



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Lamium purpureum L. ve Lamium galeobdolon (L.) L.

**TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ve KİMYASAL
KOMPOZİSYONLARININ BELİRLENMESİ**

AYŞEGÜL AKKOYUNLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. GÖRKEM DÜLGER

DÜZCE, 2019

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Lamium purpureum* L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. Türlerinin Biyolojik Aktivitelerinin ve Kimyasal Kompozisyonlarının Belirlenmesi**

Ayşegül AKKOYUNLU tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Görkem DÜLGER

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Görkem DÜLGER

Düzce Üniversitesi

Doç. Dr. Kerem CANLI

Dokuz Eylül Üniversitesi

Dr. Öğr.Üyesi Merve ALPAY

Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 02/08/2019

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

2 Ağustos 2019

(İmza)

Ayşegül AKKOYUNLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde tez danışmanlığımı üstlenerek araştırma konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, anlayışlı ve yol gösterici yaklaşımı ile beni cesaretlendiren, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum çok değerli danışmanım Doç. Dr. Görkem DÜLGER'e en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Ders dönemim ve tez dönemim boyunca engin bilgisinden yararlandığım, destekleyici ve öğretici yaklaşımıyla bana yol gösteren ve bu tezin oluşmasında büyük emeği olan değerli hocam Prof. Dr. Başaran DÜLGER'e teşekkürlerimi sunarım.

Antikanser aktivite çalışmamda yoğun temposuna rağmen bana vakit ayıran değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Merve ALPAY'a; GC-MS analizi için yol gösteren hocam Doç. Dr. Kerem CANLI'ya; uçucu yağ ekstraksiyonu işlemlerimde laboratuvarını açan ve yardımını esirgemeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi Alparslan ATAHAN'a teşekkür ederim.

Sevgi ve desteklerini hep hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan ve bana güvenen annem Fevziye GÜNGÖR'e, babam Hasan GÜNGÖR'e ve kardeşlerime gönülden teşekkür ederim.

Eğitim sürecimde 2 yaş daha büyüyen ve beni de büyüten, hayatıma anlam, gönlüme neşe katan yavrularım Rüveydam ve Cihangir Mirzam'a; çocuklarımı emanet ettiğim, sonsuz özverili kayınvalidem Ayten AKKOYUNLU'ya içten teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu yola çıkmamda beni yüreklendiren, maddi-manevi desteğini esirgemeyen, her zaman arkamda olduğunu bildiğim çok sevgili eşim Davut Ali AKKOYUNLU'ya gösterdiği anlayış ve fedakârlıklardan dolayı gönülden teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2019.04.01.900 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir

2 Ağustos 2019

Ayşegül AKKOYUNLU



Yüreğimin közü
Bahadır Hamzam 'a

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	x
SİMGELER.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. UÇUCU YAĞLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	3
1.1.1. Uçucu Yağ Elde Etme Metodları.....	4
1.1.1.1. <i>Destilasyon Metodu</i>	5
1.1.1.2. <i>Ekstrasyon Metodu</i>	6
1.2. OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDANLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	9
1.3. ANTİKANSEROJEN AKTİVİTE HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	11
1.3.1. Kanser.....	11
1.3.2. Melanom Cilt Kanseri.....	12
1.3.3. Hücre Kültürü.....	13
1.3.4. Sitotoksiste.....	14
1.4. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	15
1.4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Test yöntemleri.....	16
1.4.1.1. <i>Disk Difüzyon Testi</i> :.....	16
1.4.1.2. <i>Kuyu Difüzyon Yöntemi</i> :.....	17
1.4.1.3. <i>Dilüsyon yöntemleri</i> :.....	17
1.4.1.4. <i>Antimikrobiyal gradyan yöntemi (E-test)</i> :.....	18
1.5. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BİTKİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	19
1.5.1. Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri.....	19
1.5.1.1. <i>Lamium purpureum</i> L.....	20
1.5.1.2. <i>Lamium galeobdolon</i> (L.) L.....	21
1.6. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
2.1. BİTKİ MATERYALLERİNİN HAZIRLANMASI.....	26
2.2. ETANOL EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI.....	26
2.3. UÇUCU YAĞLARIN HAZIRLANMASI.....	26
2.4. GC-MS ANALİZİ.....	29
2.5. ANTİOKSİDAN, OKSİDAN KAPASİTE VE OKSİDATİF STRES İNDEKSİNİN BELİRLENMESİ.....	30
2.5.1. TAS (Total Antioksidan Seviyesi) Çalışma Yöntemi:.....	30
2.5.1.1. <i>Kit İçerisindeki Bileşenler</i>	30

2.5.1.2. Çalışma adımları:	30
2.5.2. TOS (Total Oksidan Seviyesi) Çalışma Yöntemi:	31
2.5.2.1. Kit İçerisindeki Bileşenler	31
2.5.2.2. Çalışma adımları:	31
2.6. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ.....	32
2.6.1. Test Mikroorganizmalarının Hazırlanışı	32
2.6.2. Disk Difüzyon Metodunun Uygulanması.....	33
2.7. ANTİKANSEROJEN AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ.....	33
2.7.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması	33
2.7.2. Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi (MTT Yöntemi)	34
3. SONUÇ	36
3.1. GC-MS ANALİZİ SONUÇLARI	36
3.2. ANTİOKSİDAN VE OKSİDAN KAPASİTE SONUÇLARI	40
3.3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE SONUÇLARI	40
3.3.1. <i>Lamium purpureum</i> L. bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi	40
3.3.2. <i>Lamium galeobdolon</i> (L.) L. bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	42
3.4. ANTİKANSER AKTİVİTE SONUÇLARI	48
3.4.1. <i>L. purpureum</i> L. bitkisinin MTT Testi Sonuçları.....	48
3.4.2. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. bitkisinin MTT Testi Sonuçları	51
4. TARTIŞMA.....	54
4.1. GC-MS ANALİZİ	54
4.2. ANTİOKSİDAN, OKSİDAN KAPASİTE VE OKSİDATİF STRES	55
4.3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE	58
4.4. ANTİKANSER AKTİVİTE	60
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	63
6. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Melanom cilt kanseri örnekleri	13
Şekil 1.2. <i>Lamium purpureum</i> L.	20
Şekil 1.3. <i>Lamium galeobdolon</i> (L.) L.	21
Şekil 2.1 .Clevenger cihazında uçucu yağ ekstraksiyonu.....	27
Şekil 2.2. Ayırma hunisinde su-yağ ayırımının yapılması.	27
Şekil 2.3. Rotary evaporatörde eterin uzaklaştırılması.	28
Şekil 2.4. Elde edilen uçucu yağ numuneleri.....	28
Şekil 2.5. GC-MS cihazı.	29
Şekil 2.6. TAS - TOS deneylerine sokulan bitki etanol ekstreleri.	32
Şekil 3.1. <i>L. purpureum</i> L. etanol ekstresinin GC-MS analiz kromatogramı.....	36
Şekil 3.2. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. etanol ekstresinin GC-MS analiz kromatogramı.....	38
Şekil 3.3. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Candida albicans</i> üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 µL; 2: 75 µL; 3: 100 µL.	44
Şekil 3.4. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Candida glabrata</i> üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 µL; 2: 75 µL; 3: 100 µL.	44
Şekil 3.5. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Candida tropicalis</i> üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 µL; 2: 75 µL; 3: 100 µL.....	45
Şekil 3.6. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Candida guilliermondii</i> üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 µL; 2: 75 µL; 3: 100 µL.	45
Şekil 3.7. <i>L. purpureum</i> L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Candida guilliermondii</i> üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 µL; 2: 75 µL; 3: 100 µL.	46
Şekil 3.8. <i>L. purpureum</i> L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Candida parapsilosis</i> üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 µL; 2: 75 µL; 3: 100 µL.	46
Şekil 3.9. <i>L. purpureum</i> L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Staphylococcus aureus</i> üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 µL; 2: 75 µL; 3: 100 µL.....	47
Şekil 3.10. <i>L. purpureum</i> L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Salmonella typhimurium</i> üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 µL; 2: 75 µL; 3: 100 µL.....	47
Şekil 3.11. <i>L. purpureum</i> L. uçucu yağının MTT Sonuçları.	48
Şekil 3.12. <i>L. purpureum</i> L. kontrol.....	49
Şekil 3.13. <i>L. purpureum</i> L. 25 µg/mL.	49
Şekil 3.14. <i>L. purpureum</i> L. 50 µg/mL.	50
Şekil 3.15. <i>L. purpureum</i> L. 100 µg/mL.....	50
Şekil 3.16. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. uçucu yağının MTT Sonuçları.	51
Şekil 3.17. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. kontrol.....	52
Şekil 3.18. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. 25 µg/mL.....	52
Şekil 3.19. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. 50 µg/mL.....	53
Şekil 3.20. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. 100 µg/mL.....	53

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1. Bitkisel kaynaklı bazı ajanlar.	3
Çizelge 1.2. Uçucu yağ elde etme yöntemleri	5
Çizelge 1.3. Gelişmiş ekstraksiyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	7
Çizelge 1.4. Doğal ve sentetik antioksidanların karşılaştırılması	11
Çizelge 1.5. Antimikrobiyallerin etki mekanizmalarına göre gruplandırılması	15
Çizelge 2.1. Test Mikroorganizmaları.....	32
Çizelge 3.1. <i>L. purpureum</i> L. etanol ekstresinin kimyasal kompozisyonu.	36
Çizelge 3.2. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. etanol ekstresinin kimyasal kompozisyonu.	38
Çizelge 3.3. İki bitkinin antioksidan ve oksidan seviyelerinin karşılaştırılması.....	40
Çizelge 3.4. <i>L. purpureum</i> L. bitkisi uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi.....	41
Çizelge 3.5. <i>L. galeobdolon</i> (L.) L. bitkisi uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi.	42

KISALTMALAR

ABTS	2,2'-Azino-Bis (3-Etilbenzotiazolin-6-Sülfonik Asit)
AK 30	Amikasin 30 µg
APX	Askorbat Peroksidaz
ATP	Adenozin Trifosfat
ATPaz	Adenozin Trifosfataz
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksitolüen
B16F10	Melanom Hücre Hattı
CAT	Katalaz
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)
CTX 30	Cefotaxime 30µg
DHAR	Dehidroaskorbat Redüktaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	Di(Phenyl)-2,4,6 İminoazanium
EAC	Ehrlich Ascites Carcinoma
EDTA	Etilen Daimin Tetra Asetik Asit
E 15	Erythromycin 15µg
FBS	Fetal Bovine Serum
GC	Gaz Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
GR	Glutasyon Redüktaz
HepG2	İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattı
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSF	İnsan Derisi Fibroblastları
KTC 20	Ketacanazole 20 µg
LC-ESI-MS	Sıvı Kromatografi-Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometresi
MDHAR	Monodehidro Askorbat Redüktaz
MHA	Mueller Hinton Agar
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MTT	3-(4,5- Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum-Bromid
MS	Kütle Spektrometresi
ND	Belirlenmedi (Not determined)
NY 100	Nystatin 100 µg
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
pH	Hidrojen Gücü (Power of Hydrogen)
P 10	Penicillin 10µg
ROS	Reaktif Oksijen Türü
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
SPME	Katı-Faz Mikroekstraksiyon (Solid-Phase Microextraction)
SOD	Süperoksit Dismutaz

TAS	Toplam Antioksidan Seviyesi (Total Antioxidant Status)
TOS	Toplam Oksidan Seviyesi (Total Oxidant Status)
UV	Ultraviyole
U251	Glioblastoma Hücre Hattı



SİMGELER

AU	Keyfi Birim (Arbitrary Unit)
Ca ²⁺	Kalsiyum
CO ₂	Karbondiyoksit
gr	Gram
K ⁺	Potasyum
mg/L	Miligram/Litre
mg/mL	Miligram/Mililitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
Na ⁺	Sodyum
Na ₂ SO ₄	Sodyum Sülfat
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece

ÖZET

***Lamium purpureum* L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ve KİMYASAL KOMPOZİSYONLARININ BELİRLENMESİ**

Ayşegül AKKOYUNLU

Düzce Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Görkem DÜLGER

Ağustos 2019, 71 sayfa

Bu çalışmada *Lamium purpureum* L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. türlerinin kimyasal bileşimi ve biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Kimyasal bileşiminin analizi GC-MS ile yapılmıştır. *L. purpureum* L.'nin etanol ekstresinde palmitik asit, 7-tetradekenal, 9,12-oktadekadienoik asit, (sikloheks-2-enil) asetik asit, etil 9,12,15-oktadekatrienoat, heksatriakontan, stearat ve benzil benzoat yüksek oranda bulundu. *L. galeobdolon* (L.) L.'nin etanol ekstresinde ana bileşenler 2(3H)-benzoksazolon, palmitik asit, 2-heksadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil, eikosan, 9,12-oktadekadienoik asit ve tetrakosan olarak belirlendi. Ayrıca etanol ekstrelerinin TAS kiti ile antioksidan kapasitesi belirlenirken, TOS kiti ile de oksidan kapasitesi tespit edildi. İkisinin oranıyla bitkilerin OSI değerleri hesaplandı ve değerler *L. purpureum* L. için 0,672 AU; *L. galeobdolon* (L.) L. içinse 0,987 AU olarak bulundu. Clevenger cihazında bitki toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyonla uçucu yağ elde edildi. Uçucu yağların antikanser aktivitesi MTT testi ile analiz edildi. *L. purpureum* L.'nin 50 µg/mL konsantrasyonunda maksimum apoptoz %14 oranında gerçekleşirken, *L. galeobdolon* (L.) L.'nin antiproliferatif etkisi aynı dozda %88,9 olarak belirlendi. Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Buna göre antibakteriyel etkinliği zayıf olan iki bitkinin antifungal etkisi daha yüksek bulundu. *L. purpureum* L. için en yüksek değer 100 µL'lik dozda *Candida tropicalis* mantarına karşı 10 mm ölçüldü. *L. galeobdolon* (L.) L.'nin 100 µL'lik dozu *Candida glabrata* ve *Candida tropicalis* mantarlarına karşı 10 mm zon oluşturarak en yüksek antifungal etki gösterdi.

Anahtar sözcükler: *Lamium* sp., GC-MS, Antioksidan, MTT, Disk difüzyon.

ABSTRACT

DETERMINATION of BIOLOGICAL ACTIVITY and CHEMICAL COMPOSITION of *Lamium purpureum* L. and *Lamium galeobdolon* (L.) L. SPECIES

Ayşegül AKKOYUNLU

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

Master's Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Görkem DÜLGER

August 2019, 71 pages

The aim of this study was to evaluate the chemical composition and bioactive properties of *Lamium purpureum* L. and *Lamium galeobdolon* (L.) L. species. The chemical composition was analyzed by GC-MS. Palmitic acid, 7-tetradecenal, 9,12-octadecadienoic acid, (cyclohex-2-enyl) acetic acid, ethyl 9,12,15-octadecatrienoate, hexatriacontane, stearate and benzyl benzoate were found high rate in the ethanol extract of *L. purpureum* L. In the ethanol extract of *L. galeobdolon* (L.) L., the main components were determined 2(3H)-benzoxazolone, palmitic acid, 2-hexadecen-1-ol, 3, 7, 11, 15-tetramethyl, eicosan, 9,12-octadecadienoic acid and tetracosan. In addition, antioxidant capacity of ethanol extracts was determined by TAS kit and oxidant capacity was determined by TOS kit. OSI values of the plants were calculated with the ratio of two and the values were found 0.672 AU for *L. purpureum* L.; 0.987 AU for *L. galeobdolon* (L.) L. In the Clevenger apparatus, essential oil was obtained by hydrodistillation from the above grand parts of the plant. The anticancer activity of the essential oil of the plants was analyzed by MTT test. The maximum apoptosis of *L. purpureum* L. at 50 µg/mL was 14%, while the antiproliferative effect of *L. galeobdolon* (L.) L. was 88,9% at the same dose. The antimicrobial activity of the essential oils was determined by disc diffusion method. Accordingly, antifungal effect of two plants with poor antibacterial activity was found to be higher. The highest value for *L. purpureum* L. was measured 10 mm against *Candida tropicalis* fungus at a dose of 100 µL. 100 µL dose of *L. galeobdolon* (L.) L. showed the highest antifungal effect by forming a 10 mm zone against *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* fungi.

Keywords: *Lamium* sp., GC-MS, Antioxidant, MTT, Disc diffusion.

1. GİRİŞ

Doğal ürünlerin tedavi amaçlı bir kaynak olarak kullanımını eski zamanlardan beri bilinmektedir. İlaç endüstrisindeki önemli bilimsel ve teknolojik ilerlemeye rağmen, doğal ürünlerden elde edilen bileşenler günümüzde hala ilaç keşfine çok büyük katkı sağlamaktadır [1].

Bitkilerden elde edilen uçucu yağların son zamanlarda biyoaktif özellikleri üzerine metodolojik çalışmalar başlatılmıştır [2]. Uçucu yağların bilimsel ve popüler olmasının sebebi, biyoaktif bileşikler olarak kullanımlarını sağlayacak antioksidan, sitotoksik, sitostatik, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antimitojenik ve antimikotik özelliklere sahip fitokimyasal maddeler bulundurmalarıdır [3], [4].

Biyolojik olarak aktif birçok uçucu yağ, Lamiaceae familyasının çeşitli üyelerinden izole edilmiştir. Diterpenoidlerin varlığı ile bilinen bu familya, antioksidan ve antimikrobiyal nitelikli uçucu yağ içeriğinden dolayı geleneksel ve modern tıpta, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan çok sayıda tıbbi taksona sahip bir ailedir [5], [6], [7].

Lamium türleri de farmakolojik özellikleri ve dünya genelindeki etnobotanik kullanımları ile dikkat çekmiş ve bu türler üzerinde yoğun fitokimyasal incelemeler başlamıştır [8].

Serbest radikaller ve hastalıklar arasındaki bağlantının anlaşılmasıyla birlikte toplumda serbest radikallere karşı ilgi oluşmuştur. Buna bağlı olarak da bitki kaynaklı antioksidanların insan sağlığı üzerindeki rolüne yönelik araştırmalara ilgi sürekli artmaktadır. Oksidasyon, canlı metabolizmasının temel bir parçasıdır. Normal koşullarda canlı vücudunda oksidanlar ile antioksidanlar arasında denge vardır. Bu denge, oksidan maddelerin üretimini artırması veya antioksidan maddelerin seviyesinin azalması sonucu bozulur. Bu dengesizlik hücre hasarına sebep olur. Oksidan maddelerin artışı kanser, kardiyovasküler hastalıklar, gastrointestinal hastalıklar, solunum ve boşaltım bozuklukları, diyabet, yaşlanma ve infertilite gibi birçok rahatsızlığın gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. Doğrudan oksidan maddelerin seviyesiyle alakalı olan bu tür hastalıkların önlenmesi için, antioksidanlar ile vücut dengesinin sağlanması gerekir. Bunun için diyet doğal bitki kaynaklarında bulunan antioksidan

bileşiklerle takviye edilmelidir [9], [10].

Kanser, toplum sağlığını ciddi şekilde etkileyen bir hastalıktır. Hayatı tehdit eden bu hastalığı tedavi etmek ve önlemek için yeni tedavi yöntemlerine sürekli bir talep vardır. Kansere en yaygın müdahale şekli olan kemoterapi, mide bulantısından kemik iliği yetmezliğine kadar pek çok olumsuz etkiye sebep olmaktadır. Bilimsel araştırmalar, kemoterapi gibi mevcut tedavilere kıyasla daha az toksik yan etkisi olduğu düşünülen doğal olarak türetilmiş bileşiklere yönlenmiştir [11], [12]. Birçok bitki türevi bileşiğin antikanser potansiyeli keşfedilmiş ve son on yılda, kanser hastalıklarının tedavi etme potansiyelleri için uçucu yağlar üzerinde çalışmalar artmıştır. Uçucu yağlar çeşitli mekanizmalarla, metastazı inhibe ederek ve çoklu-ilaç karşıtı direnç molekülleri olarak tümörlerin azaltılmasında rol oynamaktadır [13].

Enfeksiyöz hastalıklar, insanlığın varoluşundan bu yana bütün toplumları etkileyen problemlerin başında gelmiştir. Antimikrobiyaller enfeksiyöz hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçlardır. İlk olarak Alexander Fleming'in penisilini tesadüfen keşfetmesiyle başlayan antibiyotik çağı, sonraki yıllarda doğal, sentetik ve semisentetik antimikrobiyal özelliğe sahip ilaçların giderek artan seviyede üretilmesiyle devam etmiştir. Antibiyotiklerin klinik açıdan uygunsuz ve yaygın kullanımlarına bağlı olarak mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç oluşturması önemli bir sorun teşkil etmektedir. Son zamanlarda hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olan antibiyotiklerin çoğu etkisiz kalmakta ve bakteriler, etki spektrumları içerisinde dahi, kazanmış oldukları direnç sayesinde antibiyotiklerden etkilenmemektedirler [14]. Bu durum yeni antimikrobiyal ajanların keşfi ve geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Araştırmalara göre bitkilerin içeriğindeki birçok etken madde sinerjik etki oluşturarak mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Bunun sonucunda tek etken maddeli ilaç formlarına göre çok yönlü etken madde içeren bitkisel ekstratların, dirençli mikroorganizmalarda daha etkili olabileceği düşünülmektedir [15].

Analitik teknikler ve biyolojik bilimlerdeki gelişmeler sayesinde, özellikle geleneksel kullanımdaki çeşitli bitkilerin terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi mümkün olmuştur. Bu tür çalışmalar, yeni biyoaktif ürünlerin ve yarı sentetik ilaçların üretimine veya daha aktif ve seçici moleküllerin sentezi için prototip olarak kullanımına katkıda bulunabilir [13].

Çizelge 1.1’de şu anda klinik uygulamada kullanılan bitkisel kaynaklardan türetilmiş bazı ajan örnekleri gösterilmiştir [1].

Çizelge 1.1. Bitkisel kaynaklı bazı ajanlar.

İlaç	Medikal Kullanımı	Aksiyon mekanizması
Aspirin	Analjezik, antiinflamatuvar, ateş düşürücü	Siklooksijenaz inhibisyonu
Atropin	Pupil dilatörü	Postganglionik parasempatik nöroeffektör bölgelerinde muskarinik reseptörlerde asetilkolin antagonisti
Kafein	Uyarıcı	Adenozin reseptörü antagonisti
Kodein	Analjezik, antitusif	Opioid reseptörü agonisti
Digoksin	Atriyal fibrilasyon ve konjestif kalp yetmezliği için	Na ⁺ / K ⁺ ATPaz membran pompasının inhibisyonu
Eugenol	Diş ağrısı	Duyusal sinirlerin uyarılabilirliğini azaltır (artan K ⁺ akışı ve azalan Ca ₂ ⁺ akışı)
Morfin	Analjezik	Opioid reseptörü agonisti
Pilocarpine	Glacom	Muskarinik reseptör agonisti
Kinin	Sıtma profilaksisi	Sıtma parazitinde protein sentezinin inhibisyonu
Taxol	Antikanser ajanı	Antimitotik ajan (mikrotübüllere bağlanır ve stabilize olur)

1.1. UÇUCU YAĞLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Uçucu yağlar kokulu bitkiler tarafından sekonder metabolitler olarak sentezlenen, çiçek, meyve, tohum, kabuk, yaprak, reçine, rizom ve odun gibi bitkisel kısımlardan çeşitli distilasyon ve ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen yağ kıvamında kokulu sıvılardır [16], [17].

Eski çağlardan beri uçucu yağlar bitkilerin farklı kısımlarından izole edilmiş ve çeşitli amaçlar için kullanılmıştır. Geniş bir aktivite yelpazesine sahiptirler. Yapılan çalışmalarda, anti-enflamatuvar, antioksidan ve antikanserojen gibi farmakolojik etkilerinin yanında, bakteri, mantar, virüs, protozoa, böcek ve bitki gibi çok çeşitli organizmalara karşı da biyosit özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir [18].

Farklı konsantrasyonlarda yaklaşık 20-60 civarında bileşen içerebilen karmaşık yapıları doğal karışımlardır. İz miktarda bulunan birçok bileşenle beraber, yüksek konsantrasyonlarda (%20-70) bulunan iki veya üç ana bileşenle karakterize edilirler.

