

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ'NDE YETİŞEN
BAZI ENDEMİK BİTKİLERİN
ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

778413

DOKTORA TEZİ

118413

Celal Kurtuluş BURUK

Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Haziran 2002

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ'NDE YETİŞEN
BAZI ENDEMİK BİTKİLERİN
ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Celal Kurtuluş BURUK

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 19.04.2002

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 21.06.2002

Tez Danışmanı

: Yrd. Doç. Dr. Faruk AYDIN

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Murat ERTÜRK

Jüri Üyesi

: Doç. Dr. Nuri İhsan KALYONCU

Enstitü Müdürü

: Doç. Dr. Abdülkadir REİS

Haziran 2002
TRABZON

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, yardım ve desteklerini her zaman yanımda bulduğum, eğitim ve bilimsel karakterime yaptıkları katkılarla beni yönlendiren sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Faruk AYDIN, Prof. Dr. Murat ERTÜRK ve Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ'a,, her zaman yanımda olup, dostluk ve yardımlarını esirgemeyen hoca ve arkadaşlarım sayın Yrd. Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Yrd. Doç. Dr. İlknur TOSUN, Dr. Meral CİHANYURDU, Dr. Demet CANYILMAZ, Yrd. Doç. Dr. Şengül KARAOĞLU, Dr. Kıvanç ÇUBUKÇU, Yrd. Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ, Dr. Serpil YETİŞKUL, Dr. Metin SANCAKTAR, Dr. Yelda YAZICI, Dr. Hayriye BALTAOĞLU, Kimyager Belma ESMER, Biyolog Eylem Filiz ALTUNCU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda materyallerimi oluşturan bitkilerin toplanma ve tanımlanmalarındaki katkılarından dolayı sayın KTÜ Orman Fakültesi öğretim üyeleri, Prof. Dr. Rahim ANŞİN ve Yrd. Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU'na, ekstraktların hazırlanması, liyofilizasyonu, fraksiyonlanmaları hususunda bilgi, yardım ve bizzat emeklerini esirgemeyen Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyeleri sayın Doç. Dr. Atalay SÖKMEN ve sayın Yrd. Doç. Dr. Münevver SÖKMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca katkılarından dolayı Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline teşekkür ederim.

Doktora yapmam konusunda beni destekleyen KTÜ Ordu Ziraat Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Y. Nurettin İSMAİLÇELEBİOĞLU'na şükranlarımı sunarım.

En büyük desteğim, sevgili eşim Süheyla, çocuklarım Oğuz ve K.Kağan'a teşekkür ederim.

Bu çalışmaya Yrd. Doç. Dr. Faruk AYDIN yönetimindeki DPT 95K120430 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Devlet Planlama Teşkilatına teşekkür ederim.

Celal Kurtuluş BURUK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Tıbbi Bitkiler	5
2.2.1. Tıbbi Bitkilerin Modern Çağdaki Önemi	6
2.2.2. Türkiye’de Bitkisel Tıp	7
2.2.3. Doğu Karadeniz Bölgesi’nde Bitkisel Tıp	8
2.3. Doğu Karadeniz Bölgesi’nde Endemik Bitkiler	8
2.4. Bitkilerin Antimikrobiyal Önemi	8
2.5. Bitkilerdeki Kimyasal Farklılıklar	9
2.6. Bitkilerden Elde Edilen Antimikrobiyalleri İçeren Esas Gruplar	10
2.6.1. Fenolikler ve Polifenoller	10
2.6.2. Terpenoidler ve Uçucu Yağlar (Esanslar)	12
2.6.3. Alkaloidler	12
2.6.4. Lektinler ve Polipeptidler	12
2.6.5. Karışımlar	13
2.6.6. Diğer Bileşikler	13
3. MATERYAL VE METOD	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Endemik Bitkiler	14
3.1.2. Kullanılan Gereçler	25
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri	26

3.1.4. Kullanılan Mikroorganizma Suşları	27
3.1.5. Kullanılan Vero Hücre dizisi	32
3.1.6. Besiyeri ve Solüsyonların Hazırlanması	32
3.1.6.1. Bakteriyel ve Fungal Besiyerlerinin Hazırlanması	32
3.1.6.2. Hücre Kültür Vasatlarının Hazırlanması	33
3.1.6.3. Solüsyonların Hazırlanması	34
3.2. Metod	37
3.2.1. Çalışma Planı	37
3.2.2. Bitki Örneklerinin Kısımlarına Ayrılması ve Stoklanması	38
3.2.3. Ekstraktların Hazırlanması	39
3.2.3.1. Ekstraksiyon	40
3.2.3.2. Evaporasyon	41
3.2.3.3. Partitasyon	41
3.2.3.4. Kaba Maddelerin Elde Edilmesi	41
3.2.4. Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması	44
3.2.4.1. Antibakteriyel Aktivite Deneyleri	44
3.2.4.2. Antifungal Aktivite Deneyleri	47
3.2.4.3. Antiviral Aktivite Deneyleri	49
3.2.5. Aktivite Gösteren Kısımların Fraksiyonlanması ve Aktivitelerinin Belirlenmesi	56
3.2.5.1. Silika Kolonun Hazırlanması	56
3.2.5.2. <i>Centaurea helenioides</i> ve <i>Anthemis cretica</i> ssp. <i>argaea</i> Yaprak Ekstraktlarının Fraksiyonlanması	57
4. BULGULAR	60
4.1. Antibakteriyel Aktivite Deneyleri	60
4.2. Antifungal Aktivite Deneyleri	66
4.3. Antiviral Aktivite Deneyleri	69
5. TARTIŞMA	71
5.1. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	71
5.2. Ekstraktların Antibakteriyel ve Antifungal Aktiviteleri	72

5.3. Ekstraktların Antiviral Aktiviteleri	80
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
7. ÖZET	91
8. SUMMARY	93
9. KAYNAKLAR	95



ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Angelica sylvestris</i> var. <i>stenoptera</i>	14
Şekil 2. <i>Verbascum varians</i> var. <i>trapezunticum</i>	15
Şekil 3. <i>Salix rizeensis</i>	15
Şekil 4. <i>Phlomis russeliana</i>	16
Şekil 5. <i>Alchemilla rizeensis</i>	16
Şekil 6. <i>Rosa pisiformis</i>	17
Şekil 7. <i>Jasione supina</i> subsp. <i>pontica</i>	17
Şekil 8. <i>Primula longipes</i>	18
Şekil 9. <i>Centaurea appendicigera</i>	18
Şekil 10. <i>Campanula betulifolia</i>	19
Şekil 11. <i>Rh. ponticum</i> ssp. <i>ponticum</i> var. <i>heterophyllum</i>	19
Şekil 12. <i>Betula medwediewii</i>	20
Şekil 13. <i>Quercus pontica</i>	20
Şekil 14. <i>Heracleum platytaenium</i>	21
Şekil 15. <i>Centaurea helenioides</i>	21
Şekil 16. <i>Delphinium formosum</i>	22
Şekil 17. <i>Quercus macranthera</i> ssp. <i>syspirensis</i>	22
Şekil 18. <i>Papaver lateritium</i>	23
Şekil 19. <i>Lamium sulfureum</i>	23

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan bakteri suşları ve özellikleri	27
Tablo 2. Kullanılan mantar suşları ve özellikleri	30
Tablo 3. Kullanılan virus suşları ve özellikleri	31
Tablo 4. Bitki kısımları	38
Tablo 5. Bitki kısımlarına ait ekstrakt kodları	42
Tablo 6. <i>Centaurea helenioides</i> yaprak ekstraktının fraksiyonlanması	58
Tablo 7. <i>Anthemis cretica</i> ssp. <i>argaea</i> yaprak ekstraktının fraksiyonlanması	58
Tablo 8. <i>Centaurea helenioides</i> 'ten elde edilen fraksiyonların ağırlıkları	59
Tablo 9. <i>Anthemis cretica</i> ssp. <i>argaea</i> 'dan elde edilen fraksiyonların ağırlıkları	59
Tablo 10. Ekstraktların antibakteriyel aktivitelerinin araştırılması	61
Tablo 11. Antibakteriyel etkili ekstraktlar	63
Tablo 12. Güçlü antibakteriyel etkili ekstraktlar	64
Tablo 13. Antibakteriyel aktiviteye sahip ekstraktların MİK ve MBK değerleri	65
Tablo 14. Fraksiyonların antibakteriyel MİK ve MBK değerleri	66
Tablo 15. Antifungal etkili ekstraktlar	67
Tablo 16. Fraksiyonların antifungal MİK ve MFK değerleri	68
Tablo 17. Antiviral etkili ekstraktlar	69
Tablo 18. Antiviral etkili ekstraktların yüzde inhibisyon ve IC ₅₀ değerleri	70

Şekil 20. <i>Anthemis cretica</i> ssp. <i>argaea</i>	24
Şekil 21. <i>Onobrychis armena</i>	24
Şekil 22. <i>Sempervivum armenum</i> var. <i>armenum</i>	25
Şekil 23. Çalışma planı	37
Şekil 24. Ekstraksiyon şeması	39
Şekil 25. Soxhlet aparatı	40
Şekil 26. Virus titrasyonunda kullanılan 24 kuyucuklu pleyt	52
Şekil 27. Boyalı konfluent Vero hücreleri	53
Şekil 28. HSV-1 ve HSV-2'nin titrasyonu	53
Şekil 29. Agar kuyucuk yayılma yöntemiyle antibakteriyel aktivite aranması	60
Şekil 30. Ekstraktların MİK'lerinin belirlenmesi	64
Şekil 31. PRA ile ekstraktların antiviral etkilerinin araştırılması	70
Şekil 32. İnhibitör etkili ekstraktların bakteri ve mantarlara göre dağılımı	73
Şekil 33. <i>Angelica sylvestris</i> var. <i>stenoptera</i> (1S/s)	81
Şekil 34. <i>Alchemilla rizeensis</i> (5Fl+S/s)	82
Şekil 35. <i>Rosa pisiformis</i> (6F/s)	82
Şekil 36. <i>Rhododendron ponticum</i> ssp. <i>ponticum</i> var. <i>heterophyllum</i> (11F'/s, 11F/s)	83
Şekil 37. <i>Betula medwediewii</i> (12F/s, 12Fr/s)	84
Şekil 38. <i>Quercus pontica</i> (13F/s)	84
Şekil 39. <i>Quercus macranthera</i> ssp. <i>syspirensis</i> (17Fr/s)	85

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BA	: Brucella agar
DCM	: Diklorometan
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EMB	: Eosin methylene blue agar
EtAc	: Etil asetat
FCS	: Foetal Calf Serum
GM	: Growth medium (büyütme vasatı)
HSV	: Herpes simpleks virus
KA	: Kanlı agar
M199	: Medium 199
MBK	: Minimal bakterisidal konsantrasyon
MEB	: Malt extract broth
MeOH	: Metanol
MFK	: Minimal fungisidal konsantrasyon
MHA	: Mueller-Hinton agar
MHB	: Mueller-Hinton broth
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
MM	: Maintenance medium (idame vasatı)
NEAA	: Non-essential amino acids
PBS	: Phosphate buffered saline
Pfu	: Plaque forming unit
PRA	: Plaque reduction assay
SDA	: Sabouraud dextrose agar
SF	: Serum fizyolojik
YEPD	: Yeast extract, peptone, dextrose broth

1. GİRİŞ VE AMAÇ

An apple a day keeps the doctor away

Bir Amerikan deyiş (1)

Günümüzde bitkiler tüm dünyada önemli bir ilaç kaynağıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) reçete edilen ilaçların %25'i bitkilerden elde edilmiş maddeleri içermektedir (2).

Bitkilerle tedavi, tarih boyunca bilim adamlarının ilgi odağı haline gelmiştir. Geleneksel ve yerli bitkisel ilaç farmakopelerin farkına varılması, bu kaynaklardaki bazı bitkilerden elde edilen türevlerin modern farmakopelere alınması, bitkisel drogların modern ilaçlara göre daha ucuz ve güvenli oluşları ile ilgili bilgiler son yıllarda bu ilgiyi artırmıştır. Ayrıca bazı hastaların kendi tedavilerinde özerk davranmak istemeleri de önemli bir faktördür. Nitekim kanser, diyabet ve artrit gibi kronik veya spesifik tedavisi olmayan hastalıklarda ya da soğuk algınlığı gibi evde geçirilen hastalıklardan korunmada ve tedavilerinde bitkiler sıklıkla kullanılmaktadır (3).

Mikrobiyolojik olarak ise çoklu ilaç direncine sahip patojenik mikroorganizmaların ortaya çıkışı, antibiyotiklerin yan etkileri ve güvenilir tedavi seçenekleri olmayan viral hastalıklar (kazanılmış immünyetmezlik hastalığı-AIDS, Hepatit B ve C gibi), bitkisel kaynaklı antimikrobiyal ilaçların araştırılmasına yönelik ilgiyi artırmaktadır. Özellikle tıbbi bitkiler bu konuda temel potansiyel olarak görülmekte ve buna yönelik olarak araştırılmaktadır (4, 5, 6, 7, 8, 9).

Yayınlanan makaleler üzerinden yapılan istatistikler, yapılan çalışmaların büyük bir kısmının Amerika ve Avrupa merkezli olduğunu göstermektedir (10).

Ülkemizde de başta tıbbi bitkiler olmak üzere çeşitli bitkilerden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmaktadır (11, 12, 13, 14, 15, 16).

Doğu Karadeniz Bölgesi coğrafik yapısı itibariyle zengin bir floraya sahiptir. Bölgede 2000'den fazla bitki türü bulunduğu, 500'den fazlasının endemik olduğu belirtilmektedir (17). Endemik olarak yetişen bu bitkilerin çok az bir kısmının biyolojik etkileri araştırılabilmektedir.

Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetişen bazı endemik bitkilerden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Bitkiler tarih boyunca insanlardaki travma ve hastalıklarının tedavisinde kullanılmışlardır (18). Tüm insanlar tarih öncesinden beri yüzlerce belki de binlerce yerli bitkiyi yaralarına sürerek ve içerek tedavi amacıyla kullanmışlardır (1). Hakkari'nin hemen güneyinde Şânidâr Mağarası'nda ortaya çıkartılan 50000 yıllık Neanderthal insanına ait mezarda, halen bölgede tıbbi amaçlar için kullanılan *Alchemilla* (Civan Perçemi), *Althaea* (gülhatmi), *Centaurea* (peygamber çiçeği), *Ephedra* (efedra), ve *Muscari* (salkımlı sümbül) türleri bulunmuştur (19). Tıbbi bitkiler hakkında saptanan ilk yazılı belgeler 5000 yıl önceki Çin, Hint ve Yakın Doğu medeniyetlerine ait olmasına rağmen şüphesiz bitkilerle tedavi insanoğlu kadar eskidir (2). Hintliler M.Ö. 3000'li yıllarda kullandıkları 8000'den fazla bitkisel ilacı Ayurveda (Hayat Bilgisi) adlı kaynakta toplamışlardır (18). Bu bitkilerden bazıları, Hindistan'da günümüzde de kullanılmaktadır. Bunlar arasında bulunan Hintlilerin "Ay Hastalığı" adını verdikleri mental hastalıkların tedavisinde kullandıkları *Rauwolfia serpentina* batılıların ilgisini çekmiş, 1950'lerde U.S. Pharmacopoeia'sine seçilmiştir. Ekstresi olan "reserpine alkaloidleri" günümüzde özel bir mental hastalıkta ve hipertansiyonda kullanılmaktadır (20).

Çin imparatoru Shen-nung (M.Ö. 3000-2500'li yıllarda), içinde ginseng, afyon ve efedranın da olduğu 365 bitkisel ilacı içeren ilk farmakopeyi (Pun-tsao) yazmıştır (18, 20). Bu yıllarda Çinlilerin irinli yaraları tedavi için küfleri kullandıkları bilinmektedir (21).

Mezopotamya uygarlıklarına (Sümer, Akad ve Asurlar) ait M.Ö. 2000'li yıllardaki tablet kayıtlarından, 250 civarında bitkiden tıbbi amaçla faydalandıkları anlaşılmaktadır (19). İngilizce apricot (kayısı), cherry (kiraz), almond (badem) ve

poppy (gelincik, afyon) bitki adlarının Asuri dilinde de bulunması kültürel etkileşimin boyutlarını vurgulaması açısından önemli ve ilginçtir (20). Sümerlere ait yazılı belgelerde yaklaşık 1000 tıbbi bitki adı mevcuttur (18).

