.3 İmmunomodulör Etki

Avrupa'da yetişen *Verbascum* türlerinden olan *V. phlomoides*, *V. thapsiforme*, *V. nigrum* ve *V. lychnitis*'den izole edilen verbaskosaponin, luteolin 7-O-glukozit, verbaskozit, spesiozit ve forsitozit B bileşikleri invitro ortamda sıçan dalak lenfosit hücrelerinde 100µg/ml konsantrasyonda antiproliferatif etki gösterdiği; düşük konsantrasyonda (0.1µg/ml) ise verbaskozit, forsitozit ve spesiozit bileşiklerinin proliferasyonu arttırdığı görülmüştür. Bu nedenle immunomodulator etkili olduğu tespit edilen bu bileşiklerin sitotoksik ve immunostimulan özelliklerinin incelenmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir (55).

2.5.4 Sitotoksik ve Antitümör Etki

Brine shrimp yöntemi ile yapılan çalışmada, (*Artemia salina*) yumurtaları ve Radish (*Raphanus sativus*) tohumları kullanılmış ve etanol, metanol, su ekstralarının yüksek konsantrasyonda bölünme ve büyümeye etkisi incelenmiştir. Sulu ekstralar içinde dekoksasyonların infüzyonlara göre daha toksik olduğu ve diğer tüm ekstralara göre daha fazla toksik bileşen içerdiği düşünülmektedir. Turp tohumlarında tüm ekstraların yüksek dozda büyümeyi inhibe ettiği ve kök uzamasını engellediği görülmüştür. Tohumun bölünmesinde ise Müllein ekstraları 7500mg/L konsantrasyonda inhibe edici etki göstermektedir. Düşük dozlarda ise (1000mg/L) bu etki çok azdır. Diğer ekstralara göre etanollü ekstralar büyüme ve bölünmeyi daha çok inhibe etmektedir. Saponozit standart testleri ise tohumun bölünmesini Müllein ekstralarına göre daha az inhibe etmekte, kök büyümesini ise inhibe etmemektedir. Yapılan çalışmalarda Brine shrimp yumurtalarında görülen toksisite ile 9KB'da görülen (insan nasofaringel karsinoma) sitotoksisite arasında pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur. Sitotoksik etki ekstraların 1000 mg/L gibi yüksek dozunda gözlenmiştir. Sulu ekstralarda ise dekoksasyonun infüzyondan daha toksik olduğu saptanmıştır (8).

V. thapsus bitkisinden hazırlanan ve ticari olarak piyasada bulunan çay, tablet ve çiçeklerinden elde edilen yağı ile bitkinin kapsül ve yapraklarından hazırlanan metanollü, etanollü ve sulu ekstraları kullanılarak antitümör etki incelenmiştir. *V. thapsus*'dan elde edilen tüm ekstralar *Agrobacterium tumefaciens* enfekte edilmiş patates (*Solanum tuberosum*) plaklarında antitümör etki göstermiştir. Ayrıca yapılan çalışmada genelde ticari ürünlerde tümör inhibisyon etkisinin daha az olduğu saptanmıştır (8).

V. sinaiticum yapraklarının etil asetat ve dietil eterli ekstralarından elde edilen 2 flavonolignan hidnokarpin ve yeni bir bileşik olan sinaitisin; 2 flavon: krisoeriol ve luteolin bileşiklerinin doza bağlı sitotoksik etkili olup sıçangillere ait lenfositik lösemi'de P-388 hücrelerine karşı inhibitör etki gösterdiği ve bu hücreleri önemli ölçüde baskıladığı belirlenmiştir. Hidnokarpinin insan 6 kanser hücresine ve L-1210 sıçan hücrelerine karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu flavonolignanların CF₁ farelerinde "*Ehrlich ascites*" karsinomasının büyümesini engellediği, antienflamatuar ve hipolipidemik aktivite gösterdiği görülmüştür (22).

2.5.5 Antihepatoma Etki

Kanada halk tıbbında içlerinde *V. thapsus*'un da bulunduğu tedavi amaçlı kullanılan 15 bitki Hep G2/C3A, SK-HEP-1, HA22T/VGH ile Hep3B ve PLC/PRF/5 gibi 5 insan karaciğer kanser hücre topluluğu kullanılarak antihepatoma aktivite açısından araştırılmıştır. Tablo 8'de görüldüğü gibi ekstreden bu hücre topluluklarından Hepatit B virüs genomu taşıyanların taşımayan hücre topluluklarına göre farklı etkilendikleri tespit edilmiştir (56).

Tablo 8. *V. thapsus* sulu ekstresinin antihepatoma aktivite test sonuçları

	HBV(-) hücreler			Ortalama inhibisyon (%)	HBV(+) hücreler		Ortalama İnhibisyon (%)
	Hep G2/C3A	HA22T/VGH	SK-HEP-1		PLC/PRF/5	Hep3B	
<i>V. thapsus</i>	31.0	69.9	-	33.6	11.6	-	5.8+

2.5.6 Antiülser Etki

Gürbüz ve arkadaşları tarafından 2005 yılında halk arasında mide ağrısı, kalp yanması tedavilerinde kullanılan ve içerisinde *V.cheiranthifolium* Boiss var. *cheiranthifolium* türünün de olduğu 6 bitki türü üzerinde antiülser etki taraması yapılmıştır. *Verbascum* türünün çiçeklerinin sulu ekstresi ile çalışılmıştır. Sonuçta çalışılan bitkilerin oral olarak verilmesi sonucu sıçanlar üzerinde etanol indüklemeli gastrik ülser modeline karşı önemli gastrik koruma etkisi olduğu saptanmıştır. *Verbascum* türlerinde mevcut olan saponozitin, mukoza membran koruma, mide salgı miktarını ve asit salınımını baskıladığı düşünülmektedir (57).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Bitkisel Materyal

Araştırma materyalini oluşturan *V. obtusifolium* Hub.-Mor. bitkisi C4 Mersin, Silifke'den Gülnar'a 11. km'de, 450 m yükseklikten 1 Temmuz 2004 tarihinde toprak üstü kısımları ve çiçekleri olmak üzere ayrı ayrı toplandı ve uygun şartlarda kurutuldu. Bitkinin herbaryum örneği Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır (AEF 23714).

3.1.2 Kullanılan Maddeler

Rimantadin Hidroklorit	Hoffman-La Roche Inc , Nutley , NJ , USA
(E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Deoxyuridine	Sigma Aldrich Chemie'den
Madin-Darby Canine Kidney	Gibco BRL, Scotland , UK
Madin-Darby Bovine Kidney	Gibco BRL, Scotland , UK
Dulbecco's Eagle Medyum	Gibco BRL, Scotland , UK
Fetal Calf Serum	Bio Whittaker Europe, Germany
Fetal Bovine Serum	Sigma
Diklorometan	Akkimya
Metanol (HPLC)	Merck
Metanol	Akkimya
Asetonitril	Merck
HCl	Merck
Trifloroasetik asit	Fluka
Mirsetin	Fluka
Luteolin	Fluka

Kersetin	Fluka
Kemferol	Fluka
İzoramnetin	Fluka
Morin	Riedel de haen
Etanol	Merck
TLC plak	Merck
Karboksi Metil Selüloz	Sigma
Formaldehit	Merck
Fetal Bovine Serum	BioChrom/ Germany

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Rotavapor	Rotar TVP 200
HPLC	Agilent 1100 Series
Su Banyosu	Elektro-mag
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex (Almanya)
Kolon	C18Symmetry Kolon, (150mmx 3.9 Mm, I.D 5µm)
Elektrikli Hassas Terazî	Denver Instrument 040111 M
Etüv	Memmert RS 232
Ph metre	Mettler Toledo
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Spektrofotometre	Perkin Elmer
Çekerocak	Nurgaz

3.2 Yöntem

3.2.1 Fitokimyasal Çalışmalar

3.2.1.1 Ekstraksiyon

Toprak üstü kısmı: Açık havada ve gölgede kurutulan toprak üstü kısımları toz haline getirildikten sonra (700 g) diklorometan ile masere edildi. 40°C'yi geçmeyen sıcaklıkta su banyosu üzerinde ısıtılarak karıştırıcı yardımıyla 2 saat süreyle karıştırıldı. 1 haftalık maserasyonun ardından diklorometanlı ekstre süzüldü. Ekstraksiyon aynı miktar solvan ile aynı şartlarda iki kez tekrarlandı. Birleştirilen diklorometan ekstraktları alçak basınç altında kuruluğa kadar uçuruldu. Metanollü ekstraksiyona geçmeden bitki kurutularak çözücünün tamamen uçması sağlandı. Aynı işlemler metanol ile de tekrarlandı. Elde edilen ekstre miktarları ve % verim aşağıda görülmektedir.

Diklorometan ekstraktı: 18 g, % verim 2.5

Metanol ekstraktı: 53.34 g, % verim 7.62

Kaliks: Açık havada ve gölgede kurutulan kaliks toz haline geldikten sonra (84 g) metanol ile masere edildi. 40°C'yi geçmeyen sıcaklıkta su banyosu üzerinde ısıtılarak karıştırıcı yardımıyla 2 saat süreyle karıştırıldı. 1 haftalık maserasyonun ardından metanollü ekstre süzüldü. Ekstraksiyon aynı miktar solvan ile aynı şartlarda iki kez tekrarlandı. Birleştirilen metanol ekstraktları alçak basınç altında kuruyana kadar uçuruldu.

Kaliks metanol ekstraktı: 33.46 g, % verim 39.8

3.2.1.2 Ekstrelerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile Kalitatif ve Kantitatif Analizi

V. obtusifolium'un toprak üstü ve kaliksinden hazırlanan metanollü ekstraktları flavonoid içerikleri açısından YBSK yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Analizlerde mirsetin, luteolin, kersetin, kemferol ve izoramnetin flavonoidleri standart olarak kullanılmıştır. Çalışma sırasında kullanılan YBSK koşulları ise aşağıda belirtildiği gibidir (58).

HPLC cihazı: Agilent 1100 Series

Kolon: C 18 Symmetry kolon, (150mmX 3.9 mm, I.D 5µm)

Çözücü: Gradient uygulanmıştır

%15 Asetonitril/Su (A) pH: 2.5 (trifloroasetik asit ile)

%35 Asetonitril/Su (B) pH: 2.5 (trifloroasetik asit ile)

Mobil faz akış hızı: 1ml/dak

Pompa : G1311 A

Degasser: G1379 A

Detektör: UV-370 nm, luteolin için 349 nm

Enjeksiyon hacmi: 20µl

Tablo 9. Gradient yönteme göre mobil faz değişimi

<i>Zaman (dk)</i>	<i>%A</i>	<i>%B</i>
<i>0</i>	<i>100</i>	<i>0</i>
<i>20</i>	<i>0</i>	<i>100</i>
<i>30</i>	<i>0</i>	<i>100</i>

YBSK Analizlerinde Kullanılan Ekstrelerin Hazırlanması

Ekstraksiyon kısmında belirtildiği şekilde hazırlanan ekstreler aglikonların serbest hale geçmesi için hidroliz edilmiştir. Hidroliz için, Hertog ve arkadaşlarının flavonoit glikozitlerinin hidrolizi için asidik şartları optimize ettikleri yöntemden yararlanılmıştır (59). *V. obtusifolium* bitkisinin toprak üstü ve çiçek metanol ekstreleri 0.5'er g tartıldı ve 250 mL'lik balonlara konuldu. 40 mL % 62.5'luk sulu metanol ilave edildi. Daha sonra 6M HCl' den 10 mL ilave edildi. Böylece karışım 1.2 M HCl içeren % 50' lik sulu metanol haline dönüştü. Daha sonra 2 saat 90°C su banyosunda geri çeviren soğutucu ile ısıtıldı. Sistem açılmadan balonlar arasına karıştırıldı. Balon soğutulduktan sonra 100 mL'lik balon jøjeye kantitatif olarak aktarıldı ve MeOH ile hacim tamamlandı, balon jøjeler ultrasonik banyoda 5 dk tutuldu. Ekstreler 0.45 µm'lik filtrelerden geçirilerek YBSK'na enjeksiyon yapıldı.

Standartlar Karışımının Hazırlanması

Analizlerde kullanılacak standart maddelerden 5'er mg tartılmış ve ayrı ayrı 10 ml'lik balon jodelerde hidroliz için kullanılan çözücüler ile hacim tamamlanmıştır. Bunların her biri ayrı ayrı 1ml alınıp tekrar 10 ml'lik balon jodede hacim tamamlanarak seyreltilmiş ve bunlardan alınan 0.5 ml, 1 ml, 1.5 ml, 2 ml'lik 4 farklı konsantrasyonda standart karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım hazırlanırken internal standart olarak her konsantrasyon için sabit olmak üzere morin (0.5 ml) ilave edilmiştir.

Internal Standartın Hazırlanması

5 mg morin 10 ml'lik balon jodede çözülerek hacim tamamlanmış ve bu çözültiden 4 ml alıp tekrar 10 ml'ye seyreltilmiştir. Son hazırlanan bu stok çözültiden 0.5'er ml alınarak standartlar karışım serilerine sabit miktarda ilave edilmiştir.

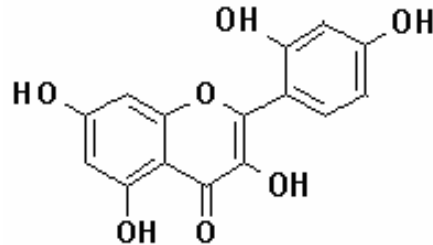
Bu durumda son konsantrasyonlar aşağıdaki gibidir;

0.0025 mg/ml=2.5 ppm

0.005 mg/ml=5 ppm

0.0075 mg/ml=7.5 ppm

0.01 mg/ml=10 ppm



Şekil 19: Morin internal standartının kimyasal formülü

3.2.2 Biyoaktivite Çalışmaları

3.2.2.1 Antioksidan Etki

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Testi

DPPH testi; bitkiden elde edilen ekstrenin serbest radikal süpürücü etkisinin değerlendirilmesi için kullanılan hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Mor renkli kararlı bir serbest radikal olan 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil'in (DPPH) indirgenerek sarı renkli difenilpikrilhidrazin'e dönüşmesi esasına dayanır.