Uçucu yağların biyolojik özelliklerini genel olarak bu ana bileşenler belirler. Uçucu yağların ana bileşenlerini farklı biyosentetik kökenli iki grup oluşturur. Terpen ve terpenoidler ile diğer aromatik ve alifatik bileşenler, aromatik ve tıbbi bitkilerin kokulu ve biyolojik özelliklerinden sorumludur [18], [19].

Uçucu yağlar iki ana özelliğe sahiptir. Bunlardan birincisi, patojenik mikroorganizmalar mutasyonla bile uçucu yağlara karşı direnç geliştirememektedirler. Uçucu yağlarda çok sayıda antibiyotik etkiye sahip madde bulunmaktadır ve mikroorganizmalar birden fazla antibiyotik maddeye karşı aynı anda savunma mutasyonu yapmamaktadır. İkinci özellik ise insanlar için düşük toksisite sergilemesidir [6]. Genellikle uzun vadeli genotoksik risklerden yoksunlardır. Üstelik bazıları, antikanserojen aktiviteyle bağlantılı olabilecek oldukça net bir antimutagenik kapasite göstermektedir [19].

Uçucu yağlar, kanser hastalıklarını tedavi etme potansiyelleri açısından son on yıldır yoğun bir şekilde incelenmiştir. Araştırmacılar, bunların kanser hücrelerini hedefleme yeteneğine sahip olduğunu ve kanser hastasına uygulandığı zaman, yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarının etkinliğini arttırabildiğini göstermişlerdir [20]. Uçucu yağların sahip oldukları antiproliferatif etkiyi, hücre döngüsünü durdurma, apoptoz, DNA onarımı da dahil olmak üzere, çeşitli mekanizmalarla sağladıkları tespit edilmiştir. Ayrıca, metastazı inhibe ederek ve çoklu-ilaç karşıtı direnç molekülleri olarak tümörlerin azaltılmasında rol oynamaktadır [13].

1.1.1. Uçucu Yağ Elde Etme Metodları

Uçucu yağlar, bitkinin cinsine, bitkide bulunduğu yere ve bitkideki miktarına göre çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilebilir. Ekstraksiyon için kullanılan metot, kullanılan botanik materyale bağlıdır ve gerekli yağın kalitesini belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Uygunsuz ekstraksiyon prosedürü, uçucu yağın kimyasal yapısının zarar görmesine veya değişmesine neden olabilir. Bu durum, biyoaktivite ve doğal özelliklerin kaybına neden olur [21].

Uçucu yağ elde etme yöntemleri Çizelge 1.2'de genel olarak sınıflandırılmıştır. (Bayrak, 2006; Toroğlu ve Çenet, 2006; Başer, 2010; Yaylı, 2013; Kaya ve Ergönül, 2015; Yaman ve Kuleaşan, 2016).

Çizelge 1.2. Uçucu yağ elde etme yöntemleri.

Destilasyon	Ekstraksiyon	Mekanik Yöntemler	Gelişmiş Yöntemleri	Ekstraksiyon
Su destilasyonu	Maserasyon	Sıkma Yöntemi	Basınçla (BSE)	Ekstraksiyon
Buhar Destilasyonu	İnfüzyon	Çizme Yöntemi	Mikrodalda Solvent (MAE)	Destekli Ekstraksiyonu
Hidrodifüzyon	Perkolasyon		Süperkritik Ekstraksiyonu (SFE)	Akışkan
Vakum Destilasyonu	Anfloraj		Ultrason Ekstraksiyonu (SAE)	Destekli
Fraksiyonel Destilasyon	Dekoksiyon			
Su-Buhar Destilasyonu				
Mikrodalga Destekli Destilasyon				
Destilasyon Fermantasyon				

1.1.1.1. Destilasyon Metodu

Sıvıların kaynama noktalarındaki farklılıklardan yararlanılarak gerçekleştirilen ayırma işlemidir. Destilasyon yöntemi uçucu yağ üretiminde en geniş şekilde kullanılan ve evrensel kabul gören bir tekniktir.

Su Destilasyonu:

Yüksek kaynama noktasına sahip suda çözünmeyen doğal ürünleri izole etmek için kullanılan, odun veya çiçek gibi bitki materyallerinden elde edilen standart uçucu yağ çıkarma yöntemi haline gelmiştir. İşlem, bitki materyallerinin suya tamamen batırılmasını ve ardından kaynatılmasını içerir. Bu yöntemde, sistemi çevreleyen su aşırı ısınmayı önleyerek bariyer görevi görür ve çıkan yağları belirli bir dereceye kadar korur. Buhar ve uçucu yağ buharı sulu bir fraksiyona yoğunlaşır ve toplama kabında toplanan yoğunlukları farklı olan su ve yağ birbirinden ayrılır. Bu tekniğin avantajı, gerekli malzemenin 100 °C'nin altındaki bir sıcaklıkta damıtılabilmesidir [21], [22]. Küçük ölçekli üretimlerde Clevenger tipi bir aparat kullanılmakta, endüstriyel uygulamalarda ise imbik adı verilen büyük destilasyon kazanlarıyla yağ elde edilmektedir [23].

Buhar destilasyonu:

Buhar destilasyonu metodu, bitkisel yağ çıkarma için en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu metod ile elde edilen uçucu yağların oranı %93 oranındadır. Bitki materyali delikli metal bir sepete veya çelik elekler arasına yerleştirilir ve ayrı bir yerde kaynayan sudan çıkan buhar, kazanın alt tarafından verilir. Uygulanan ısı, bitki materyalinin hücre yapısını bozarak, aromatik bileşiklerin veya uçucu yağların serbest kalmasına neden olur. Buhar bitki materyalindeki uçucu yağı sürükler ve yağ sudan ayrılarak uçucu yağ elde edilir [21], [22].

Hidrodifüzyon:

Bu yöntem, bitki materyali kurutulduğunda ve kaynama sıcaklığında zarar görmediğinde kullanılır. Sadece bitkisel materyalin olduğu kaba giren buhar giriş yolunun farklı olduğu bir buhar destilasyon türüdür. Hidrodifüzyon için, bitki materyalinin üstünden buhar uygulanır, buna karşın buhar destilasyon yöntemi için alttan buhar girer. İşlem ayrıca düşük basınç veya vakum altında da çalıştırılabilir ve buhar sıcaklığını 100 °C'nin altına düşürür. Hidrodifüzyon yöntemi, daha kısa işlem süresi ve daha az buhar kullanımı nedeniyle daha yüksek yağ verimi sağlar. Bu yönleriyle buhar destilasyon yönteminden üstündür [21].

Vakum destilasyonu:

Kaynama noktaları çok yüksek olan veya kaynama noktasında bozulan bileşiklerin destilasyonunda kullanılan yöntemdir. Kaynama, buhar basıncı dış basınca eşit olduğunda başlar. Kaynamanın olması için, sıcaklığı artırmak yerine basıncı düşürmek daha etkilidir. Bu sebeple dış basınç düşürüldüğü takdirde kaynama noktası da düşer ve bileşiğin daha düşük sıcaklıkta kaynaması sağlanır [23], [24].

1.1.1.2. Ekstraksiyon Metodu

Ekstraksiyon; katı ya da sıvı fazdaki bileşenlerin, çözünürlük özelliklerinin farklılığına göre sıvı faza alınması işlemidir. Herhangi bir çözücü yardımı ile maddelerin özünün alınması veya belirli bileşenlerin çıkarılması işlemidir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı-sıvı ekstraksiyonu olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda; eğer bileşen bir sıvıda çözülmüş halde bulunuyorsa, bu sıvı ile karışmayan fakat o maddeyi çözebilen başka bir sıvı ile bileşenlerin çekilmesi sağlanır. Sonrasında birbirine karışmayan iki sıvının yoğunluk farkından yararlanılarak ayrılması sağlanır. Katı- sıvı

ekstraksiyonunda ise öğütülmüş katı örneğe sıvı çözücü ile muamele edilir ve katı içerisindeki bileşenlerin sıvı çözücüye geçmesi sağlanır. Soxhlet ekstraksiyonu ve maserasyon işlemi geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden olup işlem süresi uzundur ve büyük oranda çevre kirliliğine sebep olan çözücüler kullanılmaktadır. Süperkritik sıvı ekstraksiyonu ile mikrodalga ekstraksiyonu ise son yıllarda geliştirilmiş hızlı, etkin ve modern yöntemler arasındadır [23], [25].

Çözücü İçerikli Ekstraksiyon:

Bilinen en eski geleneksel ekstraksiyon yöntemi olup günümüzde hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Oda sıcaklığında çözücü içerisine bitki materyali doğrudan batırılabilceği gibi, bir soxhlet cihazı içerisinde organik çözücü ilavesiyle de kaynatılabilmektedir. Ekstraksiyon sonunda, çözücü destilasyon ile ortamdan uzaklaştırılarak kalan yağsı kısımda uçucu bileşikler elde edilmektedir [23], [26].

Çizelge 1.3’de gelişmiş ekstraksiyon yöntemlerinin kısaca avantaj ve dezavantajları verilmiştir [26].

Çizelge 1.3. Gelişmiş ekstraksiyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.

Ekstraksiyon Teknikleri	Avantajları	Dezavantajları
Soxhlet Ekstraksiyonu	<ul style="list-style-type: none"> Fazla miktarda örnek ekstraksiyonu Matrikse bağımlı olmaması Filtrasyon gerektirmemesi Basit bir metodoloji olması Uygun maliyetli basit ekipman kullanılması 	<ul style="list-style-type: none"> Fazla miktarda organik solvent kullanılması (100-500 mL) Uzun zaman alması (6-24 saat) Ekstraksiyon sonrası buharlaştırma/deriştirme basamağı
Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu	<ul style="list-style-type: none"> Filtrasyon gerektirmemesi Hızlı olması (10-40 dakika) Düşük solvent tüketimi (20-50 mL) Kullanımının kolay olması Otomasyona uygun olması 	<ul style="list-style-type: none"> Yüksek maliyet Matrikse bağımlı olması

Çizelge 1.3.(devam) Gelişmiş ekstraksiyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.

Ekstraksiyon Teknikleri	Avantajları	Dezavantajları
Mikrodalga- Destekli Sıvı Ekstraksiyonu	<ul style="list-style-type: none"> Hızlı olması (10-30 dakika) Düşük solvent tüketimi (20-50 mL) Yüksek sıcaklık uygulanması Ekstraksiyon parametrelerinin tamamen kontrolü (zaman, güç, sıcaklık) Kurutucu ajanlar gerektirmemesi 	<ul style="list-style-type: none"> Seçilen solventlerin mikrodalga ışımasını absorplaması (polar solventler) Temizleme gerektirmesi Hesaplı maliyet
Ses Dalgaları (Ultrason) Destekli Sıvı Ekstraksiyonu	<ul style="list-style-type: none"> Fazla miktarda örneğin ekstraksiyonu Matrikse bağımlı olmaması Hızlı olması (2-20 dakika) Uygun maliyet 	<ul style="list-style-type: none"> Büyük miktarda solvent kullanılması (20-200 mL) Filtrasyon gerektirmesi
Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu	<ul style="list-style-type: none"> Hızlı olması (20-60 dakika) Düşük solvent tüketimi (10-20 mL) CO₂'in toksik olmaması, alev almaması, çevre dostu olması, ucuz olması Sıcaklık, basınç ve modifikatör değiştirilerek yüksek seçicilik sağlanması Isısal olarak kararsız analitler için uygun olması Otomasyona uygun olması 	<ul style="list-style-type: none"> Yüksek maliyet Matrikse bağımlı olması CO₂ nonpolar olduğundan, daha polar analitlerin ekstraksiyondaki zorluk Verimini artırmak için, modifikatör eklenmesi Islak veya sıvı örnekler ve çözeltilerin ekstraksiyonunda zorluk

Çözücü İçermeyen Ekstraksiyon:

Katı-faz mikroekstraksiyon (SPME) yöntemi, örnek hazırlama, ekstraksiyon ve yoğunlaştırma aşamalarını çözücü içermeyen tek bir aşamada birleştirmiştir. Bu yöntem sayesinde işlem süresi kısalmış ve maliyet azalmış, teşhiste de iyileşmeler görülmüştür. SPME yöntemi, GC veya GC-MS ile birlikte özellikle çevre, biyoloji ve gıda örneklerindeki uçucu ve yarı uçucu organik bileşiklerin ekstraksiyonunda

kullanılmaktadır. Ayrıca, yüksek-performanslı sıvı kromatografisinde de (HPLC) uygulanmaktadır. SPME ekstraksiyonu için gerekli süre 1 ila 20 dakika arasında değişmektedir. Sürenin kısa olması hekzenal gibi uçucu bileşikler için yeterli olabilmekte ancak daha az uçucu bileşikler için daha uzun sürelere ihtiyaç duyulmaktadır. Karmaşık olmayan, düşük maliyetli, temiz ve konsantre ekstrakt eldesi sayesinde kütle spektrometre uygulamaları için ideal bir yöntem olarak tercih edilmektedir [23].

1.2. OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDANLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Oksidasyon, elektronların bir atomdan diğer bir atoma transferidir ve metabolizmamızın temel bir parçasıdır. ATP formunda enerji üreten elektron akış sisteminde son elektron alıcısı oksijendir. Elektron akışı bağlantısız hale geldiğinde canlı organizmalarda doku hasarının gelişiminde kritik bir rol oynayan serbest radikaller çoğalır. Serbest radikaller, dış orbitalinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom ya da moleküllerdir ve oldukça reaktiftirler [10].

Serbest radikaller, aerobik solunumun yan ürünü, düz kas hücrelerinin bir takım metabolik artıkları, stres ve yorgunluk kaynaklı toksik yan ürün, immün sistemin patojenlere yanıtı gibi endojen kaynaklı olabilir. Ayrıca UV ışınlar, X-rays, mikrodalga ışınları, organik maddelerin pişirme sırasında yakılması, orman yangınları, volkanik faaliyetler, asbest, karbonmonoksit, ozon gibi hava kirleticiler, temizlik ürünleri, boya, parfümler, pestisitler, kloroform gibi su kirletici maddeler, tütün ürünlerinin kullanımı eksojen olarak serbest radikal üretimine neden olabilir [9].

Normal şartlarda vücudumuzda oksidanlar ile antioksidanlar denge halindedir. Stres altında, vücudumuz enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan daha fazla reaktif oksijen türü (ROS) üretir [27]. Oksijen merkezli serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinir. ROS, vücutta solunum ve immün savunmanın bir parçası olarak sürekli üretilir. Normal hücre fonksiyonu için fizyolojik konsantrasyonlarda ROS gerekebilir. Ancak fazlası hücresel bileşenler tarafından etkili bir şekilde atılmazsa, nükleik asitler, lipitler, proteinler, çoklu doymamış yağ asitleri ve karbonhidratlar gibi hayati önemdeki biyomoleküllere zarar verebilmektedirler. Bunun yanında, mutasyonla sonuçlanabilecek DNA hasarına neden olabilirler. Vücuda vermiş

olduğu hasarlar yaşlanmaya, kansere ve diğer birçok hastalığa neden olur. ROS sıtma, edinilmiş immun yetmezlik sendromu, kalp hastalığı, inme, arteritroskleroz, diyabet ve kanser dahil olmak üzere 100'den fazla hastalığın sebepleri arasında sayılmaktadır.

Tüm aerobik organizmalar, zararlı molekülleri uzaklaştırmak veya onarmak için antioksidan enzimler ve bileşenlerden oluşan antioksidan savunma mekanizmasına sahiptir. Vücut içerisinde antioksidanların konsantrasyonu mutasyona uğramış enzimler, toksinler veya doğal antioksidanların azaltılmış alımından dolayı azalabilir.

Antioksidanlar, oksidan moleküllerin oluşumunu inhibe ederek, biyolojik hedeflerle reaksiyona girmelerini yavaşlatan, durduran ve yapısında genellikle fenolik bileşik taşıyan moleküllerdir. Fenolik bileşikler sekonder bitki metabolitleridir ve doğal olarak tüm bitki materyallerinde bulunur. Bu bileşiklerin hem insan hem de hayvan diyetlerinin ayrılmaz bir parçası olduğu bir gerçektir. Doğal antioksidanların en önemlileri tokoferoller, flavonoidler ve fenolik asitlerdir [10].

Bir ya da daha fazla sayıda kimyasal bileşiğin, ilaç olarak veya diyetle alınmasıyla kanser gelişiminin engellenmesi kimyasal koruma (chemoprevention) olarak bilinmektedir ve karsinojenlerden kaynaklanan DNA hasarının önlenmesinde etkili bir yoldur. Bu amaçla kullanılan antioksidanlar sentetik olarak elde edilebileceği gibi diyetle bulunan yiyeceklerle doğal yollardan da alınabilirler [28]. Son raporlarda bütillenmiş hidroksitolen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) gibi sentetik antioksidanların karsinojenez ve karaciğer hasarı gibi sorunlara yol açtığı bildirilmiştir. Bu nedenle, doğal bileşiklere olan ilgi artmıştır. Yapılan son çalışmalar, antioksidan bakımından zengin gıdalarla beslenme ile insanlarda hastalık insidansı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir [27]. Diyetle alınan doğal bileşikler koruyucu etkilerini kanser gelişiminde önemli rol oynayan hücre içi sinyal ileti yolaklarını düzenleyerek veya da kanser oluşum sürecini uzatarak gösterirler [28]. Epidemiyolojik alışmalar, bu antioksidan bileşiklerin çoğunun, antikarsinojenik, antimutagenik, antiviral, antibakteriyel ve antienflamatuar özelliklerin yanında anti-aterosklerotik aktiviteye de sahip olduğunu göstermiştir [29].

Bitkilerde ise doğal olarak bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan etkili bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) ve

peroksidaz grubundan olan enzimler antioksidan sistemin enzimatik bileşenlerinden sayılabilir. Askorbik asit, glutatyon, α -tokoferol ve karotenoidlerse enzimatik olmayan bileşenler olarak bilinmektedir [30].

Özellikle Lamiaceae familyasına ait olan birçok bitkinin, doğal antioksidanlar açısından çok etkili olduğu bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda Lamiaceae familyasının üyelerinden olan biberiye (*Rosmarinus*), adaçayı (*Salvia*) ve kekik (*Thymus*) güçlü antioksidan aktivite göstermiştir [31].

Çizelge 1.4'te gıda korumalarında yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlar ile doğal antioksidanlar karşılaştırılmıştır [10].

Çizelge 1.4. Doğal ve sentetik antioksidanların karşılaştırılması.

Sentetik Antioksidanlar	Doğal Antioksidanlar
Ucuz	Pahalı
Yaygın olarak uygulanan	Bazı ürünlerin kullanımı sınırlı
Orta ila yüksek antioksidan aktivite	Geniş kapsamlı antioksidan aktivite
Artan güvenlik endişesi	Masum madde olarak algılanıyor
Bazılarının kullanımı yasaklandı	Kullanımın artırılması ve uygulamaların genişletilmesi
Düşük su çözünürlüğü	Geniş çözünürlük seçenekleri
Azalan ilgi	Artan ilgi
Bazıları depolanan yağ dokusu	Tamamen metabolize

1.3. ANTİKANSEROJEN AKTİVİTE HAKKINDA GENEL BİLGİLER

1.3.1. Kanser

Araştırmacılar dünya genelindeki ölümlerin yaklaşık %13'ünün (7,6 milyon) kanserden kaynaklandığını bildirmektedir [29].

Kanser, genetiği bozulmuş hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesiyle ortaya çıkar ve bazı kanserler sonunda diğer dokulara da yayılabilir [32].

Kanser hastalığıyla savaşmak için bir dizi tedavi yöntemi vardır. Kansere hastaları için mevcut olan tedavi seçenekleri cerrahi, hormon tedavisi, radyasyon terapisi, biyolojik terapi, kemoterapi, hedefe yönelik terapi ve immünoterapi olarak özetlenebilir. Bu

tedavi yöntemleri ve kullanılan ilaçlar oldukça toksiktir ve yan etkilerinin yanında genellikle etkisizdirler [29]. Ayrıca ilaca direnç gelişimi de endişe verici bir durumdur. Bu nedenle, kanser için etkili terapötik madde arayışında biyoaktif ürünlerin şifalı bitkilerden izolasyonu önem kazanmaktadır [11].

Bitkiler, karaciğer, meme, akciğer, prostat, lösemi, kolon ve yumurtalık kanserleri gibi farklı kanserlerde biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar aracılığıyla anti-proliferatif ve sitotoksik özelliklerle hayati bir rol oynayan bitkisel antioksidanlar gibi farklı bileşikler içerir [29].

Bitkiden türetilen bileşenler, son on yılda artan bir oranda antikanser ajanları olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu bileşenler, redoks dengesini değiştirmek, apoptoz yollarını indüklemek, hücre döngüsünü durdurmak gibi, tümör gelişimi ve ilerlemesine katılan çeşitli moleküler yolakları inhibe etme kabiliyetini ortaya koyarlar [2], [33].

Bitki bileşenlerini antikanser ajan olarak kullanırken, normal hücrelerin canlılığını etkilemeden yalnızca kanser hücrelerinde sitotoksik bir etkiye sahip olması beklenir [33]. Uçucu yağlar, kanser hücresi hedefleme aktivitesine sahiptir. Kanser hastasına uygulandığı zaman proimmün fonksiyonlar gösteren, paklitaksel ve docetaksel dahil yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarının etkinliğini arttırabildiği gösterilmiştir [20].

Bitkilerde yoğun olarak bulunan flavonoidler güçlü antikanser ajanlardır. Bu özellikleri antimutajenik ve antiproliferatif etkilerinin yanında anjiyogenez ile hücre sinyal iletimi ve hücre döngüsünün kontrolündeki rollerinden de kaynaklanmaktadır [28].

1.3.2. Melanom Cilt Kanseri

Cilt kanserinin en öldürücü şekli olan malign melanom, epidermiste bulunan pigment üreten melanositlerden kaynaklanır. Melanomlar sıklıkla ciltteki benlere benzer (Şekil 1.1), bazıları bu benlerden gelişir. Melanomların çoğu siyah veya kahverengiyken, bazıları ten renginde, pembe, kırmızı, mor, mavi veya beyaz da olabilir. Malign melanom; melanositlerin olduğu deri, göz, iç kulağın mukozal epiteli ve beyin zarı gibi herhangi bir dokuda gelişebilir [34].



Şekil 1.1. Melanom cilt kanseri örnekleri [34].

Dünyada giderek artan vakalar, halk sağlığını tehdit etmektedir. Dünyada görülme sıklığı erkeklerde beşinci sırada iken kadınlarda altıncı sıradadır. Türkiye’de ise görülme sıklığı açısından onsekizinci sırada yer alan kanser türüdür [35]. Metastatik melanom, yayılmasından sonraki süreçte agresif bir yapısı olduğu için, sistemik tedaviye direnç göstermektedir. Melanom, genetik yatkınlığı olanlarda, güneşin ultraviyole radyasyonuna maruz kalmaktan kaynaklanmaktadır. Metastatik melanomlu hastaların iyileşmesini sağlayacak kanıtlanmış bir tedavi şu ana kadar bulunamamıştır. Morbiditeyi azaltmak ve iyileşmeyi arttırmak için acilen yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır [34], [36].

Son yıllarda Lamiaceae familyasına ait birçok türden elde edilen uçucu yağlar antikanser etkileri için değerlendirilmiş ve antikanser ilaçlarına kaynak oluşturabileceği kabul edilmiştir [37].

1.3.3. Hücre Kültürü

Çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, organizma dışına alınarak kontaminasyondan arı bir şekilde laboratuvar ortamında, özel tasarlanmış kaplarda, nem, sıcaklık, basınç ve besin gibi ortam şartlarının kontrol edilerek yaşatılmasına hücre kültürü denilmektedir [38], [39].

Hücre kültürünün kullanımı kanser araştırmaları, çeşitli hastalıkların tanımlanması, aşı çalışmaları, ilaç geliştirilmesi, kök hücre çalışmaları, tüp bebek ve kısırlık tedavileri gibi alanlarda sıkça tercih edilmektedir [38], [39].

Hastalıkların anlaşılmasına ve tedavi geliştirilmesine yönelik çalışmaların *in vivo* canlılar üzerinde yapılması ciddi etik sorunlara yol açmaktadır. Organizmalardaki etkileşimlerin karşılıklı olması nedeniyle tedaviye yönelik girişimlerin uygulanmasında güvenlik sıkıntısı, canlı için risk faktörleri *in vivo* alışmaları sınırlandırmaktadır.