Mısır tıbbına ait bilgiler Herodotus gibi (M.Ö. 480-425) Yunanlı tarihçiler tarafından yazılmıştır. Ondokuzuncu yüzyıl ortalarında bulunan, muhtemelen hekim veya din adamları tarafından M.Ö. 1500'lerde yazılan papiruslarda (Hearst papirusu ve Ebers papirusu) üzüm, soğan, sarımsak, fasulye, arpa, sedir ve çiğdem gibi çok sayıda tıbbi bitkiden bahsedilmektedir. Sadece Ebers papirusu 800 civarında reçete içermektedir. Bunların 20'den fazlası sarımsak içermektedir. Eski Mısırlıların çiğdem (*Colchicum autumnale*) bitkisini Gut hastalığının tedavisinde kullandıklarına yönelik deliller mevcuttur (19, 20). Ayrıca Mısırlıların açık yaralara küflü ekmek uyguladıkları bilinmektedir (21).

Grek tıbbı, özellikle Mezopotamya ve Eski Mısır ile kurdukları yakın ilişkiler neticesi bunlardan etkilenmiştir. Bu dönemde yazılan kitaplar uzun yıllar İslam ve Avrupa tıbbında kullanılmıştır. Hekimliğin babası olarak kabul edilen Hippocrates (M.Ö. 460-377) tarafından yazılan 150 kadar kitapta botanik tarifleri yapılmaksızın 200'den fazla tıbbi bitkiden bahsedilmektedir (19, 20). Hippocrates bitki toplamayıp hastalığa göre bitkileri kullanarak ilaç hazırlamıştır. Bu sebeple o dönemde kökü çıkartan, bitki toplayan bir topluluk oluşmuştur (20). Botaniğin babası olarak bilinen Theophraste (M.Ö. 370-287) eğrelti otunun etkilerini ilk bildiren hekimdir (19). Eski Yunan'da sadece tedavi edici bitkiler değil aynı zamanda intihar veya idamda kullanılabilecek zehirli bitkiler de araştırılmıştır. Politik desteğini kaybeden Socrates'e ağiotu (baldıran) zehiri içeren özel bir kap içindeki sıvıyı içmesi için izin verilmiştir (20).

Pontus kralı Mithridates (M.Ö. 132-63) babasının hileli şekilde öldürüldüğünü görmüş, kendisinin de annesi tarafından öldürüleceğini düşünerek dağlara kaçmıştır (19). Trabzon ve Rize dağlarında yetişen zehirli bitkilerle ilgilenmiş, kral olduktan sonra kendini korumak için tüm zehirlere karşı etkili genel bir antidot araştırmıştır (22). İçinde 48 drog bulunan "Mithridaticum" adlı panzehiri bulmuştur (19).

Roma tarihinin en önemli tıbbi botanisti Kozan ilçesinin Anazarba şehrinde (bugünkü Dilekkaya köyü) doğmuş olan Pedanios Dioscorides'tir (20-?). Yazdığı

“De Materia Medica” adlı kitabında tıbbi önemi olan 600’den fazla bitkiden bahsetmiştir (19). O günün sağlık problemlerini çözmek için çalışmış, savaşta yaralanan askerlerin kanamalarını durdurmak için *Achillea* bitkisinden hazırladığı merhemi kullanmıştır. Dioscorides ayrıca akdiken (alıç) gibi bitki kökünden hazırlanan drogların doğum kontrolünde kullanılabileceğini yazmıştır. Bergama’da doğmuş olan Galenus (130-201) da 500 kadar drog terkiibinden bahsetmiştir (20).

Arap hekimlerinden Dineveri (820-895), bitkilerin sınıflandırılmaları, bunlardan faydalanma yolları ve cinsel gücü artırıcı maddeleri anlatan kitaplar yazmıştır. Ebu Reyhan Biruni (973-1051) ise 200 kadar bitkisel drogu tarif etmiştir. Batıda Avicenna adıyla tanınan büyük Türk bilgini İbni Sina yazdığı kitaplarda 785 bitkisel, hayvansal ve madensel droğun terkiibini ve kullanılış şeklini yazmıştır. Osmanlı Devleti döneminde tıbbi bitkilerle tedavi uygulanmış, bunlarla ilgili eserler yazılmıştır. Fatih Sultan Mehmet’in hocası aynı zamanda hekim olan Ak Şemseddin bitkilerle ilgilenmiştir. Gerede’li İshak bin Murad tarafından 1389-90 yıllarında yazılan iki ciltlik kitapta bugün de aynı şekilde uygulanan tıbbi bitkiler ve kullanılışları anlatılmıştır (19). Avrupa tıbbi Arap tıbbından büyük ölçüde etkilenmiştir. Evliya Çelebi tarafından yazılan Seyahatname’de birçok drog hakkında bilgi bulunmaktadır (19).

Bitkisel kaynaklı kemoterapinin tarihsel gelişiminde, 1600’lü yıllarda kınakına kabuklarının sıtma hastalığının tedavisinde kullanılmaya başlanması önemli bir aşamadır. 1700’lü yıllarda kaba ekstraktlardan esas etkili maddelerin elde edilmeye başlanmasını takiben 1820 yılında, uzun süre çeşitli galenik preparatlar halinde kullanılan kınakına kabuklarının etken maddeleri olan kinin ve kinkonin Pelletier ve Caventou tarafından izole edilmiştir (23).

2.2. Tıbbi Bitkiler

Tıbbi özelliklere sahip olduğu ileri sürülen tüm yüksek yapılı bitkilere **tıbbi bitki** adı verilmektedir. Bu tanımın içine sağlıkla ilgili etkileri olan, batı standartlarına göre ilaç olarak kullanılabiliirliği ispat edilen veya ilaç olarak

kullanılan maddeler içeren tüm bitkiler girmektedir (24). **Drog** ise ilaçların hazırlanmasında kullanılan bitkisel veya hayvansal kökenli ilkel maddelerdir (25).

2.2.1. Tıbbi Bitkilerin Modern Çağdaki Önemi

Dünya üzerinde 750 bin ile 1 milyon arasında bitki türü olduğu tahmin edilmektedir. Bunlardan 500 bin kadarı tanımlanıp isimlendirilmiştir. Bunların küçük bir kısmı tıbbi bitki olarak belirtilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1979 yılında yapılan bir araştırmada beşten fazla ülkede kullanılan ve ticareti yapılan bitkisel drogların toplam miktarı 1900 olarak saptanmıştır (19). Aynı kurumun 1991 yılında tüm dünyada bulunan tıbbi bitkilerin listesinin çıkarılmasına yönelik çalışması sonucu 20000'den fazla tür belirlenmiştir. Yapılan bir başka araştırmada ise yeryüzündeki bitkilerin %14-28'inin tıbbi amaçlarla kullanıldığı ileri sürülmektedir (24).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tahminlerine göre gelişmekte olan ülkelerin toplam nüfusunun yaklaşık % 80'i, primer sağlık tedavi ihtiyaçlarını geleneksel ilaçlardan karşılamaktadır. Bunun büyük bir bölümü bitki ekstraktlarıdır (24). Bir başka kaynağa göre dünyada 3 milyar insan tedavide primer olarak geleneksel bitkisel ilaçları kullanmaktadır (26). Hindistan'da, Ulusal Sağlık Uzmanları raporuna göre günümüzde 2000 farklı bitki, tıbbi preparasyonlar için kullanılmaktadır (27). Köyleri şehirlerden uzak, yolları düzgün ve bakımlı olmayan ülkelere, halkın modern tıbbi yardım alamaması bu bölgelerde bitkisel tıbbin önemini sürdürmesine sebep olmaktadır (28).

Uluslararası Ticaret Merkezi'nin 1974'de yayınladığı rapora göre endüstrileşmiş ülkelere üretilen ilaçların % 33'ü bitkisel kökenlidir (24). Halen Kuzey Amerika'da reçete edilen ilaçların % 25'ten fazlası, bitkilerden izole edilen aktif maddeleri veya bunların kimyasal olarak modifiye edilmiş şekillerini içermektedir (2). Almanya'da halen kullanılmakta olan yaklaşık 6000 hazır ilaçtan 735'i (% 13) bitkisel kökenli iken, Türkiye'deki 2500 preparattan 155'i (% 6) bitkisel drog veya ekstresi taşımaktadır (19).

Araştırmacılar mikrobiyal hastalıklar ve kansere karşı yeni ilaçlar geliştirebilmek için başta tıbbi bitkiler olmak üzere çeşitli bitkilerin biyoaktif potansiyellerini araştırmaktadırlar. Bu amaçla yüzlerce bitki incelenmiş olmasına rağmen büyük bir çoğunluğu yeterince değerlendirilememiştir (27). ABD National Cancer Institute (NCI) 1957'den beri binlerce bitkiyi antitümöral özellikleri açısından incelemiştir. Halen Latin Amerika, Afrika ve Güneydoğu Asya'dan toplanan 20000 bitki türü aynı kurum tarafından araştırılmaktadır. Ancak, bu bitkilerin antitümöral aktiviteleri araştırılırken diğer farmakolojik etkileri “araştırılmamış” olarak kalmaktadır (2).

Halen dünyada pek çok ülkede tıbbi bitkilerle ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Yayınlanan makaleler üzerinden yapılan istatistikler, yapılan çalışmaların büyük bir kısmının Amerika ve Avrupa merkezli olduğunu göstermektedir (10).

2.2.2. Türkiye’de Bitkisel Tıp

Türkiye, Avrupa kıtasının en yoğun bitki florasına sahip ülkelerinden biridir. Tüm Avrupa’da yetişen 12000 bitki türüne karşılık sadece ülkemizde 850 cins ve 9000’den fazla bitki türü yetişmektedir (17, 29). Stratejik konumundan dolayı Anadolu, Doğu ve Batı arasında köprü görevi görmektedir. Farklı ırk ve kabileler Anadolu’ya yerleşmek üzere göç etmişler ve bu göçleri esnasında çeşitli bölgelere ait kültürleri, dinleri, ve gelenekleri beraberlerinde getirmişlerdir. Kültürel farklılıklar ve floranın zenginliği Anadolu’da geleneksel tıpla ilgili olarak büyük bir bilgi birikimine sebep olmuştur. Bununla birlikte, ulaşımın kolaylaşması, halkın köylerden şehirlere göç etmesi ve modern tıbbın yayılışı ile bu bilgi hızlı bir şekilde kaybolmaktadır (29).

Türkiye’de bitkilerle tedavi, coğrafi bölgeler arasında kullanım sıklığı açısından farklılıklar olmakla beraber halen uygulanmaktadır (22, 29, 30, 31, 32).

2.2.3. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Bitkisel Tıp

Doğu Karadeniz Bölgesi halkı tıbbi bitkiler ile tedaviye çok az önem vermektedir. Trabzon'da aktar sayısı oldukça azdır ve sattıkları drogların hemen tümü İstanbul'dan getirilmektedir. Bölgeye ait tek drog kekik veya "zımbara" adı ile tanınan *Satureja spicigera* türünün çiçekli dallarıdır. Buna karşılık bölgeden toplanan 40 kadar bitkisel drog özellikle Sürmene'de bulunan bazı toptancılar tarafından dış ülkelere satılmaktadır (22).

Flora özelliği açısından bölge, yıllık yağmur oranının yüksekliği ve çoğunluğu kışın yapraklarını döken ormanları ile tanınmaktadır. Çeşitli araştırmacılar 1700'lü yıllardan beri Doğu Karadeniz Bölgesi'nin tıbbi ve zehirli bitkilerini araştırmış ve yayınlamışlardır (22).

2.3. Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Endemik Bitkiler

Endemi kelimesi, bir ülkede yerleşen (hastalık) anlamındaki Yunanca **endemon**dan gelmektedir. Bu çalışmada, adı geçen bitkilerin sadece bu yörede doğal olarak yetiştiğini belirtmek için kullanılmıştır.

Kolşis (Colchis) kuşağı içinde yer alan Trabzon, Rize ve Artvin yöreleri, başta iklim koşulları (yüksek yağış ve nem oranı) ve arazi yapısının farklı olmasına bağlı olarak çok sayıda endemik bitkiyi de içeren oldukça zengin ve gür bir floraya sahiptir. Yapılan araştırmalara göre Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 2239 farklı bitki türü bulunduğu tespit edilmiştir. Endemizm oranı % 23'tür. Bu orana göre yaklaşık 514 bitki bölgede endemik olarak yetişmektedir (17).

2.4. Bitkilerin Antimikrobiyal Önemi

ABD'de reçete edilen ilaçların %25'ten fazlasının bitkisel kökenli olmalarına karşın, antimikrobiyal olarak kullanılanları çok azdır. Günümüzde, hastalıkların tedavisinde antimikrobiyal ajan olarak daha çok bakteriyel veya fungal kaynaklı ilaçlar kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin 1950'lerde kullanıma girmeleriyle birlikte, bitki orijinli antimikrobiyal kullanımı ortadan kalkmıştır (1).

Klinik mikrobiyologlar iki sebeple antimikrobiyal bitki ekstraktları ile ilgilenmektedir:

1. Bitkisel kökenli bileşikler, hekimler tarafından reçete edilen antimikrobiyal ilaçların arasına girmesi mümkün görünmektedir. Pek çok fitokimyasal bileşik şu an insanlarda deneme aşamasındadır (1).

2. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, toplum giderek geleneksel antibiyotiklerin aşırı reçete edildiğinin ve yanlış uygulandığının farkına varmaktadır. Ayrıca pek çok insan kendi tedavilerinde özerklik aramaktadırlar (1).

ABD’de 1990’ların sonlarına doğru diğer alternatif tedavi şekillerinde olduğu gibi bitki ekstraktlarının tedavide kullanımı büyük popülarite kazanmıştır. Yapılan bir anket sonucuna göre bir yıl içinde halkın üçte biri en az bir sıradışı tedavi yöntemini uygulamıştır. Botanik ilaçlarının satışının 1996 yılında bir önceki yıla oranla % 37 oranında arttığı rapor edilmiştir.

Geleneksel antibiyotiklerin direnç gelişimi nedeniyle etkisizleştiği ve özellikle viral hastalıkların bu tip ilaçlarla kontrol altına alınamadığı vurgulanarak bitkilerden elde edilen antimikrobiyallerin ve diğer ilaçların kullanılmasına yönelik artan yenilikçi bir yaklaşım vardır. Ayrıca bitki türlerinde özellikle son 20 yılda meydana gelen hızlı tükeniş bu ilginin bir başka sebebidir.

İnsan immünyetmezlik virusu (HIV) ile enfekte insan sayısındaki hızlı artış, etkili olabilecek bitki derivelerinin araştırılmasını daha da teşvik etmiştir (1).

2.5. Bitkilerdeki Kimyasal Farklılıklar

Bitkiler genel olarak benzer kimyasal organizasyona sahiptir. Ancak morfolojik değişikliklerle birlikte kimyasal yapılarında da değişiklikler olur. Örneğin kuru alanda büyüyen bitkiler, su kaybını azaltmak için değişik bir fotosentez yolu kullanırlar. Etobur bir bitki, bu tür besinleri sindirebilecek enzim sistemine sahiptir. Buna benzer olarak stres şartları (kuraklık, tuz konsantrasyonu, suda yaşam, donma, aşırı sıcaklık, yangınlar, ultraviyole ışığı, zehirler, besin azlığı ve biyolojik tehditler) bitkilerin kimyasal yapılarında değişiklikler yapabilmektedir (10).