İnce tabaka plaklarına püskürtüldüğü zaman antioksidan bileşik varlığında mor zemin üzerinde sarı leke şeklinde gözlemlenir (60).

Ekstrenin 1mg/ml çözeltisinden 2µl wiretrol II mikropipeti kullanılarak silika jel plakalara uygulandı ve % 0.2'lik DPPH (etanolde) çözeltisi püskürtülerek 20°C'de bekletildi ve püskürtmeden sonra 30 dk içinde gözlemlendi.

Lipozom Kullanılarak Yapılan Tiyoarbitürik (TBA) Asit Testi

TBA testi; lipozomların lipid peroksidasyonundan korunmasında bileşiklerin etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan invitro antioksidan aktivite testidir ve lipozomun lipid peroksidasyonu tayin edilerek yapılır. TBA reaksiyonu, birçok membran sisteminin peroksidasyonu sonucunda az miktarda serbest malonaldehitin (MDA) oluşumuna sebep olmasına dayanır. MDA'nın bir molekülü TBA'nın 2 molekülü ile reaksiyona girerek asidik ortamda 532 nm'de ışığı absorbe eden renkli bir ürün verir ve bu ürün organik çözücülerle kolaylıkla ekstrakte edilir. Böylece spektrofotometre ile ölçülür. Işığın yoğunluğu MDA konsantrasyonunu verir. Absorbans 532 nm'de Perkin Elmer Lambda 40 UV – Vis spektrofotometresinde ölçülür. Karışıma herhangi bir antioksidanın karıştırılması peroksidasyonun devam etmesini engeller. Böylece renk oluşumu ve absorbans azalır (60).

V. obtusifolium metanollü ve DCM'lı ekstratlar fosfat-buffer tuzunda (5mg/ml) test edildi. Örneklerin peroksidasyonu 0.1 mL FeCl₃ (1 mM) ve 0.1 mL askorbik asit (1 mM) ilavesi ile 37 °C'de 20 dakika inkübe edilerek sağlandı. İyi bilinen bir antioksidan

olan askorbik asit aynı zamanda demir, bakır gibi belirli iletken metal iyonlarının varlığında prooksidan özelliğine sahiptir. Bu nedenle TBA testi boyunca lipid peroksidasyonunu önlemek için etanolde 2.6-ditertbütül-4-metilfenol (BHT) eklendi. 0.02 mg/mL den 6.4×10^{-5} mg/mL arasında değişen propil gallat'ın 7 farklı konsantrasyonu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Deneyler her bir ekstre için 4 kez tekrarlandı. Lipid peroksidasyonunun % inhibisyonu, inhibitör konulmamış reaksiyon karışımının absorbansı ile, içerisine test ekstresi konulmuş reaksiyon karışımının absorbansının kıyaslanması ile değerlendirilir.

Tek başına ekstrenin ve lipozomun absorbansı dikkate alınarak aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$(FRM-B)-(ET-B-EA)$$

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 \times \frac{\text{FRM-B} - (ET-B-EA)}{\text{FRM-B}}$$

FRM: Tüm reaksiyon karışımının absorbansı (lipozom + demir kaynağı + test maddesinin bulunmadığı çözücü)

B: Kör karışımının (yalnızca lipozomun bulunduğu) absorbansı

ET: Test maddesinin içinde bulunduğu toplam karışımın absorbansı

EA: Yalnızca ekstrenin bulunduğu karışımın absorbansı

V. obtusifolium'un diklorometan ve metanol ekstralarının inhibitör konsantrasyonunun yarısı (IC_{50}) lincer regresyon analizleri PRISM software'i kullanılarak hesaplandı.

3.2.2.2 Antimikrobiyal Etki

3.2.2.2.1 Antibakteriyel Etki

Antibakteriyel etki çalışmasında *V. obtusifolium* bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanmış diklorometan ve metanol ekstresi ile kaliksten hazırlanmış metanollü ekstre kullanılmıştır. Testlerde Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Kültür Koleksiyonları, Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Derneği (KÜKEM)' den sağlanan bakterilerden yararlanılmış ve makrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Kullanılan bakteriler;

Gram (-) bakteriler

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Gram (+) bakteriler

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Enterococcus faecalis ATCC 29212 ve

Bacillus subtilis ATCC 6633 kullanıldı.

Makrodilüsyon Yöntemi:

Yöntemde değerlendirilecek ekstrelerin “The National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) de belirtilen şekilde seri dilüsyonları yapıldı (Tablo 10) (61). Konsantrasyon oranları 160-5120 µg/mL olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 10. NCCLS’de belirtilen, seri sıvı dilüsyon duyarlılık testlerinde kullanılan ekstrelerin sulandırma şeması.

Adım	Konsantrasyon	Kaynak	Hacim ^a	CAMHB ^b hacim	Son konsantrasyon	Log ₂
1	5120 µg/mL	Stok	1 mL	9 mL	512 µg/mL	9
2	512	Adım 1	1	1	256	8
3	512	Adım 1	1	3	128	7
4	512	Adım 1	1	7	64	6
5	64	Adım 4	1	1	32	5
6	64	Adım 4	1	3	16	4
7	64	Adım 4	1	7	8	3
8	8	Adım 7	1	1	4	2
9	8	Adım 7	1	3	2	1
10	8	Adım 7	1	7	1	0
11	1	Adım10	1	1	0.5	-1
12	1	Adım10	1	3	0.25	-2
13	1	Adım10	1	7	0.125	-3

Kısaltmalar: a: seçilecek hacimler, yapılacak test sayısına bağlı olarak bu rakamların herhangi bir katı olabilir. b: CAMHB, katyonu ayarlanmış Mueller-Hinton buyyon. Katyon ayarlama, eğer gerekliyse bu adımdan önce yapılır.

0.0512 g ekstre 10 ml’lik balon jodede diklorometan ekstreleri diklorometan ile, metanol ekstreleri ise % 10’luk DMSO çözeltisi ile çözülerek en yüksek konsantrasyonlar hazırlandı. Daha sonra Tablo 10’da gösterildiği gibi seri sulandırmalar yapıldı. Bir gecelik bakteri kültürlerinden 0.5 Macfarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak 1/100 oranında serum fizyolojik ile dilüe edildi. Daha sonra tüplere 0.5 ml ekstre ve üzerine 0.5 ml bakteri süspansiyonu dağıtıldı. Tüplerde bakteri son yoğunluğu 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde yapıldı. 18-24 saat 35 °C’de etüvde inkübasyondan sonra tüplerde bulanıklık olup olmadığı değerlendirildi. İnkübasyon süresinin sonunda katı besiyerlerine pasajlar yapılarak minimal bakterisidal konsantrasyon (MBC) ve minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri tayin edildi. Minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri bulanıklığın görülmediği en düşük konsantrasyon değeri olarak belirlendi.

3.2.2.2.2 Antiviral Etki

Bovine Herpes Virus Tip-1 (BHV-1)'e Karşı Antiviral Etki

Çalışmalarda Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi kaynaklı *Bovine Herpes Virus Tip-1* (BHV-1) virüsünün Cooper standart suşu kullanılmıştır.

Virüsün log₁₀ Tabanına Göre Sulandırılarak Hazırlanması

100DKID₅₀'si bilinen BHV-1 virüsünün Cooper suşu log₁₀ tabanına göre 1x10⁻¹ den 1x10⁻⁶ aralığına kadar sulandırıldı.

Her bir dilüsyondan 4'er göze 200'er µl inokule edildi ve 1 saatlik adsorbsiyondan sonra ekstreler eklendi. Virüs kontrole ise sadece normal CMC eklendi ve etüve kaldırıldı.

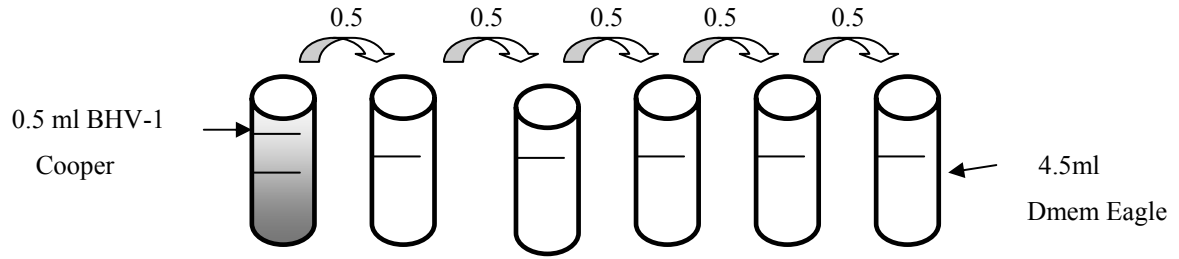
Plak Redüksiyon Testi ile Antiviral Etkinin Tayini

Virüsler %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve antibiyotik içeren DMEM ile kültüre edilen MDBK hücrelerinde üretildi ve infektivitesi Reed-Muench yöntemine göre tespit edildi. Bütün uygulamalarda hücreler 37 °C'de, nemli, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

Test Ekstrelerinin Hazırlanması

Test için, *V. obtusifolium* bitkisinden elde edilen diklorometanlı ve metanollü ekstreler 1 g/ml konsantrasyonda olmak üzere hazırlandı.

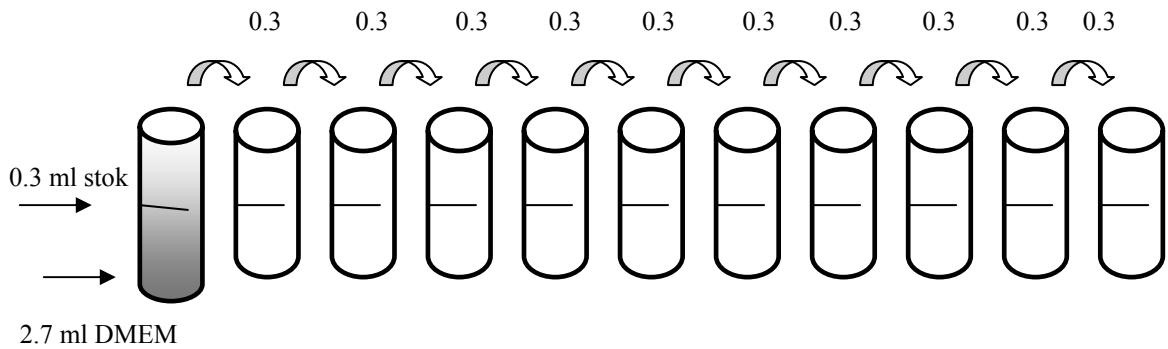
Ekstrelerin Seyreltilmesinde Kullanılan Carboxy-Methyl-Cellulose (CMC) Hazırlanması: 12.8 g CMC ve 0.6 g Na-bikarbonat tartılarak 200 ml distile suyla manyetik karıştırıcıda çözününceye kadar yaklaşık 2 saat karıştırıldı. Çözündükten sonra 200 ml 2xDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ortama konarak manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam edildi ve iyice çözündükten sonra elde edilen %4'lük CMC testte kullanıldı.



Şekil 20. Virüslerin seri seyreltilme işlemi

Ekstrelerin Seyreltilmesi

24 gözlü pleytde Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre monolayerleri üzerine 100DKID₅₀ oranında sulandırılan *Bovine Herpes Virus Tip-1* (BHV-1) 200'er µl hacimde eklenerek karbondioksit etüvünde bir saat süreyle inkübe edildi. Ekstrelerin (1 g/ml konsantrasyonda) serumsuz DMEM ile 1/10'luk dilüsyonu hazırlandı. Bu amaçla 2.7 ml DMEM üzerine 0.2 nm çaplı membran filtreden geçirilerek steril edilen ekstreten 0.3 ml ilave edildi (100 mg/ml madde). Ekstrelerin 10⁻¹¹'e kadar 10 katlı dilüsyonları yapıldı. Şekil 21'de görüldüğü biçimde bütün tüplere 2.7 ml DMEM eklendi. Daha sonra birinci tüpe 0.3 ml stok ekstre çözeltisinden ilave edildi, kondu ve vortekste karıştırıldı. Buradan ikinci tüpe 0.3 ml aktarılarak karıştırıldı ve bu şekilde diğer tüpler de seri sulandırıldı. Böylece aşağıda formüle edildiği gibi stok çözeltinin 10 katlı sulandırması hazırlanmış oldu.