Hücre kültürü yöntemleri ile test edilmek istenen maddenin etkileri farklı doku veya hücrelerde ayrı ayrı alışılabilirken, etkileri de doğrudan gözlemlenebilir. Hayvan deneyleriyle karşılaştırılmayacak kadar fazla hücrenin kullanılabilmesi, tekrarlanabilme imkânı ile parametrik karşılaştırmalara olanak tanınması, sonuçların kısa sürede alınabilmesi ve hayvanların deney amacıyla öldürülmesinin önüne geçilmesi hücre kültürü yönteminin avantajlarındanır [38], [40].

Son yıllarda hücre ve doku kültürleri moleküler biyoloji ve tıp alanlarında büyük oranda kullanılmış, hastalıkların teşhis, tedavi ve epidemiyolojisinde önemli adımlar atılmıştır [40].

1.3.4. Sitotoksisite

Bir bileşiğin biyolojik karakteristiğini anlayabilmek için hücreler üzerindeki toksik veya non-toksik etkisini belirlemek esastır. Sitotoksik kelimesi “hücre ölümüne neden olan” anlamına gelmektedir. *İn vitro* sitotoksisite testleri genellikle olası ilaç niteliği taşıyan maddelerin değerlendirilmesi ve sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının araştırılması amacıyla kullanılan hücre kültürü bazlı ölçüm yöntemleridir. *İn vitro* sitotoksisite çalışmaları, uygulama kolaylığı sağlaması ve *in vivo* alışmalardan elde edilen verilerle uyumlu olması nedeniyle, *in vivo* deneylere alternatif olarak doğmuş ve sıkça tercih edilir hale gelmiştir [39].

Sitotoksisite deneylerinde, hücre proliferasyonu, membran bütünlüğü, DNA sentezi veya hücresel metabolizma gibi değişik parametreler kullanılarak hücre canlılığı belirlenir. Hücre canlılığının belirlenmesi için yapılan çok sayıda ölçüm metodu bulunmakla birlikte, sitotoksisite çalışması hangi yöntemle yapılırsa yapılsın, önemli olan çalışma sonunda canlı ve ölü hücre miktarının belirlenmesidir [38], [39].

1.4. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Antimikrobiyal ilaçların çoğu, özellikle toprak bakterileri ve funguslar gibi bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal maddeler olup “antibiyotik” olarak adlandırılırlar. Çok az bir kısmı da antibiyotiklerle aynı etkiye sahip yapay olarak üretilen, “kemoterapötik ajanlar” olarak adlandırılan kimyasal bileşenlerdir. “Semi-sentetik antibiyotikler” olarak adlandırabilecek bir kısım ilaç ise doğal antibiyotiklerin bir nevi sentetik modifikasyonlarıdır. Doğal antibiyotiklerin etki mekanizmalarını arttırmak amacıyla yapay olarak modifiye edilirler [41], [42], [43].

Antimikrobiyaller, konukçudaki mikroorganizmaların üremesini durduran (mikrobiyostatik) veya öldüren (mikrosidal) bileşiklerdir. Etkili antimikrobiyal bir ilacın konukçuya zarar vermeden patojeni öldürmesi veya inhibe etmesi, yani seçici toksisite göstermesi beklenir [44].

Antimikrobiyaller etki mekanizmalarına göre sınıflandırılır ve buna göre beş grupta incelenirler [43]. Çizelge 1.5 'te gruplandırılmıştır.

Çizelge 1.5. Antimikrobiyallerin etki mekanizmalarına göre gruplandırılması.

Antimikrobiyallerin etki mekanizmaları	1. <u>Hücre duvarı sentez inhibitörleri</u>	1. Beta laktamlar (penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları) 2. Glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin) 3. Diğerleri (fosfomisin, sikloserin, basitrasin, ristosetin, ramoplanin, mersasidin, moenomisin)
	2. <u>Protein sentez inhibitörleri</u>	1. 50S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (makrolidler, ketolidler, linkozamidler, streptograminler, kloramfenikol, oksazolidinonlar) 2. 30S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (aminoglikozidler, tetrasiklinler, glisilsiklinler) 3. Diğerleri (mupirosin, nitrofurantoin)
	3. <u>Nükleik asit sentez inhibitörleri</u>	(kinolonlar, rifamisinler, metronidazol)
	4. <u>Antimetabolitler</u>	(trimetoprim-sülfametoksazol, paraamino salisilik asit)
	5. <u>Membran bütünlüğünü bozanlar</u>	1. Peptid antibiyotikler (polipeptit antibiyotikler [basitrasin, gramisidin S, polimiksinler], lineer katyonik peptitler [defensinler, maganinler], ribozomal peptitler [lantibiyotikler], diğerleri [pirokorisin, drosodoin, apiadesin]) 2. Siklik lipopeptitler (daptomisin).

Antimikrobiyal maddelerin ortak dezavantajları, yan etkiye sahip olmaları ve mikroorganizmalarda direnç gelişimine yol açmalarıdır [43].

Antimikrobiyal direncin ortaya çıkışı, antimikrobiyal maruz kalmaya karşı doğal bir evrimsel tepkidir. Mikroorganizmalar, birçok toksik maddeden zarar görmekten kaçınmak için sağlam mekanizmalar geliştirmiştir. Bu nedenle antimikrobiyal direncin mikroorganizmalarda ortaya çıkması doğal bir olgudur [41].

Doğası gereği antibiyotiklere direnç geliştirme kabiliyeti bulunan bakterilerde biyokimyasal ve yapısal özellikleri sayesinde oluşan bu direnç tipine “doğal direnç” denilmektedir. Normalde antibiyotiklere duyarlı olan bakterilerin, aşırı ve gelişigüzel antibiyotik kullanımı gibi çeşitli yollarla antibiyotiklerden etkilenmeyecek hale gelmeleri ise “kazanılmış direnç” olarak tanımlanmaktadır [14].

Antimikrobiyal ilaç direnci, mikroorganizmaların birbiri arasında ve kendi içlerinde yatay gen transferi ile rutin olarak gerçekleşir. Bu nedenle antimikrobiyal ilaçların kullanılması kaçınılmaz olarak hedef mikroorganizmalarda direnç gelişimine yol açar. Direncin gelişmesi ilaçların uygunsuz kullanımıyla hızlandırılır. Günümüzde birçok patojenin, yaygın antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç geliştirdiği bir gerçektir. Dirençli patojenlerle başa çıkmak ve enfeksiyon hastalıklarını tedavi etme yöntemlerini arttırmak amacıyla sürekli olarak yeni antimikrobiyal bileşikler araştırılmakta ve geliştirilmektedir [44].

Biyoaktif mikrobiyal ürünlerin araştırılması gün geçtikçe artmakta ve fitokimyasallar olarak bilinen bitki temelli antimikrobiyal bileşenler, gösterdikleri terapotik etki potansiyeli ile zengin bir alternatif sunmaktadırlar [42].

1.4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Test yöntemleri

1.4.1.1. Disk Difüzyon Testi:

1940 yılında geliştirilen disk difüzyon testi rutin antimikrobiyal duyarlılık testleri için resmi olarak birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan yöntemdir. Günümüzde, kabul edilen ve onaylanan birçok standart bakteri ve maya testi Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından yayınlanan kriterlere göre uygulanmakta ve yorumlanmaktadır. Bu basit ve pratik yöntemin prosedürüne göre, Mueller Hinton agar plakaları test mikroorganizmalarla inoküle edilir. Ardından, agar yüzeyine test bileşimini farklı konsantrasyonda içeren filtre kağıdı diskleri (yaklaşık 6

mm çapında) yerleştirilir. Petri kapları uygun koşullar altında (yaklaşık 24 saat 35 °C'de) inkübe edilir. Genel olarak, antimikrobiyal ajan agarın içine yayılır ve test mikroorganizmasının büyümesini inhibe eder. Her bir antibiyotik diskin etrafındaki büyüme inhibisyon bölgelerinin (zon) apları ölçülür. Zonun apı, izolatın duyarlılığı ve antimikrobiyal ajanın agar ortamı boyunca difüzyon hızı ile ilgilidir.

Bakteriyel büyüme inhibisyonu, bakteriyel ölüm anlamına gelmediğinden, bu yöntem bakterisit ve bakteriyostatik etkileri ayırt etmek için kullanılamaz. Disk difüzyon yöntemi, besiyerine yayılmış antimikrobiyal ajanın miktarını ölçmek mümkün olmadığından, minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) belirlemek için de uygun değildir. Bununla birlikte, bazı mikroorganizmalar ve antibiyotikler için inhibisyon zonları depolanmış algoritmalar ile karşılaştırılarak yaklaşık bir MİK hesabı yapılabilir.

Bunun yanı sıra, disk difüzyon deneyi diğer yöntemlere göre birçok avantaj sunar. Özel bir ekipman gerektirmeyen test basitliği, tüm duyarlılık yöntemlerine nazaran daha az maliyet, fazla sayıda mikroorganizma ile antimikrobiyal madde test etme yeteneği ve kolayca yorumlanabilen kategorik sonuçların elde edilmesi gibi avantajlar sağlamaktadır. Bitki özleri, uçucu yağlar ve diğer ilaçların antimikrobiyal taraması için yaygın kullanılan yöntemlerdendir [45], [46].

1.4.1.2. Kuyu Difüzyon Yöntemi:

Bitkilerin veya mikrobiyal ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin prosedürü disk difüzyon yönteminin prosedürüne benzer. Agar plakası yüzeyi, üzerine bir mikrobiyal inokulasyon yayılır. Daha sonra, steril bir mantar delici veya bir uç ile 6 ila 8 mm çapında bir delik aseptik olarak delinir ve kuyuya istenen konsantrasyonda (20 ila 100 mL) antimikrobiyal madde veya ekstrakt çözeltisi eklenir. Sonrasında agar plakaları test mikroorganizmasına uygun olan koşullar altında inkübe edilir. Antimikrobiyal ajan agar besiyerinde yayılır ve test edilen mikrobiyal türün büyümesini inhibe eder [45], [46].

1.4.1.3. Dilüsyon yöntemleri:

MİK değerlerinin belirlenmesi için en uygun yöntemlerdir. MİK değerleri, test edilen mikroorganizmanın büyümesini engelleyen antimikrobiyal ajanın en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır. Bu yöntemler, test edilen antimikrobiyal ajanın agar (agar dilüsyonu) veya broth besiyerinde (makrodilüsyon veya mikrodilüsyon) konsantrasyonunu tahmin etme imkânı sunarlar. Broth veya agar dilüsyon yöntemleri

bakteri ve mantarlara karşı *in vitro* antimikrobiyal aktiviteyi nicel olarak ölçmek için kullanılabilir [45], [46].

Broth dilüsyon yöntemi:

Broth mikro veya makrodilüsyon, en temel antimikrobiyal test yöntemlerinden biridir. Prosedür, minimum 2 mL hacimli tüpleri (makrodilüsyon) veya 96 oyuklu mikrotitrasyon plakasını (mikrodilüsyon) kullanarak bir sıvı büyüme ortamında antimikrobiyal maddenin iki kat seyreltmelerle sırayla dağıtılması şeklindedir. MİK, çiplak gözle tespit edildiği gibi, organizmaların tüplerde veya mikro seyreltme kuyularında büyümesini tamamen engelleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonudur. Makrodilüsyon yönteminin temel dezavantajları, her test için antibiyotik çözeltilerin hazırlanmasında hata olasılığı, manuel girişimlerin biktiriciliği, nispeten yüksek miktarda reaktif ve gerekli alandır. Bu nedenle, testin minyatürleştirilmiş hali olan mikrodilüsyon yöntemi, reaktiflerden ve alandan tasarruf sağlarken, tekrarlanabilirliği de bu yöntemin makrodilüsyon yönteminden daha fazla tercih edilmesini sağlamaktadır [45], [46].

Agar dilüsyon yöntemi:

Agar dilüsyon yöntemi, antimikrobiyal ajanın istenilen farklı konsantrasyonlarında erimiş bir agar besiyerine seri iki kat oranlı dilüsyonlar kullanılarak, tanımlanmış bir mikrobiyal inokulumun agar plak yüzeyi üzerine inokülasyonu şeklindedir. Bu yöntem antibakteriyel ve antifungal duyarlılık testlerinin her ikisi için de uygundur. Birden fazla izolat tek bir bileşiğe karşı test ediliyorsa veya test edilen madde, renklendirilmiş sıvı madde içindeki mikrobiyal büyüme tespitini maskeliyorsa genellikle agar dilüsyon yöntemi, MİK tayini için broth dilüsyon yöntemine tercih edilir [45], [46].

1.4.1.4. *Antimikrobiyal gradyan yöntemi (E-test):*

Antimikrobiyal gradyan metodu, MİK değerini belirlemek için, dilüsyon metodu prensibini difüzyon metodu ile birleştirir. Agar besiyerinde test edilen antimikrobiyal maddenin konsantrasyon gradyanını oluşturma prensibine dayanır. Prosedürde, artan bir konsantrasyon gradyanına sahip bir uçtan diğerine antimikrobiyal ajan emdirilmiş bir şerit, daha önce test edilen mikroorganizma ile inoküle edilmiş agar plakanın yüzeyine radyal bir şekilde yerleştirilir. MİK değeri, şeridin kesişme noktasında ve büyüme inhibisyonu elipsinde belirlenir. Uygulaması basit olduğu için rutin olarak klinisyenlerin taleplerini karşılamak için kullanılır. Fakat çok sayıda ilaç test edilecekse bu yaklaşım

pahalıya mal olur. Bu yöntem, sadece 1 veya 2 ilaç için MİK'in gerekli olduğu durumlarda, zenginleştirilmiş ortam veya özel inkübasyon atmosferini gerektiren titiz bir organizma test edileceği zaman (örneğin, pnömokoklu penisilin ve seftriakson) uygundur. Bu yöntem antibiyotiklerin, antifungallerin ve antimikobakterilerin MİK tayini için kullanılır [45], [46].

1.5. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BİTKİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

1.5.1. Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri

Eskiden çiçeklerinin alt dudak ve üst dudak şeklinde birleşmesinden dolayı Labiatae ismiyle bilinmekteydi. Hala kabul edilebilir alternatif bir ad olmasına rağmen, botanikçiler bu familyaya atıfta bulunmak için artık Lamiaceae ismini kullanmaktadırlar [47].

Dünya genelinde yaklaşık 250 cins ve 7.000'den fazla türe sahip bu önemli çiçekli bitki ailesi kozmopolit olup, Akdeniz'den Orta Asya'ya kadar dağılım göstermektedir [5], [37]. Türkiye, Lamiaceae familyasının önemli gen merkezlerinden biri kabul edilmekte ve ülkemizde 48 cins ve 782 takson (603 tür, 179 alt tür ve varyeteleri) ile temsil edilmektedir. Bunlardan 346 takson (271 tür, 75 alt tür ve varyeteleri) ise endemiktir [48]. Akdeniz mutfağına özgü birçok aromatik bitki türünü içeren bu aileye ait türlerin çoğu, uçucu yağ bakımından zengindir [49].

Bu familya içinde bulunan bitki türlerinden elde edilen uçucu yağlar tıbbi açıdan da öneme sahiptir. Özellikle mentol gibi uçucu yağlar solunumu açıcı buhar olarak kullanılmaktadır. Bu aromalı uçucu yağlar, vücudun terlemesini ve uyarılmasını sağlayan ısıtıcı ve uyarıcı özelliklere sahiptir. Bu nedenle bu familyaya ait bitki türlerinin çoğu kaynaklarda terletici olarak geçmektedir.

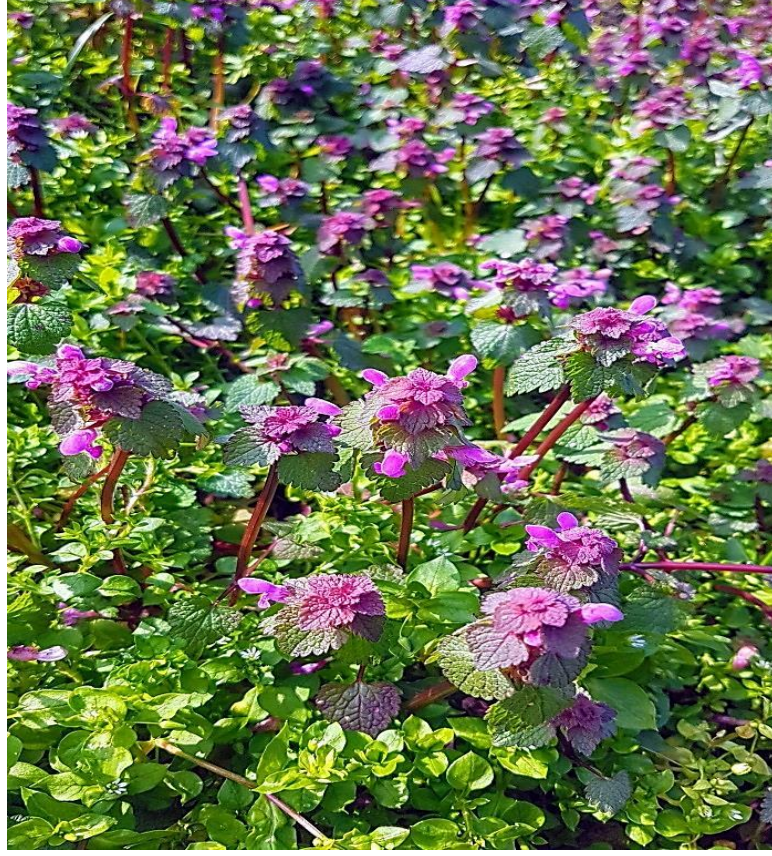
Lamiaceae familyasını diğerlerinden ayıran, kare şeklinde dört köşeli sap, karşılıklı konumlanmış yaprak yapısı ve aromalı kokularıdır [50].

Son 40 yıldır yoğun şekilde fitokimyasal yönüyle incelenmeye başlanan *Lamium* cinsi Lamiaceae familyasından olup, halk arasında "ballıbaba" olarak bilinmektedirler [8].

Geleneksel ve modern tıpta kullanılan *Lamium* türlerinin astrinjent (büzücü), antispazmodik ve antienflamatuar özellikleri bilinmekte, ayrıca travma, kırık, yara iyileşmesi, idrar söktürücü, böbrek ve sindirim eliminasyon işlevini artırma,

enfeksiyonlar, felç, yüksek tansiyon, menoraji ve uterus kanaması gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [8], [51]–[54].

1.5.1.1. *Lamium purpureum* L.



Şekil 1.2. *Lamium purpureum* L.

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Asteridae

Takım: Lamiales

Familya: Lamiaceae

Genus: *Lamium*

Tür: *Lamium purpureum* L.

Kırmızı ölü ısırgan otu adıyla bilinen bu türün çiçekleri iki dudaklıdır ve pembeden koyu kırmızımsı-mor renklere kadar değişen renklindedir. 10 ila 18 mm uzunluğundadır, çiçekleri yoğun olarak tepede sapın etrafında dağınık bir şekilde sık bulunur (Şekil 1.2).

Çiçekler hermafrodit olup, hem erkek hem de dişi organlara sahiptir ve çoğunlukla arılar tarafından tozlanır. Kırmızı ölü ısırgan otunun dişli, kalp şeklinde, ince tüylü yapraklarının tümü çiçeğin hemen üstünde ve altında tümüyle takip edilir. Gövde ve üst yapraklar morumsu olurlar ve çiçeğin hemen altında ve üstünde olanlar genellikle çarpıcı derecede koyu bir maviye döner [55].

Bu bitkilerin terletici, diüretik (idrar söktürücü), astrenjan (damar veya dokuları büzücü), purgatif (müshil) ve stiptik (kanama durdurucu) özellikleri vardır. Kaynatılarak hazırlanan özü, hemoraji kontrolünde yararlıdır. Ezilmiş yaprakları kesik ve yaralar için kullanılır [56].

Çoğu toprak ve koşullara tolerans gösterir. Genellikle yılın hemen hemen her döneminde çiçek açan bir bahçe otudur ve hava ılıman olduğunda kış mevsiminde dahi tohum çimlenebilir [57].

1.5.1.2. *Lamium galeobdolon* (L.) L.



Şekil 1.3. *Lamium galeobdolon* (L.) L.

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Asteridae

Takım: Lamiales

Familya: Lamiaceae

Genus: *Lamium*

Tür: *Lamium galeobdolon* (L.) L.

Sarı başmelek adıyla bilinen *Lamium galeobdolon* (L.) L. yaklaşık 40 ila 80 cm arasında bir yüksekliğe ulaşabilen, çok yapraklı, çok yıllık, istilacı bir türdür. Dişli kenar yapılı yapraklar, eşleşmiş karşıt yapıda ve oval tiptedir. Çiçek dudaklarının dış yüzeyi parlak sarı renktedir. Kirpik benzeri tüylerle saçaklı gibi görünen üst dudak tek loblu ve kask şeklindedir, daha az tüylü alt dudak ise merkezi üçgensel ve çoğunlukla turuncu renk çizgi ile benzer büyüklükte üç loba bölünür (Şekil 1.3) [58].

Bu bitkilerin antispazmodik (spazm giderici), anstrenjan (damar veya dokuları büzücü), diüretik (idrar söktürücü), ekspektorant (balgam söktürücü), stiptik (kanama durdurucu) ve vazokonstriktör (kan damarlarını daraltıcı) özellikleri vardır. Çok kolay yetişen bir bitki olup, çoğu toprak ve koşullara toleranslıdır. Gölge alanları sever ve ağır killi topraklarda daha iyi yetişir [59].

1.6. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

El-Gazzar ve Watson, 1970 yılında Lamiaceae familyasına ait cinslerin uçucu yağ içerikleriyle ilgili bir gruplandırma yapmışlardır. Bu gruplandırmada Grup A üyeleri yağ bakımından fakirken, Grup B üyeleri ise ticari öneme sahip ve ekimi yapılan yağ bakımından zengin cinsleri içermektedir [60]. *Lamium* cinsi de yağ bakımından fakir olmasından dolayı Grup A'da konumlandırılmıştır [61].

Uçucu yağ eldesi zor olmasına karşın, daha önce yapılmış çalışmalarda *Lamium* cinsine ait uçucu yağların içerik bakımından zengin ve antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu görülmüştür [62], [63].

Bazı *Lamium* türlerinin biyolojik aktiviteleri üzerine farklı ekstratlarıyla çok sayıda çalışmalar yapılmış, anti-enflamatuar, antioksidan, antifungal, antiproliferatif ve antimikrobiyal etkileri olduğu kaydedilmiştir [52], [64], [65].

Lamium album türü *Lamium* cinsleri içerisinde üzerinde en yoğun çalışılan türdür. Bu türün kabızlığın tedavisinde kullanıldığı, bununla birlikte antihemorajik ve antimikrobiyal etkisinin de olduğu rapor edilmiştir [66]–[68]. *L. album*'un 3 farklı ekstratının insan derisi fibroblastlarının (HSF) *in vitro* büyümesine etkisi test edildi. Sonuç olarak umut veren antikanser etkiye sahip bir bitki olmasının yanında, serbest radikalleri süpürme etkisi gösterdiği, antioksidan etkiye sahip olduğu ve yara iyileştirici özelliği bulunduğu kaydedilmiştir [4], [69].

Lamium album ve *Lamium amplexicaule* türlerinde tanımlanan kaempferolün, tümörlerde antioksidan, antiproliferasyon, antimetastatik ve antianjiyojenetik aktivitelere sahip bir madde olduğu bilinmektedir [29], [70].

Yapılan bir başka çalışmada İtalya'da yetişen dört *Lamium* türünün uçucu yağ analizi GC-MS ve SPME yöntemleri ile yapılmış ve toplamda yüz beş bileşik tanımlanmıştır. Bu türler yüksek oranda germacren D içeriği ile karakterize edilmiştir. *L. purpureum* (%35,4), *L. hybridum* (%39,0) ve *L. bifidum* (%34,9) bitkilerinde germacren D ana bileşik iken, *L. amplexicaule*'de (%28,9) ikinci bileşendir. *L. amplexicaule*'de ana bileşen, trans-krizantenil asetat (%41,1) olarak tespit edilmiştir. Uçucu yağlarda tespit edilen diğer önemli bileşenlerin *L. purpureum*'da β -pinen (%26,8) ve α -pinen (%13,4); *L. hybridum*'da (Z)-osimen (%8,7), metil salisilat (%7,5) ve β -karyofillen (%6,1); *L. bifidum*'da sabinen (%12,4), β -karyofillen (%11,5) ve α -humulen (%6,8); son olarak *L. amplexicaule*'de ise α -pinen (%6,8) olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan SPME tekniği ile, bitkiler tarafından yayılan uçucu maddeler hızlı ve kolay bir şekilde örneklenirken, bu sayede farklı türlerin, hatta bir bitkinin farklı kısımlarının (yaprak, çiçek ve brakte) yaydığı uçucu maddelerin çok farklı olduğu tespit edilmiştir [71].