2.6. Bitkilerden Elde Edilen Antimikrobiyalleri İçeren Esas Gruplar

Bitkiler neredeyse sınırsız şekilde aromatik bileşik sentezleme yeteneğine sahiptirler. Sekonder metabolit olarak adlandırılan bu bileşiklerin çoğu, fenoller ve bunların oksijen takılmış deriveleridir. En az 12000 metabolit izole edilmiş olmasına rağmen bu rakam tahmin edilen toplamın % 10'undan daha azını oluşturmaktadır. Büyük bölümü mikroorganizma, böcek ve herbivorlara karşı bitkinin savunma mekanizması olarak görev görürler. Bazıları (örneğin terpenoidler) bitkiye koku verirler. Kinonlar ve tanenler bitkilerdeki pigment oluşumundan sorumludur. Bir kısmı ise (acı biberdeki capsaicin gibi) bitkiye tat verir (1).

2.6.1. Fenolikler ve Polifenoller

a) Basit Fenoller : Basit biyoaktif fitokimyasallardan bazıları tek bir fenolik halka ve bunun üzerine bağlı değişik grupları kapsarlar. Virus, bakteri ve mantarlara karşı etkili olduğu gösterilmiş olan kafeik asit bu gruptandır. Catechol ve pyrogallol mikroorganizmalara karşı toksik olduğu ispatlanmış hidrosillenmiş fenollerdir. Hidrosillenme sayısı ile toksisite arasında orantı mevcuttur. Oksidize bileşikler tarafından enzim inhibisyonu, sülfidril grupları veya proteinler ile oluşan nonspesifik reaksiyonlar, fenolik toksisiteden sorumlu olası mekanizma olarak düşünülmektedir (1).

b) Kinonlar: Kinonlar iki keton grubu içeren aromatik halkalardır. Doğada yaygın olarak bulunurlar. Renkli ve yüksek derecede reaksiyona girme yeteneğine sahip bileşiklerdir. Kesilen veya yaralanan meyve ve sebzelerin kahverengileşmelerinden sorumludur. İnsan derisinde melanin sentez yolunun ara ürünleri olarak da ortaya çıkarlar. Kinonun içerisinde bulunan boya maddeleri de kinon yapısındadır. Vitamin K kompleks bir naftokinondur.

Kinonların proteinlerdeki nükleofilik amino asitlerle geri dönüşümsüz kompleks oluşturma ve böylece proteinleri inaktive edebilme kabiliyetleri

bilinmektedir. Bu sebeple mikroorganizmalardaki muhtemel hedefleri, yüzeyde sunulan adezinler, hücre duvarı polipeptidleri ve membrana bağlı enzimlerdir (1).

c) Flavonlar, Flavonoidler ve Flavonoller: Flavonlar bir karbonil grubu içeren yapılardır. Flavonollerde 3-hidroksil grubu bulunur. Flavonoidler ise hidroksillenmiş fenolik bileşiklerdir (1).

Bu bileşikler bitkiler tarafından daha çok mikrobiyal infeksiyonlara karşı cevap olarak oluşturulmaktadır. Bu sebeple in vitro antimikrobiyal etkilerinin saptanması doğaldır (1). Flavonoidlerin antibakteriyel ve antifungal etkileri öne çıkarken, flavonollerin antiviral aktivitelerinin daha fazla olduğu rapor edilmektedir (33). Bunların antibakteriyel etkileri muhtemelen, mikroorganizmaların hücre dışı çözünebilir proteinleri ve bakteri hücre duvarı ile kompleks oluşturma yeteneklerine dayanır. Lipofilik flavonoidler mikrobiyal membranları parçalayabilirler. Catechin'ler de bu gruba ait etkili bileşiklerdendir (1). Çayda bulunan catechin'lerin birçok bakteri ve virüsü inhibe ettiği gösterilmiştir (34).

d) Tanenler: Tanen kelimesi deriyi bronzlaştırabilme ve solüsyon içindeki jelatini presipite edebilme yeteneğindeki bir grup polimerik fenolik bileşiğin tanımlayıcı ismidir. Tanen içeren içeceklerin tüketilmesinin, birçok hastalığı tedavi edebileceği ileri sürülmektedir (1, 34). Antimikrobiyal etki mekanizması muhtemelen mikrobiyal adezinlerin, enzimlerin ve hücre duvarı transport proteinlerinin inaktivasyonu ile ilişkilidir. Tanenler ayrıca polisakkaridlerle kompleks oluşturabilirler (1).

e) Kumarinler: Kumarinler, birleşmiş benzen ve α -piron halkalarından oluşmuş fenolik maddelerdir. Kuru otların karakteristik kokusunu oluştururlar. Esas olarak antitrombotik, antiinflamatuvar ve vazodilatatör etkileri sebebiyle kullanılırlar. Warfarin en çok bilinen kumarindir (1).

2.6.2. Terpenoidler ve Uçucu Yağlar (Esanslar)

Bitkilerin güzel kokusu esansiyel yağ fraksiyonlarındadır. Sekonder metabolit olan bu yağlar terpenler olarak adlandırılırlar. Genel kimyasal yapıları $C_{10}H_{16}$ şeklindedir. İsimleri karbon sayısına göre değişir; C_{20} diterpen, C_{30} triterpen, C_{40} tetraterpen, C_5 hemiterpen, C_{15} sesquiterpen gibi. Terpenoidler ise genel olarak oksijen gibi ilave elementler içeren bileşiklerdir. Çeşitli terpen ve terpenoidlerin güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları bildirilmektedir (1, 19). Etki mekanizması muhtemelen mikroorganizmanın solunumunun inhibisyonu esasına dayanır (10).

2.6.3. Alkaloidler

Yapılarında azot bulunan heterosiklik bileşiklerdir. İlk bulunan alkaloid morfindir. Morfin kelimesi rüya tanrısı olan Morpheus'tan gelmektedir. Ranunculaceae familyası üyesi diterpenoid alkaloidlerin genel olarak antimikrobiyal özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir (1). Alkaloidler DNA ve RNA sentezini inhibe edebilirler (10).

2.6.4. Lektinler ve Polipeptidler

Mikroorganizmaların üremelerini inhibe eden peptidler genel olarak pozitif yüklüdürler ve disülfid bağı içerirler. Muhtemelen mikrobiyal membran üzerinde kanallar açarlar veya konak reseptörlerine bağlanmada mikrobiyal adezyon molekülleri ile yarışır.

Birçok bitkiden elde edilmiş olan mannoz spesifik lektinlerin antiviral etkili oldukları gösterilmiştir (1).

2.6.5. Karışımlar

Afrika ülkelerinde kullanılan ve ağız hijyenine yardımcı olan çiğneme çubukları, Ayurveda tıbbında kullanılan bazı ilaçlar ve bal, çeşitli bileşikleri içeren antimikrobiyal etkili karışımlardır (1).

2.6.6. Diğer Bileşikler

Poliaminler, poliasetilenler, bazı glukozitler antimikrobiyal etkileri yönünden araştırılmaktadır.

İdrar yolu enfeksiyonlarından korunmak için kadınlara yabanmersini suyu içilmesinin önerildiği bilgisinden yola çıkarak yapılan bazı araştırmalarda, bu bitkide bulunan fruktozun *E. coli*'nin üriner sistem epitellerine bağlanmasını kompetitif olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (1). Bazı bitkilerde bulunan siyanojenik glikozitler, hücrel solunumu durdurabilen hidrojen siyanid'in salınmasına sebep olurlar (10).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Endemik Bitkiler

Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki değişik yerleşim alanlarından (Trabzon, Rize, Artvin ve Bayburt yöreleri) KTÜ Orman Fakültesi Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Rahim ANŞİN ve Yrd. Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU tarafından teşhis edilen, fotoğrafları alındıktan sonra toplanan ve uygun ortamlarda kurutulan, aşağıda adı (Latince ve Türkçe), familyası, kısa botanik özellikleri, toplandığı bölge ve toplama tarihleri şekillerle birlikte verilen 22 adet endemik bitki örneği çalışmaya dahil edilmiştir.

1. *Angelica sylvestris* L. var. *stenoptera* Lallem. : **Melekotu** (*Umbelliferae*)



Çok yıllık, 70-200 cm'ye kadar boylanabilen otsu bir bitkidir (Şekil 1). Çiçekleri pembemsi-beyaz renklidir. Çiçeklenme Ağustos-Eylül aylarında olur. Dere boyları ve nemli çayırarda 10-2200 m yükseltiler arasında yayılır. Avrupa-Sibiry (Karadeniz) elementi. İki varyetesi ülkemizde doğal olarak yetişmektedir (35).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Of, Eskipazar Beldesi, 15 m, 04.07.1996.

Şekil 1. *Angelica sylvestris*
var. *stenoptera* (Foto: S.Terzioğlu)

2. *Verbascum varians* Freyn.& Sint. var. *trapezunticum* Murb.: Trabzon
Sığirkuyruğu (*Scrophulariaceae*)



Birkaç yıllık, 30-80 cm'ye kadar boylanmış bir bitkidir (Şekil 2). Çiçekler sarı renkli, 20-35 mm çapındadır. Çiçeklenme Nisan-Temmuz aylarında olur. Meşe çalılıkları, kayalık ve boş alanlarda, 40-2450 m yükseltiler arasında yayılır. Karadeniz elementi. Dört varyetesi ülkemizde doğal olarak yetişmektedir (36).

Materyal toplanan alan: Trabzon: KTÜ Kanuni Kampüsü, 40 m, 27.06.1996.

Şekil 2. *Verbascum varians* var. *trapezunticum* (Foto: S.Terzioğlu)

3. *Salix rizeensis* A.Güner et J. Zielinski : Rize Söğüdü (*Salicaceae*)



Kısa boylu, dik bir çalıdır (Şekil 3). Soyulmuş odunu düzgün, genç sürgünleri tüysüz ve sarımsı-kahverengindedir. Yapraklar en çok 7 x 3 cm boyutlarındadır. Yaprak şekli, ters yumurta veya ters mızrak şeklindedir (37). Çiçeklenme Haziran-Temmuz aylarında olur. Subalpin ve Alpin kesimlerde, dere kenarlarında, 2000-2500 m yükseltiler arasında yayılır.

Materyal toplanan alan: Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 2500 m, 06.07.1996.

Şekil 3. *Salix rizeensis* (Foto: S.Terzioğlu)

4. *Phlomis russeliana* (Sims) Bentham : Alev Otu (*Labiatae*)



Otsu ve 100 cm'ye kadar boylanabilen bir bitkidir (Şekil 4). Çiçek grupları 2-5 adet ve her biri 12-20 adet çiçeklidir. Çiçekler sarı renklidir. Çiçeklenme Mayıs-Eylül aylarında olur. Geniş ve iğne yapraklı ormanların orman içi açıklıklarında ve fındık çalılıklarında, 300-1900 m yükseltiler arasında yayılır. Karadeniz (dağ) elementi (38).

Materyal toplanan alanlar: Trabzon: Çaykara, Soğanlı Dağı, 1900 m, 10.07.1996; Maçka: Zigana Dağı, 1450 m, 15.07.1996.

Şekil 4. *Phlomis russeliana* (Foto: S.Terzioğlu)

5. *Alchemilla rizensis* B.Pawl.: Rize Civan Perçemi (*Rosaceae*)

Çok yıllık, çok gövdeli ve 10-20 cm'ye kadar boylan bir bitkidir (Şekil 5). Yapraklar parlak-grimsi, çiçekler parlak-gümüşü renklidir. Çiçeklenme Haziran-Ağustos (Eylül) aylarında olur. Alpin vejetasyonun üst kesimlerinde, 2200-3300 m yükseltiler arasında yayılır. Karadeniz (Dağ) elementi (35).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 3300 m, 07.07.1996.



Şekil 5. *Alchemilla rizensis* (Foto: S.Terzioğlu)

6. *Rosa pisiformis* (Christ) D.Sosn.: Yabani Gül (*Rosaceae*)

Dik büyüyen ve 2 m'ye kadar boylanabilen bir çalıdır (Şekil 6). Çiçekler koyu gül (pembe) renklidir. Çiçeklenme Temmuz ayında olur. Nemli gölgeler, Söğüt çalılıklarında, 1600-2000 m yükseltiler arasında yayılır (35).

Materyal toplanan alan: Bayburt Orman Fidanlığı, 1700 m, 20.07.1996.



Şekil 6. *Rosa pisiformis* (Foto: S.Terzioğlu)

7. *Jasione supina* Sieber subsp. *pontica* (Boiss.) Dumbold (*Campanulaceae*)

Çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 7). Çiçekler mavimsi renklidir. Çiçeklenme Haziran-Ağustos aylarında olur. Alpin çayırarda, 2000-2800 m yükseltiler arasında yayılır. Ülkemizde 4 alttürü bulunmaktadır. Karadeniz (dağ) elementi. (36).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Çaykara, Multat, 2300 m, 25.06.1996.



Şekil 7. *Jasione supina* subsp. *pontica* (Foto: S.Terzioğlu)

8. *Primula longipes* Freyn & Sint. : Çuha Çiçeği (*Primulaceae*)



Dik gövdeli, 50 cm'ye kadar boylanan otsu bir bitkidir (Şekil 8). Yapraklar 6-28 x 1-5.8 cm, darca ters yumurta veya eliptik şekilde ve dişlidir. Çiçekler lavanta mavisi veya kırmızımsı-mavi renklindedir. Çiçeklenme Temmuz-Ağustos aylarında olur. Islak çimenli yamaçlar, akarsu kenarları ve nemli kayalıklarda, 1625-3400 m yükseltiler arasında yayılır. Karadeniz elementi (36).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 3200 m, 28.07.1996.

Şekil 8. *Primula longipes* (Foto: S.Terzioğlu)

9. *Centaurea appendicigera* C.Koch : Peygamber Çiçeği (*Compositae*)



Çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 9). Çiçekli sürgünler dik, 7-30 cm uzunluğundadır. Yapraklar yoğun ve basık gri tüylüdür. Çiçekler mat sarı renklidir. Çiçeklenme Temmuz-Ağustos aylarında olur. Yüksek kayalıklardaki hareketli, taşlık yamaçlarda, 2500-3500 m yükseltiler arasında yayılır. Karadeniz (dağ) elementi (39).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, Kayışkıran Geçidi, 3200 m, 07.07.1996.

Şekil 9. *Centaurea appendicigera* (Foto: S.Terzioğlu)

10. *Campanula betulifolia* C.Koch : Huş Yapraklı Çan Çiçeği
(*Campanulaceae*)

Çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 10). Çiçekler beyaz veya mat pembemsi renklidir. Çiçeklenme Mayıs-Eylül aylarında olur. Kayalık alanlarda, 250-2285 m yükseltilerde yayılır. Karadeniz elementi (36).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Soğanlı Dağı, 1600 m, 06.07.1996.



Şekil 10. *Campanula betulifolia* (Foto: S.Terzioğlu)

11. *Rhododendron ponticum* L. subsp. *ponticum* var. *heterophyllum* Anşın :
Değişik Yapraklı Orman Gülü (*Ericaceae*)

Her zaman yeşil, 10 m'ye kadar boylanabilen bir çalıdır (Şekil 11). Yaprakların kimileri üçlü damarlanma gösterir. Çiçekler mor renklidir. Çiçeklenme Mart-Haziran aylarında olur. Ormanlarda, 1-2000 m yükseltilerde yayılır, Karadeniz elementi (36, 40).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Of, Kumludere Köyü, 210 m, 05.05.1996.



Şekil 11. *Rh. ponticum* subsp. *ponticum* var. *heterophyllum* (Foto: S.Terzioğlu)

12. *Betula medwediewii* Regel : Kızılağaç Yapraklı Huş (*Betulaceae*)

Yaprağını döken, 6-15 m boyunda boylu bir çalıdır (Şekil 12). Gövde kabuğu beyazımsı renktedir. Çiçeklenme Mayıs-Haziran aylarında olur. Ormanlık ve çalılık alanlarda, 1300-2160 m yükseltiler arasında yayılır (38, 41).

Materyal toplanan alan: Artvin: Murgul, Şevval Tepe, 1800 m, 05.06.1996.



Şekil 12. *Betula medwediewii* (Foto: S.Terzioğlu)

13. *Quercus pontica* C.Koch : Doğu Karadeniz Meşesi (*Fagaceae*)

Yaprağını döken, 3-5 m boyunda bir çalıdır (Şekil 13). Yaprak kenarları düzenli dişlidir. Meyveler kısa saplı olup, Ağustos-Eylül aylarında olgunlaşır. Orman içlerinde, 800-2100 m yükseltiler arasında yayılır. Karadeniz elementi (42).