Şekil 21. Ekstrelerin seri seyreltilme işlemi

1. tüp= 10^{-1} = 100 mg/ml (stok)
2. tüp= 10^{-2} =10 mg/ml
3. tüp= 10^{-3} =1 mg/ml
4. tüp= 10^{-4} =100 µg/ml
5. tüp= 10^{-5} =10 µg/ml
6. tüp= 10^{-6} =1 µg/ml
7. tüp= 10^{-7} =100 ng/ml
8. tüp= 10^{-8} =10 ng/ml
9. tüp= 10^{-9} =1 ng/ml
10. tüp= 10^{-10} =100 pg/ml
11. tüp= 10^{-11} =10 pg/ml

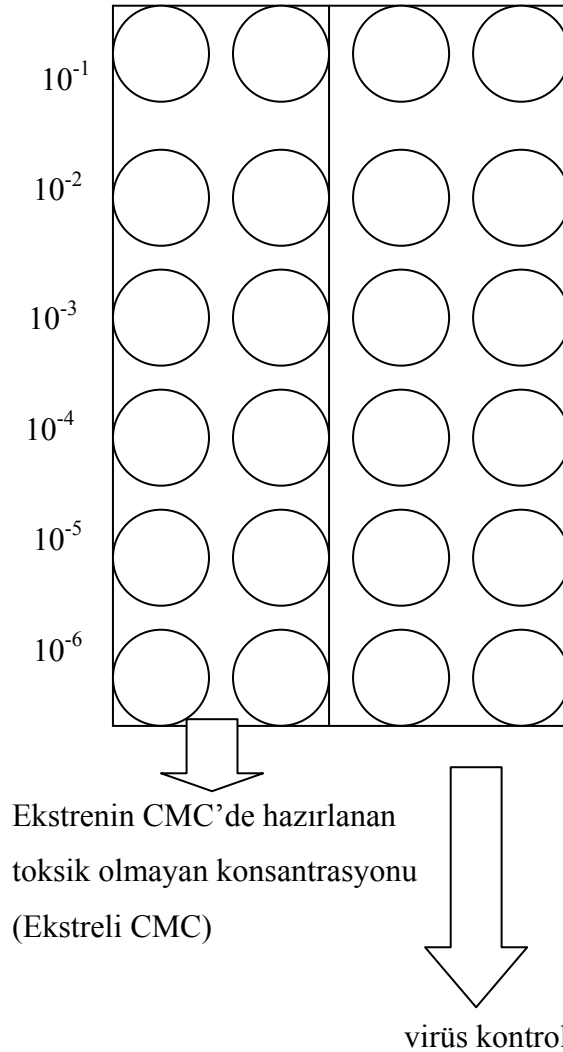
İnkubasyonunu tamamlayan virüs ile enfekte plate gözlerine ekstre sulandırmalarından dağıtıldı ve sistem ileri inkubasyona alındı.

Sitotoksisite Testi

Çalışmaların bu basamağında; antiviral aktivite deneylerinde kullanılacak olan mikroskobik hücre kültürlerinde metanollü ve diklorometanlı bitki ekstralarının toksik etki göstermediği ekstre dilüsyon oranı belirlendi. MDBK hücrelerinde bitki ekstralarının değişik konsantrasyonları inkübe edildi. Hücrelerdeki morfolojik değişimler 48. saatte gözlemlendi. Non-toksik ekstre konsantrasyonu; hücre morfolojisinde belirgin değişikliğe neden olmayan en yüksek ekstre konsantrasyonu olarak tanımlandı. Sitotoksisite bulguları sonucunda antiviral aktivite çalışması için toksik etkinin görülmediği en yüksek konsantrasyondaki ekstraların kullanılmasına karar verildi.

Her ekstre için bir plate kullanıldı. MDBK hücrelerinin 24 saatlik monolayerleri farklı dilüsyonlarda hazırlanan BHV-1 Cooper suşu ile 0.2 ml (200 µl) hacimde infekte edildi ve 37 °C'de 1 saat virüs adsorbsiyona bırakıldı. Toksik olmayan 1 mg/ml'lik konsantrasyonda bitki ekstresi CMC ile sulandırılarak hazırlandı. Virüsün bir saatlik absorpsiyon periyodundan sonra hücre üzerine taze ekstre sulandırmalarının 1 mg/ml'lik çözeltisinden 1'er ml kondu. Plateler uzunlamasına 2 ye ayrıldı yarısına ekstre sulandırması diğer yarısına da sadece normal CMC çözeltisi konuldu. Deneylerde virüs ve hücre kontrolleri kullanıldı (Şekil 22). Platelerde 37 °C'de, nemli, %5 CO₂ içeren

etüvde en az 5 gün inkube edildi. CPE'ler (Cytopathogenic effect) mikroskopik olarak her gün gözlemlendi. Virüsün sitopatik etkisi ile meydana gelen plakların daha iyi görünmesi için tespit işlemi uygulandı. Testin sonunda hücrelerin tespit işlemi için platelerdeki kuyucukların her birinin üzerine 1 ml formaldehit eklendi. 1 saat bekletilerek tespit işlemi yapıldı. Tespit sonunda formaldehit çeşme suyu ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Plateler kuruyuncaya kadar 37 °C'deki etüvde bekletildi. Plakların daha iyi görünmesi için platelerin kuyucuklarına %1'lik Kristal Viole'den 1'er ml ilave edilerek boyandı. Yarım saat bekletildikten sonra boyalar dökülerek yavaş akan çeşme suyu ile yıkama işlemi yapıldı. Plateler kurutma kağıdına vurularak kurutuldu. Ekstre ile muamele edilmiş ve muamele edilmemiş kültürlerdeki virüs plakları invert mikroskopta veya gözle sayıldı (12, 45, 46, 47).



Şekil 22. Plate'lerin genel görünüşü ve platelere uygulanan dilüsyon miktarları

Avian influenza, Human influenza, Herpes simplex-1 ve Herpes simplex-2 Virüslerine Karşı Antiviral Etki

Test

Avian Influenza virüs A/Chicken/Germany/27 suş Weybridge (H7N7) (A/Weybridge) ve *Human Influenza* virüsü A/Aichi/2/68 (H3N2) (A/Aichi) 11 günlük fertil tavuk yumurtasında büyütüldü ve allantoik sıvı virüs inokulumu olarak kullanıldı. Virüs infeksiyon titre aralığı 10^6 - 10^7 TCID₅₀/ml (% 50 doku kültürü infeksiyon dozu/ml) ve hemaglutinasyon (HA) titre aralığı da 1024-2048'dir. *Herpes simplex* virüs tip I DA (HSV-1) suşu ve tip 2 Bja (HSV-2) suşu MDBK hücrelerinde pasajlandı, bunların infeksiyon titresi $10^{9.5}$ - 10^{13} TCID₅₀/ml aralığının üzerindedir. Virüs stokları -80°C'de saklanmıştır. Bu suşlar Sofia Bulgaristan Bilim Akademisi Mikrobiyoloji Enstitüsü koleksiyonu kaynaklıdır.

Ekstrelerin Hazırlanması

Ekstreler uygunluklarına göre % 10'luk dimetilsülfoksit (DMSO) ile yada diklorometan (DCM) ile çözüldü. Deneyler için ex tempore hücre kültür ortamında ya 2 yada 4 kat seyreltildi.

Hücreler ve Besiyeri

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ve MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) hücreleri Dulbecco's Eagle ortamında (Gibco BRL, Scotland , UK) pasajlandı ve %5 fetal calf serumu (FCS) (Bio Whittaker Europe, Germany) ve 100 IU/ml benzilpenisilin ve 100 µg/ml streptomisin antibiyotikleri eklendi; hücre kültürleri 37°C'de % 5 CO₂ varlığında monolayer formasyonları oluşuncaya kadar yetiştirildi. Antiviral testlerde % 0.5 FCS eklendi.

Toksisite Testi

96 bölmeli plastik platelerde MDCK ve MBDK hücre monolayerleri büyüme ortamında 4 kat seyreltilmiş bitki ekstraları ile inkübe edilip inkübasyonun 24, 48 ve 72 saatlerinde hücre morfolojindeki değişiklikler ve yaşama kabiliyetleri mikroskopik olarak gözlemlendi. Sitopatik etki (CPE) invert mikroskop altında belirlendi.

Sonuç 0 =0 %CPE, Sonuç 1 =0-25%CPE, Sonuç 2 =25-50 %CPE, Sonuç 3 =50-75%CPE, Sonuç 4 =75-100%CPE

%50 CPE (TC₅₀)'ye neden olan dilüsyon belirlendi.

Antiviral etki 2 yöntemle yapıldı. "Cytopathogenic effect (CPE) reduction" testi ve "%50 end point titration technique" (EPTT) testi;

"Cytopathogenic Effect (CPE) Reduction" Testi

Antiviral etki viral büyümenin multicycle deneylerinde çalışıldı. Virüs kaynaklı CPE, virüslerin yeniden üremesi için ölçü olarak kullanıldı. 96 gözlü platelerde 4 katlı monolayerler, 2 kat (2X) ilaç içeren ortam (0.1 ml) ve eşit hacimde virüs süspansiyonu (100 TCID₅₀/ml) ile kaplandı. Virüsün oluşturduğu CPE, yukarıda belirtildiği gibi 37°C'de inkübe edildikten sonra 48-72 saat sonunda belirlendi. Virüs kontrolü ile ilgili %50 (EC₅₀) CPE'yi azaltan konsantrasyon (virüs infekte edilmiş kontrol hücrelerine kıyasla) grafiklerden yararlanılarak belirlendi. TC₅₀/EC₅₀ oranı kullanılarak seçici indeks (SI) ile saptandı. SI ≥ 4 olması, anlamlı seçici inhibisyon olarak değerlendirildi.

"%50 End Point Titration Technique" (EPTT) ile Yapılan Test

Vanden Berghe et.al (1986)'e göre uygulandı. 96 gözlü mikrotitre platelerde 4 kat monolayerler, 10 kat seyreltilmiş virüs süspansiyonun 0.05 ml'si ile enfekte edildikten sonra doku kültürü ortamında (0.05 ml) çift katlı seri sulandırma hazırlandı, kültürler 37°C'de inkübe edilerek CPE için mikroskopta günlük olarak incelendi. CPE yukarıda tanımlandığı gibi hesaplandı (62, 63).

Antiviral aktivite kontrol ve ekstre uygulanan virüsler arasındaki farka göre saptandı. Farklılıkların istatistiksel anlamlılığı Student-t testi ile değerlendirildi. %90 etkili konsantrasyon (EC₉₀) ise virüs enfeksiyon titresinin 1 log TCID₉₀/ml redüksiyonuna sebep olan doz olarak saptandı.

Pozitif kontrol olarak, antiinfluenza ilacı Rimantadin hidroklorür ve antiherpetik ilaç olarak da BVDU ((E)-5-(2-bromovmil)-2'-deoksioridin) kullanıldı.

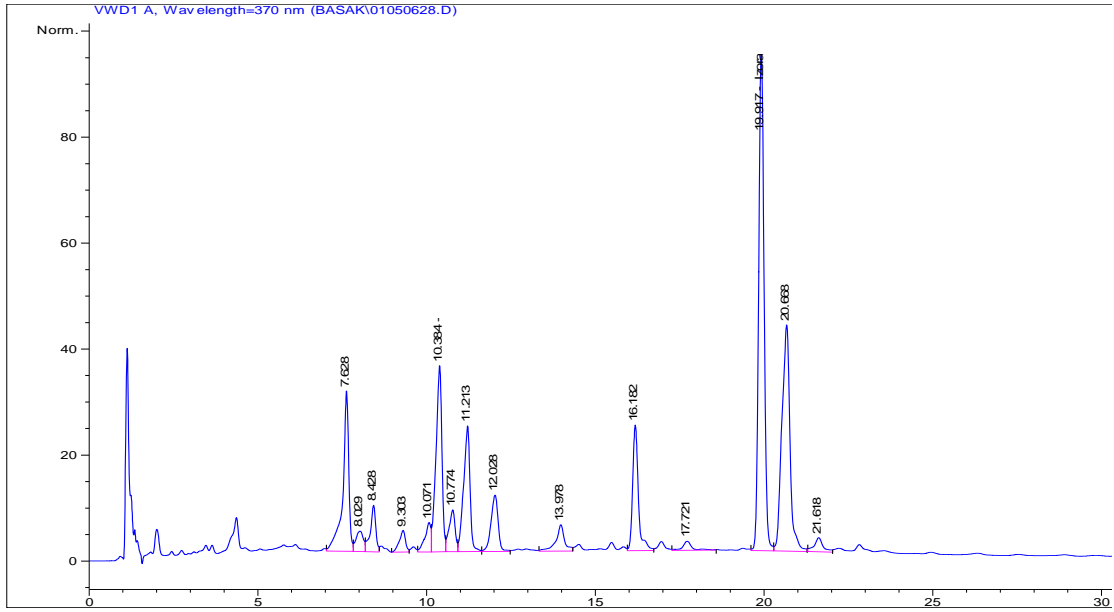
4. BULGULAR

4.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile Kalitatif ve Kantitatif Analiz