Alipieva ve arkadaşları tarafından, *L. album* L., *L. amplexicaule* L., *L. garganicum* L., *L. maculatum* L. ve *L. purpureum* L.'nin LC-ESI-MS analizi yapılmış ve bu yöntemle daha önce kaydedilmemiş iridoidler rapor edilmiştir. *L. album*, *L. maculatum* ve *L. purpureum*'da şanzizid metilester ve barlerin ilk kez bu çalışmada kaydedilmiştir. *L. purpureum*'da lamalbid, *L. maculatum*'da sesamosid ve *L. amplexicaule*'de ise 5-deoxylamiol yeni bileşenler olarak bulunmuştur [72].

L. purpureum L. üzerinde yapılan çalışmalarda, antioksidan düzeyinin orta seviyede olmasına karşın yine de önemli sayılabilecek etkinliği olduğu vurgulanmıştır. Metanol ekstratla yapılan bir başka çalışmada *L. purpureum* L. çiçekleri için antioksidan ve serbest radikal temizleme aktiviteleri sergilediği rapor edilmiştir [52], [73].

Roussis ve arkadaşlarının 1996'da yapmış olduğu çalışmaya göre *Lamium garganicum* bitkisinden elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri GC-MS yöntemi ile aydınlatılmış, 1,8 cineole (%47,5), sitronellal (%25,1) ve 2-metoksi-4- (2-propenil) fenol (isoeugenol) (%11,8) olarak belirlenmiştir. Ayrıca uçucu yağ, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının da içinde bulunduğu altı farklı bakteri üzerinde bakteriyostatik etki göstermiştir [63].

Lamium maculatum üzerinde yapılan bir çalışmada, uçucu yağın içeriği belirlenerek, orta düzeyde bulunan antimikrobiyal etkinliğinin yanında insektisidal özelliğe de sahip olduğu ortaya konmuştur. Uçucu yağ içeriğinde yüksek oranda β -kariofilen, kariofilen oksit, Z, E- α -farnesene, dihidroedulan I bileşenleri tespit edilmiştir [62].

Çok sayıda laboratuvar çalışması polifenollerin serbest radikal terminatörleri gibi davrandıkları için, önemli antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. *Lamium amplexicaule* bitkisinin metanol ekstratı ile yapılan çalışmada toplamda %9,98 fenolik bileşen, %21 flavanoid, %22 feniletanoid ve %28 oranında iridoid içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca *L. amplexicaule*'nin de olduğu 23 bitkinin, 3 farklı hücre hattı üzerinde (EAC, HepG2 ve U251) yaptıkları antikanser taraması sonucu *L. amplexicaule*'nin antikanser etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir [74].

Yalçın ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada 4 farklı *Lamium* türünün (*L. eriocephalum* Benth subsp. *eriocephalum*, *L. garganicum* L. subsp. *laevigatum* Arcangeli, *L. garganicum* L. subsp. *pulchrum* R. Mill, and *L. purpureum* L. var. *purpureum*) 4 farklı ekstresi (metanol, diklorometan, n-butanol ve sulu ekstreleri) hazırlanmış ve mikrodüzyon yöntemi ile antimikrobiyal özelliklerine bakılmıştır. Orta düzeyde antimikrobiyal etkinlikleri tespit edilen ekstreler maya türlerine karşı bakterilerden daha fazla etki göstermişlerdir. Ayrıca bu bitkilerin n-butanol ekstrelerinin metanol, sulu ve diklorometan ekstreleri ile karşılaştırıldığında tüm doz seviyelerinde yüksek radikal süpürme etkinliği gösterdiği ortaya koyulmuştur [64].

Lamium tenuiflorum bitkisinin etanol ekstratı ile yapılan bir çalışmada ise, bitki ekstresinin antifungal etkisi olduğu belirlenmiştir [65].

Çalışmamızda, *Lamium purpureum* L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. türlerinden elde edilen etanol ekstraların kimyasal içeriği ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesinin yanında ayrıca uçucu yağlarının antimikrobiyal ve antikanserojen aktivitelerini de inceledik. İki bitkinin uçucu yağlarıyla ilgili daha önce yalnızca kimyasal içerik tayini olmasına karşın, literatürde biyoaktivite özellikleri hakkında çalışma bulunamamıştır. Çalışmamız bu alanda ilk niteliğindedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. BİTKİ MATERYALLERİNİN HAZIRLANMASI

Araştırmada, Düzce ilinde doğal olarak yetişen *Lamium purpureum* L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. bitki türleri kullanılmıştır. Bitkiler, Düzce, Gölyaka, Efteni Gölü civarından, 120 m rakımda, çiçeklenme dönemlerine göre *Lamium purpureum* L. bitkisi Mart 2018 ve Mart 2019 tarihlerinde, *Lamium galeobdolon* (L.) L. ise Nisan 2018 ve Nisan 2019 tarihlerinde toplanmıştır. Bitkilerimiz Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Ersin Karabacak tarafından teşhis edilmiştir.

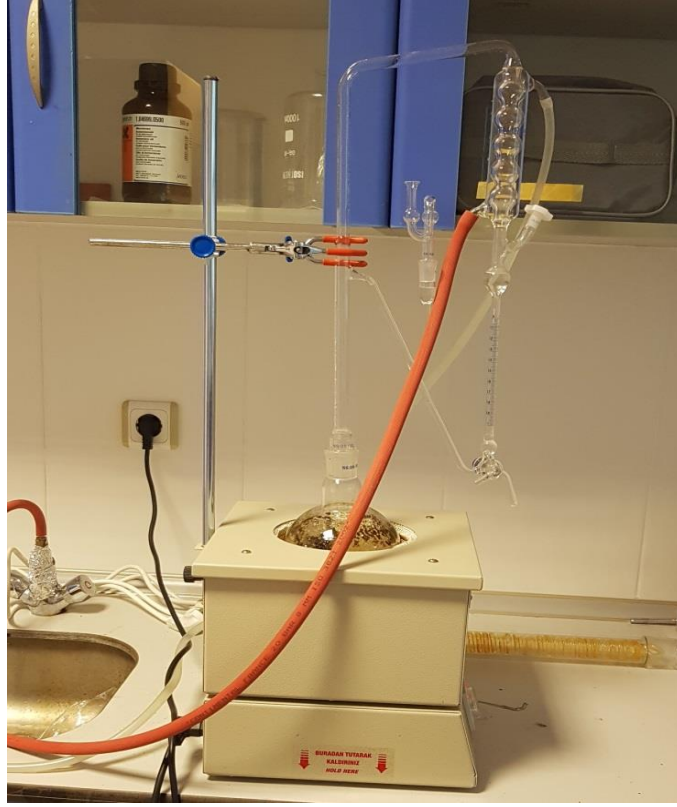
Toprak üstü kısımları (gövde, yaprak ve çiçek) toplanan bitkiler açık havada, doğrudan güneş almayan gölge bir yerde, herbaryum tekniklerine göre kurutularak, blenderdan geçirilmiştir.

2.2. ETANOL EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI

Toz haline getirilen her bir bitkiden 20 gr tartılarak üzerilerine 180 mL %96'lık etanol ilave edilmiştir. Soxhlet cihazında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinden sonra elde edilen ekstratlar +4 °C'de saklanmıştır.

2.3. UÇUCU YAĞLARIN HAZIRLANMASI

Bitkilerin her birinden 50 gr alınarak, 300 mL su ile Clevenger cihazında 2,5-3 saat süre ile hidrodistilasyon yöntemi ile yağ ekstraksiyonu yapıldı (Şekil 2.1). Ayırma hunisinde 3 kez eterle muamele edilerek su ve yağ fazları ayrıştırıldı ve yağ kısmı ayrıştırma hunisi yardımı ile behere alındı (Şekil 2.2). Sodyum Sülfat (Na₂SO₄) tuzuyla muamele edilerek su tamamen uzaklaştırıldı. Karışım filtre kâğıdından (Whatman No:1) süzüldü. Rotary evaporatörde 150 rpm basınç ve ortalama 20-24 °C sıcaklık altında eter uçurularak saf uçucu yağ elde edildi (Şekil 2.3). *L. purpureum* L. ve *L. galeobdolon* (L.) L. bitkilerinden 600 gr kullanıldı. *L. purpureum* L.'den 3,5 gr, *L. galeobdolon* (L.) L.'den ise 7,20 gr saf uçucu yağ elde edildi (Şekil 2.4). Uçucu yağlar +4 °C'de buzdolabında saklandı.



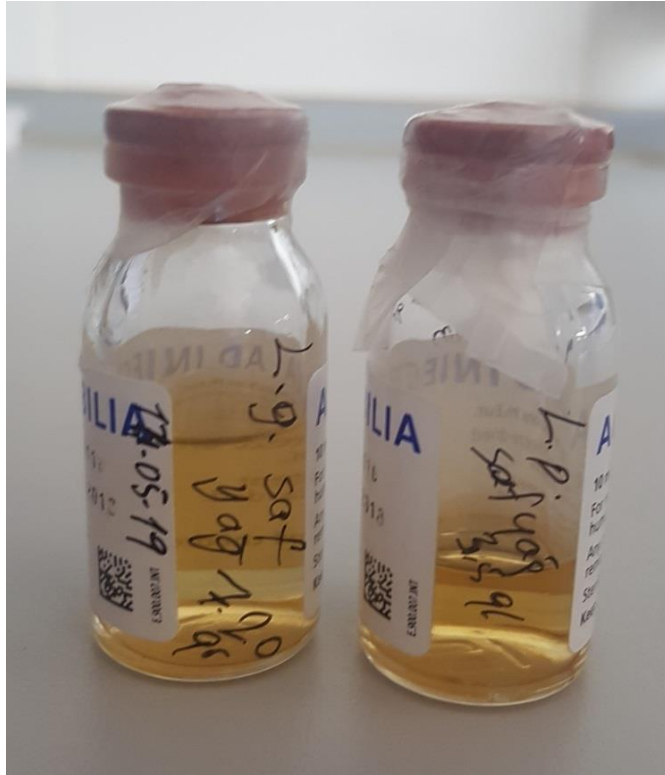
Şekil 2.1. Clevenger cihazında uçucu yağ ekstraksiyonu.



Şekil 2.2. Ayırma hunisinde su-yağ ayrımının yapılması.



Şekil 2.3. Rotary evaparatörde eterin uzaklaştırılması.

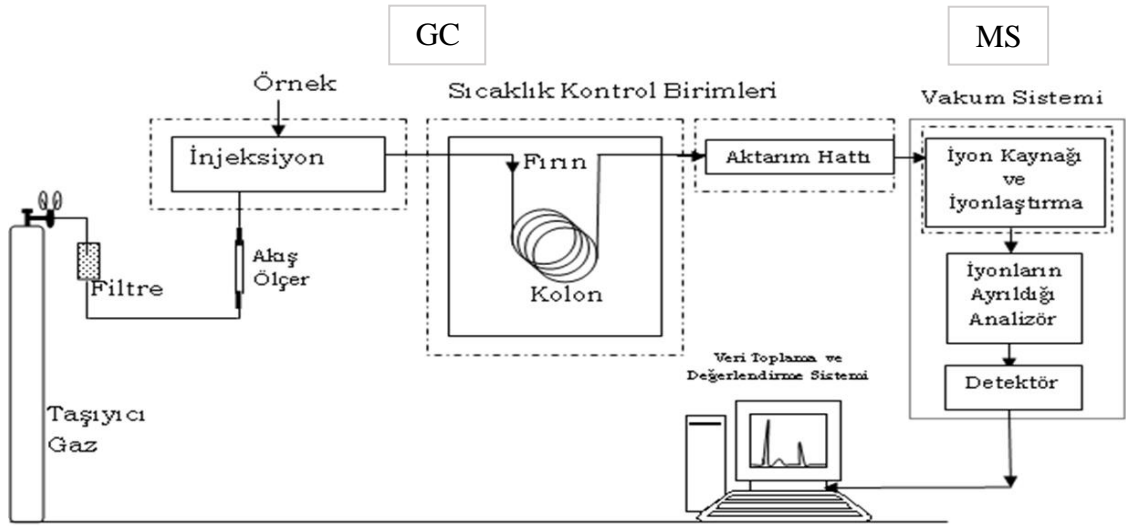


Şekil 2.4. Elde edilen uçucu yağ numuneleri.

2.4. GC-MS ANALİZİ

L. purpureum L. ve *L. galeobdolon* (L.) L. bitkilerinden hazırlanan etanol ekstraktları, içeriği belirlenmek üzere Kastamonu Üniversitesi, Merkez Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'na GC-MS analizine gönderilmiştir.

GC-MS adından da anlaşıldığı gibi iki farklı tekniğin birleşiminden oluşmaktadır. Gaz kromatografisi (GC) cihazında karışımdaki gazlar birbirinden ayrılarak iyonlaşır, ardından bir ara akım hattı ile kütle spektrometresi (MS) cihazına aktarılır. Bu kısımda maddelerin kütlelerine bağlı olarak içeriği belirlenmektedir. Her iki cihazın şartları ayrı ayrı ayarlanmalıdır. Şekil 2.5'te çalışma prensibi gösterilmiştir [75].



Şekil 2.5. GC-MS cihazı.

Kimyasal bileşenlerin tanımlanması için daha önce Canlı ve arkadaşları [76] tarafından tanımlanan yönteme dayanılarak her numune HP5-MS kılcal sütun (30 m x 0.25 mm; kaplama kalınlığı 0.25 μm) ile donatılmış Agilent GC 6890N-Agilent MS 5973 model bir cihazda analiz edildi. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanıldı (1 mL / dak). Bölünme oranı 10: 1'de ayarlandı. Enjektör sıcaklığı 350 °C; basınç 48.2 kPa, ayrık akış 9.9 mL / dak idi. MS tarama koşulları, 280 °C'lik bir transfer çizgisi sıcaklığı, 280 °C'lik bir arayüz sıcaklığı ve 230 °C'lik bir iyon kaynağı sıcaklığıydı. Bileşenlerin tespiti, alıkonma sürelerine göre Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST Kütle Spektrometresi Veri Merkezi) veri kütüphanesi ile eşleştirilerek yapıldı ve daha önce yayınlanmış verilerle çapraz kontrol uygulandı.

2.5. ANTIOKSİDAN, OKSİDAN KAPASİTE VE OKSİDATİF STRES İNDEKSİNİN BELİRLENMESİ

2.5.1. TAS (Total Antioksidan Seviyesi) Çalışma Yöntemi:

TAS ölçümü Relassay marka ticari kit ile yapıldı (Relassay, Türkiye). Her iki bitkiden elde edilen etanol ekstratlarıyla çalışılmıştır.

Erel tarafından geliştirilen bu yöntemde, numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikal solüsyonunu, renksiz ABTS formuna çevirir. ABTS, konsantrasyonlarına ve antioksidan kapasitelerine göre antioksidanlar tarafından çözülebilen 2,2V-azinobis- (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonudur ve hidrojen peroksit varlığında, oksitlendiğinde karakteristik absorpsiyon spektrumuna sahip ürün üretir. Spektrofotometrede 660 nm absorbansda takibi yapılan reaksiyonda rengin açılma oranı numunenin total antioksidan miktarıyla ilişkilidir. Reaksiyon, Trolox Equivalent adı verilen E vitamini benzeri stabil antioksidan standardı ile kalibre edilir. Sonuçlar mmol Trolox Eq/L olarak verilir [77], [78].

2.5.1.1. Kit İçerisindeki Bileşenler:

Reaktif 1: Tampon çözeltisi (0,4 mol/L pH 5,8 asetat tamponu)

Reaktif 2: Prokromojen çözeltisi (30 mmol/L ABTS)

Standart: Trolox 1 mmol/L

QC Level 1 (Negatif Kontrol) : Trolox 0,5 mmol/L

QC Level 2 (Pozitif Kontrol) : Trolox 2,0 mmol/L

2.5.1.2. Çalışma adımları:

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS300 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı. Her iki bitkiden elde edilen etanol ekstratları ile total antioksidan kapasite belirlenmiştir.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1'den 300 µl alındı, numuneden 18 µl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra 660 nm'de ilk okuma yapıldı. Ardından Reaktif 2'den 45 µl karıştırıldı ve inkübatörde 5 dakika bekletilip 660 nm'de ikinci okuma yapıldı. Her iki bitkinin etanol ekstratı, standart ve kontroller için işlemler yukarıda anlatıldığı şekilde sırasıyla gerçekleştirildi.

2.5.2. TOS (Total Oksidan Seviyesi) Çalışma Yöntemi:

TOS ölçümü Relassay marka ticari kit ile yapıldı (Relassay,Türkiye). Her iki bitkiden elde edilen etanol ekstratlarıyla çalışılmıştır.

Erel tarafından geliştirilen bu yöntemde numunede varolan oksidanlar, ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyona okside eder. Oksidasyon reaksiyonu ortamda bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile prolonje edilir. Ferrik iyon asidik ortamda kromojen ile renkli bir bileşik oluşturur. Spektrofotometrede ölçülen rengin koyuluğu numunedeki oksidan moleküllerinin toplam miktarını verir. Kitin kalibrasyonu hidrojen peroksit ile yapılır, sonuçlar litre başına düşen mikromol hidrojen peroksit olarak verilir ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$) [79].

2.5.2.1. Kit İçerisindeki Bileşenler:

Reaktif 1: Tampon çözeltisi (25 mM pH 1.75 H_2SO_4 çözeltisinde)

Reaktif 2: Substrat çözeltisi (25 mM pH 1.75 H_2SO_4 çözeltisinde 5 mM ferröz iyon, 10 mM o-dianisidine)

Standart: H_2O_2 $\mu\text{mol/L}$

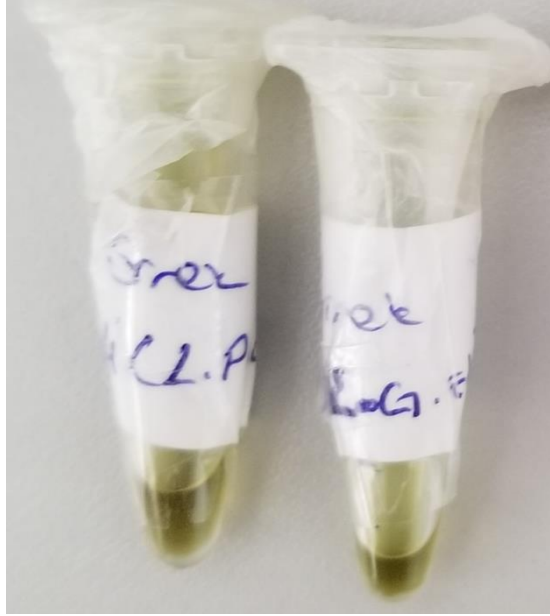
QC Level 1 (Negatif Kontrol) : H_2O_2 5 $\mu\text{mol/L}$

QC Level 2 (Pozitif Kontrol) : H_2O_2 20 $\mu\text{mol/L}$

2.5.2.2. Çalışma adımları:

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS300 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı. Her iki bitkiden elde edilen etanol ekstratları ile total oksidan kapasite belirlenmiştir.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1'den 300 μl alındı, numuneden 45 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 530 nm'de yapıldı. Ardından Reaktif 2'den 15 μl karıştırıldı ve inkübatörde 5 dakika bekletilip 530 nm'de ikinci okuma yapıldı. Her iki bitkinin etanol ekstratı, standart ve kontroller için işlemler yukarıda anlatıldığı şekilde sırasıyla gerçekleştirildi.



Şekil 2.6. TAS - TOS deneylerine sokulan bitki etanol ekstreleri.

2.6. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

Antimikrobiyal aktivitenin tayini disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Bunun için iki adet bitkiden elde edilen uçucu yağların üç farklı konsantrasyonu (50 µL, 75 µL ve 100 µL) kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan test mikroorganizmaları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Test Mikroorganizmaları.

Gram pozitif bakteriler	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>
Gram negatif bakteriler	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>
Maya mantarları	<i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. guilliermondii</i>

2.6.1. Test Mikroorganizmalarının Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları daha önce Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’ndan temin edilmiş ve +4°C’de stoklanmıştır. Kullanılacak olan bakteri ve maya kültürlerinin aktif hale getirilmesi için, önceden hazırlanan Nutrient Broth besiyerlerine mikroorganizmalar ayrı ayrı inoküle edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik kültürlerin turbiditesi 0,5 McFarland’a göre steril serum fizyolojik ile ayarlandı.

2.6.2. Disk Difüzyon Metodunun Uygulanması

20 mL Mueller Hinton Agar (MHA) dökülen steril petri kaplarına, hazırlanan mikroorganizma kültürlerinden McFarland 0,5 oranında ayrı ayrı ekim yapıldı. Bunun için, steril eküvyon çubukları mikroorganizma kültürlerine daldırılarak, petri kaplarına sık aralıklarla taranmak suretiyle inoküle edildi. Tüm petri kapları 10-15 dakika kadar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu esnada daha önce steril edilen 6 mm çapında boş kağıt disklerle 3 farklı konsantrasyonda olacak şekilde, sırası ile 50 µL, 75 µL ve 100 µL miktarında uçucu yağ mikropipet yardımıyla emdirildi. Bu diskler daha önce ekim yapılan petri kaplarına farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde 3 ayrı bölgeye uygun aralıklarla yerleştirildi. Bakterilerin inoküle edildiği petri kapları 35-37 °C’de, mayalarınki ise 25-27 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları mm cinsinden cetvel yardımıyla ölçüldü. Mukayese amaçlı olarak, standart 6 mm çapındaki antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite deneyleri, tüm test mikroorganizmaları için 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

2.7. ANTİKANSEROJEN AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

2.7.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

B16F10 melanom hücreleri Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Merve Alpay’dan temin edilmiştir.

Lamium purpureum L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. bitkilerinden elde edilen uçucu yağların *in vitro* antikanser aktivite potansiyellerini belirlemek amacıyla deneylerimizde melanom hücre hattı (B16F10) kullanıldı. Hücreler kriyotüpler içinde -80°C’de saklandıkları derin dondurucudan çıkartılarak, steril su banyosunda 37°C sıcaklıkta çözdürüldü. Tüpler %70’lik alkolle olası bir kontaminasyonu önlemek için silindi. Tekrar laminar akımlı kabine alınan hücreler hafifçe pipetaj yapılarak dağıtıldı ve serumlu besiyerinin (%20 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin, %1 non-essential aminoasit içeren DMEM besiyeri) olduğu falcon tüpe aktarıldı. 1200 rpm devirde 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüp tekrar alkolle silinerek laminar akımlı kabine alındı ve üstte kalan medyum uzaklaştırıldı.

Tüpte kalan hücreler, içinde hücre üremesine uygun DMEM besi ortamı olan T75 cm²’lik hücre kültürü üretme kabına (flask) aktarıldı. Laminar kabinden alınarak

37°C’de %5 CO₂ içeren nemli inkübatöre koyuldu. Dondurma işleminden sonra ilk kez çözdürülen hücreler, yeniden geçerli morfolojilerini göstermeleri ve standart büyüme eğrilerine ulaşmaları için deneylere başlamadan önce 4 kez pasajlandı (subkültür). Daha sonra deneylerde kullanıldı.

Tam tabaka oluşturmuş B16F10 melanom hücreleri, devamlılıklarının sağlanması için pasajlandı. Deneylerden önce, çözülen ve kültür kabı yüzeyini kaplayan hücreler subkültüre edildi. Hücrelerin bir kısmı, 1 ml’lik vialler içerisinde, %20 Fetal bovine serum ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren dondurma kültür vasatında dondurularak -80°C’de saklandı. Diğer hücrelerin büyümeleri invert mikroskobu (hücre kültürü mikroskobu) kullanılarak kontrol edildi.

Flasklarda tam tabaka oluşturmuş hücrelerin, yapıştıkları yüzeyden kaldırılması amacıyla, flasklar önce alkolle silinerek laminar kabine alındı. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyi, kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Sonrasında PBS uzaklaştırılarak, 3-4 ml Tripsin/EDTA enzim çözeltisi ile 3 ila 8 dakika süre ile 37 °C’de inkübe edildi.

Tutulduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine 6 ila 8 ml kadar besiyeri eklendi ve 800 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan medyum alındıktan sonra, kalan peletin üzerine uygun miktarda medyum ilave edilerek pipetlendi ve 37 °C sıcaklıkta, %10 serum ve %1 antibiyotikli DMEM besi ortamı ile hücreler yeniden süspanse edildi. Süspansiyon 3 adet T75 kültür kabına bölündü. Bu şekilde 4 seri pasaj yapılarak hücre pasajlama işlemi tamamlandı ve hücrelerin devamlılığı sağlandı [39], [40].

2.7.2. Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi (MTT Yöntemi)

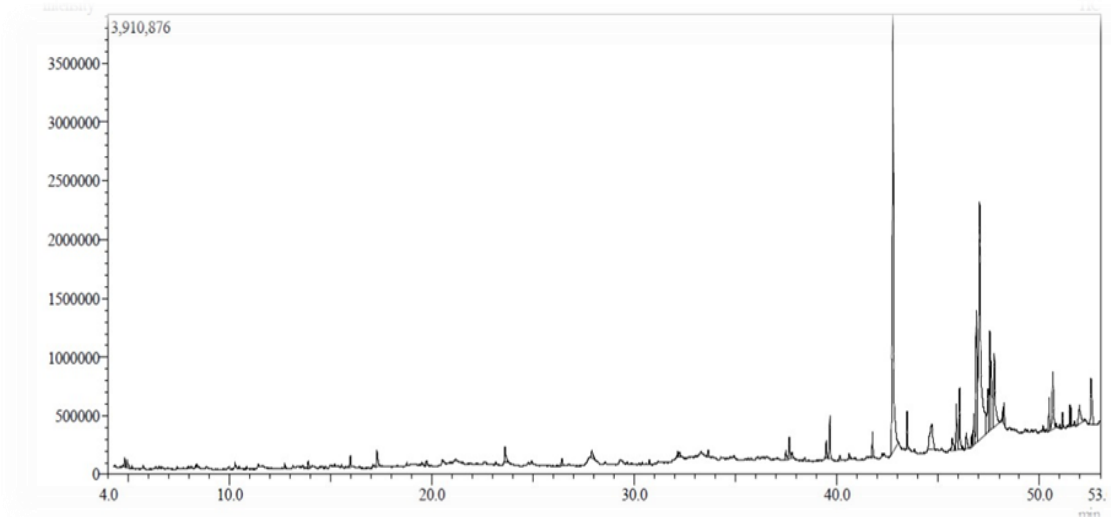
Deney gruplarının çoğalma hızları ve canlılıkları, MTT [3-(4,5- dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid] yöntemi ile belirlenmiştir. MTT, pozitif yüklü bir bileşiktir ve ökaryot hücrelerin membranından kolayca geçebilir. Hücre içerisinde mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi ile indirgenerek, suda çözünmeyen mavi formazan kristallerine dönüşür. Sadece aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde formazan oluşumu görülür. Formazanın oluşumuyla görülen renklenme, hücre canlılığının göstergesi olarak kabul edilir. Hücre membranı içinde biriken kristaller DMSO ile çözüldükten sonra, canlılıkla doğru orantılı olarak oluşan renk, spektrofotometrede 540 nm ila 570 nm arasındaki dalga boyunda ölçülür. Spektrofotometrik olarak belirlenen değer, hücre sayısı ile ilişkilendirilir [39], [40].

Hücre proliferasyonu ve sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla T75 flasklarda %70-80 yoğunluğa ulaşmış B16F10 melanom hücreleri, 96 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucukta eşit olacak şekilde 5×10^4 hücre/100 μ l ekildi. Hücre ekimi yapıldıktan sonra 1 gece karbondioksitli etüvde inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklara 7 farklı konsantrasyonda uçucu yağ içeren (1,5 μ g/mL, 3 μ g/mL, 6 μ g/mL, 12 μ g/mL, 25 μ g/mL, 50 μ g/mL ve 100 μ g/mL) ve içermeyen (kontrol) dozlar uygulandı. Deney gruplarının 24 saat ve 48 saat etüvde inkübasyonundan sonra, kuyucuklara kit içeriğine uygun olarak; 10:1 (toplam besiyeri: MTT ajanı) oranında MTT ajanı ilave edildi. 4 saatlik inkübasyonun ardından 1:1 (besiyeri: solüsyon) oranında çözücü solüsyon (DMSO) ilavesiyle oluşan formazan kristalleri çözüldü. Son olarak oluşan renkler 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü.

3. SONUÇ

3.1. GC-MS ANALİZİ SONUÇLARI

Bu çalışmada, GC-MS yöntemi kullanılarak *L. purpureum* L.'nin etanol ekstresinde, toplam içeriğin %99,67'sini temsil eden 49 bileşik tanımlandı. Ana bileşikler palmitik asit (%22,55), 7-tetradekenal (%20,65), 9,12-oktadecadienoik asit (%7,40), oktadekanoik asit (%4,80), (Sikloheks-2-enil) asetik asit (%4,48), etil 9,12,15-oktadekatrienoat (%3,50) ve heksatriakontan (%3,36) olarak tespit edildi. Diğer maddelerin ise %3'ten daha düşük oranlarda seyrettiği görüldü. Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1, *L. purpureum* L. etanol ekstresine ait GC-MS analiz sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 3.1. *L. purpureum* L. etanol ekstresinin GC-MS analiz kromatogramı.

Çizelge 3.1. *L. purpureum* L. etanol ekstresinin kimyasal kompozisyonu.

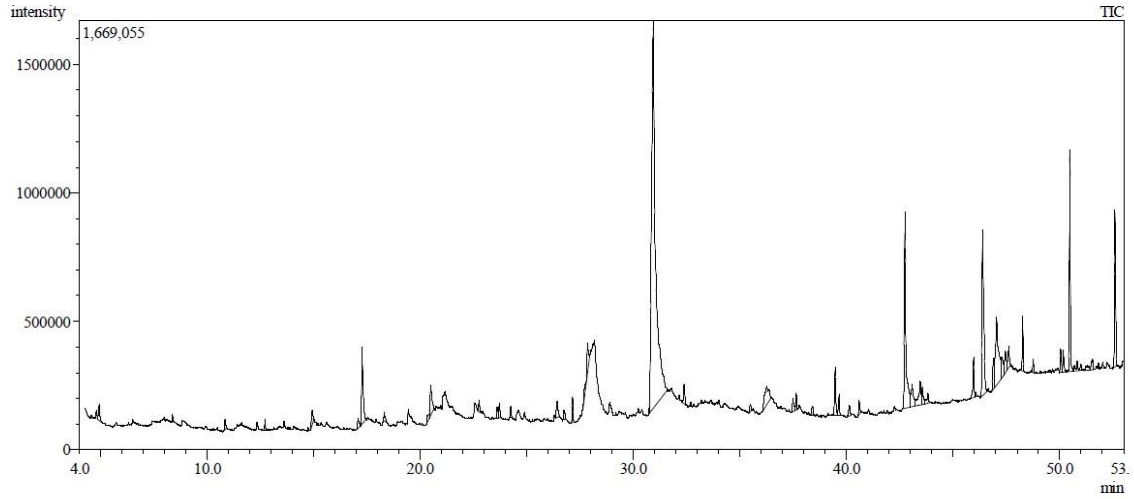
Peak#	İçerik	% Komp.	A.Süresi
1	PYRROLIDINE-.ALPHA.,.ALPHA.,.ALPHA.'..ALPHA.'-D4	0,19	4.832
2	PYRROLIDINE-.ALPHA.,.ALPHA.,.ALPHA.'..ALPHA.'-D4	0,34	4.960
3	D-Limonene	0,14	12.725
4	Isoxazole, 3,5-dimethyl- (CAS)	0,19	13.906
5	Ethyl 1-pyrrolidineacetate	0,36	15.973
6	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	0,78	17.288
7	Dianhydromannitol	0,16	19.727
8	Guaiacol <4-vinyl->	0,84	23.615
9	2-Pyrrolidinecarboxylic acid-5-oxo-, ethyl ester	0,50	27.895

Çizelge 3.1.(devam) *L. purpureum* L. etanol ekstresinin kimyasal kompozisyonu.

Peak#	İçerik	% Komp.	A.Süresi
10	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl- (CAS)	0,15	30.738
11	Fumaric acid, 2,4-dimethylpent-3-yl ethyl ester	0,24	32.149
12	Megastigmatrienone	0,17	32.265
13	Megastigmatrienone	0,21	33.645
14	Tetradecanoic acid	0,44	37.486
15	Benzyl Benzoate	1,01	37.651
16	(-)-Loliolide	0,33	37.775
17	Neophytadiene	0,63	39.474
18	Phytone	1,39	39.653
19	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	0,21	40.142
20	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- (CAS)	0,20	40.604
21	Hexadecanoic acid, methyl ester	0,86	41.760
22	Palmitic acid	22,55	42.770
23	Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	1,28	43.466
24	Hexatriacontane	2,95	44.676
25	1-Nonadecanol	0,80	45.693
26	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (CAS)	1,79	45.906
27	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester (CAS)	2,69	46.062
28	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)	0,15	46.195
29	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- (CAS)	0,83	46.392
30	Methyl stearate	0,41	46.649
31	Methyl 5,6-octadecadienoate	1,02	46.764
32	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	7,40	46.892
33	7-Tetradecenal, (Z)-	20,65	47.050
34	n-Propyl 9,12-octadecadienoate	2,88	47.470
35	Octadecanoic acid	4,80	47.551
36	Ethyl 9,12,15-octadecatrienoate	3,50	47.626
37	(Cyclohex-2-enyl)acetic acid	4,48	47.778
38	Octadecanoic acid, ethyl ester	0,50	48.200
39	17-Octadecen-14-yn-1-ol	0,78	48.252
40	3-Cyclopentylpropionic acid, 2-dimethylaminoethyl ester	0,22	50.180
41	Eicosane	1,15	50.482
42	Hexatriacontane	3,36	50.669
43	9,12,15-Octadecatrien-1-ol, (Z,Z,Z)-	0,14	50.996
44	Eicosanoic acid, methyl ester (CAS)	0,53	51.147
45	3-methyl-5-(2,6-dimethylheptyl)-1,5-Pent-2-enolide	0,81	51.502
46	Cyclohexane, 1,4-dimethyl-2-octadecyl-	0,63	51.550
47	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0,23	51.742
48	Eicosanoic acid (CAS)	1,35	51.971
49	Stearate <ethyl->	2,49	52.550
	Total	99,67	

A.Süresi: Alıkonma Süresi Komp.: Kompozisyon

L. galeobdolon (L.) L. bitkisinin etanol ekstratı için de GC-MS yöntemiyle içerik analizi yapılmıştır. Çıkan sonuçlar Şekil 3.2 ve Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Toplam içeriğin %98,08’i tanımlanmıştır. Buna göre ana bileşenler 2(3H)-benzoksazolun (%38,92), palmitik asit (%8,18), 2-heksadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil (%7,25), eikosan (%5,80), 9,12-octadekadienoik asit (%4,93) ve tetrakosan (%3,88) olarak bulunmuştur. Diğer tanımlanan maddeler %3 oranından daha az bulunmaktadır.



Şekil 3.2. *L. galeobdolon* (L.) L. etanol ekstresinin GC-MS analiz kromatogramı.

Çizelge 3.2. *L. galeobdolon* (L.) L. etanol ekstresinin kimyasal kompozisyonu.

Peak#	İçerik	% Komp.	A.Süresi
1	1,1-Diethoxypropanal	0,47	4.947
2	2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one	0,30	10.846
3	D-Limonene	0,21	12.715
4	1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine	0,55	14.930
5	Butanoic acid, 2-methyl-3-oxo-, ethyl ester	0,36	17.080
6	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	2,68	17.280
7	Benzofuran, 2-methyl-	0,26	18.322
8	4-Piperidinamine, N,1-dimethyl-	0,33	20.330
9	2,3-DIHYDRO-BENZOFURAN	1,42	20.499
10	2,6-Dimethyl-1-nonen-3-yn-5-ol	0,31	22.767
11	Guaiacol <4-vinyl->	0,39	23.610
12	Phenol, 2,6-dimethyl-	0,43	23.710
13	2,3-Dimethylphenyl isocyanate	0,30	24.245
14	5H-Imidazole-4-carboxylic acid, 5-amino-, ethyl ester	0,31	26.752
15	CLO[7.2.0]UNDEC-4-ENE, 4,11,11-TRIMETHYL-8-METHYLENE-, [1R-(1R*,4E]	0,62	27.148

Çizelge 3.2.(devam) *L. galeobdolon* (L.) L. etanol ekstresinin kimyasal kompozisyonu.

16	3(2H)-Benzofuranone, 5-methyl-	1,47	27.854
17	2(3H)-Benzoxazolone	38,92	30.938
18	Caryophyllene oxide	0,51	32.393
19	4-(1,3,3-Trimethyl-bicyclo[4.1.0]hept-2-yl)-but-3-en-2-one	0,23	35.498
20	3-Amino-4-hydroxy benzoic acid hydrazide	1,85	36.257
21	Tetradecanoic acid	0,50	37.495
22	Benzyl Benzoate	0,44	37.648
23	2-Cyclohexen-1-one, 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)-	0,29	38.406
24	Neophytadiene	1,36	39.474
25	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	0,52	39.656
26	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-(CAS)	0,32	40.138
27	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-(CAS)	0,35	40.604
28	Palmitic acid	8,18	42.749
29	2,6-Dimethyl-6-nitro-2-hepten-4-one	1,26	43.080
30	Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	1,40	43.467
31	Eicosane	0,63	43.560
32	Heneicosane	1,08	45.969
33	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-(CAS)	7,25	46.396
34	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	1,42	46.890
35	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	4,93	47.046
36	tert-Hexadecanethiol	1,05	47.300
37	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)- (CAS)	0,99	47.470
38	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-	0,90	47.630
39	Eicosane	1,31	48.272
40	Phytol, acetate	0,32	48.765
41	9-Hexacosene	0,61	50.064
42	Octanoic acid, 2-dimethylaminoethyl ester	0,56	50.182
43	Eicosane	5,80	50.482
44	Octadecane (CAS)	0,35	51.250
45	Cyclooctane, tetradecyl-	0,46	51.557
46	Tetracosane	3,88	52.604
	Total	98,08	

A.Süresi: Alıkonma Süresi Komp.: Kompozisyon

3.2. ANTIÖKSİDAN VE OKSİDAN KAPASİTE SONUÇLARI

Lamium purpureum L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. bitkilerinden elde edilen etanol ekstratların antioksidan ve oksidan seviyeleri Relassay kiti ile Mindray BS300 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı. Sonuçlar Çizelge 3.3'te verilmiştir. Buna göre *L. purpureum* L. bitkisinden elde edilen etanol ekstratın toplam antioksidan seviyesi 2,48 mmol/L olarak bulunurken, *L. galeobdolon* (L.) L. ekstratında bu seviye 2,51 mmol/L düzeyinde tespit edilmiştir. *L. purpureum* L. bitkisinin toplam oksidan seviyesi 16,67 $\mu\text{mol/L}$ civarındayken, diğer bitkide bu değer 24,78 $\mu\text{mol/L}$ seviyesindedir.

Oksidatif stres indeksi ise (OSI), toplam oksidan seviyesinin (TOS) toplam antioksidan seviyesine (TAS) bölünmesiyle hesaplandı. Hesaplama için, sonuçtaki TAS birimi $\mu\text{mol/L}$ 'ye dönüştürüldü ve OSI değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{OSI (AU(keyfi birim))} = \text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./L}) / \text{TAS } (\mu\text{mol Trolox equiv./L}).$$

OSI değerleri Çizelge 3.3'te belirtildi. Bu durumda *L. purpureum* L. bitkisinin oksidatif stres indeksi 0,672 AU oranında çıkmıştır. *L. galeobdolon* (L.) L. bitkisi için bu değer biraz daha yüksek olup 0,987 AU oranına sahiptir.

Çizelge 3.3. İki bitkinin antioksidan ve oksidan seviyelerinin karşılaştırılması.

	<i>L. purpureum</i> L. Etanol ekstrat	<i>L. galeobdolon</i> (L.) L. Etanol ekstrat
TAS (mmol Trolox equiv./L)	2,48	2,51
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./L)	16,67	24,78
OSI (AU)	0,672	0,987

3.3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE SONUÇLARI

3.3.1. *Lamium purpureum* L. bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Lamium purpureum L. bitkisinden elde edilen uçucu yağın farklı konsantrasyonlarının mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkisi Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Bu bitkiden elde edilen uçucu yağın her bir konsantrasyonunun yalnızca maya türlerinden üçüne karşı etkinliği olduğu görülmüştür. 50 μL 'lik en düşük konsantrasyonu *Candida parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* mayalarına karşı etki

göstermiş ve zon çapları sırasıyla 7 mm, 7 mm ve 8 mm olarak ölçülmüştür. Diğer maya ve bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşmamıştır. 75 µl'lik konsantrasyon ise yine aynı türler üzerine etki etmiş ve zon çapları 50 µl'lik doz uygulaması sonuçlarına göre kayda değer bir artış göstermemiştir. 100 µl'lik en yüksek dozda *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* türlerine karşı uçucu yağın inhibisyon zon çapı 9 mm olarak ölçülmüştür. En yüksek etkinliği *C. tropicalis* türüne karşı göstermiş, 100 µl konsantrasyonda uçucu yağ içeren steril disk etrafında zon çapı 10 mm'yi bulmuştur.

Çizelge 3.4. *L. purpureum* L. bitkisi uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi*.

Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)								
	Ekstratlar			Mukayese Antibiyotikleri					
	50 µL	75 µL	100 µL	E 15	CTX 30	P 10	AK 30	NY 100	KTC 20
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	24,0	8,0	10,0	20,0	ND	ND
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	33,0	-	12,0	21,0	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	16,0	24,0	27,0	16,0	ND	ND
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	18,0	24,0	17,0	15,0	ND	ND
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	ND	ND	ND	ND	9,0	15,0
<i>Candida parapsilosis</i>	7,0	7,0	9,0	ND	ND	ND	ND	12,0	24,0
<i>Candida glabrata</i>	7,0	7,0	9,0	ND	ND	ND	ND	11,0	15,0
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	8,0	8,0	10,0	ND	ND	ND	ND	-	7,0

E 15: Erythromycin 15µg.

CTX 30: Cefotaxime 30µg.

P 10: Penicillin 10µg.

AK 30: Amikacin 30µg.

NY 100: Nystatin 100 µg.

KTC 20: Ketacanazole 20 µg.

ND: Belirlenmedi (Not Determined).

(-) : Etkisiz.

(*) : Rakamlar inhibisyon zon çaplarını göstermektedir. 6 mm çapındaki herbir diske sırasıyla 50 µL, 75 µL, 100 µL uçucu yağ emdirilmiştir. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır ve sonuçlar üçünün ortalamasıdır.

3.3.2. *Lamium galeobdolon* (L.) L. bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Lamium galeobdolon (L.) L. bitkisinin uçucu yağının antimikrobiyal aktivite bulguları Çizelge 3.5'te sunulmuştur.

Bu bitkiden elde edilen uçucu yağın antifungal etkisi gözlemlenirken, antibakteriyel etkiye sahip olmadığı görülmüştür. 50 µL'lik konsantrasyonu sadece *Candida glabrata* maya türüne karşı etki göstermiş ve inhibisyon zon çapı 8 mm olarak kaydedilmiştir. 75 µL'lik konsantrasyonun maya ve bakteri türlerine karşı hiçbir etkisi gözlenmemiştir. 100 µL'lik en yüksek konsantrasyonda *Candida parapsilosis* için zon çapı 7 mm ölçülürken, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* türlerinde ise zon çapı 10 mm olarak tespit edilmiştir. Diğer maya ve bakteri türlerine karşı uçucu yağ emdirilmiş steril disklerin etrafında inhibisyon bölgeleri oluşmamıştır.

Çizelge 3.5. *L. galeobdolon* (L.) L. bitkisi uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi*.

Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)								
	Ekstratlar			Mukayese Antibiyotikleri					
	50 µL	75 µL	100 µL	E 15	CTX 30	P 10	AK 30	NY 100	KTC 20
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	24,0	8,0	10,0	20,0	ND	ND
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	33,0	-	12,0	21,0	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	16,0	24,0	27,0	16,0	ND	ND
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	18,0	24,0	17,0	15,0	ND	ND
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	ND	ND	ND	ND	9,0	15,0
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	7,0	ND	ND	ND	ND	12,0	24,0

Çizelge 3.5.(devam) *L. galeobdolon* (L.) L. bitkisi uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi*.

Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)								
	Ekstratlar			Mukayese Antibiyotikleri					
	50 µL	75 µL	100 µL	E 15	CTX 30	P 10	AK 30	NY 100	KTC 20
<i>Candida glabrata</i>	8,0	-	10,0	ND	ND	ND	ND	11,0	15,0
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	10,0	ND	ND	ND	ND	-	7,0

E 15: Erythromycin 15µg.

CTX 30: Cefotaxime 30µg.

P 10: Penicillin 10µg.

AK 30: Amikacin 30µg.

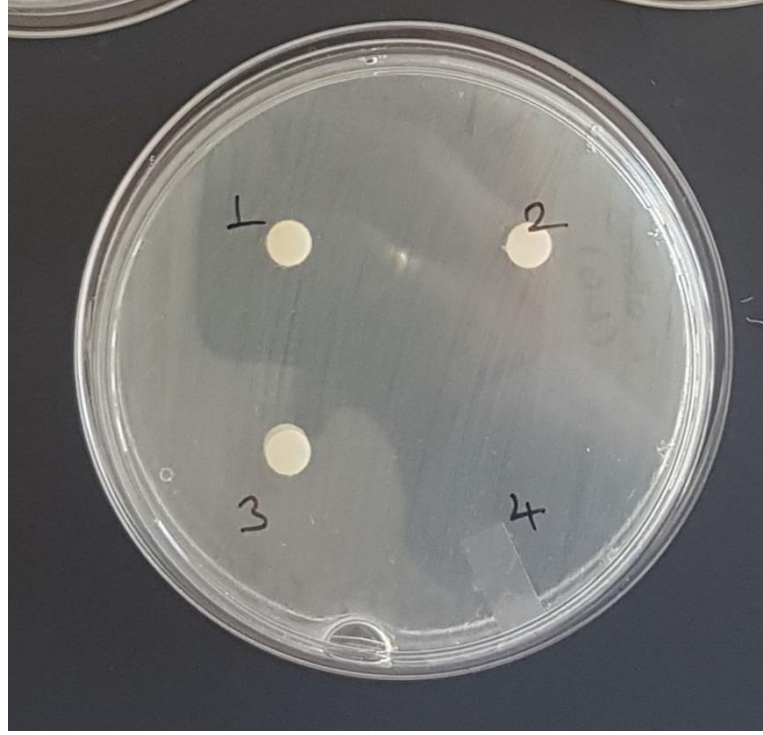
NY 100: Nystatin 100 µg.

KTC 20: Ketacanazole 20 µg.

ND: Belirlenmedi(Not Determined).

(-) : Etkisiz

(*): Rakamlar inhibisyon zon çaplarını göstermektedir. 6 mm çapındaki her bir diske sırasıyla 50 µL, 75 µL, 100 µL uçucu yağ emdirilmiştir. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır ve sonuçlar üçünün ortalamasıdır.



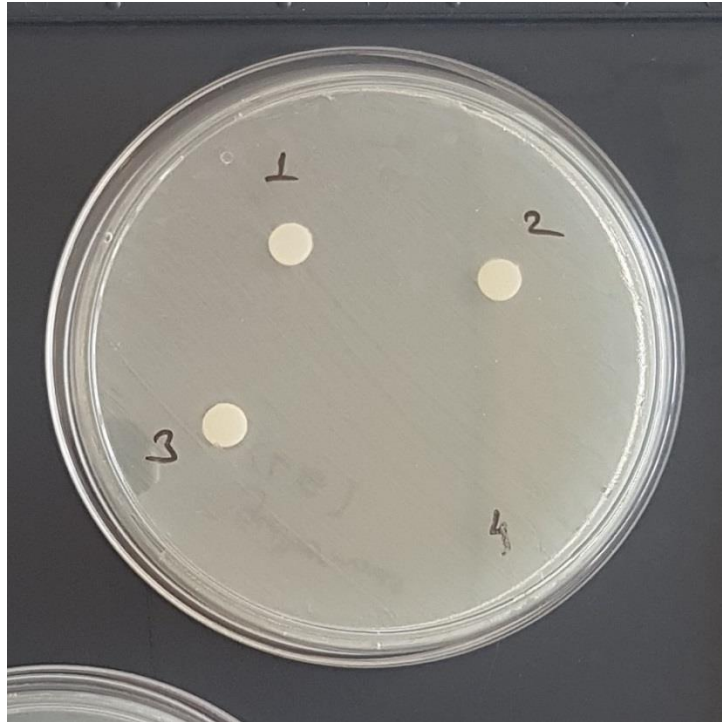
Şekil 3.3. *L. galeobdolon* (L.) *L.* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Candida albicans* üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 μ L; 2: 75 μ L; 3: 100 μ L.