Materyal toplanan alan: Rize: İkizdere, Çağrankaya, 1700 m, 13.07.1997.



Şekil 13. *Quercus pontica* (Foto: S. Terzioğlu)

14. *Heracleum platytaenium* Boiss. : Çayır Tavşancıl Otu (*Umbelliferae*)



Şekil 14. *Heracleum platytaenium*
(Foto: S. Terzioğlu)

Birkaç yıl yaşayan, keskin kokulu ve 1-2 m'ye kadar boylanan otsu bir bitkidir (Şekil 14). Gövde en azından 2 cm çapındadır. Taban yaprakları parçalı ve alt yüzleri beyazdır. Çiçekler beyaz renkli ve şemsiye şeklinde kurullar oluşturur. Çiçeklenme Mayıs-Ağustos aylarında olur. Karışık ormanlarda, kayalık alanlarda, 0-1500 m yükseltiler arasında yayılır. Karadeniz elementi (35).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Araklı, Dağbaşı, 1300 m, 28.07.1997.

15. *Centaurea helenioides* Boiss. : Peygamber Çiçeği (*Compositae*)



Şekil 15. *Centaurea helenioides*
(Foto: S. Terzioğlu)

Çok yıllık, 1 m'ye kadar boylanan otsu bir bitkidir (Şekil 15). Gövde tek veya yukarı kısımlarından dallanmıştır. Çiçek başçığı 2-3.5 cm çapında ve çiçekler sarı renklidir. Çiçeklenme Temmuz-Ağustos aylarında olur. Subalpin çayırlar ve üst orman sınırına yakın orman içi açıklıklarda, 1400-2450 m yükseltiler arasında yayılır (39).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 2100 m, 02.08.1997.

16. *Delphinium formosum* Boiss. & Huet : Narin Hezaren (*Ranunculaceae*)



Çok gövdeli, 60-180 cm boylarında ve çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 16). Çiçekler 3-4.5 cm, koyu menekşemsi-mavi renkte ve belirgin bir çıkıntıya sahiptir. Çiçeklenme Temmuz-Ağustos aylarında olur. Alpin çayırlarda, 1500-2700 m yükseltilerde yayılır. Karadeniz elementi (43).

Materyal toplanan alan: Rize: İkizdere, Ballıköy (Anzer), 2250 m, 10.08.1997.

Şekil 16. *Delphinium formosum*
(Foto: S. Terzioğlu)

17. *Quercus macranthera* Fisch. Et Mey. subsp. *syaspirensis* (C. Koch.) Menitsky : İspir Meşesi (*Fagaceae*)

Yaprağını döken, 7 m'ye kadar boylanan küçük bir ağaçtır (Şekil 17). Yapraklar 5-9 çift düzenli lopludur. Meyve sapsız, kadeh yarı küre şeklindedir. Meyve olgunlaşması Ağustos-Ekim aylarında olur. Kuru yamaçlarda, 1000-1900 m yükseltilerde yayılır (42).

Materyal toplanan alan: Bayburt: Kavakyanı Köyü, 1100 m, 04.09.1997.



Şekil 17. *Quercus macranthera* subsp. *syaspirensis* (Foto: S. Terzioğlu)

18. *Papaver lateritium* Koch : Gelincik (*Papaveraceae*)



Çok yıllık, 45-60 cm'ye kadar boylanan otsu bir bitkidir (Şekil 18). Dişli yapraklar şerit şeklindedir. Çiçekler turuncu renkli, kapsül çıplaktır. Taşlıklı yamaçlar ve alpin çayırlarda, 1200-3000 m yükseltiler arasında yayılır. Karadeniz elementi (43).

Materyal toplanan alan: Rize: İkizdere, Ballıköy (Anzer), 1980 m, 12.07.1996.

Şekil 18. *Papaver lateritium* (Foto: S. Terzioğlu)

19. *Lamium sulfureum* Hauss. & Sint. : Ballıbaba (*Labiatae*)



Yerde sürünen, 5-24 cm'ye kadar boylanabilen ve çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 19). Gövde çoğunlukla morumsu renkte. Çiçek kurulları 1-3 (-4) adet ve her bir kurulda 4-12 çiçek bulunur. Kayalık, hareketli taşlı yamaçlarda, 2745-3050 m yükseltiler arasında yayılır. İran-Turan elementi (38).

Bitki toplanan alan: Artvin : Yusufeli, Yaylalar Yaylası, 3020 m, 24.10.1997.

Şekil 19. *Lamium sulfureum* (Foto: S. Terzioğlu)

20. *Anthemis cretica* L. subsp. *argaea* (Boiss.& Bal.) Grierson : Papatya
(*Compositae*)

Çok yıllık ve 40 cm'ye kadar boylanan otsu bir bitkidir (Şekil 20). Çiçek dalcikleri beyaz renklidir. 12 adet alttürü ülkemizde doğal olarak yetişmektedir. Yüksek dağlık kesimlerde, 3707 m'ye kadar yayılır. İran-Turan elementi (39).

Materyal toplanan alan: Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, Kayışkiran Geçidi, 2850 m, 05.10.1997.



Şekil 20. *Anthemis cretica* subsp. *argaea* (Foto: S. Terzioğlu)

21. *Onobrychis armena* Boiss.&Huet: Korunga (*Leguminosae*)

Çok sayıda yatık gövdeleri olan, 15-60 cm'ye kadar boylanan, çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 21). Yapraklar bileşik yaprak şeklindedir. Çiçekler pembe renklidir. Taşlıklı yamaçlarda, 100-2000 (-2500) m yükseltiler arasında yayılır (44).

Materyal toplanan alan: Artvin: Yusufeli, Yaylalar Yaylası, 2500 m, 23.10.1997.



Şekil 21. *Onobrychis armena* (Foto : S. Terzioğlu)

22. *Sempervivum armenum* Boiss.& Huet var. *armenum* : Gelin Parmağı
(Crassulaceae)

Rozetleri 2-6 cm çapında olan çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 22). Etili yapılı yapraklar yumurtamsı-mızrak ya da kaşık şeklindedir. Çiçekler mat sarı veya yeşilimsi renktedir. Taşlık yamaçlar ve kayalıklarda, 1600-3200 m yükseltilerde yayılır. Karadeniz (dağ) elementi (35).

Materyal toplanan alan: Artvin: Yusufeli, Yaylalar Yaylası, 3040 m, 24.10.1997.



Şekil 22. *Sempervivum armenum* var. *armenum* (Foto: S. Terzioğlu)

3.1.2 Kullanılan Gereçler

Anaerobik kavanozlar, beherler, buz makinesi (Scotman), buzdolapları, cam balonlar, cam pastör pipetleri, cam petri kutuları, cam ve plastik tüpler, çalışma kabinetleri (Holten, Powtech), deiyonize su sağlayıcısı (Barnstead), derin dondurucular (-20 ve -85°C'lik, Profilo, Arçelik, Nuaire), distile su cihazı (Şimşek Labortechnik), eküvyon çubuğu, evaporatör, filtre aparatı ve çeşitli filtreler, filtre kağıdı (Whatman), flasklar (Corning, grainier), hassas terazi (Schimadzu), havan, ışık mikroskobu (Nicon), invert mikroskop (Soif), kum (asitle yıkanmış, 40-100 meshlik, FISIONS Laboratory Reagents), lam, lamel, liyofilizatör, McFarland bulanıklık tüpleri, manyetik karıştırıcı (Stuart), mikrosantrifüj tüpleri, negatif vakum pompası (Sartorius), normal (Memmert) ve CO₂'li inkübatör (Nuaire ve

Shellab), otoklav (Medexport), şişeler (çeşitli hacimlerde, Schott, Simax), otomatik pipetler (Prizma), otomatik pipet uçları, pastör fırını (Nüve), pH metre (Hanna), plastik pipet (10 ml'lik, LP İtaliana SPA), plastik pipeti (5 ml'lik, grainer), hücre kültür pleytleri (24 ve 96 kuyucuklu, grainer, TPP), repetitif pipet (Eppendorf), repetitif pipet uçları (Eppendorf), santrifüj (Nüve), silica gel 60 (0.063-0.200mm, Merck), soxhlet aparatı, su banyosu, taşınabilir aspiratör (Bilsan), TLC-Sheets (Silica gel 60 F 254, Riedel-de Haën), vakumlu poşet kapatma cihazı, vorteks (Janke&Kunkel), mikroaerofilik gas pack (BBL), anaerobik kavanoz (Oxoid), gaz karışımı içeren tüp (%5 O₂, %10 CO₂, %85 N₂), liyofilizatör, saklama tüpleri (cryo vial), parafilm (American National Can), sonikatör (35 HF-Freq., Gen-probe), thoma lamı, ultraviyole kaynağı (Spectroline, USA).

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

Medium 199 (10X), foetal calf serum (FCS), Non Essential Amino Acids (NEAA, 100X), sodyum bikarbonat (%7.5 sol.), L-glutamin (Biological industries, İSRAİL), asiklovir (Zovirax 800mg, GlaxoWellcome), ampisilin (FischerBiotec, ABD), eosin methylene blue agar (EMB, Levine), mueller-hinton broth (MHB), blood agar base, tripton, phosphate buffered saline (PBS, Dulbecco's A), brucella agar (Oxoid, İNGİLTERE), pepton (Difco, ABD), diklorometan (Riedel-de Haën), sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, sabouraud dextrose agar (SDA), mueller-hinton agar (MHA), aseton, glasial asetik asit, hidroklorik asit, etil asetat, kloroform, metanol, maya ekstraktı (Merck, ALMANYA), dimethyl sulfoxide (DMSO), naphtol blue black, tripsin (1:250), ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA), sodyum asetat, vankomisin, amfoterisin B, flukonazol (Sigma, ABD), streptomisin (İE), fizyolojik tuzlu su (Eczacıbaşı).

3.1.4. Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri 9 patojen mikroorganizma üzerinde araştırıldı.

a) Bakteri suşları

Bakteri suşları KTÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunan koleksiyondan temin edildi.

Antibakteriyel etki araştırılacak bakteriler, morfolojik farklılıkları göz önünde bulundurularak belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Bakteri suşları ve özellikleri

Bakterinin Adı	Suş Numarası	Morfolojik Görünüm	Gram özelliği	Üretildiği besiyeri	Deney Besiyeri
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Kok	Pozitif	KA ^a	MHA ^b MHB ^c
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Basil	Pozitif	KA	MHA MHB
<i>Branhamella catarrhalis</i>	ATCC 25238	Kok	Negatif	KA	MHB
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Basil	Negatif	EMB ^d	MHA MHB
<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC 49503	Spiral	Negatif	BA ^e	BA

^a Kanlı Agar

^b Mueller Hinton Agar

^c Mueller Hinton Broth

^d Eosine Methylene Blue agar

^e Brucella Agar

b) Bakteri suşlarının genel özellikleri

Staphylococcus aureus : Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, katalaz ve koagülaz pozitif koklardır. Bakteriyolojik besiyerlerinin çoğunda, aerobik ve fakültatif anaerobik koşullarda kolaylıkla üreyebilirler. Sahip oldukları toksinleri ve enzimleri ile kıl foliküllerinde lokalize apselerden menenjitte kadar değişen klinik görünüm ve ciddiyette enfeksiyon oluşturabilirler (45).

Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisi, çeşitli mekanizmalarla pek çok antibiyotiğe karşı direnç kazanmaları ve **tolerans** özellikleri sebebiyle sorun oluşturmaktadır. Hücre duvarındaki otolitik enzimlerin aktivasyonunun olmayışının sebep olduğu tolerans, ilacın Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (MBK) arasındaki büyük farklar olarak tedaviye yansımaktadır (46).

Bacillus subtilis : Gram pozitif, sporlu büyük basillerdir. Hava, toz, toprak ve suda bulunur ve laboratuvarıda sıklıkla kontaminant olarak ürerler. İmmunsuprese kişilerde, uyuşturucu kullananlarda bakteriyemi ve göz enfeksiyonlarına sebep olurlar (45). *B. subtilis*, sterilizasyonun kontrolünde ve antibiyotik üretiminde (basitrasin) kullanılmaktadır (47).

Branhamella catarrhalis : Gram negatif, sporsuz, hareketsiz diplokoklardır. Aerob ve fakültatif anaerob olarak ürerler. Kanlı agar ve çikolata agarda 35°C'de kolaylıkla üretilebilirler. Üst solunum yollarının normal florasında bulunmakla birlikte, otitis media, sinüzit, trakeit, menenjit ve alt solunum sistemi enfeksiyonlarına sebep olabilirler.

Tedavilerinde penisilin ve tetrasiklinler kullanılmaktadır. BRO tip β -laktamazları tarafından oluşturdukları yüksek direnç oranı (% 84) sebebiyle, *B. catarrhalis* enfeksiyonlarının tedavisinde sorunlarla karşılaşmaktadır (48).

Escherichia coli : Gram negatif, sporsuz, genel olarak hareketli, laktoz pozitif, basil şeklinde, fakültatif anaerob bakterilerdir. Rutin besiyerlerinde kolaylıkla ürerler. *E.coli*, Enterobacteriaceae familyası üyeleri arasında normal barsak florasında en sık bulunan bakterilerdir. Özellikle infantlarda oluşturduğu diyarelerin yanında üriner sistem enfeksiyonu ve neonatal menejitlerin en sık etkenidirler (45).

E.coli suşları arasında, aktarılabilen plazmitlerin kontrolünde bulunan çoklu ilaç direnci yaygındır ve tedavide sorun yaratmaktadır (46).

Helicobacter pylori : *H.pylori* gram negatif, katalaz ve üreaz pozitif, polar flagellası ile hareketli, spiral yapıda, mikroaerofilik bir bakteri olup kronik aktif gastrit etkenidir. Ayrıca, peptik ülser hastalığı, gastrik adenokarsinom ve gastrik mukoza ilişkili lenfoid doku lenfoması (MALToMa) patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (49). WHO tarafından class I karsinojen olarak belirtilmektedir (50).

H.pylori, katkılı besiyerlerinde, mikroaerofilik ortamda 37°C'de inkübe edildiğinde, 3-6 günde küçük şeffaf koloniler oluşturarak ürer (46).

Gastrik mukozadan eradikasyonunda yaygın olarak, antibiyotik (amoksisilin, tetrasiklin, metronidazol ve klaritromisin) ve anti-ülser ilaç kombinasyonları kullanılmaktadır. Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, antibiyotiklerin gastrik mukozaya penetrasyonunun azlığı ve pH tarafından inaktive edilmeleri gibi mikroorganizma ve konağa ait faktörler tedavinin etkinliğini etkilemektedir (50).

c) Mantar Suşları

Maya suşu KTÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarındaki kültür koleksiyonundan temin edilirken, küf suşu Ankara Hıfzısıhha Enstitüsü Müdürlüğü'nden sağlandı. Çalışmada kullanılan mantar suşları ve özellikleri Tablo 2'deki gibidir.

Tablo 2. Mantar suşları ve özellikleri

Mantarın Adı	Suş Numarası	Morfolojisi	Üretildiği Besiyeri	Deney Besiyeri
<i>Candida albicans</i>	ATCC 60193	Maya	SDA ^a	SDA YEPD ^b
<i>Trichophyton rubrum</i>	(TP 4-2) 486	Küf	SDA	SDA YEPD, MEB ^c

^a Sabouraud Dextrose Agar

^b Yeast extract, peptone, dextrose broth

^c Malt extract broth

d) Mantar suşlarının genel özellikleri

Candida albicans : Maya morfolojisinde, oval, tomurcuklanarak üreyen bir mantardır. Boğaz, üst solunum yolları, gastrointestinal kanal ve vajende normal flora elemanı olarak bulunurlar. Sabouraud Dekstroz Agar'da (SDA), oda ısında krem rengi koloniler oluşturarak ürer. Fırsatçı patojen funguslar arasında *C.albicans*, lokal ve sistemik kandidozun en sık nedenidir (45).

Nistatin absorbe olmadığı için sistemik kandida enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmamaktadır. Yüzeyel kandidozda ketokonazol, derin kandidozda ise amfoterisin B, en yaygın kullanılan antifungal ilaçlardır (46).