Sonuçları

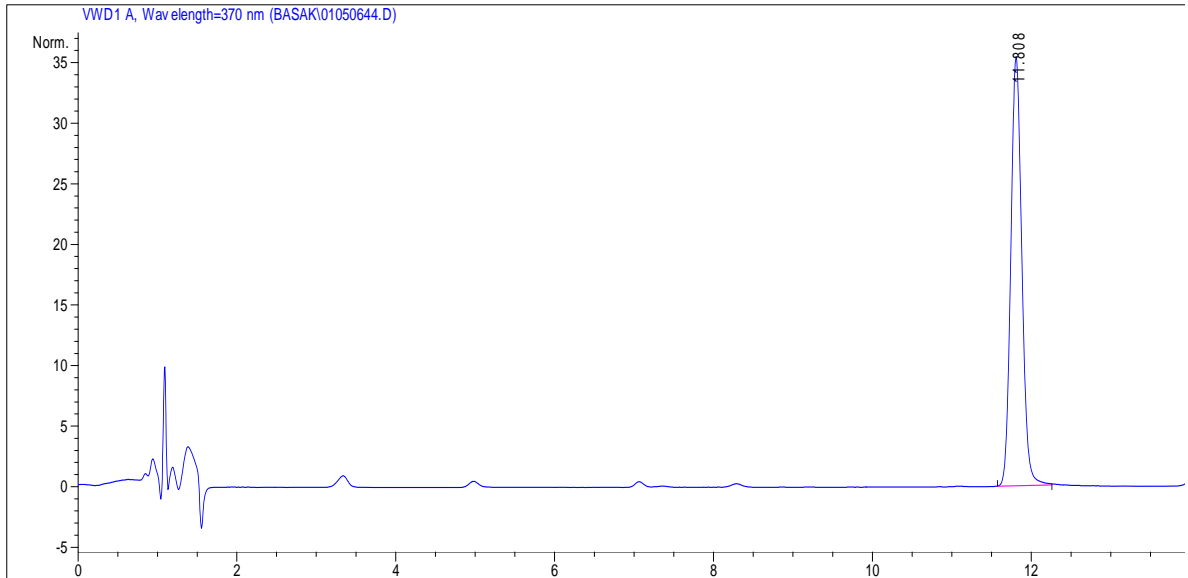
V.obtusifolium'un topraküstü kısmı ve kaliksinden deneysel kısımda belirtilen şekilde hazırlanan metanollü ekstreler flavonoit bileşimleri açısından Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile analiz edilmiştir. Analiz öncesi ekstrede bulunan flavonoit glikozitlerinin hidroliz işlemi yapılmış ve hidroliz edilen ekstreler belli hacme tamamlanmıştır. Kalitatif analiz için standart flavonoitler olarak mirsetin, luteolol, kersetol, kemferol ve izoramnetin kullanılmıştır. Ekstrelerde bulunan flavonoitler standart flavonoitlerin retansiyon zamanları ile ve standart ilavesi yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Kantitatif tayin için internal standart yönteminden yararlanılmıştır. İnternal standart olarak ekstrelerde bulunmayan bir flavonoit olan morin kullanılmıştır. Hem ekstrelere hem de standart olarak kullanılan flavonoit çözeltilerinin dilüsyonlarına internal standart stok çözeltilisinden sabit miktarda ilave edilmiştir. Standartların farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin analizleri sonucu her bileşik için kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır (Kalibrasyon eğrisi 1-4). Ekstrelerde bulunan flavonoitlerin miktar tayinleri ilgili standartın kalibrasyon denklemlerinden yararlanılarak ve kromatogramlardaki pik alanlarının konsantrasyon ile olan ilişkisinden hareketle yapılmıştır. Ekstrelerle ait kromatogramlar, standart ilavesi ile elde edilen kromatogramlar, kromatogramlar 1-4'de görülmektedir.

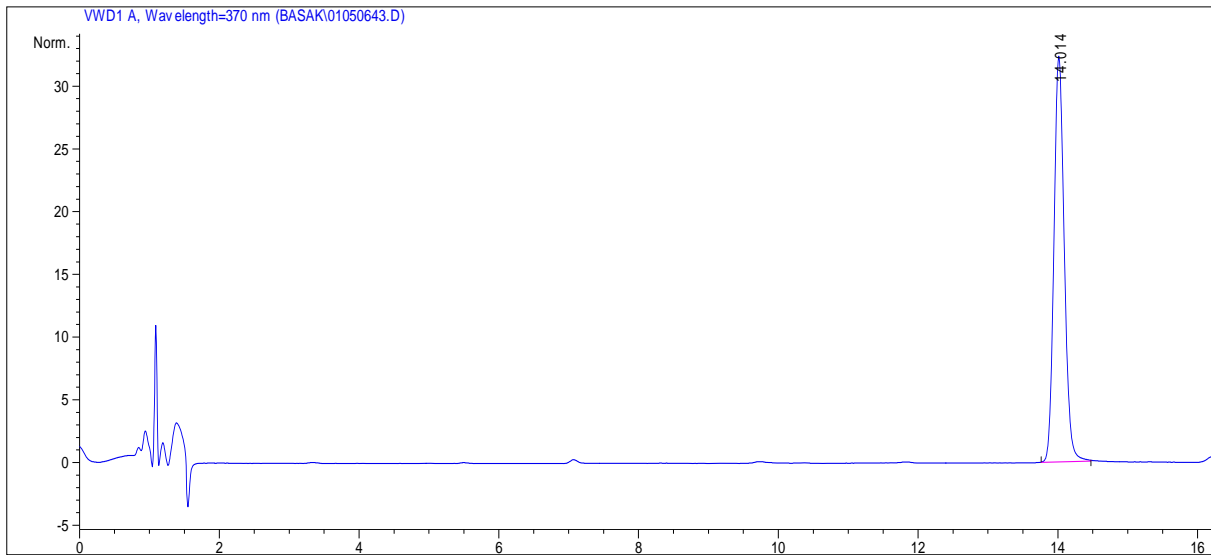


Rt=12.028 mirsetin, Rt=13.978 morin, Rt=16.182 luteolol, Rt= 20.668 kemferol,
Rt=21.618 izoramnetin

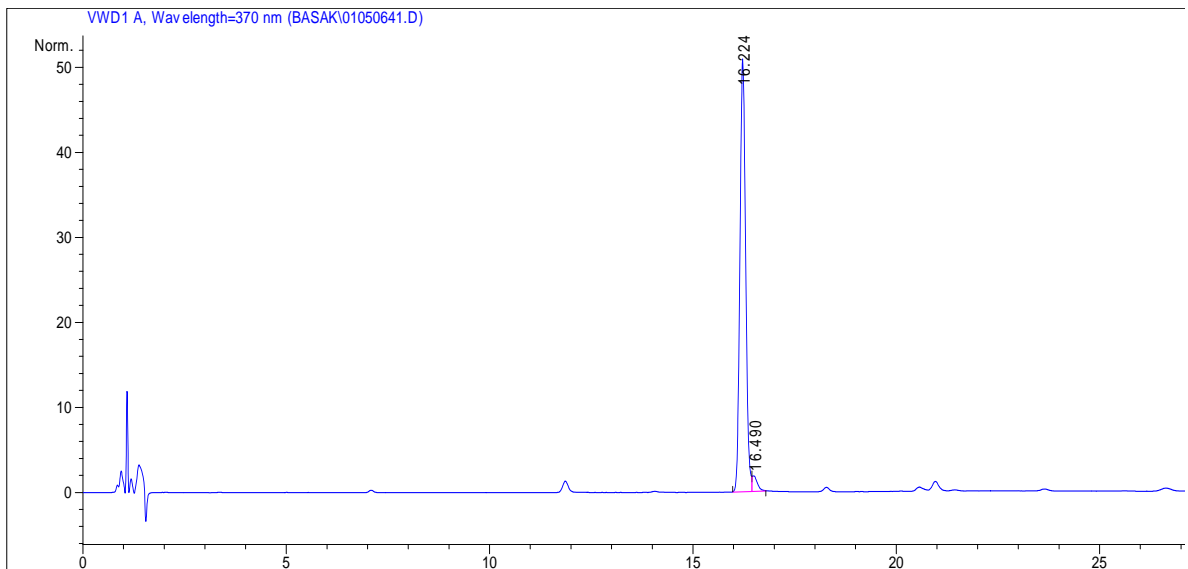
Kromatogram 1. *V. obtusifolium* topraküstü metanol ekstresinin YBSK kromatogramı



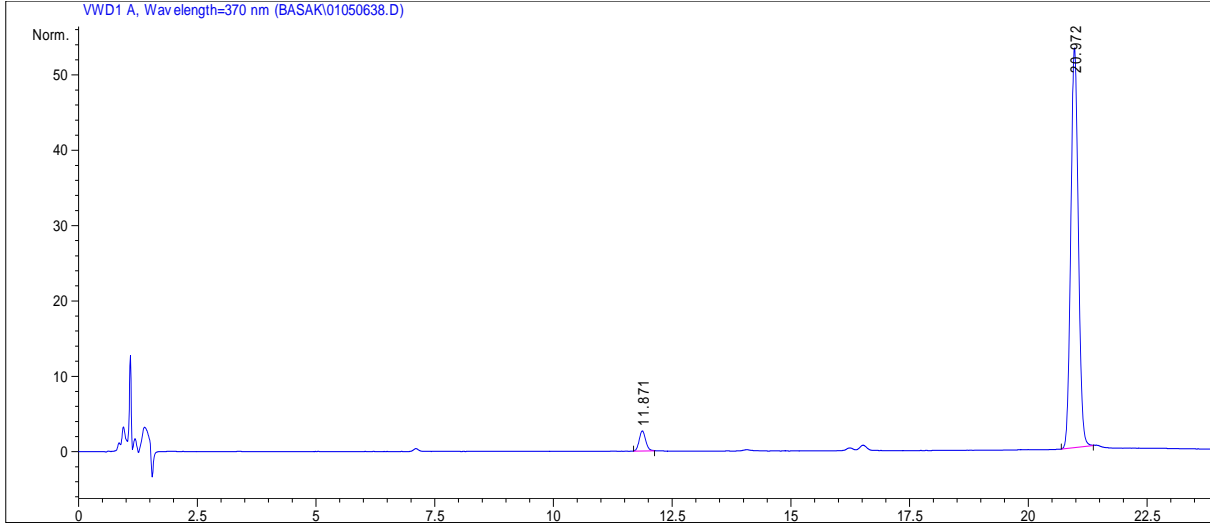
Kromatogram 2. Mirsetin standardının YBSK kromatogramı



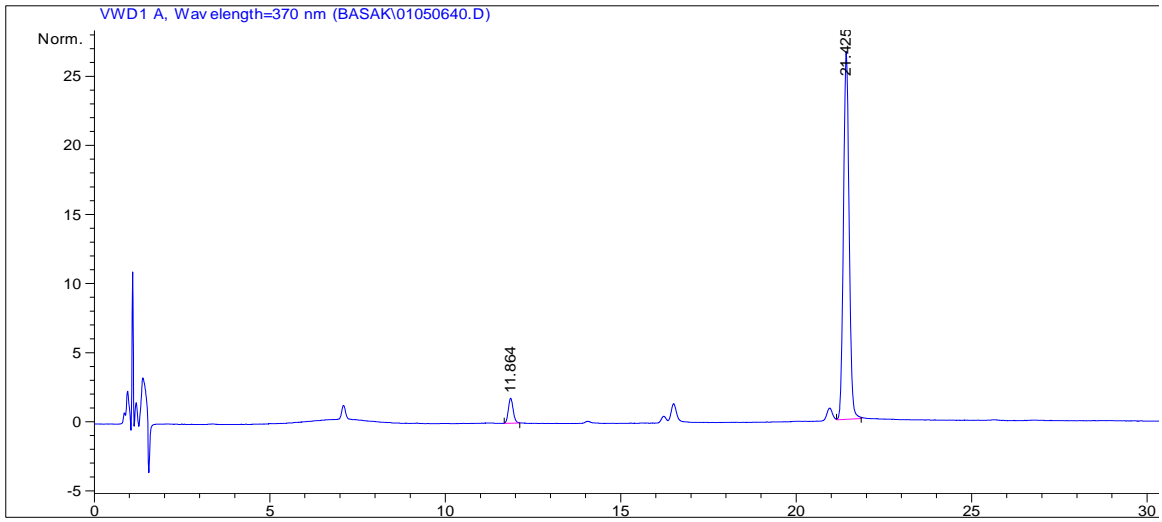
Kromatogram 3. Morin standardının YBSK kromatogramı



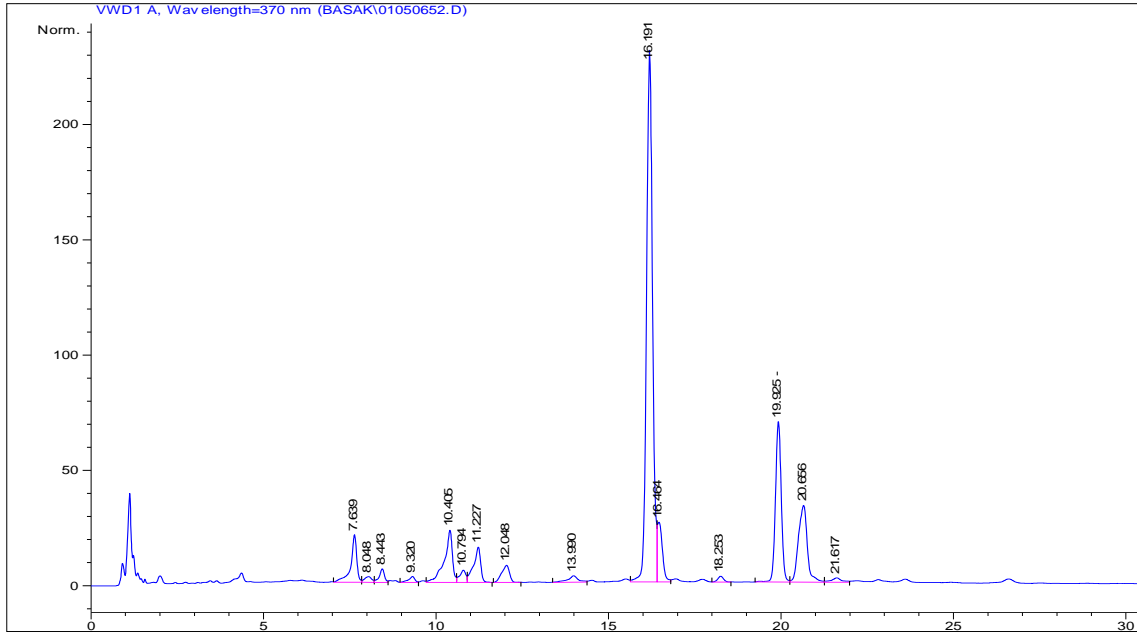
Kromatogram 4. Luteolol standardının YBSK kromatogramı