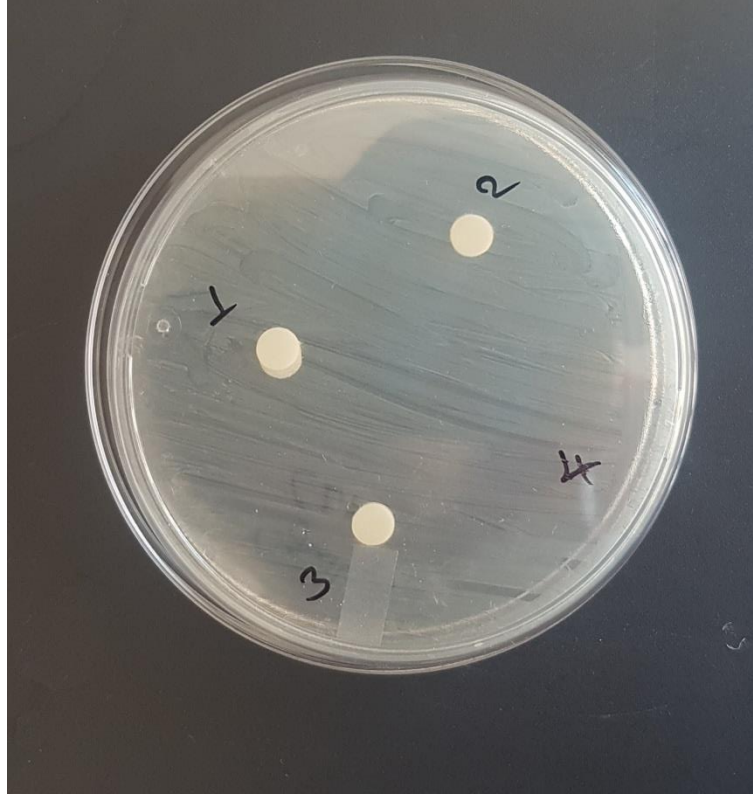
Şekil 3.4. *L. galeobdolon* (L.) *L.* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Candida glabrata* üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 μ L; 2: 75 μ L; 3: 100 μ L.



Şekil 3.5. *L. galeobdolon* (L.) *L.* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Candida tropicalis* üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 μ L; 2: 75 μ L; 3: 100 μ L.



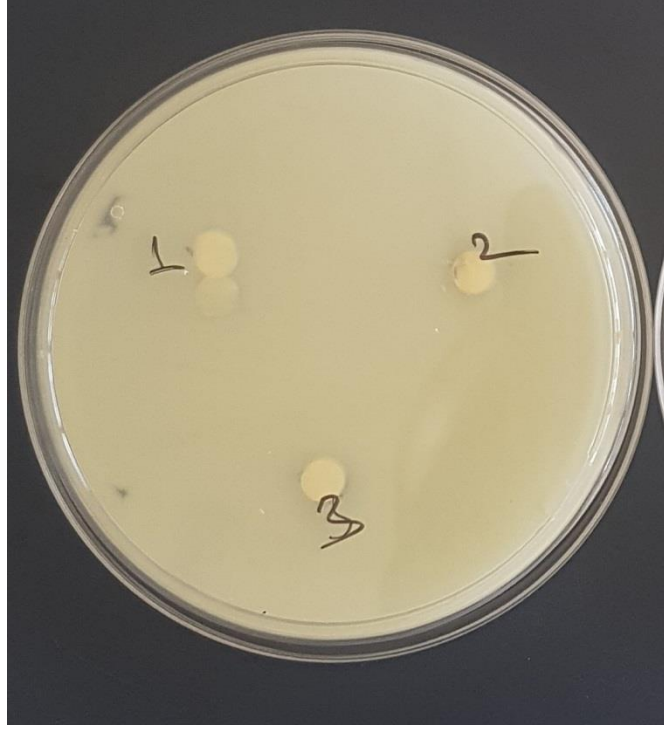
Şekil 3.6. *L. galeobdolon* (L.) *L.* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Candida guillermondii* üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 μ L; 2: 75 μ L; 3: 100 μ L.



Şekil 3.7. *L. purpureum* L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Candida guilliermondii* üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 μ L; 2: 75 μ L; 3: 100 μ L.



Şekil 3.8. *L. purpureum* L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Candida parapsilosis* üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 μ L; 2: 75 μ L; 3: 100 μ L.



Şekil 3.9. *L. purpureum* L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Staphylococcus aureus* üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 μ L; 2: 75 μ L; 3: 100 μ L.



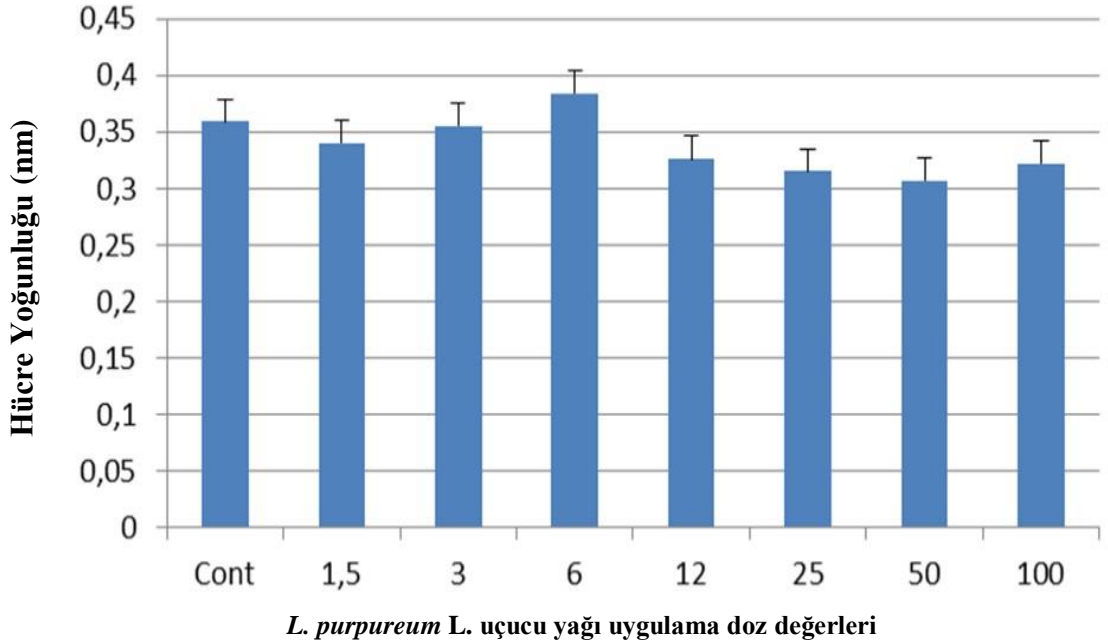
Şekil 3.10. *L. purpureum* L. etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Salmonella typhimurium* üzerine inhibisyon zonları. 1: 50 μ L; 2: 75 μ L; 3: 100 μ L.

3.4. ANTİKANSER AKTİVİTE SONUÇLARI

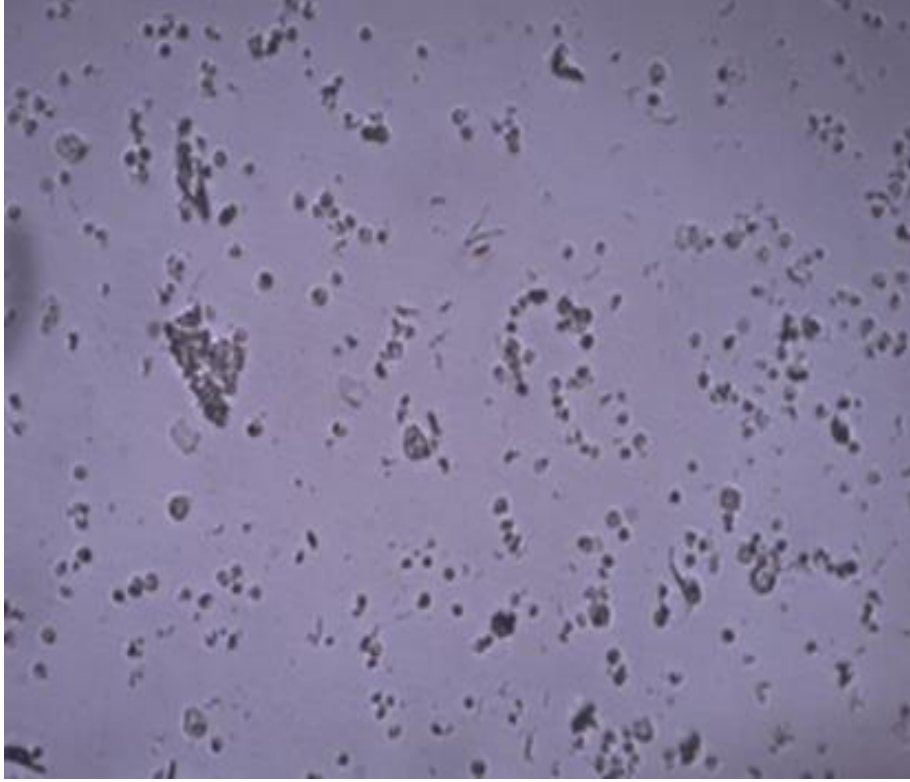
L. purpureum L. ve *L. galeobdolon* (L.) L. bitkilerinden elde edilen uçucu yağların anti-proliferatif etkisi B16F10 hücre hattı üzerinde çeşitli doz aralıklarında (1,5 µg/mL, 3 µg/mL, 6 µg/mL, 12 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL) MTT yöntemiyle araştırıldı. Dozaj uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinin canlılığı, tüm zaman dilimlerinde %100 kabul edildi ve diğer numunelerin canlılık değerleri, ortalama absorban değerlerinden hesaplandı.

3.4.1. *L. purpureum* L. bitkisinin MTT Testi Sonuçları

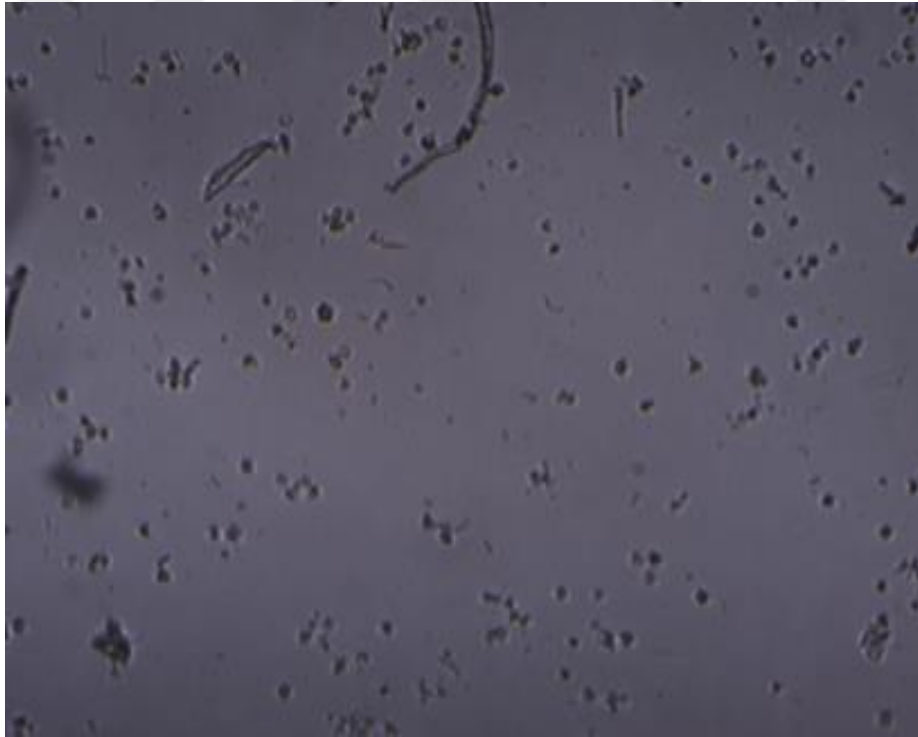
L. purpureum L.'nin 1,5 µg/mL'lik dozu kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında önemli bir değişiklik oluşturmamıştır. 3 µg/mL dozda, canlılık oranı tekrar kontrol grubu seviyesine ulaşmıştır. 6 µg/mL'lik doz uygulamasında proliferatif bir etki gözlenmiş ve %5'lik bir artışla hücrelerin canlılığı kontrol grubundan daha yüksek çıkmıştır. Bununla birlikte, büyük ölçüde olmasa da, 12 µg/mL'lik doz uygulamasında hücre canlılığında bir azalma olmuştur. Hücrelere uygulanan 50 µg/mL'lik *L. purpureum* L. dozu, en yüksek antiproliferatif etkiyi göstermiş, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında yaklaşık %14'lük bir düşüş gözlenmiştir. 100 µg/mL'lik dozda ise tekrar proliferatif etki artmış ve hücre canlılığı kısmen yükselmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. *L. purpureum* L. uçucu yağının MTT Sonuçları.



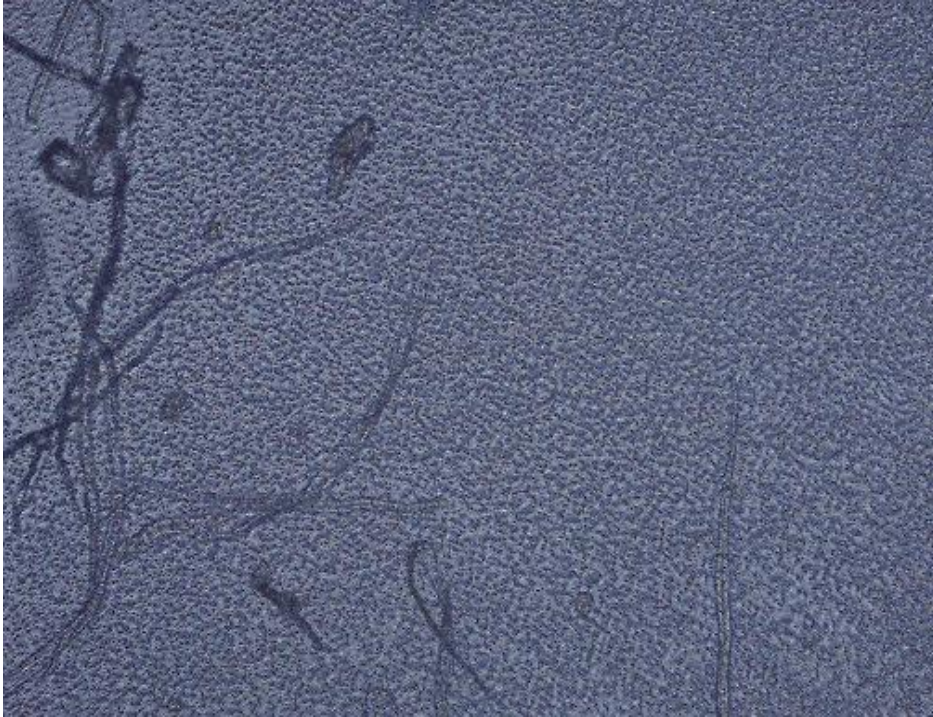
Şekil 3.12. *L. purpureum* L. kontrol.



Şekil 3.13. *L. purpureum* L. 25 µg/mL.



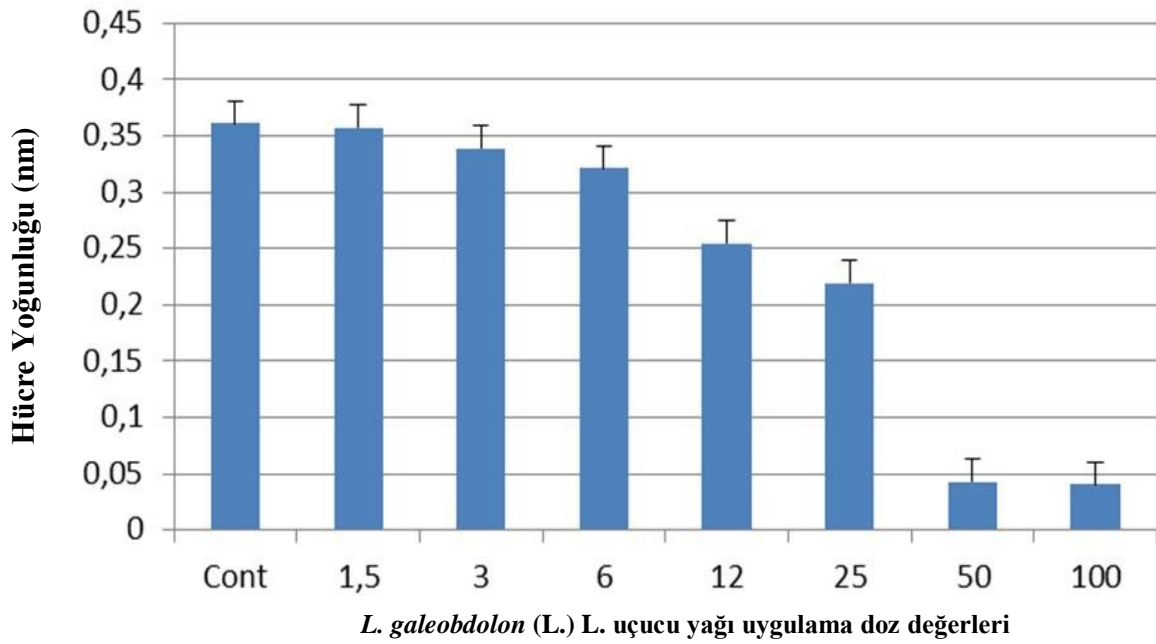
Şekil 3.14. *L. purpureum* L. 50 µg/mL.



Şekil 3.15. *L. purpureum* L. 100 µg/mL.

3.4.2. *L. galeobdolon* (L.) L. bitkisinin MTT Testi Sonuçları

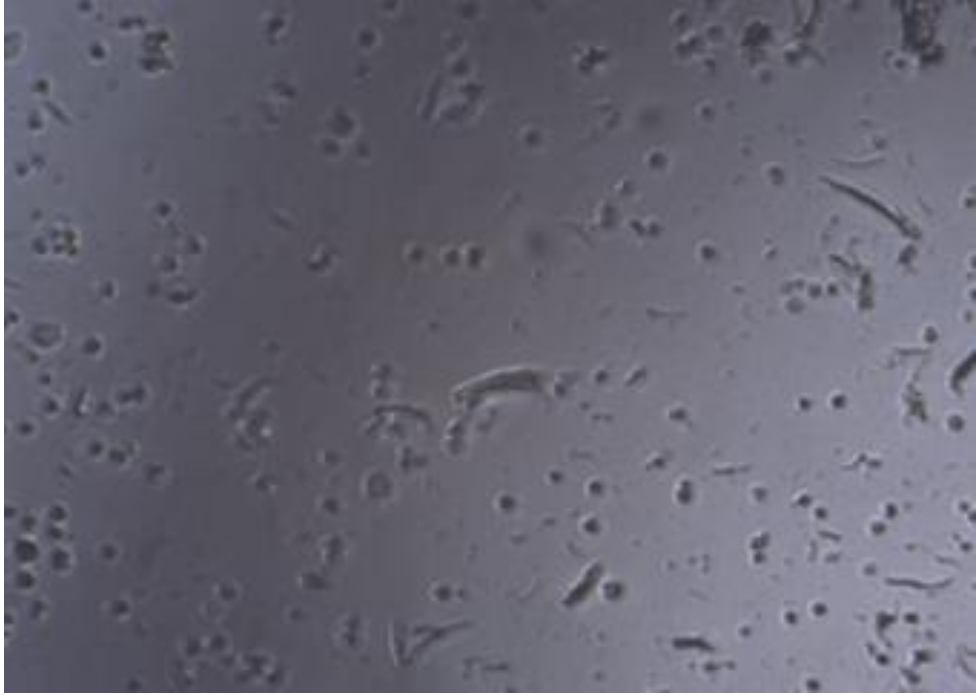
L. galeobdolon (L.) L. bitkisi için, melenom B16F10 hücrelerine 1,5-100 µg/mL doz aralığında uygulama yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 3.16'da gösterilmiştir. *L. galeobdolon* (L.) L.'nin anti-proliferatif etkisi *L. purpureum* L.'ye kıyasla oldukça yüksek çıkmıştır. 1,5 µg/mL'lik *L. galeobdolon* (L.) L. dozu kontrol hücrelerine kıyasla bir değişiklik göstermezken, 3 µg/mL dozundan itibaren hücre canlılığı doza bağlı bir şekilde önemli oranda azalmıştır. 12 µg/mL'lik *L. galeobdolon* (L.) L. dozu uygulandığında, hücre canlılığındaki düşüş, kontrol ile karşılaştırıldığında yaklaşık %28 oranında iken, 50 µg/mL'lik *L. galeobdolon* (L.) L. dozu ile yapılan muamele sonucu, hücre canlılığında yaklaşık %88,9 oranında bir azalma göstermiştir. 100 µg/mL'lik *L. galeobdolon* (L.) L. dozu en yüksek doz olup, hücre viyabilitesinde 50 µg/mL ile yaklaşık aynı oranda etkiye sahiptir.



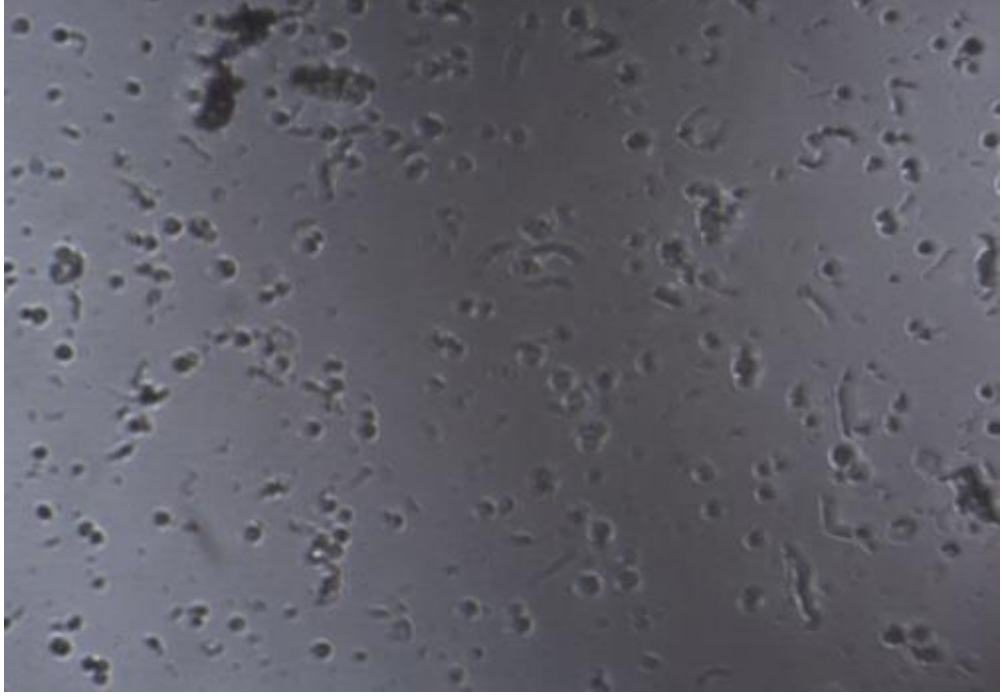
Şekil 3.16. *L. galeobdolon* (L.) L. uçucu yağının MTT Sonuçları.



Şekil 3.17. *L. galeobdolon* (L.) L. kontrol.



Şekil 3.18. *L. galeobdolon* (L.) L. 25 µg/mL.



Şekil 3.19. *L. galeobdolon* (L.) L. 50 µg/mL.



Şekil 3.20. *L. galeobdolon* (L.) L. 100 µg/mL.