Tricophyton rubrum : Genel olarak mikrokonidyalı ile üreyen küf şeklinde bir mantardır. Üremesi esnasında çoğunlukla SDA besiyerinin ters yüzünde kırmızı renk oluşturur. *T.rubrum* saç, deri ve tırnak enfeksiyonlarının en sık sebebi olarak belirtilmektedir (45).

e) Virus suşları

Çalışmamızda, antiviral aktivite testlerinde kullanılan virus suşları orijinal olarak İngiltere Sheffield Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden sağlanan ve KTÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda çoğaltularak saklanan stoklardan temin edildi (Tablo 3).

Tablo 3. Kullanılan virus suşları ve özellikleri

Virusun Adı	Tipi	Suş Adı	Üretildiği Hücre Dizisi
HSV	Tip 1	wal	Vero
HSV	Tip 2	333	Vero

f) Virus suşlarının genel özellikleri

Human Herpes Simplex Virus 1 ve 2 (HSV-1, HSV-2) : Herpetoviridae familyasına ait zarflı, ikozahedral simetrlili, çift iplikli, lineer DNA içeren virustardır (51).

HSV-1'in kesin ayırım olmamakla birlikte daha çok "belden yukarı" kısımda veneral olmayan, HSV-2'nin "belden aşağı" genital bölgede veneral hastalık etkeni oldukları kabul edilmektedir. HSV-1 ve HSV-2 sıklıkla sebep oldukları deri ve mukozaları tutan yüzeysel enfeksiyonların yanında ciddi sistemik ve sinir sistemi hastalıklarına sebep olurlar. In vitro şartlarda, fibroblast ve epitel kökenli birçok insan ve hayvan hücre kültüründe (Vero, BHK-21, RK, MRC-5, HeLa gibi), yüksek titrelerde üretilebilirler. HSV, hücre kültürlerinde sinsisya tarzı sitopatik etki oluşturarak ürer (52).

HSV tedavisinde, kliniğe göre değişmekle birlikte acyclovir, vidarabine, ioxiuridine, trifluorothymidine kullanılmaktadır (52).

Asiklovir, HSV enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılan bir guanin analogudur. Enfekte hücrelerde virus tarafından kodlanan timidin kinaz (tk) tarafından fosforile edilen asiklovir, hücresel enzimlerce aktif trifosfat şekline dönüştürülür. Asiklovir trifosfat, viral DNA polimeraza seçici olarak bağlanarak

replikasyonu engeller. Viral timidin kinaz enzimi ekspresyonundaki değişiklikler asiklovire dirençli suşlarının ortaya çıkışına sebep olmaktadır. Ayrıca kan-beyin bariyerini zor geçişı, yarılanma ömrünün kısalığı bu ajanla ilgili diğer sorunlardır (52).

3.1.5. Kullanılan Vero Hücre Dizisi

Çalışmada kullanılan Vero hücre dizisi orijinal olarak İngiltere Sheffield Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden sağlanan ve KTÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında çoğaltılarak saklanan hücre stoklarından temin edildi.

Vero (African Green Monkey Kidney) hücre dizisi: Normal erişkin bir Afrika Yeşil Maymunu'nun böbreklerinden elde edilmiştir. Fibroblast benzeri hücre karakterine sahip sürekli hücre dizisidir. Tek tabaka (monolayer) olarak ürer. Vero hücreleri SV-40, SV-v, kızamık, arboviruslar, reoviruslar, kızamıkçık, simian adenovirus, poliovirus, influenza virusları, paraifluenza virusları, respiratuar sinsityal virus, vaksinya, koksaki virus B ve herpesviruslar ile enfeksiyona hassastırlar. Vero hücreleri virus replikasyon çalışmaları, plak deneyleri (plaque assays), virus izolasyonu ve aşı üretiminde (inaktif polio aşısı, Aventis Pasteur) kullanılmaktadır (53).

3.1.6. Besiyeri ve Solüsyonların Hazırlanması

3.1.6.1. Bakteriyel ve Fungal Besiyerlerinin Hazırlanması

KA, MHA, MHB, EMB, BA ve SDA, liyofilize ticari preparatlar kullanılarak hazırlandı. Üzerinde yazılı oranlar uyarınca toz besiyeri tartılıp distile su içinde çözüldü.

YEYPD, % 1 maya ekstraktı, % 2 pepton ve % 2 dekstrozu kullanılarak distile suda hazırlandı. Steril edilmeden önce pH'sı 5.0-5.2'ye ayarlandı.

MEB, % 1.5 malt ekstrakt ve % 0.5 pepton distile suda çözülerek hazırlandı (9).

Katı besiyerleri kaynar su banyosu içinde ara sıra karıştırarak agar tamamen çözünene kadar bekletildi. Sıvı besiyerleri ise manyetik karıştırıcı kullanılarak çözüldü.

Besiyerleri otoklavda 121 °C'de, 1 atm basınçta, 15 dakika tutularak steril edildi.

Brucella ve kanlı agara, sıcaklıkları 45-50 °C'ye düşünce % 5 oranında insan kanı katıldı. Pastör fırınında 175 °C'de 1 saat bekletilerek steril edilmiş 90 ve 140 mm çapındaki petrilere 4 mm kalınlıkta olacak şekilde besiyeri döküldü. Besiyerleri kullanılıncaya kadar buzdolabında kapaklı kutularda saklandı.

3.1.6.2. Hücre Kültür Vasatlarının Hazırlanması

Vero hücrelerinin üretimi ve aktivite deneylerinde, büyüme (growth medium, GM), idame (maintenance medium, MM) ve yoğun ortam (overlay) besiyerlerinin hazırlanması için, katkı maddeleri eklenerek Medium 199 (M199) kullanıldı.

a) Tam Medium 199'un (Complete M199) hazırlanması: % 10 M199 (10X), % 2.9 sodyum bikarbonat (% 7.5) ve % 1 Non-Essential Amino Acids (NEAA, 100X) olacak şekilde deiyonize suda hazırlandı.

b) Büyütme vasatının (GM) hazırlanması: % 5 FCS, 50 µg/ml vankomisin, 100 µg/ml streptomisin ve 0.25 µg/ml amfoterisin B olacak şekilde, tam M199 ile hazırlandı.

c) İdame vasatının (MM) hazırlanması: % 2 FCS, 50 µg/ml vankomisin, 100µg/ml streptomisin ve 0.25 µg/ml amfoterisin B olacak şekilde, tam M199'da hazırlandı.

d) Yoğun Besiyerinin Hazırlanması: Karboksimetil selüloz, % 1.6 olacak şekilde deiyonize suya eklendi. Bir gece 37°C'de etüvde bekletildi. Tamamen çözündüğünde otoklavlanarak steril edildi ve oda ısısında saklandı.

% 20 M199 (10X), % 5.8 sodyum bikarbonat (% 7.5), % 2 NEAA (100X), deiyonize su ile çözülerek iki kat (double strength) M199 hazırlandı.

Bu iki solüsyon 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra son hacimde 50 µg/ml vankomisin, 100 µg/ml streptomisin, 0.25 µg/ml amfoterisin B ve % 2 FCS olacak şekilde solüsyonlar eklendi ve buzdolabında saklandı.

3.1.6.3. Solüsyonların Hazırlanması

a) Fosfat tamponlu tuzlu su (phosphate buffered saline, PBS): PBS (Dulbecco's A) tabletleri 100 ml için 1 tablet olmak üzere deiyonize suda çözülürdü. İstenilen hacimlerde şişelere bölündü. Otoklavda 121°C'de, 1 atm basınçta, 15 dakika tutularak steril edildi. Kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra oda ısısında saklandı.

b) Ampisilin solüsyonu: Ekstraktların antibakteriyel aktivitelerinin araştırıldığı deneylerde kontrol amacıyla kullanıldı. Toz halindeki ampisilin (Sigma) 100 mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözülürdü. Küçük hacimlerde tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı. Stoktan çıkarılan ampisilin solüsyonu bir kez çözülüp kullanıldıktan sonra atıldı.

c) Amfoterisin B: Hücre kültürlerinin fungal kontaminasyonlarını engellemek ve ekstraktların antifungal aktivitelerinin araştırılmalarında kontrol amacıyla kullanıldı. Son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde Amfoterisin B (Sigma) deiyonize suda hazırlandı. Küçük hacimlere bölünerek -20 °C'de stoklandı.

Hücre kültür ortamına son konsantrasyonu 0.25 µg/ml olacak şekilde ilave edildi (54).

d) Flukanozol: Ekstraktların *T. rubrum*'a karşı antifungal aktivitelerinin araştırıldığı deneylerde kontrol olarak kullanıldı. Flukonazol (Sigma) 5 mg/ml olacak şekilde DMSO ile çözüldü (55).

e) Tripsin-EDTA solüsyonu: Steril 100 ml PBS (kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponlu tuz) içinde 250 mg tripsin çözüldü. Yüz miligram EDTA 10 ml deiyonize su içinde NaOH tabletleri eklenerek çözüldü. Yüz mililitre tripsin solüsyonuna 9.6 ml EDTA solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Steril filtreden (0.2 µm por genişliğine sahip) süzülen Tripsin-EDTA solüsyonu 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 1'er ml olarak bölünerek -20 °C'de saklandı. Kullanılacağı zaman 1ml Tripsin-EDTA solüsyonu 15 ml steril PBS ile karıştırıldıktan sonra 37°C'de ısıtıldı.

f) Antibiyotik kokteyli: Kültüre edilen hücrelerin kontamine olmalarını engellemek için besiyerlerine antibiyotik eklendi. Etki mekanizmaları göz önünde bulundurularak seçilen vankomisin (Sigma) ve streptomisin (İE), konsantrasyonları sırasıyla 5 mg/ml ve 10 mg/ml olacak şekilde deiyonize su ile antibiyotik kokteyli olarak hazırlandı.

Antibiyotikler tamamen çözüldükten sonra steril 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine bölündü ve -20 °C'de saklandı. Bu solüsyondan 100 ml besiyerine 1 ml ilave edilince vankomisin ve streptomisin son konsantrasyonları sırasıyla 50 µg/ml ve 100 µg/ml oldu.

g) Asiklovir solüsyonu: Sekizyüz mg asiklovir (Zovirax, GlaxoWellcome) 80 ml PBS içinde (10 mg/ml) çözüldükten sonra steril filtreden, steril bir cam şişeye süzüldü. Bundan 600 µl'lik tüplere 100'er µl bölünerek -80 °C'de saklandı.

h) Sodyum bikarbonat (NaHCO₃, % 7.5): Biological Industries'ten sağlandı veya laboratuvarında hazırlandı. Bunun için 7.5 g NaHCO₃ tartıldıktan sonra mezürde 100 ml'ye tamamlandı. Tamamen çözüldükten sonra solüsyon 0.2 µm por çaplı filtreden temiz, steril bir cam şişeye süzüldü. Etiketlendikten sonra buzdolabı ısısında saklandı.

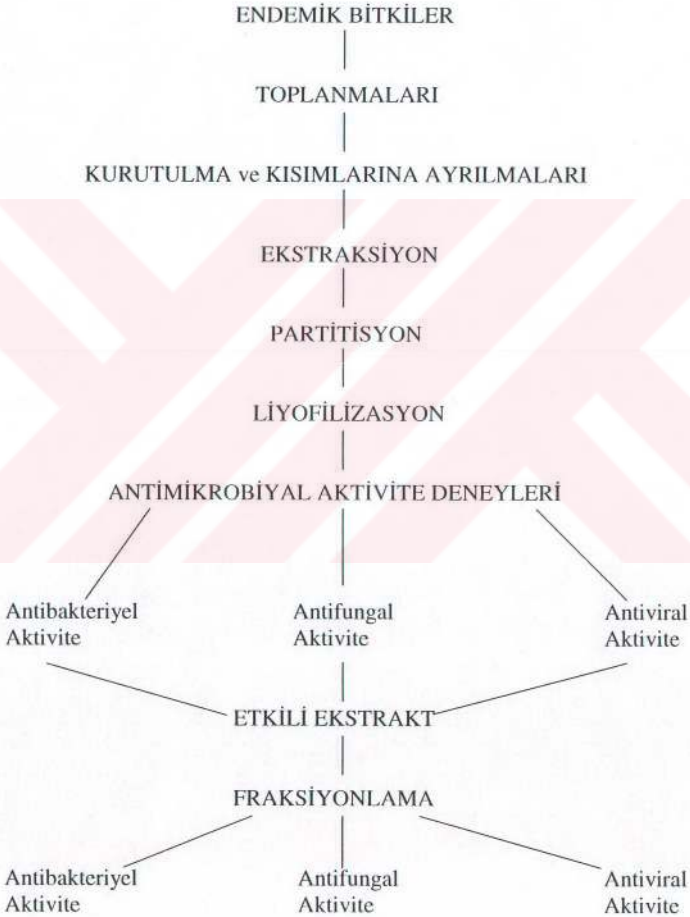
i) **Deiyonize su**, musluk suyunun distilasyonu takiben deiyonize su sağlayıcısından geçirilmesi ile elde edildi. Deiyonize su alındığında suyun kalitesinin hücre kültürü derecesinde olmasına dikkat edildi (direnç 15-18.3 Ω).

j) **Plak boyası:** Vero hücrelerinin boyanması için kullanıldı. % 6 asetik asit, % 1.36 sodyum asetat ve % 0.1 naphtol blue black olacak şekilde deiyonize suda hazırlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Çalışma Planı

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri Şekil 23'te belirtildiği sıra ile araştırıldı.



Şekil 23. Çalışma planı.

3.2.2. Bitki Örneklerinin Kısımlarına Ayrılması ve Stoklanması

Kurutulmuş bitkiler KTÜ Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirildi ve numaralandırıldı. Yirmiiki endemik bitki gövde, yaprak, çiçek, tohum, dal ve kök olarak kısımlarına ayrıldı. Kök ve odunsu dal gibi ekstraksiyonu zor olan kısımlar çalışma dışı bırakıldı. Deneylerde kullanılan bitkiler ve bunlardan elde edilen kısımlar Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Bitki kısımları.

Bitki No	Adı	Kısım ^a
1	<i>Angelica sylvestris</i> var. <i>stenoptera</i>	F, S
2	<i>Verbascum varians</i> var. <i>trapezunticum</i>	F, S
3	<i>Salix rizeensis</i>	F, Fr
4	<i>Phlomis russeliana</i>	F, Fl
5	<i>Alchemilla rizeensis</i>	Fl+S, H
6	<i>Rosa pisiformis</i>	F
7	<i>Jasione supina</i> ssp. <i>pontica</i>	H
8	<i>Primula longipes</i>	H
9	<i>Centaurea appendicigera</i>	F, Fl
10	<i>Campanula betulifolia</i>	F
11	<i>Rhododendron ponticum</i> ssp. <i>ponticum</i> var. <i>heterophyllum</i>	F ^b , F, Fl+S
12	<i>Betula medwediewii</i>	F, Fr
13	<i>Quercus pontica</i>	F
14	<i>Heracleum platytaenium</i>	F, Fl+S
15	<i>Centaurea helenioides</i>	F, Fl
16	<i>Delphinium formosum</i>	F, Fl
17	<i>Quercus macranthera</i> ssp. <i>sypirensis</i>	F, Fr
18	<i>Papaver lateritium</i>	F, S, Fl
19	<i>Lamium sulfureum</i>	H
20	<i>Anthemis cretica</i> ssp. <i>argaea</i>	F, Fl+S
21	<i>Onobrychis armena</i>	F
22	<i>Sempervivum armenum</i>	F

^a Kısımlar: S Semen (Tohum), F Folia (Yaprak), Fr Fructus (Meyve), Fl Flores veya Flos (Çiçek),

H Herba (Otsu bitkinin tümü)

^b F' Genç yaprak

Kısımlar 35°C'ye ayarlanan Pastör fırınında iyice kurutulduktan sonra ufalanarak toz haline getirildi. Bitki tozları naylon poşetlere konuldu ve vakumlu poşet kapatma cihazı ile havası alınıp ağzı kapatıldıktan sonra serin, ışık almayan bir ortamda oda ısısında saklandı.