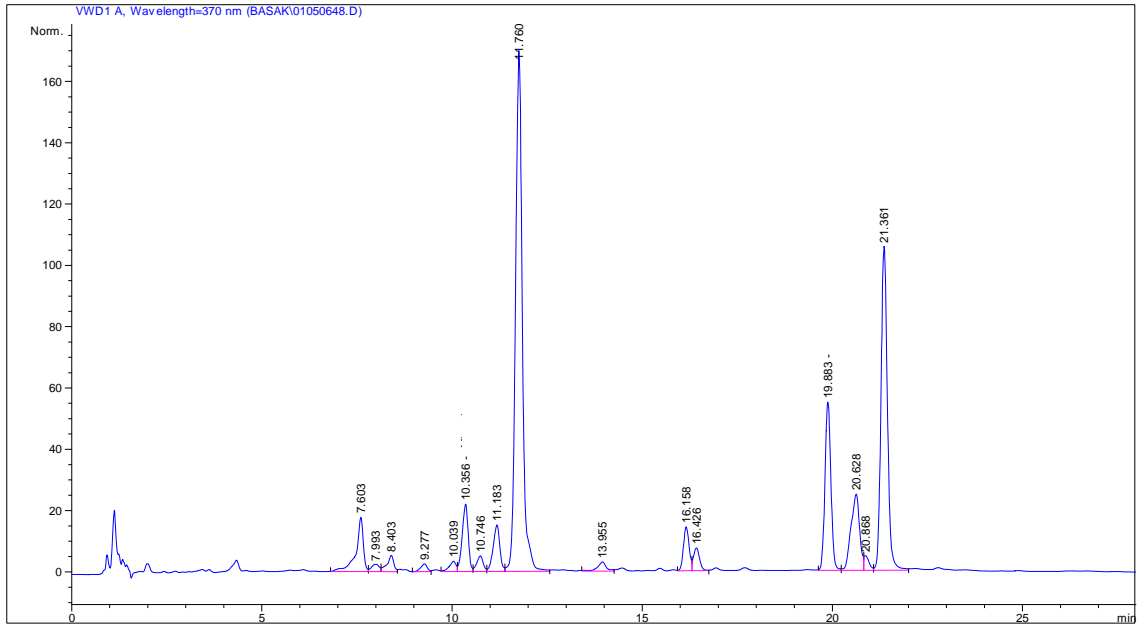
Kromatogram 5. Kemferol standardının YBSK kromatogramı



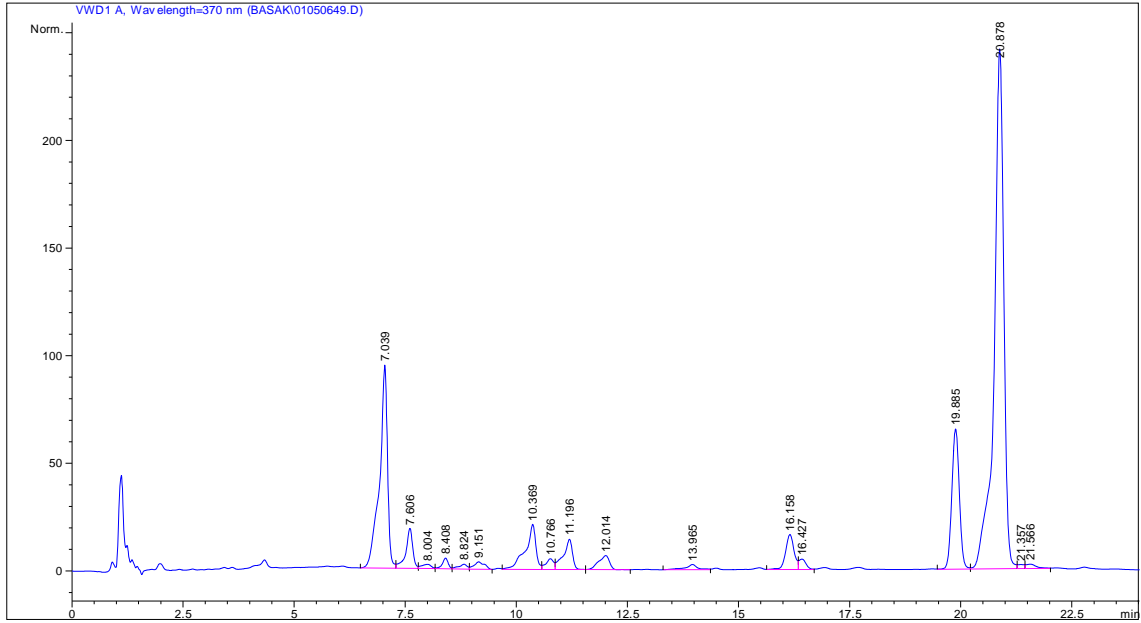
Kromatogram 6. İzoramnetin standardının YBSK kromatogramı



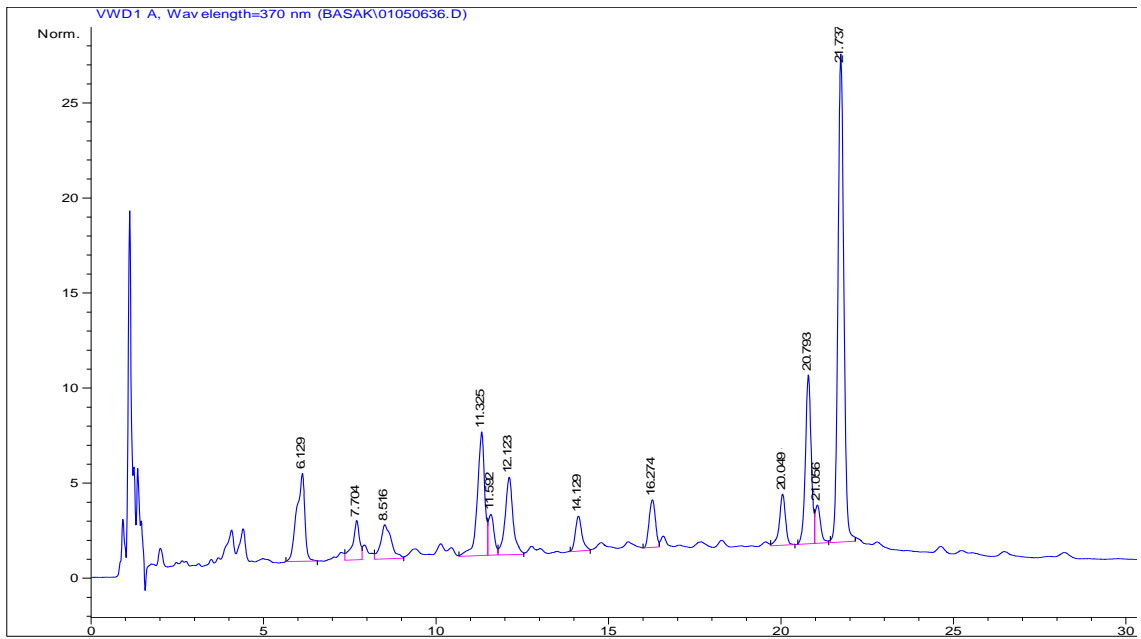
Kromatogram 7. *V. obtusifolium* topraküstü ekstresi + luteolol standartının YBSK kromatogramı



Kromatogram 8. *V. obtusifolium* topraküstü metanol ekstresi + mirsetin + izoramnetin standartlarının YBSK kromatogramı

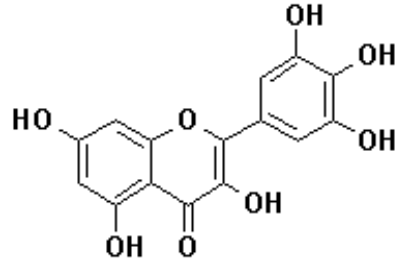


Kromatogram 9. *V. obtusifolium* topraküstü metanol ekstresi + kemferol standartının YBSK kromatogramı

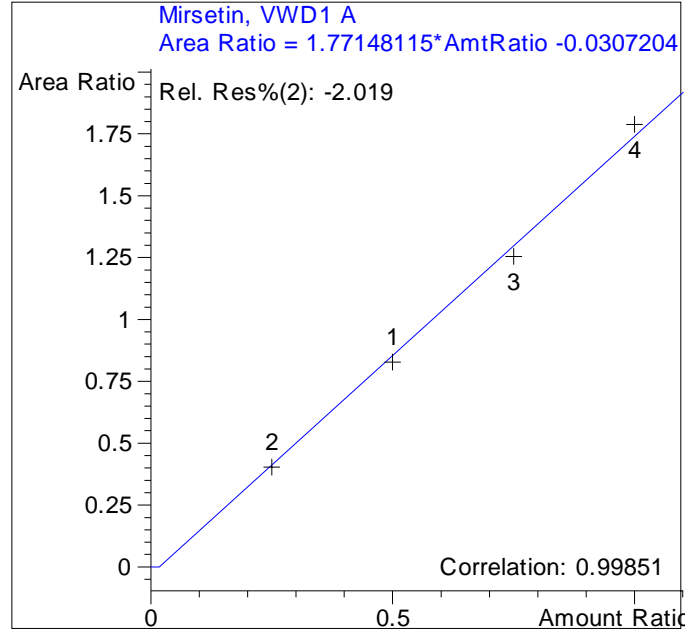


Rt=12.123 mirsetin, Rt=16.274 luteolol, Rt=20.793 kemferol, Rt=21.737 izoramnetin

Kromatogram 10: *V. obtusifolium* kaliksin metanol ekstresinin YBSK kromatogramı

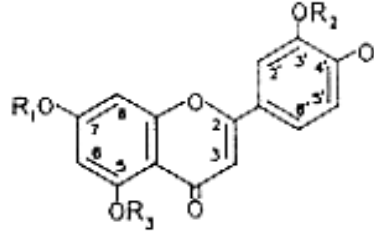


Mirsetin

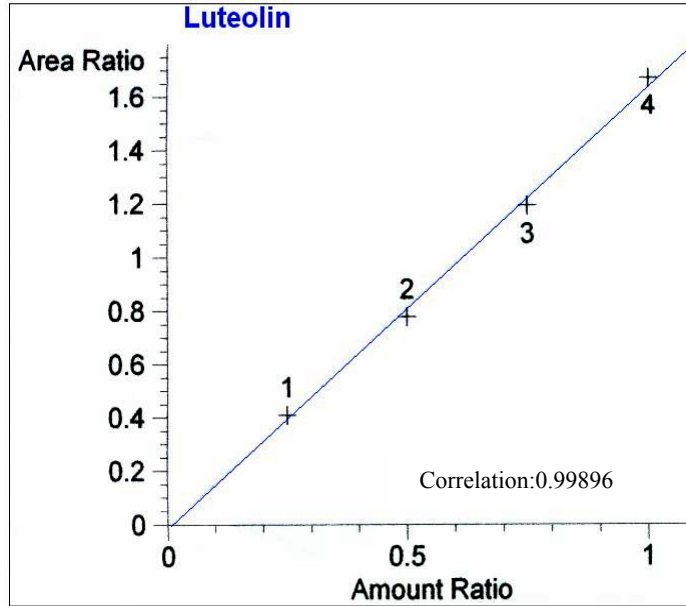


$$y=1.77148x-3.07204e^{-2}$$

Kalibrasyon eğrisi 1. Mirsetinin kimyasal formülü, kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi

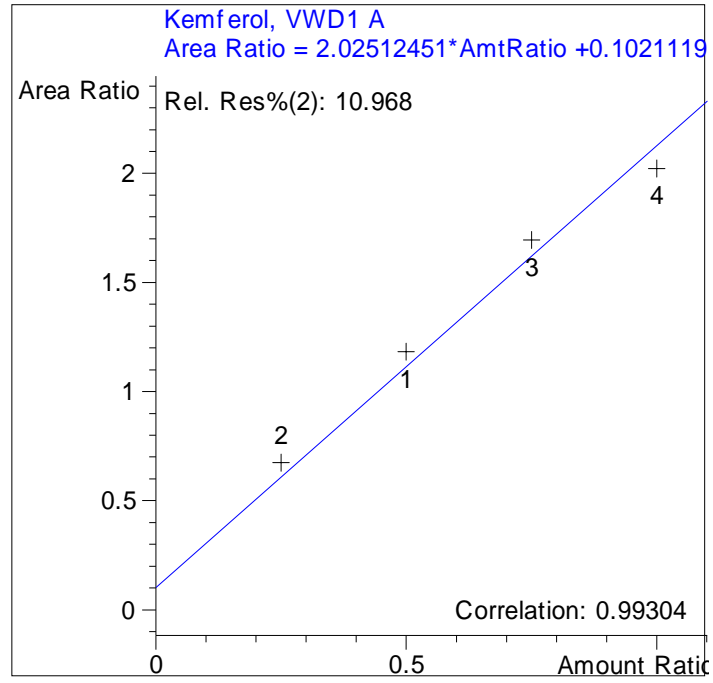
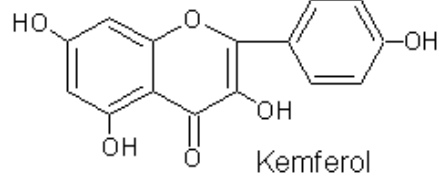


R₁,R₂,R₃=H Luteolin



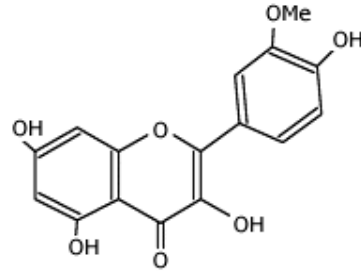
$$y=1.64928x-1.46653e^{-2}$$

Kalibrasyon eğrisi 2: Luteolinün kimyasal formülü, kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi

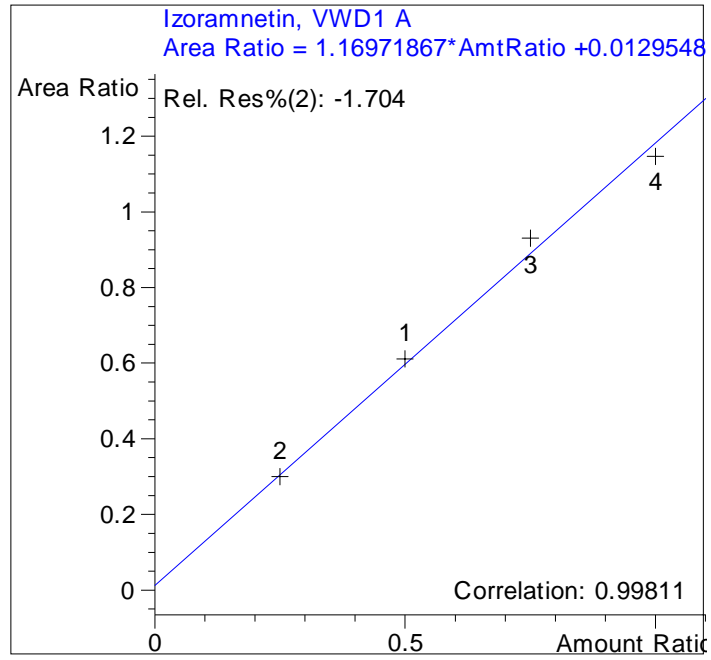


$$y=2.02512x+1.022112e^{-1}$$

Kalibrasyon eğrisi 3: Kemferolün kimyasal formülü, kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi



Izoramnetin



$$y=1.16972x+1.29548e^{-2}$$

Kalibrasyon eğrisi 4: İzoramnetinin kimyasal formülü, kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi

Ekstrelerde bulunduğu saptanan flavonoidlerin % miktarları, 3'er kez yapılan enjeksiyonlar sonucu, tanımlayıcı istatistikler SPSS 11.5 paket programında hesaplanarak ortalama \pm standart hata cinsinden Tablo 11'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde toprak üstü kısmın major bileşeninin kemferol, kaliks kısmının major bileşeninin ise luteolol olduğu görülmüştür

Tablo 11. *V. obtusifolium* toprak üstü ve kaliks metanol ekstrelerinde bulunan flavonoidlerin % miktarları

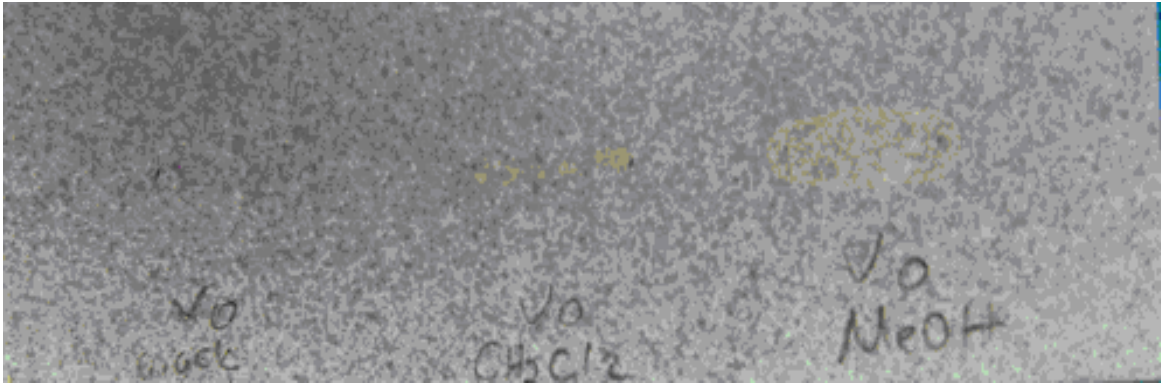
	Toprak üstü kısım	Kaliks
Mirsetin	0.070267 \pm 0.0004807	0.034267 \pm 0.0007424
Luteolol	0.071667 \pm 0.0002906	0.428867 \pm 0.0007055
Kemferol	0.224333 \pm 0.0019641	0.059867 \pm 0.0017676
İzoramnetin	0.023667 \pm 0.0014438	0.185933 \pm 0.0032049

4.2 Antioksidan Etki Çalışmasının Sonuçları

V. obtusifolium'dan hazırlanan topraküstü kısmın diklorometanlı ve metanollü ekstreleri ile çiçeklerinin metanollü ekstresine DPPH (2,2-difenil-1-1pikrilhidrazil) testi uygulanmıştır. Deneye ilişkin kromatogramda diklorometan ekstrelerinin etkili olmadığı, metanol ekstrelerinde ise antioksidan etkinin bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 23). Tiyobarbitürik asit testinde ise pozitif kontrol olarak kullanılan propil gallat'ın IC₅₀ 0.05 değeri ile ekstreler karşılaştırıldığında *V. obtusifolium* topraküstü kısmının metanol ekstresi yüksek etki, çiçek metanol ekstresi ise belirgin etki göstermiştir. DCM ekstresi ise antioksidan etki göstermemiştir.

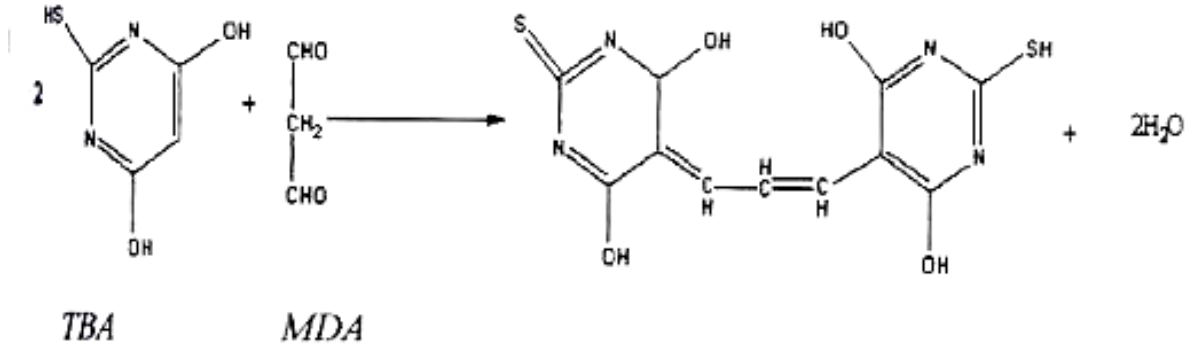
Tablo 12. *V. obtusifolium* ekstreleri üzerinde tiyobarbitürik asit testi ile yapılan antioksidan etki sonuçları

<i>V. obtusifolium</i>	IC ₅₀ mg/ml
Topraküstü kısım metanol ekstresi	0.11
Çiçek metanol ekstresi	1.86
Propil gallat (Pozitif kontrol)	0.05



Şekil 23. *V. obtusifolium* topraküstü ve çiçek ekstralarının DPPH testi ile yapılan antioksidan etki testine ait ince tabaka kromatogramı

Şekil 24.'de 2 TBA molekülü ile 1 MDA molekülünün reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 24. MDA ile tiyobarbitürik asitin reaksiyonu

4.3 Antimikrobiyal Etki Sonuçları

4.3.1 Antibakteriyel Etki Sonuçları

V. obtusifolium topraküstü kısımlarının diklorometanlı ve metanollü ekstreleri ile çiçeklerinin metanollü ekstreleri kullanılarak yapılan antibakteriyel etki test sonuçları Tablo 13'de görülmektedir. Bitkinin diklorometan ekstresi Gram (+) bakterilerden *E. faecalis*'e 2560 µg/ml inhibitör etki gösterirken aynı ekstre 5120 µg/ml konsantrasyonda bakterisidal etki göstermiştir. Diklorometan ekstresi 5120 µg/ml *E.coli* ve *S.aureus* bakterilerinin çoğalmasını inhibe etmiştir. *V.obtusifolium* metanol ekstresi ise sadece *S.aureus*'a karşı inhibitör ve bakterisidal etki göstermiştir (MIC 5120, MBC 5120) *V.obtusifolium* çiçek metanol ekstresi, 5120 konsantrasyonda ise hem *B. subtilis*'e hem de *E.coli* ye inhibitör etki göstermiştir. Minimum bakterisidal konsantrasyonlarda ise sadece *S. aureus* 5120 dilüsyonda etkili olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak topraküstü kısmın metanol ekstresi *S. aureus*'a karşı en fazla etkiyi göstermektedir. Diklorometan ekstresi ise MIC açısından 3 bakteriye etkili iken MBC açısından sadece *E. faecalis* üzerine etkilidir. Çiçek metanol ekstresi ise *B. subtilis*'e en etkili görülmektedir.

Tablo 13. *V. obtusifolium* antibakteriyel etki çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar ve elde edilen test sonuçları

	MIC değerleri				
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>
Topraküstü kısım metanol ekstresi	-	-	5120	-	-
Topraküstü kısım diklorometan ekstresi	5120	-	5120	2560	-
Çiçek metanol ekstresi	5120	-	-	-	5120

	MBC değerleri				
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>
Topraküstü kısım metanol ekstresi	-	-	5120	-	-
Topraküstü kısım diklorometan ekstresi	-	-	-	5120	-
Çiçek metanol ekstresi	-	-	-	-	5120

4.3.2 Antiviral Etki Sonuçları

V. obtusifolium'dan hazırlanan ekstrelerin Avian influenza (A/Weybridge (H7N7)), Human influenza (A/Aichi (H3N2)), Herpes simplex-1 ve Herpes simplex-2 virüslerine karşı gösterdiği antiviral etki sonuçları Tablo 14 ve Tablo 15'de gösterilmiştir. Buna göre *V. obtusifolium* diklorometan ekstresinin HSV-1 (SI değeri 20.0) ve HSV-2 (SI değeri 20.0) virüslerine karşı yüksek antiviral etkisi bulunmuştur. Bu ekstre Human influenza virüs'e de bir miktar etkilidir (SI=4.0). Bitkinin metanol ekstresinin ise test edilen virüslere karşı etkisiz olduğu görülmüştür.

Bovine Herpes virus Tip-1' ile yapılan antiviral çalışmada ekstrelerin bu virüse karşı hiçbir etkisi gözlenmemiştir.

Tablo 14. *V. obtusifolium* ekstrelerinin Influenza virüs suşlarına karşı gösterdiği antiviral etki sonuçları

Ekstreler	MDCK hücreleri		A/Weybridge (H7N7)		A/Aichi (H3N2)		
	TC ₅₀ ^a mg/ml	EC ₅₀ ^b mg/ml	SI ^c	EC ₉₀ ^d mg/ml	EC ₅₀ ^b mg/ml	SI ^c	EC ₉₀ ^d mg/ml
Topraküstü kısım metanol	0.9	> T ₅₀	-	-	> TC ₅₀	-	-
Topraküstü kısım diklorometan	2.4	0.8	3.0	-	0.6	4.0	-
Çiçek metanol	1.6	>TC ₅₀	-	-	>TC ₅₀	-	-

Tablo 15. *V. obtusifolium* ekstralarının *Herpes simplex* suşlarına karşı gösterdiği antiviral etki sonuçları

Ekstreler	MDBK hücreleri TC ₅₀ ^a mg/ml	HSV-1			HSV-2		
		EC ₅₀ ^b mg/ml	SI ^c	EC ₉₀ ^d mg/ml	EC ₅₀ ^b mg/ml	SI ^c	EC ₉₀ ^d mg/ml
Topraküstü kısım metanol	0.62	0.62	1.0	-	> TC ₅₀	-	-
Topraküstü kısım diklorometan	1.0	0.05	20.0	0.06	0.03	33.3	0.03
Çiçek metanol ekstresi	1.6	> TC ₅₀	-	-	> TC ₅₀	-	-

^a 50% toksik konsantrasyon, bozulmamış kültürün %50'sinde değişim meydana getirmesi için gerekli olan doz

^b 50% etkili konsantrasyon, virüsün indüklediği CPE'yi % 50 azaltan doz

^c seçici index (TC₅₀/EC₅₀).

^d 90% etkili konsantrasyon, Virüs enfekte titrasyonunun 1 lg TCID₅₀/ml redüksiyonuna neden olan doz.

5. TARTIŞMA

Verbascum türleri üzerinde yapılmış araştırmalar incelendiğinde, özellikle çok tanınan türler olan *V. thapsus*, *V. phlomooides*, *V. lychnitis* ve *V. nigrum*'un yanı sıra diğer *Verbascum* türlerinin de çeşitli araştırmalara konu olduğu ve bu güne dek araştırılan *Verbascum* türlerinde triterpenik, saponozit, iridoit glikozit, flavonoit, fenilpropanoit ve fenil etanoit glikozitleri, seskiterpen asit, steroid ve alkaloid gibi sekonder metabolitlerin bulunduğu saptanmıştır. *Verbascum* türlerinin geleneksel tedavide dahilen ve haricen çeşitli kullanımlarının olduğu ve ekspektoran, diüretik, yatıştırıcı, demulsan, sedatif gibi etkilerinin bulunduğu ayrıca antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiülserojenik, antioksidan, sitotoksik ve antitümör, immunomodülatör, antiülser, antihepatoma etkilerinin çeşitli araştırmalarla saptanmış olması *Verbascum* türlerini bilimsel açıdan araştırılmaya açık bitki grubu olduğunu ortaya koymaktadır (8, 9).

Bu türlerden tez çalışma konusunu oluşturan *V. obtusifolium* türü endemik bir türdür ve günümüze kadar fitokimyasal ve biyoaktivite açısından incelenmemiştir. *V. obtusifolium*'un fitokimyasal ve biyoaktivite açısından incelenmesinin amaçlandığı bu tez çalışmasında bitkinin topraküstü kısımlarından iki farklı polaritede olmak üzere diklorometan ve metanol kullanılarak ekstratlar hazırlanmıştır. Bitkinin kaliksinden ise metanollü ekstre elde edilmiştir.