4. TARTIŞMA

4.1. GC-MS ANALİZİ

Bu çalışmada, Türkiye’de yaygın olarak yetişen *Lamium purpureum* L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. bitkilerinin kimyasal kompozisyonlarını belirlemek amacıyla bitkilerden elde edilen etanol ekstratlar GC-MS analizine tabi tutulmuştur.

L. galeobdolon (L.) L. bitkisinde ana bileşen %38,92 oranında 2(3H)-Benzoksazolon olarak bulunmuştur. Önemli bir bileşen olan 2(3H)-Benzoksazolon maddesinin, genel olarak merkezi sinir sistemine etki eden bileşiklerde bulunan bir farmakofor grup oluşturduğu, ayrıca antikonvülsan etkiye sahip olduğu bilinmektedir ve türevleri yeni ilaç adaylarının sentezinde kullanılmaktadır. Çok sayıda 2(3H)-Benzoksazolon türevi bileşikler, antifungal, antimikrobiyal, analjezik ve anti-enflamatuar etkiler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler için test edilmiştir [80], [81]. 2(3H)-Benzoksazolon, benzoksazinoid türevlerindedir [82]. Benzoksazinoidlerin, *Lamium galeobdolon*’un yetişkin fidesinin tüm toprak üstü organlarında yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu daha önce yapılan bir çalışmada rapor edilmiştir [83]. Alipieva ve arkadaşları *Lamium galeobdolon*’un etanol ekstratının farklı kromatografik yöntemlerle analizini yapmışlardır. Buna göre bilinen 4 farklı benzoksazinoidin yanında bir yeni türevi olan “2-O- b- d- glikopiranosil -6- hidroksi- 2H- 1,4-benzoksazin- 3 (4H)- on (6- hidroksiblepharin)” izole etmişlerdir [84].

Çalışmamızda *L. purpureum* L.’nin etanol ekstratında ana bileşen %22,55 oranında palmitik asit olarak çıkmıştır. Palmitik asit *L. galeobdolon* (L.) L. bitkisinin ekstratında da %8,18 oranıyla ikinci ana bileşendir. Flamini ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, *Lamium purpureum*’dan elde edilen uçucu yağı GC-MS yöntemi ile analiz etmiş ve yüksek germacren-D bileşeni içerdiğini bulmuşlardır [71]. Jones ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, *L. purpureum* uçucu yağında α -pinen, β -pinen, 1-okten-3-ol, β -elemen ve germacren-D maddeleri baskın çıkmıştır [85]. Ancak bu bileşenler çalışmamızda bulunamadı. Her ne kadar Jones ve arkadaşları çalışmalarında *L. purpureum* bitkisinin içeriğinde palmitik asidin düşük bir yoğunluğa (%0,4 -%0,6 -%1,2) sahip olduğunu tespit etmişlerse de, çalışmamıza göre bu bitkinin

etanol ekstresinde kimyasal içeriğinin ana bileşeni yüksek oranda palmitik asit (%22,55) olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda *L. purpureum* L.'da belirlenen bir diğer önemli bileşen ise 7-Tetradekenal idi. Tetradekenal, bir tetradekan hidritinden türetilmiş uzun zincirli bir yağ aldehittir [86]. Flamini ve arkadaşlarının sonuçlarına göre, *L. purpureum* yağında tetradekan bulunmuştur [71]. Tetradekan, *Lamium* türlerinin en çok çalışılan *Lamium album* türünde de tespit edilmiştir [87].

Morteza-Semnani ve arkadaşları *Lamium album* L. (Lamiaceae) esansiyel yağını analiz etmek için GC ve GC-MS yöntemlerini kullandılar ve kimyasal bileşiminde kırk üç bileşeni tespit ettiler. Bunlardan en önemlisi, 6,10,14-trimetil-2-pentadekanon (%10,2) ve 4-hidroksi-4-metil-2-pentanon (%9,1) idi [87]. Başka bir çalışmada, Catalina bölgesinden (Cluj-Napoca) toplanan *Lamium album* GC-MS ile analiz edilmiş ve yüksek oranda palmitik asit (256,6 µg/g) içerdiği gösterilmiştir [88]. Daha önceki bir çalışmada *L. purpureum* bitkisinin tohum yağında %16 oranında octadeca-5,6-trans-16-trienoic asit (lamenallenik asit) bulunmuştur. Bizim çalışmamızda bulduğumuz oktadekanoik asit türevlerinden biridir. Ayrıca yine aynı çalışmada %11 oranında palmitat (palmitik asit tuzu/esteri) bileşeni de tespit edilmiştir [89].

Uçucu yağ üretimi ve içeriği sadece bitkinin genetiğine bağlı değildir. Bitkinin gelişim aşamaları gibi endojen faktörlerin yanı sıra bitkinin maruz kaldığı ortam gibi eksojen faktörler de uçucu yağların üretimini ve içeriğini değiştirebilir [90]. Ayrıca total ekstrede uçucu yağa geçmeyen bileşenlerin de olabileceği düşünülebilir. Yapılan çalışmaların sonuçları, bitkilerin yetiştiği ortam, toplanma zamanı, ekstraksiyonların oluşturulma şekilleri, kullanılan yöntemlerin farklılıkları gibi pek çok durumdan etkilenmektedir. Bu tür etkenlerin bir araya gelmesiyle ortaya çıkan değerlerin birbirinden farklı olması beklenen bir sonuçtur.

4.2. ANTIOKSİDAN, OKSİDAN KAPASİTE VE OKSİDATİF STRES

Antioksidan bileşikler ile nötralizasyonları arasındaki dengesizlikten doğan oksidatif stres birçok hastalığa neden olmaktadır. Her ne kadar yalnızca oksidanların veya yalnızca antioksidan bileşenlerin belirlenmesi, oksidatif stres hakkında bilgi verebilirse de, oksidanlarla birlikte antioksidan kapasitenin aynı anda ölçülmesi daha kesin bilgi sağlayacaktır. Bu nedenle çalışmamızda iki bitkiden elde edilen etanol ekstrelerin hem antioksidan hem de oksidan kapasitelerine bakılmıştır. Bunun için piyasada hazır olarak

satılan TAS (Total Antioksidan Status) ve TOS (Total Oksidan Status) ticari kitleri kullanılmıştır.

Bu çalışmada ilk defa *Lamium galeobdolon* (L.) L. türü için antioksidan, oksidan kapasitesi ve oksidatif stres belirlenmiştir. *Lamium purpureum* L. türünün antioksidan kapasitesi ise birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Ancak çalışmaların metodolojisi birbirinden farklı olduğu için karşılaştırma yapmak zordur. Çalışmamızda kullandığımız yöntem, henüz yeni bir yöntemdir. Bugüne kadar kan, serum gibi biyolojik sıvılarda, insan dokularında yoğun olarak çalışılmıştır. Yapılan literatür çalışmalarında, bu yöntemin bitkisel materyallerle yapılmış çalışmalarına oldukça az rastlanmaktadır. Söz konusu yöntemi seçmemizdeki esas neden, hassas, güvenilir ve doğru sonuçlara ulaştıracak yöntemlerden biri olması ve yeni olan bir yöntemin literatüre kazanımının sağlanmasıdır.

Çalışmamızda *L. purpureum* L. etanol ekstratının TAS değeri 2,48 mmol/L, TOS değeri 16,67 μ mol/L, OSI değeri ise 0,672 olarak bulunmuştur. *L. galeobdolon* (L.) L. ekstratında tüm bu değerler biraz daha yüksek olup, TAS değerinin 2,51 mmol/L, TOS değerinin 24,78 μ mol/L, OSI değerinin ise 0,987 civarında olduğu belirlenmiştir. Bitkilerimizin antioksidan seviyeleri orta düzeyde olmasına karşın TOS değerlerinin yüksek olmasından dolayı OSI değerleri de yüksek düzeyde çıkmıştır.

Lamiaceae familyasından olan *Salvia multicaulis* bitkisinin etanol ekstratıyla yapılan bir çalışmada, TAS değeri $6,434 \pm 0,113$, TOS değeri $22,441 \pm 0,231$ ve OSI değeri $0,349 \pm 0,004$ olarak belirtilmiş ve bu bitkinin aşırı kullanımına dikkat etmek şartıyla doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilceği ifade edilmiştir [91].

Lamiaceae familyasından olan *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* türü ile yapılan başka bir çalışmada 7 farklı lokasyondan toplanan bitkinin etanol ekstratı değerlendirilmiştir. Tüm bitki örneklerinde oksidatif stres gözlenmiştir. En düşük OSI değeri tarım alanı çevresinde toplanan örneklerde tespit edilmiştir ($0,112 \pm 0,025$). Otoyol yakınında sulama alanı ve dere yatağı, dağ yamacı, yerleşim yerlerine yakın bölgeler, tarımsal arazi sulama kanalı ve karayolu yakınında sulak alanlar olmak üzere diğer bölgelerden toplanan tüm bitki örneklerinde yüksek TOS değerleri nedeniyle yüksek OSI değerleri bulunmuştur. Organizmaların tarım alanı bölgesinde besin maddelerine ve suya daha kolay erişmesinin, bu alandaki bitkilerin, gıda rekabeti açısından diğer bölgelere göre daha avantajlı olmasının OSI değerini düşürdüğü düşünülmektedir. Çalışmaya göre en

yüksek OSI değeri (0.645 ± 0.081), çevre stresine daha az maruz kaldığı düşünülen dağ yamaçlarından toplanan bitki örneklerinde belirlenmiştir [92].

Grujić ve arkadaşları *L. purpureum*'un etanol, metanol, etil asetat ve kloroform olmak üzere dört farklı çözücüyle ekstratları hazırlanmış, çeşitli metodlar kullanılarak ekstratların antioksidan kapasitesi tayin edilmiştir. Bu çalışmada *L. purpureum* ekstratlarının doza bağlı olarak orta düzeyde antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. En iyi indirgeme kapasitesi, *L. purpureum*'un metanol ve etanol ekstratlarında görülmüştür. Etil asetat ve kloroform ekstratları daha düşük, hatta neredeyse eşit oranda indirgeme kapasitesine sahiptir [52].

L. purpureum var. *purpureum*'un da olduğu dört farklı *Lamium* türünün metanol, diklorometan, n-butanol ve sulu ekstreleri ile yapılan bir başka çalışmada tüm türlerin n-butanol ekstreleri DPPH yöntemi sonucu diğer ekstrele oranla daha yüksek radikal süpürme etkisi göstermiştir [64].

L. album ve *L. purpureum*'un metanolik ekstresinin serbest radikal temizleme özelliklerini karşılaştıran bir başka çalışmada DPPH metoduyla *L. album* ekstresinin *L. purpureum*'dan daha fazla süpürücü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada yapılan fosfomolibden deneyinde 90 °C'de *L. album*'un serbest radikal süpürme aktivitesi *L. purpureum*'dan daha yüksekken, 40 °C'de sonuç tersine dönmüş ve *L. purpureum*'un daha güçlü aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Linoleik asit peroksidasyon analizinde ise her iki *Lamium* türünün maksimum insidansı *L. purpureum* ekstresinde %73,5 ve *L. album* ekstresinde %70,3 olarak belirlenmiştir [73].

Budzionowski ve arkadaşının çalışmasında *Lamium album* ve *Lamium purpureum* türlerinin butanolik ekstratlarının oldukça yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu hatta bilinen sentetik antioksidan olan BHA'ya eşdeğer nitelikte olduğu belirtilmiştir [93].

Yine bir başka çalışmada *Lamium album* ve *Lamium purpureum* n-butanol ekstrelerinin DPPH ve kemilüminesans olmak üzere iki yöntem kullanılarak antioksidan aktivitesi ölçüldü. Sonuçlar, her iki yöntem için de iki ekstraktın güçlü antioksidan aktivitesini gösterdi. Ekstratlarla inkübasyonun 30. dakikasında, *L. purpureum* ekstraktının (%1 konsantrasyon) *L. album* ekstraktına ve referans maddelere kıyasla en yüksek temizleme aktivitesi sergilemiştir. Yapılan kemilüminesans reaksiyon ölçümleri başladıktan beş saniye sonra ise, *L. purpureum* ekstresi ve referans maddeleri ile karşılaştırıldığında, *L. album* ekstresi (%1 konsantrasyon) en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

Çalışmada bu iki yöntemin sonuçları arasındaki farklılıkların, reaksiyon mekanizmalarından, reaksiyonlarda bulunan bileşiklerin farklı reaktivitelerinden, zamana bağlı reaksiyonların ortaya çıkmasından dolayı olabileceği bildirilmiştir [94].

Çalışmamızda kullandığımız iki bitki türünden *L. purpureum* L. türü düz zeminli, güneş gören bakımlı bir fındıklık bahçesinden toplanmıştır (OSI: 0,672). *L. galeobdolon* (L.) L. ise oldukça eğimli, yabani otların yoğun olduğu, bakımsız ve gölgelik bir fındıklık bahçesinden toplanmıştır (OSI: 0,987). Bu bitkilerin TAS, TOS ve OSI değerlerine bakıldığında, aralarındaki farkın, bitkilerin kimyasal kompozisyonundaki değişikliklerden kaynaklı olabileceği gibi, maruz kaldıkları gıda ve su rekabeti, ışık gibi çevresel stres faktörlerinden de etkilendiği söylenebilir. Ayrıca yine çevresel stres faktörlerinin bitkilerin TOS değerini arttırdığı ve bu nedenle OSI değerinin yüksek düzeyde çıkmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra literatürde kayıtlı çalışmaların sonuçlarına bakıldığında, bitkinin özümlemesi için kullanılan çözücülerin ve uygulanan yöntemlerin de antioksidan aktivitenin belirlenmesinde önemli bir etkiye sahip olduğu vurgulanabilir.

4.3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE

Çalışmamızda *L. purpureum* L. ve *L. galeobdolon* (L.) L. bitkilerinden elde edilen uçucu yağların bazı gram negatif, gram pozitif ve maya mantarlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir.

Bazı *Lamium* türlerinin vajinal ve servikal inflamasyon tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir [94]. Vajinal inflamasyona neden olan *Candida* türleri [95] çalışmamız için özellikle seçilmiş ve çalışmamızda kullandığımız bitkilerin anticandidal etkinlikleri de araştırılmıştır.

Her iki bitkiden elde edilen uçucu yağların farklı konsantrasyonlarıyla yapılan çalışmalarda en anlamlı veriler disklere emdirilen 100 µL'lik konsantrasyonda elde edilmiştir. *L. purpureum* L. uçucu yağı en yüksek antifungal etkinliği 100 µL'de *Candida tropicalis* türüne karşı göstermiş ve inhibisyon çapı 10 mm olarak ölçülmüştür. Bu değer mukayese antibiyotiklere karşı oluşan inhibisyon zon çapından daha yüksek bir değerdir. Bu bitkimizin uçucu yağının antibakteriyel etkinliği zayıf olup bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşmadığı görülmüştür.

L. galeobdolon (L.) L. uçucu yağı 100 µL'lik konsantrasyonda anticandidal etki göstermiştir. *C. parapsilosis*'e karşı oluşan inhibisyon zon çapı (7 mm), mukayese antibiyotiklere nazaran oldukça düşüktür. Buna karşılık *C. glabrata* (10 mm)'ya karşı oluşan inhibisyon zonları, mukayese antibiyotiklerden NY 100'e yakın değerdedir. Ayrıca bu konsantrasyonun *C. tropicalis* (10 mm)'e karşı mukayese antibiyotiklerden daha etkili olduğu görülmüştür. *C. guilliermondii*'ye ve bakteri türlerine karşı ise antagonistik etki göstermemiştir.

L. purpureum var. *purpureum*'un metanol, diklorometan, n-butanol ve sulu ekstraları ile yapılan bir çalışmada, antimikrobiyal aktivitesi iki gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*), iki gram negatif bakteri (*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve üç adet maya mantarına (*Candida albicans*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis*) karşı denenmiş ve sonuçlar orta düzeyde çıkmıştır. Bitkinin maya mantarlarına karşı, bakterilerden daha etkin olduğu tespit edilmiştir [64]. Bu sonuç çalışmamızı kısmen destekler niteliktedir.

Yine *L. purpureum* var. *purpureum* türü ile yapılan bir çalışmada etanol, metanol ve petrol eter ekstralarının antimikrobiyal aktivitesi hem disk difüzyon, hem de mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmamızla paralel olarak *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris* ve *Staphylococcus aureus* mikroorganizmaları kullanılmıştır. Etanol ekstresi *B. cereus*'da 10,3±1,3 mm, *C. albicans*'da 7,75±0,9 mm ve *P. vulgaris*'de 7±0 mm inhibisyon zonu oluştururken, *S. aureus*'da etki göstermemiştir. Metanol ekstresi ise *B. cereus*'a karşı 11,5±0,6 mm, *S. aureus*'a karşı 9,75±0,9 mm inhibisyon zonu oluşturmuş, diğerlerine karşı etkinlik göstermemiştir. Petrol eter ekstresi diğer iki ekstreye karşı daha fazla etki göstermiş, inhibisyon zonları *B. cereus*'da 14,75±3,86 mm, *S. aureus*'da 8,0±0,81 mm ve *P. vulgaris*'de 15,25±4,35 mm olarak ölçülmüş, *C. albicans*'a karşı etki göstermemiştir. Bu çalışmada fenolik madde konsantrasyonlarına da bakılmış ve petrol eter ekstresinin fenolik madde açısından metanol ve etanol ekstralara göre oldukça fakir olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın antimikrobiyal etkisinin diğer ekstralara göre yüksek olması bitki içerisindeki başka maddelerin antimikrobiyal etki oluşturduğu fikrini ortaya çıkarmıştır [96]. Bizim sonuçlarımızla karşılaştırıldığında *L. purpureum* L. için göze çarpan tezat sonuçların, farklı tür ekstraların kullanılması, ekstre dozlarının ve kimyasal içeriklerinin farklı olması gibi koşulların değişkenliğinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Total ekstre ile yapılmış diğer çalışmalarda, daha yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite olduğu gözlenmektedir. Uçucu yağ ile yapmış olduğumuz çalışmada bu aktivite oldukça az düzeyde kalmıştır. Bitkinin total bileşiminde, uçucu yağ dışında kalan maddelerin

antimikrobiyal aktivite düzeyini arttırdığı fikri ortaya çıkmaktadır. Örneğin her iki bitkimizin etanol ekstresi ile yapılan kimyasal içerik analizine bakıldığında antimikrobiyal etkiye sahip bir bileşen olan palmitik asidin yüksek konsantrasyonda olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda anlamlı sonuçlar genellikle en yüksek konsantrasyon olan 100 µL'lik dozlarda ortaya çıkmıştır. Bu durumda steril boş disklere daha fazla konsantrasyonda uçucu yağ emdirilmesi sayesinde antimikrobiyal etkinliğin artabileceği düşünülmektedir.

4.4. ANTİKANSER AKTİVİTE

Literatürde kayıtlı önceki çalışmalar, Lamiaceae familyasının birçok üyesinden izole edilen uçucu yağların apoptotik bir etki gösterdiğini bildirmiş ve antikanser veya antimitojenik / antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [13], [97]. Ancak literatür taramalarında *L. purpureum* L. ve *L. galeobdolon* (L.) L. ile yapılmış antikanser aktivite çalışması bulunamamıştır. Bu nedenle çalışmamız bu iki bitkinin antikanser etkinliklerinin araştırılması açısından ilk çalışma niteliğindedir. Bazı *Lamium* türlerinin cilt toniği ve yara iyileştirici olarak kullanıldığı literatürde kayıtlıdır [98]. Bu özellik göz önünde bulundurularak çalışmamızda bir cilt hastalığı olan melanom hücreleri kullanılmıştır.

L. purpureum L. bitkisinden elde edilen uçucu yağın antiproliferatif etkisi B16F10 melanom hücre hattı üzerinde MTT yöntemi ile tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada, bitki uçucu yağının doza bağlı olarak proliferatif etkisinin değiştiği gözlemlendi. Hücre canlılığı 1,5 µg/mL dozda çok düşük oranda azalmış, 3 µg/mL dozda kontrol seviyesine ulaşmış ve 6 µg/mL dozda %5 oranında kontrol grubunun üstüne geçmiştir. Dozun artımına bağlı olarak 50 µg/mL dozda en yüksek antiproliferatif etki göstermiş, %14 oranında hücre canlılığında bir azalma kaydedilmiştir. 100 µg/mL dozda ise yeniden antiproliferatif etki azalmış, hücre canlılığı artmıştır.

L. galeobdolon (L.) L.'nin uçucu yağının sitotoksik etkisi yine MTT metoduyla B16F10 melanom hücre hattı üzerinde çalışılmıştır. Bu bitkinin uçucu yağı *L. purpureum* L.'un uçucu yağına göre çok daha fazla antiproliferatif etki göstermiştir. Doza bağlı olarak %88,9 oranında hücre canlılığında düşüş gözlenmiştir. 1,5 µg/mL dozda çok önemli bir düşüş olmazken, 100 µg/mL dozda antiproliferatif etki maksimum seviyeye ulaşmıştır.

Trouillas ve arkadaşları *Lamium album* türünün önemli antiproliferatif etki gösterdiğini belirtmiştir. Yaptıkları çalışmada Limousin kırsalında bitkisel çay olarak kullanılan 16

bitkinin etanol ekstrelerinin B16 melanom hücreleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bunlardan *L. album* türünün de olduğu altı bitki yüksek konsantrasyonlarda (>0,5 mg/mL) önemli sayılabilecek antiproliferatif etki göstermişlerdir [54].

Ek olarak *L. album* türünün kloroform/metanol ekstratıyla yapılmış bir başka çalışmada 2,5 mg/mL konsantrasyonda güçlü antikanserojen etki göstermiştir. Ancak çözücü olarak yalnızca metanolun kullanıldığı ekstratın aynı konsantrasyonda etkisinin zayıf olduğu belirlenmiştir [69].

Farklı bir *Lamium* türü olan *L. amplexicaule*'nin metanol ekstratı 3 farklı hücre hattı üzerinde (EAC, HepG2 ve U251) çalışılmış ve sonuçlarda *L. amplexicaule*'nin antikanser etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir [74].

Araştırmacılar *Lamium* türlerinin sitotoksik aktivitesini gösterdiler ve sitotoksik etkinin palmitik asit de dahil olmak üzere çeşitli kimyasal bileşenlerden kaynaklandığını öne sürdüler. Araştırmaları, palmitik asidin, antitümör aktivitelerine yol açtığını ve palmitik asidin, antikanser ilaçlarında öncü bir bileşik olabileceğini göstermiştir [99].

L. purpureum L. bitkisinde 49 fitokimyasal maddenin bulunması tıbbi açıdan bir değerdir. Ancak bazı bileşenlerin hayvan veya insan için zararlı etkileri de olabilir. Antikanser ilaçlarda öncü bir bileşen olan palmitik asit *L. purpureum* L. bitkisinde yüksek oranda bulunmasına rağmen uçucu yağın antikanser etkisinin az olması ve hatta belli bir dozda proliferatif etkiyi arttırması, bu bitki içerisinde bulunan diğer bileşenlerin melanom hücre hattı üzerinde zararlı olabileceği fikrini ortaya çıkardı. Örneğin bu bitkinin ikinci ana bileşeni olan 7-Tetradekanal, daha önceki tespitlere göre cilt, göz ve solunum tahrişine sebep olan bir madde olarak bildirilmiştir [100], [101].

L. galeobdolon (L.) L.'da ana bileşen olarak bulunan 2(3H)-benzoksazon maddesinin türevleri ile ilgili yapılmış pek çok çalışma vardır. Bunlardan bir tanesi Ivanova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadır. Yeni 2(3H)-benzoksazon türevleri sentezlemişler ve bu bileşiklerin antikanser aktivitelerinin belirlemişlerdir. Sentezlenen yeni bileşiklerin yapılan biyo-tahlilinden çıkan sonuçlar potansiyel bir sitotoksik madde sınıfını temsil ettiğini ortaya koymuştur [102]. Buna bağlı olarak *L. galeobdolon* (L.) L. bitkimizin yüksek antiproliferatif etki göstermesinin, içerisinde yüksek oranda bulunan ve çalışmalarla sitotoksik etkili olduğu bildirilen 2(3H)-benzoksazon ve palmitik asit maddelerinden ileri gelebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda iki bitkinin uçucu yağları antiproliferatif etkinin yanında bazı dozlarda proliferatif etki de göstermiştir. Bu yağların etkinliğini kanıtlamak için *in vitro* ve *in vivo* modellerde ileri bilimsel çalışmalar yapılması önemlidir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bitkilerin zengin içeriğinden yararlanmak için mevcut bilimsel verilerin ışığında geçmişten günümüze kadar süregelen bitkisel tedavilerin güvenilirliğinin araştırılması ve bitkisel kaynaklı yeni ilaç arayışları gittikçe büyüyen bir araştırma alanıdır.