3.2.3. Ekstraktların Hazırlanması

Bitki kısımlarından ekstrakt hazırlama prosedürü genel hatlarıyla Şekil 24'de gösterilmiştir (11).



Şekil 24. Ekstraksiyon şeması.

3.2.3.1. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi Sökmen ve ark. (11)'nin tarif ettiği yöntem kullanılarak yapıldı (Şekil 24). Bitki örnekleri soxhlet kullanılarak, aspiratör vasıtasıyla buharlaşan gazın atılmasını sağlayacak bir ortamda ekstrakte edildi.



Şekil 25. Soxhlet aparatı

Soxhlet aparatı 3 kısımdan oluşmaktadır (Şekil 25). Küçük bir balon, onun üzerinde odacık (chamber) ve en üstte de spiral soğutucu bulunmaktadır. Odacığın (chamber) hacmi ve ekstrakt miktarı göz önünde bulundurularak balona %10 oranında (w/v) metanol (MeOH) eklendi. Filtre kağıdından cam odacığın içine sığabilecek şekilde fişekler (timber) hazırlandı ve içlerine toz halindeki bitki kısımlarından yaklaşık 25 gr aktarıldı. Fişegin üzeri hidrofob bir pamukla kapatıldı ve odacığın içine yerleştirildi. Spiral soğutucunun üzerindeki açıklık da buharlaşan metanolün sistemden kaçışını önlemek için bir miktar pamukla kapatıldı. Spiral soğutucunun su girişi ve çıkışı ayarlandı.

Soxhletin ekstraksiyon sistemi: Isıtılan MeOH buharlaştıktan sonra spiral soğutucuda yoğunlaşarak tekrar sıvı hale geçer. Spiralin alt bölümünden örneğin üzerine damlar. Burada birikirken aynı zamanda bitki içinde bulunan metanolün çözebileceği maddeleri de ekstrakte ederek alır. MeOH seviyesi odacığın kenarındaki ince cam borunun üst eşiğini geçince oradaki tüm metanol tekrar balonun içine akar (reflux) ve akabinde işlem tekrarlanır.

Balon, düzeneğe takılıp 60°C'deki su banyosu içine yerleştirildi ve 6 saat beklendi. Fişek içinde bulunan bitki örneği temiz bir havana aktarıldı. Üzerine bir miktar metanol ve asitle yıkanmış kum ilave edildikten sonra iyice ezilerek

ekstrakte edildi. Buradan toplanan metanol soxhlet balonundaki ile birleştirildikten sonra filtre edilerek partiküllerden arındırıldı. Ekstrakt temiz, ışık geçirmeyen bir şişeye alındı ve evaporasyon işlemine kadar 4°C’de saklandı.

3.2.3.2. Evaporasyon

Ekstraksiyon işlemi ile toplanan MeOH, sıcaklığı 45°C olacak şekilde ısıtılarak evaporatörde vakum altında uçuruldu ve yapışkan kaba madde elde edildi.

3.2.3.3. Partitasyon

Evaporatör balonu içindeki yapışkan kaba madde, 20 ml distile su ve 20 ml kloroform içinde çalkalanıp karıştırılarak çözüldükten sonra temiz bir şişeye alındı. Bu hacimde çözünmeyenlere su ve/veya kloroform ilave edildi. Karışım ayırma hunisine aktarılarak fazların ayrılması için beklendi. Bu aşamada ekstrakt içindeki maddeler polaritelerine göre ikiye ayrıldı. Daha apolar bileşikler sudan ağır olan kloroformda çözünerek ayırma hunisindeki alt tabakada biriktiler. Polar bileşikler suda daha iyi çözüldükleri için su kısmında toplandılar. Fazlar, karışımamalarına dikkat edilerek 20 ml hacimli kapaklı cam şişelerde toplandı.

3.2.3.4. Kaba Maddelerin Elde Edilmesi

Ekstrakt önceden tartılmış ve numaralandırılmış lastik kapaklı cam tüplere konularak 40-45°C’deki su banyosuna yerleştirildi. Bir aspiratörün ucuna bağlı enjektör iğnesi tüpe batırılarak vakum oluşturuldu. Kloroform tamamen uçurulduktan sonra tüp tekrar tartılarak kaba madde ağırlığı tespit edildi. Bu işlem, aspiratör vasıtasıyla içerideki havanın ortamdan uzaklaştırıldığı çalışma kabininde gerçekleştirildi. İçinde ekstrakt bulunduran tüpler kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Ekstraktların su kısmının uçurulması amacıyla liyofilizatör kullanıldı. Elde edilen toz şeklindeki kaba madde, üzerinde ekstrakt numarası yazılı kapaklı steril cam şişelere konularak -20°C 'de saklandı.

Deney aşamasında ekstraktların çözülmesinde dimetilsülfoksit (DMSO) ve PBS karışımı kullanıldı. Kaba madde DMSO:PBS (1:1) içinde 100 mg/ml olacak şekilde çözüldü ve üzerinde ekstrakt numarası yazılı tüplerde küçük hacimlere bölünerek -20°C 'de saklandı.

Partitasyon ve liyofilizasyon aşamasında bitki sırasına dikkat edilmedi. Deneyler esnasında etiketleme kolaylığı sağladığı için ekstrakt numaraları kullanıldı. Daha sonra kaba ekstraktlara, ekstraktı anlatacak şekilde kısım kodları verildi (Tablo 5). Örneğin 18S/k kodlu ekstrakt, *Papaver lateritium*'a (bitki numarası 18) ait tohumların (S) kloroformda çözünen (k), 18S/s ise aynı materyalin suda çözünen bileşikleri içermektedir.

Tablo 5. Bitki kısımlarına ait ekstrakt kodları.

Eks ^a No	Bitki No	Bitki adı	Çözücü	Kısım ^b	Kod ^c
2	18	<i>P. lateritium</i>	CHCl_3	S	18S/k ^d
4	18	<i>P. lateritium</i>	H_2O	S	18S/s ^e
8	6	<i>R. pisiformis</i>	CHCl_3	F	6F/k
10	6	<i>R. pisiformis</i>	H_2O	F	6F/s
15	12	<i>B. medwediewii</i>	CHCl_3	F	12F/k
16	12	<i>B. medwediewii</i>	H_2O	F	12F/s
24	16	<i>D. formosum</i>	CHCl_3	F	16F/k
25	16	<i>D. formosum</i>	H_2O	F	16F/s
26	11	<i>Rh.ponticum</i> ssp.pontica var.heterophyllum	CHCl_3	F ^f	11F ^f /k
27	11	<i>Rh.ponticum</i> ssp.pontica var.heterophyllum	CHCl_3	F	11F/k
28	11	<i>Rh.ponticum</i> ssp.pontica var.heterophyllum	H_2O	F ^f	11F ^f /s
29	11	<i>Rh.ponticum</i> ssp.pontica var.heterophyllum	H_2O	F	11F/s
30	21	<i>O. armena</i>	CHCl_3	F	21F/k
31	21	<i>O. armena</i>	H_2O	F	21F/s
32	11	<i>Rh.ponticum</i> ssp.pontica var.heterophyllum	CHCl_3	Fl+S	11Fl+S/k
33	11	<i>Rh.ponticum</i> ssp.pontica var.heterophyllum	H_2O	Fl+S	11Fl+S/s
34	18	<i>P. lateritium</i>	CHCl_3	Fl	18Fl/k
35	18	<i>P. lateritium</i>	H_2O	Fl	18Fl/s
36	7	<i>J. supina</i> ssp.pontica	CHCl_3	H	7H/k
37	7	<i>J. supina</i> ssp.pontica	H_2O	H	7H/s
38	1	<i>A. sylvestris</i> var.stenoptera	CHCl_3	S	1S/k
39	1	<i>A. sylvestris</i> var.stenoptera	H_2O	S	1S/s
40	1	<i>A. sylvestris</i> var.stenoptera	CHCl_3	F	1F/k
41	1	<i>A. sylvestris</i> var.stenoptera	H_2O	F	1F/s
42	5	<i>A. rizeensis</i>	CHCl_3	Fl+S	5Fl+S/k
43	5	<i>A. rizeensis</i>	H_2O	Fl+S	5Fl+S/s
44	9	<i>C. appendicigera</i>	CHCl_3	F	9F/k

Tablo 5'in devamı

45	9	<i>C. appendigera</i>	H ₂ O	F	9F/s
46	2	<i>V. varians</i> var. <i>trapezunticum</i>	CHCl ₃	F	2F/k
47	2	<i>V. varians</i> var. <i>trapezunticum</i>	H ₂ O	F	2F/s
48	18	<i>P. lateritium</i>	CHCl ₃	F	18F/k
49	18	<i>P. lateritium</i>	H ₂ O	F	18F/s
50	9	<i>C. appendigera</i>	CHCl ₃	Fl	9Fl/k
51	9	<i>C. appendigera</i>	H ₂ O	Fl	9Fl/s
52	3	<i>S. rizeensis</i>	CHCl ₃	Fr	3Fr/k
53	3	<i>S. rizeensis</i>	H ₂ O	Fr	3Fr/s
54	15	<i>C. helenioides</i>	CHCl ₃	F	15F/k
55	15	<i>C. helenioides</i>	H ₂ O	F	15F/s
56	15	<i>C. helenioides</i>	CHCl ₃	Fl	15Fl/k
57	15	<i>C. helenioides</i>	H ₂ O	Fl	15Fl/s
58	4	<i>P. russeliana</i>	CHCl ₃	Fl	4Fl/k
59	4	<i>P. russeliana</i>	H ₂ O	Fl	4Fl/s
60	5	<i>A. rizeensis</i>	CHCl ₃	H	5H/k
61	5	<i>A. rizeensis</i>	H ₂ O	H	5H/s
62	8	<i>P. longipes</i>	CHCl ₃	H	8H/k
63	8	<i>P. longipes</i>	H ₂ O	H	8H/s
64	10	<i>C. betulifolia</i>	CHCl ₃	F	10F/k
65	10	<i>C. betulifolia</i>	H ₂ O	F	10F/s
66	3	<i>S. rizeensis</i>	CHCl ₃	F	3F/k
67	3	<i>S. rizeensis</i>	H ₂ O	F	3F/s
68	20	<i>A. cretica</i> ssp. <i>argaea</i>	CHCl ₃	F	20F/k
69	20	<i>A. cretica</i> ssp. <i>argaea</i>	H ₂ O	F	20F/s
70	14	<i>H. platytaenium</i>	CHCl ₃	Fl+S	14Fl+S/k
71	14	<i>H. platytaenium</i>	H ₂ O	Fl+S	14Fl+S/s
72	13	<i>Q. pontica</i>	CHCl ₃	F	13F/k
73	13	<i>Q. pontica</i>	H ₂ O	F	13F/s
74	17	<i>Q. macranthera</i> ssp. <i>sypirensis</i>	CHCl ₃	Fr	17Fr/k
75	17	<i>Q. macranthera</i> ssp. <i>sypirensis</i>	H ₂ O	Fr	17Fr/s
76	14	<i>H. platytaenium</i>	CHCl ₃	F	14F/k
77	14	<i>H. platytaenium</i>	H ₂ O	F	14F/s
78	12	<i>B. medwediewii</i>	CHCl ₃	Fr	12Fr/k
79	12	<i>B. medwediewii</i>	H ₂ O	Fr	12Fr/s
80	17	<i>Q. macranthera</i> ssp. <i>sypirensis</i>	CHCl ₃	F	17F/k
81	17	<i>Q. macranthera</i> ssp. <i>sypirensis</i>	H ₂ O	F	17F/s
82	4	<i>P. russeliana</i>	CHCl ₃	F	4F/k
83	4	<i>P. russeliana</i>	H ₂ O	F	4F/s
84	20	<i>A. cretica</i> ssp. <i>argaea</i>	CHCl ₃	Fl+S	20Fl+S/k
85	20	<i>A. cretica</i> ssp. <i>argaea</i>	H ₂ O	Fl+S	20Fl+S/s
86	2	<i>V. varians</i> var. <i>trapezunticum</i>	CHCl ₃	S	2S/k
87	2	<i>V. varians</i> var. <i>trapezunticum</i>	H ₂ O	S	2S/s
88	16	<i>D. formosum</i>	CHCl ₃	Fl	16Fl/k
89	16	<i>D. formosum</i>	H ₂ O	Fl	16Fl/s
90	19	<i>L. sulfureum</i>	CHCl ₃	H	19H/k
91	19	<i>L. sulfureum</i>	H ₂ O	H	19H/s
92	22	<i>S. armenum</i>	CHCl ₃	F	22F/k
93	22	<i>S. armenum</i>	H ₂ O	F	22F/s

^a Ekstrakt Numarası^b Ekstrakt elde edilen kısımlar: S Semen (Tohum), F Folia (Yaprak), Fr Fructus (Meyve), Fl Flores veya Flos (Çiçek), H Herba (Otsu bitkinin tümü)^c Ekstrakt Kodu^d Kloroformda çözünen ekstrakt fazı^e Suda çözünen ekstrakt fazı^f F' Genç yaprak

3.2.4. Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması

3.2.4.1. Antibakteriyel Aktivite Deneyleri

Antibakteriyel etki araştırılacak bakterilerin seçiminde morfolojik farklılıklar göz önünde bulunduruldu. Bakterilere karşı ekstraktların antibakteriyel etkisi, agar kuyucuk yayılma deneyi (agar well diffusion), sıvı mikrodilüsyon (broth microdilution) ve agar dilüsyon yöntemleri kullanılarak araştırıldı.

a) Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması

Bakteri suşlarından *E. coli* EMB, *H. pylori* Brucella agar diğerleri kanlı agara tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. *H. pylori*, havası vakum pompası ile boşaltıldıktan sonra, içine % 85 azot, % 10 karbondioksit, % 5 oksijen karışımı verilmiş anaerobik kavanozlarda üç gün, diğer bakteriler ise atmosferik koşullarda bir gece 37°C'de inkübe edildi.

Üremiş kültür plaklarından tek koloni alınarak 3 ml MHB'a ekim yapıldı ve etüvde inkübe edildi (*H.pylori* hariç). Sıvı kültürler, bakterinin üremesi neticesi oluşan bulanıklık McFarland'ın 0.5 no'lu bulanıklık tüpüne (yaklaşık 1.5×10^8 bakteri/ml) eşit hale gelinceye kadar 37°C'de inkübe edildi.

H. pylori süspansiyonu ise sıvı besiyerinde kolayca üretilmediği için, katı besiyerindeki kültürden alınan mikroorganizmalar PBS ile McFarland'ın 0.5 no'lu tüpünün bulanıklığına eşdeğer bulanıklıkta olacak şekilde süspanse edilerek hazırlandı.

b) Ekstraktların kabaca antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi

Agar kuyucuk yayılma yöntemi ile yapıldı (11).

Deney besiyeri olarak *S. aureus*, *B. subtilis* ve *E. coli* için MHA, *B. catarrhalis* için KA, *H. pylori* için ise BA kullanıldı.

Besiyerlerinin yüzeyi, etüvde 15 dakika bekletilmek suretiyle kurutuldu. McFarland'ın 0.5 no'lu tüpüne denk bulanıklıktaki bakteri süspansiyonları eküvyon

çubuğu ile besiyerleri üzerine homojen şekilde yayıldı. Besiyeri yüzeyinin kuruması için petriler etüvde 5 dakika bekletildi.

Petrilerin alt yüzeyine ekstraktların konacakları kuyucuk yerleri işaretlendi ve ekstrakt numaraları yazıldı. Taşınabilir bir aspiratörün vakum ucuna bağlı hortuma ortadan kırılmış bir pastör pipeti, düzgün kısmı dışarıda kalacak şekilde takıldı. Cam pipet ucu % 96'lık alkole batırıldıktan sonra alevde yakılarak steril edildi. Uç soğuduktan sonra motor çalıştırılarak besiyeri içinde pastör pipeti çapında (6mm) kuyucuklar açıldı.

Her ekstraktın PBS:DMSO (1:1) içinde konsantrasyonları 5 mg/ml olacak şekilde sulandırımı yapıldı. Bu sulandırmadan kuyucuklara 100'er µl pipete edildi. Kontrol olarak 100 µg/ml konsantrasyonunda ampisilin ve ekstrakt içermeyen çözücü (PBS:DMSO, 1:1) kullanıldı.