Verbascum türlerinde bu güne kadar izolasyon, yapı ve miktar tayini ve çeşitli aktivite çalışmaları yapılmış, ancak flavonoidler açısından YBSK ile analizi konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle *V. obtusifolium*'un topraküstü kısmı ve kaliksinden hazırlanan metanollü ekstratlar flavonoid içerikleri açısından YBSK kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiş ve sonuçta topraküstü ve kaliks kısmında mirsetin (sırasıyla % miktarları 0.070267 ± 0.0004807 , 0.034267 ± 0.0007424), luteolol (0.071667 ± 0.0002906 , 0.428867 ± 0.0007055), kemferol (0.224333 ± 0.0019641 , 0.059867 ± 0.0017676) ve izoramnetin (0.023667 ± 0.0014438 , 0.185933 ± 0.0032049) flavonoidlerinin bulunduğu saptanmıştır.

V. obtusifolium türünün topraküstü kısımlarından hazırlanan diklorometan ve metanollü ekstratlar ile kaliksin metanollü ekstresi biyoaktivite yönünden de

araştırılmıştır. Biyoaktivite çalışmalarında antioksidan, antibakteriyel ve antiviral etkiler incelenmiştir.

DPPH (2,2-difenil-1-1-pikrilhidrazil) ve TBA (Tiyobarbitürik asit) testi kullanılarak yapılan antioksidan etki çalışmalarında metanollü ekstrelerden toprak üstünden hazırlanan ekstre yüksek antioksidan etki gösterirken (IC₅₀ değeri 0.11 mg/ml), çiçek ekstresinde belirgin antioksidan etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (IC₅₀ değeri 1.86 mg/ml). DCM'lı ekstrede ise antioksidan etki gözlenmemiştir. *V. macrurum*'un toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinde serbest radikal süpürücü etkiye sahip 2,2-difenil-1-pikrilhidrazile (DPPH) karşı antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca Lancimat metoduyla oksidatif bozulma da incelenmiştir. Ekstreden izole edilen fenilpropanoit glikozit türevi olan okteozitin serbest radikal süpürücü potansiyelin çok yüksek olduğu ve ayçiçek yağının oksidatif eşkimesine karşı yüksek koruma faktörünü gösterdiği bulunmuştur. Bu bileşik sentetik bir antioksidan olan BHT ile karşılaştırıldığında doğal α -tokoferol açıkça daha yüksektir. Ayrıca bu bileşen nontoksik bir bileşendir. Bu nedenle gıdaların oksidatif ransiditiye karşı doğal yollardan korunmasında okteozit önemli bir bileşiktir (53). *V. wiedemannianum* türünün köklerinden hazırlanan metanollü ekstrede radikal süpürücü etkide saptanmıştır. Ayrıca bitkinin köklerinden izole edilen verbaskozit ve ekinakozitte belirgin bir aktivite görülmüştür (9, 38). *V. salviifolium* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstrede elde edilen flavonoid glikozidlerden, apigenin-7-O- β -glukopiranozit ve krizoeriyol-7-O- β -glukopiranozit bileşikler DDPH yöntemi ile yapılan deneylerde önemli antioksidan etki göstermiştir (41). *V. lasianthum*'un köklerinden elde edilen metanollü ekstrede izole edilen iridoit glikozitlerden; harpagozit ve poliumozitin serbest radikal süpürücü etkiye sahip 2,2-difenil-1-pikrilhidrazile (DPPH) karşı antioksidan etki göstermiştir (42). Literatürde *Verbascum* cinsi üzerinde yapılmış antioksidan etki çalışmalarında bu etkinin metanol ekstrelerinin içerdiği flavonoid ve feniletanoit glikozitlerden kaynaklandığı görülmektedir. Tez çalışmasını oluşturan *V. obtusifolium* metanol ekstresinde bulunan flavonoidler ve fenil etanoit glikozitleri izole edilerek bu bileşiklerin antioksidan etki çalışmasının yapılması çalışmaya daha da ışık tutacaktır.

Antibakteriyel etki çalışması makrodilüsyon yöntemi ile yapılmış ve sonuçta topraküstü kısmın diklorometan ekstresinin kullanılan bakterilerden *E. coli*, *S.aureus* ve

E. faecalis üzerine etkili olduğu, *P.aeruginosa* ve *B. subtilis*'e etkisiz olduğu görülmüştür. Topraküstü kısmının metanol ekstresi ise sadece *S. aureus*'a hem inhibitör hem de bakterisit olarak etki göstermiştir. Çiçek metanol ekstresinin ise kullanılan Gram (-) bakterilerden sadece *E. coli*'ye karşı düşük derecede inhibitör etkili olduğu gözlemlenmiştir. Dünyada ve Türkiye'de *Verbascum* türleri üzerinde yapılmış antibakteriyel etki çalışmaları incelendiğinde; *V. phlomoides* bitkisinin çiçeklerinden hazırlanan sulu ekstrenin Gram (+) bakterilerden; *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* gibi ve Gram (-) bakterilerden; *E.coli* gibi bakterilere karşı aktivite göstermediği bulunmuştur (43). *V. undulatum*'un köklerinden hazırlanan ekstreya en duyarlı olan bakteriler, *S. aureus* ve *S. epidermidis*, *Salmonella enteritidis* olarak tespit edilmiştir (28). *V. sinaiticum* ile yapılan antimikrobiyal aktivite test sonuçları incelendiğinde *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin kadar aktivite göstermiştir (49). Bitkilerin metanollü ekstraları sulu ekstralarına göre mikroorganizmalara karşı daha etkilidir. *V. thapsus*'un çiçeklerinden hazırlanan yağın *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram(-) bakteriler ile *Staphylococcus aureus* gibi gram (+) bakterilerin büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Yapılan testlerde sulu ekstre *Staphylococcus aureus*'a karşı hassasiyet göstermiştir (8). *V. gypsicola* bitkisinden hazırlanan ekstrenin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram-negatif bakterilere karşı aktivite göstermediği buna karşılık *Staphylococcus aureus* karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir (10). Bu da metanollü çözücülerin bitkideki pek çok etken madde grubunu çözebilmesinden kaynaklanmaktadır. Buna karşılık sulu çözücüler ise sadece antosiyanin, nişasta, tanen, saponin, terpenik bileşikler polipeptitler ve lektinleri çözebilmektedir (44). *V. obtusifolium* ekstralarının antiviral etkili olup olmadıkları *Bovine Herpes Virus Tip-1*, *Avian influenza*, *Human influenza*, *Herpes simplex-1* ve *Herpes simplex-2* virüsleri kullanılarak yapılmıştır. *Bovine Herpes Virus Tip-1*' e karşı yapılan antiviral etki testlerinde ekstraların bu virüse karşı hiçbir etkisi gözlenmemişken, toprak üstü kısmın diklorometanlı ekstresi HSV-1 ve HSV-2 virüslerine karşı yüksek antiviral etki göstermiştir. Aynı ekstre *Avian influenza* ve *Human influenza*, virüslerine karşı düşük aktivite gözlenmiştir. Toprak üstü kısmının ve çiçeğin metanollü ekstresi antiviral aktivite göstermemiştir.

Dünyada ve Türkiye’de yapılan antiviral çalışmalarda; *V. thapsiforme*’nin çiçeklerinden elde edilen ve içerisinde flavonoit, iridoit, fenolik asit, serbest şekerler, saponozitler, aminoasitler ve müsilaj gibi bileşiklerin bulunduğu sulu infüzyonu ile yapılan antiviral çalışmada *Herpes simplex* tip I virüsüne karşı virüsidal etkili olduğu görülmüştür (45). *V. thapsus*’un yapraklarından elde edilen metanollü ekstre *Bovine herpes virüs type 1*’e karşı kısmen inhibe edici bir antiviral etki gösterdiği tespit edilmiştir (12). *V. phlomoides*; **Flores Verbasci (Flos Verbasci)** drogunun hazırlandığı *Verbascum* türlerinden biri olup bu bitkinin çiçeklerinden hazırlanan Dekoksiyon *Verbasci*’nin A₂ ve B nezele virüsüne karşı etkili olduğu saptanmıştır (16). *V. obtusifolium* ile literatürde çalışılan türün metanollü ekstrelerinin *Bovine herpes virüs type 1*’e karşı farklı etki göstermiştir. Bu iki ekstre bileşiminin farklı olduğunu göstermektedir. *Herpes simplex* ve *Influenza* virüslerine karşı bulunan etki literatürlerle uyum göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Scrophulariaceae familyasının en geniş cinsi olan *Verbascum* ülkemizde de çok sayıda türle temsil edilen bir cinstir. Türkiye’de yetişen 233 türün 185’inin endemik olması ve bu türlerin bir çoğunun araştırılmamış olması *Verbascum* türlerini ilgi çekici hale getirmektedir. Literatürler incelendiğinde *Verbascum* türlerinin başta iridoit glikozitler olmak üzere fenil propanoit ve fenil etanoit glikozitleri, saponozitler ve flavonoitler başlıca sekonder metabolitler olarak taşıdıkları görülmektedir. Bugüne kadar yapılmış olan biyolojik aktivite çalışmalarında ise özellikle antibakteriyel ve antiviral etki üzerinde durulmuş ve son yıllarda ise bazı türlerin antioksidan etkileri de araştırılmıştır. Bunların dışında antifungal, antiülserojenik, sitotoksik ve antitümör, immunomodülatör, antiülser, antihepatoma etkilerinin de bazı türlerde araştırıldığı göze çarpmaktadır. Yapılan fitokimyasal araştırmalar daha çok izolasyon ve yapı tayini biçiminde olup türlerin flavonoit içerikleri ancak izolasyon çalışmalarıyla belirlenebilmiştir. Flavonoit içeriği açısından incelenmiş olan türler *V.thapsus*, *V.thapsiforme*, *V.sinaiticum*, *V.salviifolium*’dur. Bu türlerde flavonoitlerin izole edildiği ancak bitkideki miktarlarına ait herhangi bir bilgi olmadığı göze çarpmıştır.

Türkiye’de yetişen türlerden *V. wiedemannianum*, *V. lasianthum*, *V. salviifolium*, *V. pterocalycinum* var. *mutense*, *V. gypsicola*, *V. thapsus* ve *V. cilicicum* dışında herhangi bir tür üzerinde araştırmanın olmadığı görülmüştür. Araştırılmamış türlerden olan ve Güney Anadolu bölgesinde yetişen *V. obtusifolium* endemik bir türdür. Bu türün fitokimyasal açıdan incelenmesi düşünülmüş ve son yıllarda insan sağlığında çeşitli yararları (antioksidan, immünsistem stimülasyonu, antibakteriyel, antiviral, antienflamatuar ve antikarsinojenik gibi) nedeniyle üzerinde durulan bir etken madde grubu olan flavonoitlerinin incelenmesi amaçlanmıştır (65).

Flavonoit içerikleri bitkiden hazırlanan metanollü ekstrenin YBSK ile analizi sonucu belirlenmiş olup topraküstü ve kaliks kısmın ekstresin de başlıca mirsetin, (sırasıyla % miktarları 0.070267±0.0004807, 0.034267±0.0007424), luteolol (0.071667±0.0002906, 0.428867±0.0007055), kemferol (0.224333±0.0019641, 0.059867±0.0017676) ve izoramnetin (0.023667±0.0014438, 0.185933±0.0032049) flavonoitlerinin bulunduğu saptanmıştır.

V. obtusifolium bitkisinin geleneksel kullanımına ait kayda rastlanmadığından bu türün biyolojik aktivite açısından öncelikle diğer *Verbascum* türlerinde sıklıkla gözlenmiş olan antioksidan, antibakteriyel ve antiviral aktiviteler yönünden incelenmesi gerekliliği düşünülmüş ve ilerdeki fitokimyasal araştırmalara da yarar sağlayabilmesi için 2 farklı polaritede ekstre hazırlanmıştır. Diklorometan ve metanol ekstralarının kimyasal açıdan farklı etken madde gruplarını taşıması nedeniyle biyolojik aktivite testlerinde her iki ekstrede kullanılmıştır. Ayrıca literatürde bazı *Verbascum* türlerinde kalikslerinden yapılmış biyolojik aktivite bulunması nedeniyle *V. obtusifolium* kaliksinden metanol ekstresi hazırlanarak bu ekstre de flavonoid ve biyolojik aktivite açısından incelenmiştir.

Antioksidan aktivite testlerinde hızlı sonuç veren DPPH ön testinden sonra metanol ekstralarının aktif olduğu gözlenerek TBA testi uygulanmış olup topraküstü kısmının IC₅₀ değeri 0.11 mg/ml, kaliks ekstresinin ise IC₅₀ değeri 1.86 mg/ml olduğu saptanmıştır. Buna göre *V. obtusifolium* metanol ekstralarının antioksidan etki açısından değerlendirilebilir olduğu ve bu etkiden sorumlu bileşiklerin flavonoidlerin özellikle topraküstü kısmın major bileşiği olarak bulunan kemferol, kaliks kısmın major bileşiği olarak bulunan izoramnetin ve luteolol flavonoidlerinin olabileceği ve daha ileri çalışmalarda bu araştırmaların yapılacağı uygun olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Antibakteriyel etki testinde bitkinin metanol ekstresinin *S. aureus*'a karşı düşük etkili olduğu bunun yanında diklorometan ekstresinin *P. aeruginosa* ve *B. subtilis* hariç olmak üzere kullanılan diğer bakterilere hafif etki gösterdiği gözlenmiştir. Çiçek metanol ekstresi ise sadece *B. subtilis*'e karşı duyarlıdır.