Çalışmamızda, Türkiye'de yaygın olarak yetişen *Lamium purpureum* L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. türlerinin kimyasal içeriği analiz edilmiştir. Ek olarak, antimikrobiyal, antikanserojen etkinlikleri test edilmiş ve antioksidan-oksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Bu bitki türlerinden elde edilen uçucu yağların sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile analiz edilmiş olup, ilk kez antikanserojen etkileri literatüre kazandırılmıştır. Yine uçucu yağları kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Yeni bir yöntem olan TAS-TOS kitleriyle bitkilerin etanol ekstratlarının antioksidan ve oksidan seviyeleri belirlenerek, oksidatif stres indeksleri hesaplanmıştır. *L. purpureum* L. bitkisinin biyoaktif etkilerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunan bu çalışma, *L. galeobdolon* (L.) L. bitkisi için literatüre geçen ilk biyoaktivite belirleme çalışmasıdır.

Çalışmamız, *Lamium purpureum* L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. türlerinin kimyasal bileşimi hakkında daha önceki bilgileri doğrular niteliktedir. Kimyasal açıdan önemli ve biyoaktif anlamda etkili bileşenler tespit edilmiştir. Bitkilerimizin antioksidan kapasitesi orta düzeyde olup, oksidan kapasitesi yüksek seviyededir. Oksidan seviyeyi arttıracak etkenlerin azaltılması şartıyla bitkilerin kontrollü kullanılması gerektiği söylenebilir. Bitkilerden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal etkinliği, total ekstratlarla yapılan çalışmalara nispeten düşük oranda çıkmıştır. Disklere emdirilen madde konsantrasyonlarının artırılmasıyla antimikrobiyal ajan olarak kullanımını destekleyecek başka çalışmalar yapılmalıdır. *Lamium purpureum* L. melanom hücrelerde belli bir dozda sitotoksik etki gösterirken, genelde proliferatif etkisi olduğu tespit edilmiştir. *Lamium galeobdolon* (L.) L ise ciddi oranda antiproliferatif etkiye sahiptir. Bu bitki türlerinin bir antikanser ajanı olarak potansiyel önemi ve terapötik kullanımı için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sentetik ilaçların sağlıklı hücreler üzerindeki istenmeyen yan etkiler göstermesi ve klinikte kullanımlarının oldukça maliyetli olması, doğal kaynaklı ilaçların kazanımlarının arttırılması gerektiğini düşündürmektedir. Fakat bu alanda yapılan deneysel çalışma ve araştırmalardan çıkan bulguları destekleyecek nitelikteki klinik çalışmaların sayısı henüz çok azdır. Bitkisel bileşiklerin biyoyararlanımının arttırılması, sağlıklı ve sağlıksız hücrelerle etkileşim mekanizmalarının araştırılması ve hastalıklar için etkin dozlarının belirlenmesi gibi konularda çalışmalar devam etmelidir.

6. KAYNAKLAR

- [1] A.B. da Rocha, R.M. Lopes and G. Schwartzmann, "Natural products in anticancer therapy," *Current Opinion in Pharmacology*, c. 1, sayı 4, ss. 364-369, 2001.
- [2] C.S.C. Garcia, C. Menti, A.P.F. Lambert, T. Barcellos, S. Moura, C. Calloni, C.S. Branco, M. Salvador, M. Roesch-Ely and J.A.P. Henriques, "Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells," *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, c. 88, sayı 1, ss. 281-292, 2010.
- [3] N. Saraç, A. Uğur and M.E. Duru, "Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of *Thymbra spicata* var. *intricata*," *International Journal of Green Pharmacy*, c. 3, sayı 1, ss. 24-28, 2009.
- [4] R. Paduch, G. Matysik, M. Wójciak–Kosior, M. Kandefer–Szerszeń, A. Skalska–Kamińska, M. Nowak–Kryśka and P. Niedziela. "Lamium album extracts express free radical scavenging and cytotoxic activities," *Polish Journal of Environmental Studies*, c. 17, sayı 4, ss. 569-580, 2008.
- [5] M. Heinrich, J. Barnes, S. Gibbons ve E.M. Williamson, *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2. baskı, Churchill Livingstone, London: Elsevier, 2012, ss. 40-41.
- [6] G. Nieto, "Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family," *Medicines*, c. 4, sayı 3, s. 63, 2017.
- [7] F. Naghibi, M. Mosaddegh, S.M. Motamed and A. Ghorbani "Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology," *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, c. 4, sayı 2, ss. 63-79, 2005.
- [8] F.N. Yalçın and D. Kaya, "Ethnobotany, pharmacology and phytochemistry of the genus *Lamium* (Lamiaceae)," *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, c. 31, sayı 1, ss. 43-52, 2006.
- [9] H. Karabulut ve M. Ş. Gülay, "Serbest radikaller," *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, c. 4, sayı 1, ss. 50-59, 2016.
- [10] İ. Gülçin, "Antioxidant activity of food constituents : an overview," *Archives of Toxicology*, c. 86, sayı 3, ss. 345-391, 2012.
- [11] V. Rai, V. R. Pai, and P. Kedilaya, "A preliminary evaluation of anticancer and antioxidant potential of two traditional medicinal plants from Lamiaceae- *Pogostemon heyneanus* and *Plectranthus amboinicus*," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, c. 6, sayı 08, ss. 73-78, 2016.
- [12] M. Greenwell and P.K.S.M. Rahman, "Medicinal plants : their use in anticancer treatment," *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, c. 6, sayı 10, ss. 4103-4112, 2015.
- [13] L.S.S. de Mesquita, T.R.S.A. Luz, et al. "Exploring the anticancer properties of

- essential oils from family Lamiaceae,” *Food Reviews International*, c. 35, sayı 2, ss. 105-131, 2018.
- [14] A. Çiftci and A. Aksoy. "Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları," *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, c. 1, sayı 2, ss. 1-10, 2015.
- [15] M. Lermi, “*Isatis cappadocica*’nın antioksidan, antimikrobiyal, tirozinaz inhibitör ve sitotoksik etkilerinin incelenmesi,” Yüksek Lisans tezi, Eczacılıkta Biyokimya, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2018.
- [16] D. Turhan, “Bazı esansiyel yağların *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* üzerine antimikrobiyal etkisinin araştırılması,” Yüksek Lisans tezi, Gıda Mühendisliği, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 2015.
- [17] K.H.C. Başer, “Uçucu yağlar ve aromaterapi,” *Fitomed*, c. 7, sayı 8, ss. 8-25, 2009.
- [18] D. Kalemba and A. Kunicka, "Antibacterial and antifungal properties of essential oils," *Current medicinal chemistry*, c. 10, sayı 10, ss. 813-829, 2003.
- [19] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar, “Biological effects of essential oils – A review,” *Food and chemical toxicology*, c. 46, sayı 2, ss. 446-475, 2008.
- [20] K. Blowman, M. Magalhães, M.F.L. Lemos, C. Cabral and I.M. Pires, “Anticancer properties of essential oils and other natural products,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018; Article ID:3149362.
- [21] P. Tongnuanchan and S. Benjakul, “Essential oils : extraction , bioactivities , and their uses for food preservation,” *Journal of food science*, c. 79, sayı 7, ss. 1231-1249, 2014.
- [22] E. Apaydın, “*Salvadora persica* (misvak) bitkisinden elde edilen uçucu yağın antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması,” *Sakarya University Journal of Science*, c. 22, sayı 3, ss. 1001-1006, 2018.
- [23] A. Kılıç, “Uçucu yağ elde etme yöntemleri,” *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, c. 10, sayı 13, ss. 37-45, 2008.
- [24] C. Dima and S. Dima, “Essential oils in foods : extraction, stabilization and toxicity,” *Current Opinion in Food Science*, c. 5, özel sayı, ss. 29-35, 2015.
- [25] S. M. Venkateshappa and K. P. Sreenath, “Potential medicinal plants of Lamiaceae,” *American International Journal of Research in Formal, Applied and Natural Sciences*, c. 1, sayı 3, ss. 82-87, 2013.
- [26] E. Büyüktüncel, “Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I,” *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, c. 32, sayı 2, ss. 209-242, 2012.
- [27] D. Krishnaiah, R. Sarbatly, and R. Nithyanandam, “A review of the antioxidant potential of medicinal plant species,” *Food and bioproducts processing*, c. 89, sayı 3, ss. 217-233, 2010.
- [28] A.S. Yalçın, A.M. Yılmaz, E.M. Altundağ, ve S. Koçtürk, “Kurkumin , Kuersetin ve Çay Kateşinlerinin Anti-Kanser Etkileri,” *Marmara Pharmaceutical Journal*, c. 21, sayı 1, ss. 19-29, 2017.

- [29] B. Yalameha, "Administration of herbal antioxidant to prevent and treatment of cancers," *Annals of Research in Antioxidants*, c. 3, sayı 1, 2018.
- [30] E. Çaylak, "Oksidatif stres," *Tıp Araştırmaları Dergisi*, c. 9, sayı 1, ss. 73-83, 2011.
- [31] N. Erdemoglu, N.N. Turan, I. Çakıcı, B. Sener and A. Aydın, "Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts," *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, c. 20, sayı 1, ss. 9-13, 2006.
- [32] Anonim, (2019, 3 Şubat). [Online]. Erişim: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>
- [33] L. Mouhid *et al.*, "Identification of antitumoral agents against human pancreatic cancer cells from Asteraceae and Lamiaceae plant extracts," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, c. 18, sayı 1, ss. 254, 2018.
- [34] Anonim, (2019, 8 Şubat) [Online]. Erişim: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma>
- [35] A.M. Tuncer, N. Özgül, E. Olcayto, M. Gültekin, *Türkiye'de Kanser Kontrolü*, Ankara: Koza Matbaacılık, Yayın No:777, 2010.
- [36] K. Kim *et al.*, "Inhibition of tumor growth *in vitro* and *in vivo* by fucoxanthin against melanoma B16F10 cells," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, c. 35, sayı 1, ss. 39-46, 2012.
- [37] L. Santos *et al.*, "Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae," *Food Reviews International.*, c. 35, sayı 2, ss. 105-131, 2019.
- [38] B. Barutca, "Bazı Bitki Bileşenlerinin Memeli Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Aktivitelerinin *In Vitro* Araştırılması," Yüksek Lisans tezi, Biyoloji, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye, 2006.
- [39] O. Tokur and A. Aksoy, "In Vitro Sitotoksik Testleri," *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, c. 6, sayı 1, ss. 112-118, 2017.
- [40] M. Alpay, "Kolon adenokarsinoma hücrelerinde (CACO-2) kapsaisin ve alfa lipoik asitin antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin incelenmesi," Doktora tezi, Biyokimya ABD, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2014.
- [41] A. H. Holmes *et al.*, "Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance," *The Lancet*, c. 387, sayı 10014, ss. 176-187, 2016.
- [42] A.E. Erdoğan, A. Everest, "Antimikrobiyal Ajan Olarak Bitki Bileşenleri," *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, c. 6, sayı 2, ss. 27-32, 2013.
- [43] B. Saran ve Z. C. Karahan, "Antimikrobiyal Ajanlara Genel Bakış," *Türk Üroloji Seminerleri*, c. 1, ss. 216-220, 2010.
- [44] M.T. Madigan, J.M. Martinko, *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, 14. baskı, İstanbul, Türkiye: Palme Yayıncılık, 2016, ss. 811-824
- [45] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, "Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity : A review," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, c. 6, sayı 2, ss. 71-79, 2016.
- [46] L.B. Reller, M. Weinstein, J.H. Jorgensen and M. J. Ferraro, "Antimicrobial

- susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices,” *Clinical Infectious Diseases*, c. 49, sayı 11, ss. 1749-1755, 2009.
- [47] “R.R. Raja, "Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview." *Research Journal of Medicinal Plant*, c. 6, sayı 3, ss. 203-213, 2012.
- [48] F. Celep and T. Dirmenci. "Systematic and Biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey." *Natural Volatiles & Essential Oils*, c. 4, sayı 4, ss. 14-27, 2017.
- [49] Y.Z. Kocabaş and Ş. Karaman. "Essential oils of Lamiaceae family from south east Mediterranean region (Turkey)." *Pakistan Journal of Biological Sciences*, c. 4, sayı 10, ss. 1221-1223, 2001.
- [50] Anonim, (2019, 1 Şubat). [Online]. Erişim: https://www.wildflowers-and-weeds.com/Plant_Families/Lamiaceae.htm
- [51] K. Alipieva, L. Evstatieva, N. Handjieva, S. Popova. "Comparative analysis of the composition of flower volatiles from *Lamium* L. species and *Lamiastrum galeobdolon* Heist. ex Fabr." *Zeitschrift für Naturforschung C*, c. 58, sayı 11-12, ss. 779-782, 2003.
- [52] S.M. Grujić et al., “Effects of solvent extraction system on antioxidant activity of *Lamium purpureum* L .,” *Hemijska Industrija*, c. 71, sayı 5, ss. 361-370, 2017.
- [53] H. Fathi *et al.*, “In-vitro evaluation of the antioxidant potential , total phenolic and flavonoid contents and antibacterial activity of *Lamium album* extracts” *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, c. 9, sayı 10, ss. 4210-4219, 2018.
- [54] P. Trouillas *et al.*, “Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas,” *Food Chemistry*, c. 80, sayı 3, ss. 399-407, 2003.
- [55] Anonim, (2019, 6 Şubat). [Online]. Erişim: <https://www.first-nature.com/flowers/lamium-purpureum.php>.
- [56] Anonim, (2019, 1 Şubat). [Online]. Erişim: <https://kocaelibitkileri.com/lamium-purpureum/>
- [57] Anonim, (2019, 1 Şubat). [Online]. Erişim: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Lamium+purpureum>.
- [58] Anonim, (2019, 6 Şubat). [Online]. Erişim: <https://www.first-nature.com/flowers/lamium-galeobdolon.php>
- [59] Anonim, (2019, 1 Şubat). [Online]. Erişim: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Lamium+galeobdolon>
- [60] A. El-Gazzar and L. Watson “Some economic implications of the taxonomy of Labiatae essential oils and rusts,” *New Phytologist*, c. 69, sayı 2, ss. 487-492, 1970.
- [61] A. El-Gazzar and L. Watson, “A taxonomic study of Labiatae and related genera,” *New Phytologist*, c. 69, sayı 2, ss. 451-486, 1970.
- [62] Z.I.A. El-Sayed, “Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oil of *Lamium maculatum* L. grown in Egypt,” *Biosciences Biotechnology Research Asia*, c. 5, sayı 1, ss. 65-72, 2008.

- [63] V. Roussis, I. Chinou, D. Perdetzoglou, and A. Loukis, "Identification and bacteriostatic activity of the essential oil of *Lamium garganicum* L. ssp. *laevigatum* Arcangeli," *Journal of Essential Oil Research*, c. 8, sayı 3, ss. 291-293, 1996.
- [64] F.N. Yalçın, D. Kaya, E. Kılıç, M. Özalp, T. Ersöz, İ. Çalış. "Antimicrobial and free radical scavenging activities of some *Lamium* species from Turkey." *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, c. 27, sayı 1, ss. 11-22, 2007.
- [65] B. Dulger, "Antifungal activity of *Lamium tenuiflorum* against some medical yeast *Candida* and *Cryptococcus species*," *Pharmaceutical Biology*, c. 47, sayı 5, ss. 467-470, 2009.
- [66] L. Kokoska, Z. Polesny, V. Rada, A. Nepo, and T. Vanek, "Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity," *Journal of Ethnopharmacology*, c. 82, sayı 1, ss. 51-53, 2002.
- [67] T. Baytop, *Türkiye'nin Tıbbi Ve Zehirli Bitkileri*, İstanbul, Türkiye: İstanbul Üniversitesi, 1963, ss. 334-335.
- [68] V.A. Chipeva *et al.*, "Antimicrobial activity of extracts from *in vivo* and *in vitro* propagated *Lamium album* L. plants." *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, c. 10, sayı 6, ss. 559-562, 2013.
- [69] T. Topouzova-Hristova *et al.*, "Anticancer effect of plant extracts from *Lamium album* L. by induction of cell death *in vitro*," *Medicine*, c. 2, sayı 1, ss. 55-59, 2012.
- [70] J. M. Calderón-Montaña, E. Burgos-Morón, C. Pérez-Guerrero, and M. López-Lázaro, "A review on the dietary flavonoid kaempferol" *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, c. 11, sayı 4, ss. 298-344, 2011.
- [71] G. Flamini, P.L.Cioni and I. Morelli, "Composition of the essential oils and *in vivo* emission of volatiles of four *Lamium* species from Italy: *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*." *Food Chemistry*, c. 91, sayı 1, ss. 63-68, 2005.
- [72] K. Alipieva, *et al.* "LC-ESI-MS analysis of iridoid glucosides in *Lamium* species." *Biochemical Systematics and Ecology*, c. 35, sayı 1, ss. 17-22, 2007.
- [73] A. Matkowski and M. Piotrowska, "Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae," *Fitoterapia*, c. 77, sayı 5, ss. 346-353, 2006.
- [74] N.M. Abdel-Hady, *et al.* "Interrelation of antioxidant, anticancer and antileishmania effects of some selected Egyptian plants and their phenolic constituents." *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, c. 41, sayı 3, ss. 785-800, 2011.
- [75] Anonim, (2019, 1 Haziran). [Online]. Erişim: <https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=45843>
- [76] K. Canlı, O. Şimşek, A. Yetgin, E.M. Altuner. "Determination of the chemical composition and antimicrobial activity of *Frankenia hirsuta*." *Bangladesh Journal of Pharmacology*, c. 12, sayı 4, ss. 463-469, 2017.
- [77] O. Erel, "A novel automated direct measurement method for total antioxidant

- capacity using a new generation , more stable ABTS radical cation,” *Clinical Biochemistry*, c. 37, sayı 4, ss. 277-285, 2004.
- [78] Dr. M. Ergin, “Toplam antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemlerin karşılaştırılması” Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Ankara, 2015.
- [79] O. Erel, “A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status,” *Clinical Biochemistry*, c. 38, sayı 12, ss. 1103-1111, 2005.
- [80] E. Pothou, E. Melliou, L. Skaltsounis, M. Liouni and P. Magiatis, “Investigation of volatile constituents of beer, using resin adsorption and gc/ms, and correlation of 2-(3 h)-benzoxazolone with wheat malt,” *Journal of American Society of Brewing Chemists*, c. 71, sayı 1, ss. 35-40, 2013.
- [81] A.G. Usman, “Study on synthesis and characterization of some 2-benzoxazolinone derivatives,” M.S. thesis, Pharmaceutical Chemistry, Health Sciences Institute, Near East University, Nicosia, Cyprus, 2018.
- [82] I.S. Fomsgaard, et al. "Use of benzoxazinoids-containing cereal grain products for health-improving purposes." *U.S. Patent Application*, c. 12, sayı 933, ss. 195, 2011.
- [83] K. Schullehner *et al.*, “Phytochemistry Benzoxazinoid biosynthesis in dicot plants,” *Phytochemistry*, c. 69, sayı 15, ss. 2668-2677, 2008.
- [84] K. I. Alipieva, R. M. Taskova, L. N. Evstatieva, N. V. Handjieva, and S. S. Popov, “Benzoxazinoids and iridoid glucosides from four *Lamium* species,” *Phytochemistry*, c. 64, sayı 8, ss. 1413-1417, 2003.
- [85] C. D. Jones, K. E. Woods, and W. N. Setzer, “A chemical ecological investigation of the allelopathic potential of *Lamium amplexicaule* and *Lamium purpureum*,” *Open Journal of Ecology*, c. 2, sayı 4, ss. 167-177, 2012.
- [86] Anonim, (2019, 4 Nisan). [Online]. Erişim: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tetradecanal>.
- [87] K. Morteza-Semnani, M. Saeedi, M. Akbarzadeh. “Chemical Composition of the Essential Oil of the Flowering Aerial Parts of *Lamium album* L.” *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, c. 19, sayı 3, ss. 773-777, 2016.
- [88] A. Iordache, M. Culea, C. Gherman and O. Cozar. “Characterization of some plant extracts by GC–MS.” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, c. 267, sayı 2, ss. 338-342, 2009.
- [89] K.L. Mikolajczak, M.F. Rogers, C.R. Smith, and I.A. Wolff, “An octadecatrienoic acid from *Lamium purpureum* L. seed oil containing 5 , 6- allenic and trans-16-olefinic unsaturation MnO₄C,” *Biochemical Journal*, c. 105, sayı 3, ss. 1245-1249, 1967.
- [90] C.L. Prins, I.J. Vieira and S.P. Freitas. “Growth regulators and essential oil production.” *Brazilian Journal of Plant Physiology*, c. 22, sayı 2, ss. 91-102, 2010.
- [91] M. Pehlivan and M. Sevindik, “Antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia multicaulis*,” *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, c. 6, sayı 5, ss. 628-631, 2018.

- [92] M. Sevindik, H. Akgul, M. Pehlivan, and Z. Selamoglu, "Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*," *Fresenius Environmental Bulletin*, c. 26, sayı 7, ss. 4757-4763, 2017.
- [93] J. Budzianowski and A. Budzianowska, "Chromatographic and spectrophotometric analyses of the DPPH free radical scavenging activity of the fractionated extracts from *Lamium album* L., *Lamium purpureum* L. and *Viscum album* L.," *Herba Polonica*, c. 52, sayı 1, ss. 51-57, 2006.
- [94] C. Bubueanu, et al., "Antioxidant activity of butanolic extracts of Romanian native species–*Lamium album* and *Lamium purpureum*," *Romanian Biotechnological Letters*, c. 18, sayı 6, ss. 8855-8862, 2013.
- [95] D. Sanglard and F.C. Odds, "Resistance of *Candida* species to antifungal agents : molecular mechanisms and clinical consequences," *The Lancet Infectious Diseases*, c. 2, sayı 2, ss. 73-85, 2002.
- [96] E. Solmaz, "*Lamium purpureum* L. var. *purpureum* türünün farklı ekstrelerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi ve aktivitede rol oynayan fenoliklerin belirlenmesi," Yüksek Lisans tezi, Biyoloji ABD, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Türkiye, 2009.
- [97] M.T. Selvi, R. Thirugnanasampandan and S. Sundarammal. "Antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of *Ocimum canum* Sims. from India." *Journal of Saudi Chemical Society*, c. 19, sayı 1, ss. 97-100, 2015.
- [98] T. Baytop, *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*, 2. baskı, İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevi, 1999, s. 163.
- [99] H. Harada, U. Yamashita, H. Kurihara, E. Fukushi, J. Kawabata, Y. Kamei. "Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga." *Anticancer Research*, c. 22, sayı 5, ss. 2587-2590, 2002.
- [100] Anonim, (2019, 4 Nisan). [Online]. Erişim: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/174080section=Safety-and-Hazards>
- [101] Anonim, (2019, 4 Nisan). [Online]. Erişim: <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/56693>
- [102] Y. Ivanova, G. Momekov, O. Petrov, M. Karaivanova, and V. Kalcheva, "Cytotoxic Mannich bases of 6- (3-aryl-2-propenoyl)-2(3H) -benzoxazolones," *European Journal of Medicinal Chemistry*, c. 42, sayı 11-12, ss. 1382-1387, 2007.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşegül AKKOYUNLU
Doğum Tarihi ve Yeri :01.06.1984 / Düzce
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta : aysegulgungor84@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyoloji	Düzce Üniversitesi	2019
Y.Lisans(Tezsiz)	Biyoloji Öğretmenliği	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2011
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2007
Lise		Düzce Anadolu İmam Hatip Lisesi	2002

ÇALIŞMALAR

1. *Lamium purpureum* L. ve *Lamium galeobdolon* (L.) L. Türlerinin Biyolojik Aktivitelerinin ve Kimyasal Kompozisyonlarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi

YAYINLAR

1. Akkoyunlu A., Dülger G., Chemical Composition of *Lamium purpureum* L. and Determination of Anticancer Activity of Its Essential Oil on Melanoma. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, c. 7, sayı 3, ss.1755-1763, (2019).