H.pylori'ye karşı aktivite araştırılan petriler "mikroaerofilik gas pack" veya havası alındıktan sonra özel gaz karışımı verilmiş anaerobik kavanozlarda 37°C'de 72 saat inkübe edildi. Diğerleri ise 37°C'de 18 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapı ölçüldü.

c) Ekstraktların antibakteriyel minimal inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) tespiti

Agar kuyucuk yayılma yöntemi ile aktivite belirlenen ekstraktların mikroorganizmalara karşı (*H. pylori* hariç) MİK'leri, iş gücü azlığı, ekonomik oluşu ve pratikliği sebebiyle sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi (13).

Bu amaçla, hazırlanan MHB besiyerinden steril 96 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µl dağıtıldı. Ekstraktların PBS:DMSO (1:1) ile 20 mg/ml konsantrasyonda sulandırmaları hazırlandı. Bu sulandırmılardan 96 kuyucuklu pleytlerin ilk kuyucuklarına (1A, 2A, 3A,...) 100'er µl konuldu.

Kontrol olarak da;

1. Ampisilin: Standart suşun kalitesini ve deneyin doğruluğunu test etmek için bir serinin ilk kuyucuğuna 100 µl ampisilin süspansiyonu (ilk kuyucukta 100 µg/ml olacak şekilde) konuldu.

2. PBS:DMSO (1:1): Çözücünün sulandırımı hazırlanarak, inhibitör etkinin çözücü ile ilişkisi araştırıldı.
3. Bakteri kontrol: Bir sıra kuyucukta bulunan besiyerinin üzerine 100 µl bakteri süspansiyonu eklenerek, bakterinin üreme kabiliyeti değerlendirildi.
4. Besiyeri kontrol: Bir sıraya sadece besiyeri eklenerek kontaminasyon sebebiyle oluşabilecek inhibitör etki araştırma dışı bırakıldı.

Sekiz kanallı pipet ile ilk kuyucuklardaki besiyeri ve ekstrakt pipete edilerek iyice karıştırıldıktan sonra bunlardan alınan 100 µl'lik hacimler bir sonraki kuyucuklara aktarıldı. Bu şekilde 5-6 kez pipetlemeyi takiben bir sonraki kuyucuklara 100 µl aktararak ekstraktların 1/2 seri sulandırımı yapıldı (10 mg/ml – 4 µg/ml).

McFarland 0.5 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan besiyeri ile 10^{-2} sulandırım yapılarak ml'sinde 10^6 bakteri olan süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan her kuyucuğa 100 µl aktarıldı. Sonuçta ekstraktların 5 mg/ml ile 2 µg/ml konsantrasyonları arası sulandırımı elde edildi. Pleytler 37°C'de 18 saat inkübe edildi.

H. pylori'ye karşı etkili oldukları tespit edilen ekstraktların MİK'leri ise bazı değişikliklerle birlikte Valsaraj ve ark. (6) tarafından uygulanan agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi. Agar dilüsyon, *H. pylori* için referans antibiyotik duyarlılık tespit yöntemi olarak belirtilmektedir (40).

Bu amaçla, brucella agar hazırlanıp steril edildikten sonra 60°C olacak şekilde soğutuldu. Çalışma kabini içine alınan ısıtıcı bloğun sıcaklığı 60°C'ye ayarlanarak üzerine steril 24 kuyucuklu pleyt yerleştirildi. Besiyerine % 5 oranında insan kanı katılıp karıştırıldıktan sonra 10 ml'lik pipetle her kuyucuğa 1ml dağıtıldı. Yine ısıtıcı bloğun üzerinde, 1.5 ml'lik bir santrifüj tüpü içinde, ekstraktın besiyeri ile karıştırılarak 10 mg/ml'lik dilüsyonu hazırlandı. Bu tüpten alınan 1'er ml besiyeri pleytin ilk kuyucuğuna aktarıldı ve burada pipetlenerek karıştırıldı. Buradan alınan 1ml'lik hacim ikinci kuyucuğa aktararak aynı şekilde karıştırıldı. Bu şekilde, alınan 1ml'lik hacmi diğer kuyucuğa aktarmak suretiyle 24 kuyucuklu pleyt üzerinde ekstraktların 5 mg/ml'den başlayan iki kat seri dilüsyonları hazırlandı.

Kontrollere de aynı işlem uygulandı. Pleyt kapağı kapatılıp oda ısısına alınarak katılaşması sağlandı.

Pleytler ekim işlemine kadar 4°C'de saklandı. Ekim işleminden önce besiyeri yüzeyi etüvde kurutuldu.

H. pylori'nin süspansiyonundan 10⁷ bakteri/ml olacak şekilde sulandırım yapıldı. Buradan mikropipet ile her kuyucuğun ortasına 10 µl ekim (10⁵ bakteri/inokulum) yapıldı (56). Uygun atmosferik şartlar sağlandıktan sonra pleyt 37°C'de 3 gün inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben pleytlerdeki üreme kontrol edildi. Gözle görülebilen bir üremenin olmadığı, dolayısıyla üremenin inhibe olduğu en düşük ekstrakt konsantrasyonu, MİK olarak değerlendirildi. Ayrıca üremenin olmadığı kuyucuklardan ekstrakt içermeyen petri yüzeylerine öze ile ekimler yapıldı. Uygun ortam ve sürede inkübasyonu takiben üreme kontrol edildi. Üzerinden ekstraktın antimikrobiyal baskısı kaldırıldıktan sonra dahi üremenin olmadığı en düşük ekstrakt konsantrasyonu, Minimal Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) olarak kaydedildi.

3.2.4.2. Antifungal Aktivite Deneyleri

Ekstraktların antifungal aktiviteleri agar kuyucuk yayılma ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle araştırıldı (11, 13).

Mantarlar SDA besiyerinde üretildi. Ekstraktların antifungal MİK'lerinin belirlenmesinde YEPD ve MEB besiyerleri kullanıldı.

a) Mantar süspansiyonlarının hazırlanması

C. albicans SDA besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekildi ve 35°C'de inkübe edildi. *C. albicans* 1-2 gün içinde maya formunda koloni oluşturarak üredi. Buradan YEPD'ye tek koloni alınarak 35°C'de üretildi.

T. rubrum liyofilize saklama tüpünde 1ml YEPD ile çözüldükten sonra SDA besiyerine ekildi. Bir hafta 30°C'de inkübasyonu takiben küf formundaki tipik görüntüsü ile ürettiği gözlemlendi. Buradan steril ıslak eküvyon çubuk ile toplanan

sporlar 140 mm çaplı petrilere yaygın olarak ekildi ve 30°C'de inkübe edildi. İyice sporlanmaları beklendikten sonra petriye 10 ml steril distile su aktarıldı. Steril eküvyon çubuk yardımıyla sporlar toplandı ve plastik pastör pipeti ile spor süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Sporlar 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Bir ml steril distile su içinde çözölen sporlar, steril iki kat sargı bezinden süzölerek hifalar uzaklaştırıldı. Elde edilen süspansiyondaki spor sayısı thoma lamında sayılarak belirlendi.

b) Ekstraktların kabaca antifungal aktivitelerinin belirlenmesi

C. albicans'ın ekstraktlara olan duyarlılığının belirlenmesinde kullanıldı. YEPD besiyeri, *C. albicans*'ın oluşturduğu bulanıklık McFarland 1 oluncaya kadar inkübe edildi. Bu tüpten eküvyon çubuğu ile etüvde 15 dakika bekletilmek suretiyle kurutulan SDA yüzeyine yaygın ekim yapıldı. Deney, 3.2.4.1'de belirtildiği şekilde yapıldı. Kontrol kuyucuklarına 250 µg/ml konsantrasyonunda amfoterisin B (5) ve ekstrakt içermeyen PBS:DMSO (1:1)'den 100 µl eklendi.

Petriler 35°C'de 18 saat inkübe edildi. Süre sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapı ölçüldü.

Ekstraktların *T. rubrum*'a olan etkilerinin kabaca araştırılmasında agar kuyucuk yayılma yöntemi denendi. Kuyucuklar arasında oluşan üremenin inhibisyon zonunu örtmesi sebebiyle, agar kuyucuk yayılma yönteminin bu mikroorganizma için uygun olmadığına karar verildi. Bu sebeple *T. rubrum*'un ekstraktlara olan duyarlılıklarının araştırılmasında, sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı.

c) Ekstraktların antifungal MİK'lerinin tespiti

Agar kuyucuk yayılma yöntemi ile *C. albicans*'a karşı etkili olan ekstraktların MİK'leri ve *T. rubrum*'un ekstraktlara olan duyarlılıklarının saptanması için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı.

Doksan altı kuyucuklu pleytlerde, 3.2.4.1'de ifade edildiği şekilde, YEPD veya MEB besiyeri kullanılarak araştırıldı. Ekstrakt ve kontrollerin (amfoterisin B, PBS-DMSO), 5 mg/ml'den başlayarak 1/2 azalan konsantrasyonlarda dilüsyonları hazırlandı. Ayrıca bazı kuyucuklar *T. rubrum* ve *C. albicans*'ın üremesini

değerlendirmek (ekstrakt içermeyen kuyucuklar) ve besiyeri ile pleytin sterillliğini denetlemek (ekstrakt ve mantar içermeyen kuyucuklar) amacıyla çalışmaya dahil edildi. Mantar süspansiyonlarından (*C. albicans* için 10^6 hücre/ml, *T. rubrum* için 10^5 spor/ml) 100'er µl kuyucuklara pipetlendi (57).

Pleytler *C. albicans* için 35°C'de 18 saat, *T. rubrum* için 30°C'de 5 gün inkübe edildi. *T. rubrum* içeren pleytler, üremeleri açısından her gün makroskopik olarak ve invert mikroskop altında kontrol edildi.

Gözle görülebilen bir üremenin olmadığı en düşük ekstrakt ve kontrol konsantrasyonu MİK olarak kaydedildi.

Minimal Fungisidal Konsantrasyonlarını (MFK) belirlemek amacıyla MİK ve MİK altlarından ekstrakt içermeyen petrideki SDA yüzeylerine öze ile ekimler yapıldı. İnkübasyon sonucu üzerinden ekstraktın antimikrobiyal baskısı kaldırıldıktan sonra üremenin olmadığı en düşük ekstrakt konsantrasyonu MFK olarak kaydedildi.

3.2.4.3. Antiviral Aktivite Deneyleri

Ekstraktların anti-HSV etkileri, virusun Vero hücrelerinde üremelerinin inhibe edilmesi esasına dayalı plak azalma testi (plaque reduction assay, PRA) ile araştırıldı. Deneyler için öncelikle konak hücre ve virus ile ilgili hazırlıklar yapıldı.

1. Hücre ve Virusların Hazırlanması

Çalışmada, Afrika Yeşil Maymun böbreklerinden elde edilmiş olan, pasaj 154-172 arası Vero hücreleri kullanıldı.

a) Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi

Vero hücreleri -85°C'den çıkarıldıktan sonra avuç içinde yuvarlama hareketleri yapılarak çözüldü. Dondurma tüpündeki (cryo vial) hücre süspansiyonu plastik pastör pipeti ile alınarak yavaşça yeni ve steril bir TC25 flaskına boşaltıldı. Üzerine önceden ısıtılmış 8-9 ml büyütme vasatı (GM) eklendi. Flaskın üzerine hücrenin adı, pasaj sayısı ve tarih yazılarak 37°C'deki % 5 CO₂'li etüve kaldırıldı.

b) Hücrelerin üretilmesi

Vero hücrelerinin üreme ve sağlık durumları invert mikroskopta izlendi. Konfluent hale gelmiş (flask tabanını tamamen doldurmuş) Vero hücreleri pasajlanarak çoğaltıldı. Bir flastan pasaj yolu ile elde edilen her 3 flask hücreden biri geri besleme amacıyla dondurulurken ikincisi deneyde kullanılmak üzere 24 kuyucuklu pleytlere pasajlandı. Diğer flastaki hücreler ise bir sonraki deneyde kullanılmak üzere TC25 flastlarına pasajlanarak çoğaltıldı.

c) Hücrelerin pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması sırasında kullanılacak olan tripsin-EDTA solüsyonu, PBS (veya serum fizyolojik, SF) ve GM 37°C'de ısıtıldı. İçinde konfluent Vero hücreleri bulunan flasttaki besiyeri döküldü. Hücreler 10ml PBS veya SF ile iki kez yıkandı. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra flaska 1.5ml tripsin-EDTA solüsyonu pipetlendi. Ağız kapatılarak hücreler invert mikroskopta incelendi. Hücreler birbirinden ve flask yüzeyinden ayrılmaya başladığı ve yuvarlaklaştığı anda tripsin-EDTA solüsyonu, flastta yaklaşık 1 ml kalacak şekilde döküldü. İçinde yüzeyini ıslatacak kadar tripsin-EDTA solüsyonu kalan flask, tripsinin aktivitesini artırmak amacıyla 37°C'ye konuldu ve 2-3 dakikalık aralarla hücreler invert mikroskopta incelendi. Hücrelerin zeminden koptuğu görüldükten sonra flastın tabanı sert bir zemine birkaç kez vurularak tek tabaka (monolayer) hücreler flask tabanından tamamen kaldırıldı.

Flask içine yaklaşık 3ml GM konarak hücreler plastik pastör pipeti ile pipete edildi. Böylece küme şeklinde toplanmış hücreler birbirinden ayrıldı. Bu hücre süspansiyonundan yeni steril flastlara 1'er ml aktarıldı. Flask, 8-9 ml GM eklendikten sonra üzerine hücrenin adı, yeni pasaj sayısı, pasaj oranı (1:3) ve tarih yazılarak 37°C'deki % 5 CO₂'li etüve kaldırıldı.

d) Hücrelerin dondurularak saklanması

Saklama işlemi için flastan tripsinizasyon işlemi sonucu elde edilen hücreler 10 ml PBS içinde çözülerek 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Oda ısısında 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyonu takiben süpernatant atıldı. Tüpün

dip kısmına parmakla yavaşça vurularak pellet çözüldü. Üzerine % 10 DMSO içeren GM'den 1ml aktarıldı. Plastik pastör pipeti ile dondurma vasatı içinde süspanse edilen hücreler, küçük, vida kapaklı hücre dondurma tüpüne (cryo vial) alındı. Kapağı sıkıca kapatıldıktan sonra parafilm ile sarıldı. Üzerine hücrenin adı, pasaj numarası ve donduruldukları tarih yazılarak -85°C 'ye kaldırıldı.

e) Stok virus süspanسیونlarının hazırlanması

TC25 flasklarında konfluent olmuş Vero hücreleri, 37°C 'deki etüvde önceden ısıtılmış steril 3-5 ml PBS ile yıkandı. Virus suşlarını içeren vialler avuç içinde yuvarlayarak çözüldü. Çoğaltılmak istenen stok vialdeki virus titresi gözönünde bulundurularak, 5'er flaska, flask içindeki hacim 1'er ml olacak şekilde ekim yapılarak 37°C 'de 1 saat inkübe edildi. Bu sürede virusun küçük hacim içinde hücre yüzeyi ile daha kolay temas ederek hücreye bağlanması sağlandı. Daha sonra flaskların içindeki bağlanmayan virus atılarak hücreler PBS ile yıkandı. Flaska 8-10 ml idame vasatı (MM) eklenerek 37°C 'deki % 5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı.

Hücreler her gün sitopatik etki (cpe) oluşumu açısından kontrol edildi. Yüzde 90 cpe görülen flasklar -85°C 'ye kaldırıldı. Dondurulmuş flasklar 37°C 'de etüvde ısıtılarak çözüldü. Bu şekilde, hassaslaşmış olan hücrelerin parçalanarak virusların hücre dışına çıkması sağlandı. Bunu takiben flask içindeki hücreler plastik pastör pipeti ile mekanik olarak zeminden ayrıldı ve santrifüj tüplerine aktarıldı. Sonikatörde 35 kHz'de 15 dakika bekletilen bu hücre süspanسیونları 3500 rpm'de 4°C 'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada hücrelerin ses dalgaları yardımıyla parçalanması ve virus partiküllerinin serbest bırakılması amaçlandı. Süpernatantlar birleştirilerek virus havuzu oluşturuldu. Bu havuzdan üzerinde suş adı ve hazırlanma tarihi yazılı viallere 1'er ml pipetlenerek -85°C 'de depolandı.