Verbascum türlerine ilişkin antiviral etki araştırmalarında yaygın olarak kullanılan virüslerden olan *Bovine Herpes Virus* Tip-1, *Avian influenza*, *Human influenza*, *Herpes simplex-1* ve *Herpes simplex-2* tez çalışmamızda kullanılmıştır. Topraküstü kısım diklorometan ekstresinin HSV I'e karşı SI:20, HSV II'ye karşı SI:30'un üstünde olması bu virüsler üzerine çok yüksek antiviral etkili olduğu görülmüştür. Bu açıdan ekstrenin değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

V. obtusifolium bitkisinin hem topraküstü hem de kaliks üzerinde yapılan bu araştırma sonuçları bitkinin özellikle antioksidan ve antiviral etki açısından değer taşıdığını göstermiştir. Antioksidan etki açısından topraküstü ve kaliks metanol ekstresinin yüksek etkili olması; ayrıca, diklorometan ekstresinin de antiviral etki açısından önem taşıması araştırmamızın dikkat çekici yönüdür. Bu nedenle her iki

ekstrenin de fitokimyasal olarak ileri düzeyde araştırılması ve kimyasal yapı-aktivite ilişkisinin saptanması bitkinin söz konusu aktiviteler açısından değerlendirilebilmesi için önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. **Juan R, Fernandez I, Pastor J.** Systematic consideration of microcharacters of fruits and seeds in the genus *Verbascum* (*Scrophulariaceae*). *Annals of Botany*, **1997**; 80:591-598.
2. **Heywood VH.** *Flowering Plants of the World*. Oxford: Oxford University, **1979**
3. **Davis PH.** *Scrophulariaceae*. Flora of Turkey and The East Aegean Island. Edinburgh: Edinburgh University Press, Vol 6, **1978**;461-603.
4. **Davis PH. ,Mill RR., Tan K.** Flora of Turkey and The East Aegean Island. Edinburgh: Edinburgh University Press, Vol 10, **1988**;191-193.
5. **Güner A, Özhatay N, Tuna E, Başer K.H.C.** *Scrophulariaceae*. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. (Suplement 2)Edinburgh: Edinburgh University Press, Vol 11.**2000**;193.
6. **Robbers JE, Tyler VE.** *Tyler's Herbs of Choice (The therapeutic Use of Phytomedicinals)*. New York: The Harworth Herbal Pres, **1999**;119.
7. **Baytop T.** *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, **1999**: 334-336.
8. **Turker AU, Camper ND.** Biological activity of Common Mullein, a medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**; 82:117-125.
9. **Abougazar H, Bedir H, Khan IA, Çalış İ.** Wiedemanniosides A-E: new phenylethanoid glycosides from the roots of *Verbascum wiedemannianum*. *Planta Medica*, **2003**; 69:814-819.
10. **Dülger B, Gonuz A.** Antimicrobial Activity of Some Endemic *Verbascum*, *Salvia* and *Stachys* Species. *Pharmaceutical Biology*, **2004**; 42(4-5):301-304
11. **Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E.** *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*. 5. Baskı, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, **1998**: 283-284.
12. **McCutcheon AR, Roberts TE, Gibbons E, Ellis MS, Babiuk AL, Hancock WER, Towers NHG.** Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **1995**; 49:101-110.
13. **Türker AU, Gürel E** Common Mullein (*Verbascum thapsus* L.): recent advances in research. *Phytotherapy Research* , **2005**

14. **Pieroni A, Quave CL**, Tradional pharmacopoeias and medicines among Albanians and Italians in southern Italy:A comparison. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**; 101; 258-270
15. **Klimek B, Lavaud C, Massiot G**. Saponins from *Verbascum nigrum*. *Phytochemistry*, **1992**; 31(12):4368-4370.
16. **Klimek, B**. Hydroxycinnamoly ester glycosides and saponins from flowers of *Verbascum phlomoides*. *Phytochemistry*, **1996**; 43(6):1281-1284.
17. **Ghorbani A**, Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, North of Iran (Part 1): General results *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**; 102;58-68
18. **Seifert K, Preiss A, Johne S, Schmidt J, Lien TN, Lavaud C, Massiot G**. Triterpene saponins from *Verbascum songaricum*. *Phytochemistry*, **1991**; 30(10):3395-3400.
19. **Hartleb I, Seifert K**. Songarosaponin D-A triterpenoid saponin from *Verbascum songaricum*. *Phytochemistry*, **1994**; 35(4):1009-1011.
20. **Hartleb I, Seifert K**. Triterpenoid saponins from *Verbascum songaricum*. *Phytochemistry*, **1995**; 38(1):221-224.
21. **Miyase T, Horikoshi C, Yabe S, Miyasaka S, Melek RF, Kusano G**. Saikosaponin homologues from *Verbascum spp.* the structures of mulleinsaponins I-VII. *Chem.Pharm.Bull*, **1997**; 45(12):2029-2033.
22. **Afifi MSA, Ahmed MM, Pezzuto MJ, Kinghorn DA**. Cytotoxic flavonolignans and flavones from *Verbascum sinaiticum* leaves. *Phytochemistry*, **1993**; 34(3):839-841.
23. **Klimek, B**. Flavonoid glucoronides from *Verbascum lychnitis* and *Verbascum nigrum*. *Acta Poloniae Pharmaseutical Drug Research*, **1995**; 52(1):53-56.
24. **Gazar AH, Taşdemir D, Ireland MC, Çalış I**. Iridoids and triterpene saponins from *Verbascum wiedemannianum* (*Scrophulariaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, **2003**; 31:433-436.
25. **Bianco A, Guiso M, Iavarone C, Passacantilli P, Trogolo C**. 6-O-β-D- Xylopyranosylaucubin from *Verbascum sinuatum*. *Phytochemistry*, **1980**; 19:571-573.
26. **Vesper T, Seifert K**, Iridoids from *Verbascum nigrum*. *Liebigs Annaelen Der Chemie*, **1994**; 751-753.
27. **Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mitakou S, Skaltsounis AL**. Verbaspinoside, a new iridoid glycosides from *Verbascum spinosum*. *J.Nat.Prod*, **1999**; 62:342-344.

28. **Magiatis P, Spanakis D, Mitaku S, Tsitsa E, Mentis A, Harvala C.** Verbalactone, a new macrocyclic dimer lactone from the roots of *Verbascum undulatum* with antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, **2001**; 64(8):1093-1094.
29. **Molgaard P, Ravn H.** Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in Dicotyledones. *Phytochemistry*, **1988**; 27(8):2411-2421.
30. **Warashina T, Miyase T, Ueno A.** Phenylethanoid and lignan glycosides from *Verbascum thapsus*. *Phytochemistry*, **1992**; 31(3):961-965.
31. **Klimek, B.** 6'-O-apiosyl-verbascoside in the flowers of mullein (*Verbascum* species). *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, **1996**; 53:137-140.
32. **Khuroo MA, Qureshi MA, Razdak TK, Nichols P.** Sterones, iridoids and a sesquiterpene from *Verbascum thapsus*. *Phytochemistry*, **1988**; 27(11):3541-3544.
33. **Koblicova Z, Turecek F, Nimova P, Trojanek J, Blaha K.** Verbascine, a macrocyclic spermine alkaloid of a novel type from *Verbascum pseudonobile* Stoj. et Stef. (*Scrophulariaceae*). *Tetrahedron Letters*, **1983**; 24(40):4381-4384.
34. **Drandarov K.** Verbacine and verballocine, novel macrocyclic spermine alkaloids from *Verbascum pseudonobile* Stoj. et Stef. (*Scrophulariaceae*). *Tetrahedron Letters*, **1995**; 36(4):617-620.
35. **Drandarov K, Hais IM.** Separation of E-Z isomeric macrocyclic spermine alkaloids of *Verbascum pseudonobile* and *Verbascum phoeniceum* and of their derivatives using thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1996**; 724:416-423.
36. **Youhnovski N, Drandarov K, Guggisberg A, Hesse M.** Macrocyclic spermine alkaloids from *Verbascum*: Isolation, structure elucidation and syntheses of the (E / Z)-isomeric pairs (S)-verbasikrine / (S)-isoverbasikrine and (S)-verbamekrine / (S)-isoverbamekrine. *Helvetica Chimica Acta*, **1999**; 82(8):1185-1194.
37. **Drandarov K.** Verballoscenine, the Z isomer of verbascenine from *Verbascum phoeniceum*. *Phytochemistry*, **1997**; 44(5):971-973.
38. **Çalış I, Gazar AH, Bedir H, Khan A.** Phenylethanoid glycosides with free radical scavenging properties from *Verbascum wiedemannianum*. 3rd IUPAC International Conference on Biodiversity. Antalya, **2001**:64.
39. **Tatlı İİ, Akdemir ŞZ, Bedir E, Khan AI.** *Verbascum pterocalycinum* var. *mutense*'den elde edilen doğal bileşikler ve bunların antimikrobiyal aktiviteleri. 14. BİHAT. Eskişehir, **2002**: 27.

40. **Tath İİ, Akdemir ŞZ, Bedir E, Khan AI.** 6-0- α -L-Rhamnopyranosylcatalpol derivative iridoids from *Verbascum cilicicum*. 7. International Symposium on Pharmaceutical Sciences. Ankara, **2003**; 223
41. **Akdemir ŞZ, Tath İİ, Bedir E, Khan AI.** Antioxidant flavonoids from *Verbascum salviifolium* Boiss. *Fabad J. Pharm. Sci*, **2003**; 28:71-75.
42. **Akdemir ŞZ, Tath İİ, Bedir E, Khan AI.** Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Verbascum lasianthum*. *Turk J. Chem*, **2004**; 28:227-234.
43. **Brantner A, Grein E.** Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **1994**; 44:35-40.
44. **Barbour K E, Sharif A M, Sagherian K V, Harbe N A, Talhouk S R, Talhouk N S.** Screening of selected Indigenous Plants of Lebanon for Antimicrobial Activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**; 93:1-7.
45. **Slagowska A, Zgorniak-nowasielska I, Grzybek J.** Inhibition of Herpes Simplex Virus replication by *Flos Verbasci* infusion. *Pol. J. Pharmacol. Pharm*, **1987**; 39:55-61.
46. **Zgorniak-Nowosielska I, Grzybek J, Manolova N, Serkedjieva J, Zawilinska B.** Antiviral activity of *Flos Verbasci* infusion against Influenza and Herpes Simplex Viruses. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis+Supplements*, **1991**; 39(1-2):103-108.
47. **Serkedjieva J.** Combined antiinfluenza virus activity of *Flos Verbasci* infusion and amantadine derivatives. *Phytotherapy Research*, **2000**; 14:571-574.
48. **McCutcheon AR, Ellis SM, Hancock REW, Towers GHN.** Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology*, **1994**; 44:157-169.
49. **Taged H, Mohammed E, Asres K, Mariam TG.** Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**; 100:168-175.
50. **Geyid A, Abebe D, Deballa A, Makonnen Z, Aberra F, Teka F, Kebede T, Urga K, Yersaw K, Biza T, Mariam BH, Guta M.** Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their antimicrobial properties and chemical profiles. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**; 97: 421-427
51. **Özgen U, Mavi A, Terzi Z, Coşkun M, Yıldırım A.** Antioxidant Activities and Total Phenolic Compounds Amount of Some *Asteraceae* Species. *Turkish J. Pharm. Sci*, **2004**; 1(3):203-216.
52. **Lugasi A, Dworschak E, Blazovics A, Kery A.** Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* L. var *niger*) Root. *Phytotherapy research*, **1998**; 12:502-506.

53. **Aliyiannis N, Mitaku S, Tsardis TE, Harvala C, Tsaknis I, Lalas S, Haroutounian S.** Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. *J. Agric Food Chem*, **2003**; 51:7308-7312.
54. **Tepe B, Sökmen M, Akpulat HA, Yumrutaş Ö, Sökmen A.** Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch.&Mey., *Sideritis libanotica* Labill. Subsp. *linearis* (Bentham) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. And *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. *Food Chemistry*, **2005**;
55. **Klimek B, Stepien H.** P17 Effect of some constituents of Mullein (*Verbascum sp.*) on proliferation of Rat splenocytes in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1994**; 2:117-194.
56. **Lin LT, Liu LT, Chiang LC, Lin CC.** In vitro anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phytotherapy Research*, **2002**; 16:440-444.
57. **Gürbüz I, Özkan AM, Yeşilada E, Kutsal O.** Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**; 313-318.
58. **Crozier A., Jensen E. , Lean M.E. J, Mc Donald M.S.,** Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 761, 315-321, **1997**
59. **Hertog M.G.L, Hollman, P.C.H, Venema D.P.,** Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits, **J.Agric. Food Chem. (1992)** 40, 1591-1598
60. **Güvenç A., Houghton P. J., Duman H., Çoşkun M., Şahin P.** Antioxidant Activity Studies on Selected *Sideritis* Specie Native to Turkey. *Pharmaceutical Biology*, **2005**, 43: 173-177
61. **Wayne PA.** *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standart.* The National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) 6. Baskı, NCCLS Document, **2003**: M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4)
62. **Vanden Berghe D A, Vlietinck A J, Van Hoof L.** *Bull. Inst. Pasteur*, **1986**; 84: 101
63. **Serkedjieva J, Hay AJ.** *Antiviral Res*, **1998** 37: 221-230
64. **Dip A.** Arsenik Toksisitesinde Serbest Radikaller ve Antidot Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2001**.
65. **Howard. M. Merken, Casandra D. Merkan, Gary R. Beecher.** Kinetics method for the quantitation of Anthocyanidins, flavonols and flavones in foods, *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, 49, 2727-2732

ÖZGEÇMİŞ

04.12.1981 yılında Kayseri’de doğmuştur. İlkokulu Kayseri Anayurt İlkokulunda, ortaokul ve liseyi Mersin Atatürk Lisesinde tamamladıktan sonra 1999 yılında Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazanmıştır. 2003 yılında lisans eğitiminden mezun olduktan sonra aynı yıl Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde yüksek lisans eğitimine başlamıştır. 2004 yılında Meslek Bilimleri bölümünde araştırma görevlisi olarak göreve başlamış olup halen aynı göreve devam etmektedir.

Başak ÖZBİLGİN