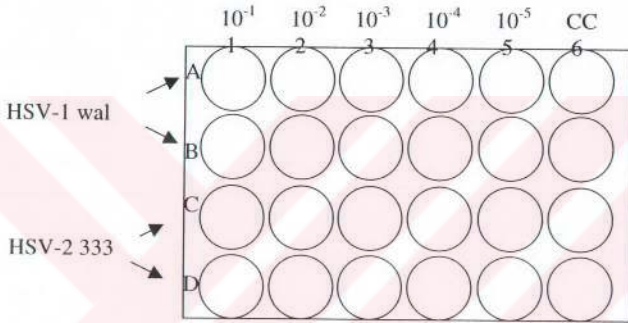
f) Virus titrasyonu

Hazırlanan stok virus havuzlarından birer vial çıkarılarak avuç içinde çözüldü ve buz üzerine alındı. HSV-1 ve HSV-2 için buz üzerine yerleştirilen 5'er adet 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 900'er µl MM konuldu. İlk tüpe stok virus vialinden 100 µl pipetlendi. Kapağı kapatılıp vortekslendikten sonra bundan 100 µl bir sonraki

tüpe aktarıldı. İşlem bu şekilde tekrarlanarak virus suşlarının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} dilusyonları hazırlandı.

Konfluent olmuş Vero hücreleri bulunan 24 kuyucuklu hücre kültür pleytindeki vasat döküldü. Kuyucuklara yaklaşık 0.5 ml PBS eklenip dökülerek hücreler yıkandı. Kuyucuklarda kalan PBS mikropipet ile alındı.

Kuyucuklara replika olmak üzere her iki virus suşunun dilüsyonlarından 100'er µl aktarıldı. Tüm sıraların son kuyucuklarına hücre kontrolü (CC=Cell Control) olarak 100'er µl MM pipetlendi (Şekil 26).



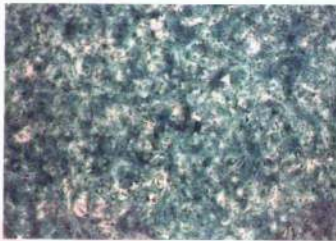
Şekil 26. Virus titrasyonunda kullanılan 24 kuyucuklu pleyt.

Pleyt 1 saat 37°C 'de % 5 CO_2 içeren inkübatörde bekletildi. Kuyucuk yüzeyinin kurumaması için pleyte 10-15 dakika arayla dairesel hareketler yaptırıldı.

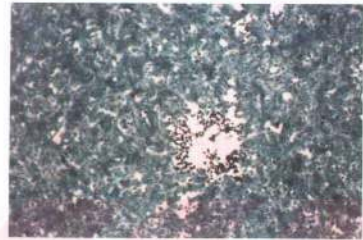
Süre sonunda kuyucuklardaki virus süspansiyonları ve kontrol kuyucuklarında bulunan MM pipet yardımıyla alındı. Kuyucuklar 2-3 damla PBS ile yıkandı ve kuyucuklara 1'er ml yoğun besiyeri ilave edildi. Pleyt 37°C 'de % 5 CO_2 'li etüvde 72 saat inkübe edildi.

Pleyt içeriği bir aspiratör yardımıyla alındı. Kuyucuklar, önceden ısıtılmış PBS'ten 1 ml pipetlendikten sonra aspiratörle alınması suretiyle iki kez yıkandı. Kuyucuklara 1'er ml plak boyama solüsyonu pipetlenerek pleyt yarım saat 37°C 'de bekletildi. Pleyt çok basınçlı olmayan musluk suyu altında yıkanarak boyadan arındırıldı ve 37°C 'de bekletilerek kurutuldu.

Boyama işlemi ile hücreler zemine fikse edildi ve HSV-1 ve HSV-2 suşları tarafından oluşturulan sitopatolojinin (plaklar) daha kolay görülmesine olanak sağlayan renk zıtlığı oluşturuldu. Makroskopik olarak ve invert mikroskopta sağlıklı hücreler mavi-lacivert renkte, virusun üremesi sonucu oluşan patoloji ise hücre morfolojisinde değişiklik veya boşluklar olarak görüntülendi (Şekil 27, 28).

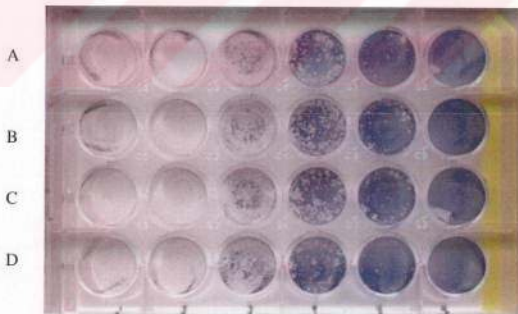


A



B

Şekil 27. Boyalı konfluent Vero hücreleri (A Normal, B HSV tarafından oluşturulmuş plak)



Şekil 28. HSV-1 ve HSV-2'nin titrasyonu; A ve B sırası HSV-2 333 suşunun, C ve D sırası HSV-1 wal suşunun dilüsyonları.

Virus suşları tarafından oluşturulan plaklar, düşük dilüsyonlardaki yüksek virus titresi sebebiyle plaklar sayılamayacak kadar çok iken 10^{-4} ve 10^{-5} dilüsyonlardaki plaklar sayılarak stoktaki yaklaşık virus sayısı hesaplandı (Şekil 27).

Stok virus sayısını daha doğru hesaplayabilmek için yeni 24 kuyucuklu pleytlere her virus suşunun 10^{-4} , $1/2 \cdot 10^{-4}$, $1/3 \cdot 10^{-4}$, $1/4 \cdot 10^{-4}$, $1/5 \cdot 10^{-4}$, $1/6 \cdot 10^{-4}$, $1/7 \cdot 10^{-4}$, $1/8 \cdot 10^{-4}$, $1/9 \cdot 10^{-4}$ ve 10^{-5} dilüsyonları inoküle edilerek deney tekrarlandı.

Plak sayımları ve dilüsyon katsayıları kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucu elimizdeki stok virus titresinin HSV-1 wal suşu için 2.5×10^7 pfu/ml, HSV-2 333 suşu için 3×10^7 pfu/ml olduğu tespit edildi.

2. Plak azalma testi ile ekstraktların antiviral aktivitelerinin belirlenmesi

Plak azalma testi, virusların antiviral ilaçlara hassasiyetlerinin belirlenmesinde referans metod olarak kullanılmaktadır (1, 58, 59). PRA, bazı modifikasyonlarla birlikte, Pacheko ve ark. (60) tarafından yapılan çalışma temel alınarak uygulandı.

Çalışmada pasaj 154-172 arası Vero hücreleri kullanıldı. Flaskta çoğaltılan Vero hücreleri 24 kuyucuklu hücre kültür pleytlerine pasajlandı ve deneyler yapıldı.

Stok virus suşları avuç içinde çözüldü ve iyice vortekslendi. Stok virus miktarı göz önünde bulundurularak her virus suşu için 1000 pfu/ml oluşturacak dilüsyon (HSV-1 wal suşu için $1/5 \times 10^{-4}$, HSV-2 333 suşu için $1/6 \times 10^{-4}$) hesaplandı. Böylece hücrelerin enfeksiyonu için 100 µl'lik inokulum içinde yaklaşık 100 plak (1000 pfu/ml) oluşturacak virus dilüsyonu hazırlandı.

Pleyt etüvden çıkarılarak besiyeri döküldü. Kuyucuklar önceden ıltılmış yaklaşık 0.5 ml PBS ile yıkandı. Kuyucuklarda kalan PBS mikropipet ile alındıktan sonra C6 ve D6 kuyucuklarına 100 µl MM, diğerlerine 1000 pfu/ml olacak şekilde hazırlanan virus süspansiyonundan 100 µl pipetlendi. Bir saat 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi.

Bu arada ekstraktların dilüsyonlarının hazırlanması amacıyla her ekstrakt için 5 adet steril 1.5 ml'lik tüpler çıkarıldı. Bunlara 900'er µl yoğun besiyeri pipetlendi. Stok ekstrakt tüpü iyice vortekslendikten sonra bundan ilk tüpe 100 µl aktarıldı. İşlem diğer tüplere de aynı şekilde uygulanarak her ekstraktın 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml dilüsyonları hazırlandı.

Bir saatlik inkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki bağlanamayan viruslar fosfat tamponu ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Hazırlanan 1, 0.1, 0.01 ve 0.001 mg/ml'lik ekstrakt dilüsyonları pleytin 4 kuyucuğuna aktarıldı. Altıncı sütundaki kuyucuklara ekstrakt içermeyen overlay konuldu. Böylece A6 ve B6 virus kontrol (VC), C6 ve D6 ise hücre kontrol (CC) olarak ayrılmış oldu. Pleyt, 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde 72 saatlik inkübasyonu takiben yukarıda anlatıldığı şekilde yıkanıp boyanarak plak inhibisyonu invert mikroskop altında araştırıldı.

İnhibisyon görülen ekstraktların etkili konsantrasyonlarını daha iyi belirlemek için etki gösterdikleri aralıklarda 1/2 dilüsyonları yapılarak (1, 0.500, 0.250, 0.125, 0.062, 0.031mg/ml) deney tekrarlandı.

Hücre kontrolünde beklenildiği gibi plak görülmemesi kontaminasyon olmadığını, dökülme olmaması da hücrelerde kendiliğinden veya dış etkenlerden kaynaklanan zararlı bir etkinin olmadığını göstermektedir.

Virus kontrol kuyucuklarında sayılan plaklar, ekstraktların inhibitör etkili konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanıldı.

Çözücünün etkisini araştırmak için aynı oranda çözücü enfekte kuyucuklara uygulandı. DMSO, DMSO:PBS (1:1) ve PBS'in herhangi bir inhibitör etkiye sahip olmadıkları gözlemlendi.

Pozitif kontrol olarak asiklovir kullanıldı.

Kuyucuklarda virus tarafından oluşturulan plaklar (plaque forming unit, pfu) sayılarak yüzde plak inhibisyonu şu şekilde hesaplandı (8):

$$\text{Yüzde inhibisyon} = 100 - (\text{Verilen dozdaki pfu} / \text{Kontroldeki pfu} \times 100).$$

Bu hesaplamalar kullanılarak ekstrakt konsantrasyonu ve yüzde inhibisyon bir grafiğe aktarıldı. Ekstraktın, plak oluşumunu % 50 inhibe eden konsantrasyonu (IC₅₀) regresyon analizi ile hesaplandı (61). Olumlu sonuçlar mililitredeki µg kaba madde olarak (µg/ml) ifade edildi.

3.2.5. Aktivite Gösteren Kısımların Fraksiyonlarına Ayrılması ve Aktivitelerinin Belirlenmesi

Biyolojik deneyler sonucu etkili bulunan bazı ekstraktların fraksiyonlanmasına karar verildi. Ekstraktların seçiminde biyolojik aktiviteleri ve fraksiyonlanacak miktarda kaba madde hazırlanabilecek kadar bitki kısmına sahip olmamız göz önünde bulunduruldu.

Centaurea helenioides ve *Anthemis cretica* ssp. *argaea*'nin yapraklarından elde edilen kaba ekstraktların, kloroformda çözünen kısımlarının fraksiyonlanmasına karar verildi. Böylece ekstraktta bulunan antimikrobiyal etkili bileşiğin saflaştırılması hedeflendi.

Toz halindeki bitki yaprakları soxhlette 1/10 MeOH (w/v) ile ekstrakte edildi. Antimikrobiyal etkili bileşikler suda çözünmeyen karakterde oldukları için elde edilen yapışkan kaba maddenin kloroformda çözünen kısmı evapore edilerek fraksiyonlanacak kaba madde elde edildi. Önceden tartılmış evaporatör balonu toplam ağırlıktan çıkarılarak net ekstrakt ağırlıkları tespit edildi.

3.2.5.1. Silika Kolonun Hazırlanması

Uzun ve temiz bir cam kolona (1.5 cm çap ve 50 cm uzunluğunda) yaklaşık 20 cm'lik bir bölüme küçük hacimler halinde silika ve diklorometan (DCM) eklendi. Kolon cam çubuk ile karıştırılarak silikanın içinde hava boşlukları olmadan paketlenmesi sağlandı. Silikanın kurumaması ve hava kabarcıklarının oluşmaması için, DCM seviyesinin her zaman yatak üst seviyesini geçmesi gerektiği göz önünde bulundurularak yatak, hacminin 2-3 katı DCM geçirilerek yıkandı.

İnce tabaka kromatografi (Thin Layer Chromatography, TLC) kağıtlarından yürütüleceği tanka sığabilecek ebatta parçalar kesildi.

Ekstrakt 2 ml DCM ile çözüldü ve silika ile karıştırılarak kolona aktarıldı. Kolona ilk olarak, kullanılan çözücülerin en apoları ve aynı zamanda kolonun sıvı fazı olan DCM uygulandı.

Ekstrakttaki renkli bileşiklerden iz boya gibi yararlanarak, bileşiklerin kolonda ilerlemeleri izlendi. Bu esnada kuru, temiz ve üzeri numaralandırılmış cam tüplere alınan 1'er ml hacimli elüant örnekleri TLC kağıtlarında yürütülerek UV lambası ile kısa dalga boylu ışıktaki (TLC kağıtları üzerinde) bileşikler arandı.

Bileşiklerin yürümeleri ve bantların ayrılması, TLC tankı içindeki çözücünün polaritesi değiştirilerek sağlandı. Fraksiyonlama işlemine önce apolar bileşiklerden başlandığı için tanktaki çözücünün çok apolar olması durumunda bileşiklerin ayrılmadan yürüdükleri, polar olmaları durumunda yürümedikleri görüldü.

İlk bileşiklerin elüe edildikleri ultraviyole ışığı altında görüldükten sonra 6-7 ml'lik elüantlar alındı ve oluşan bantlara göre fraksiyonlar belirlendi. Etilasetat (EtAc) ve MeOH kullanılarak polarite değiştirilmek suretiyle ekstrakt içindeki bileşikler ayrıştırıldı. Aynı fraksiyona ait tüpler birleştirilerek evapore edildi. Fraksiyonlar evaporasyon balonunda DCM içinde çözüldü. Önceden tartılmış tüplere alınan fraksiyonların miktarları, DCM'nin 45-50 °C'de su banyosunda uçurulduktan sonra tüplerin tartılması ve tüp ağırlığının toplam ağırlıktan çıkarılması ile hesaplandı.

Fraksiyonlar biyolojik aktivite deneyleri için DMSO'de çözüldü.

Fraksiyonların aktivite gösterdikleri mikroorganizmalardan *H. pylori* üzerine etkisi agar dilüsyon, diğer mikroorganizmalar üzerine etkisi sıvı mikrodilüsyon ile araştırıldı.

3.2.5.2. *Centaurea helenioides* ve *Anthemis cretica* ssp. *argaea* Yaprak

Ekstraktlarının Fraksiyonlanması

Ekstraksiyon ile *Centaurea helenioides*'ten elde edilen 0.802g ve *Anthemis cretica* ssp. *argaea*'dan elde edilen 1.160g suda çözünmeyen kaba madde 2 ml DCM ile çözüldü. Silika ile karıştırılarak kolona aktarıldı. Kolona Tablo 6 ve 7'de belirtilen hacim ve sırayla kimyasallar uygulanarak elüasyon yapıldı.

Tablo 6. *Centaurea helenioides* yaprak ekstraktının fraksiyonlanması.

ORANLAR		
DCM	EtAc	HACİM (ml)
1	-	100
98	2	200
96	4	100
95	5	100
90	10	100
75	25	100
1	1	100
MeOH		
-	1	100
2	98	100
4	96	100
1	1	100
-	1	100

Tablo 7. *Anthemis cretica* ssp. *argaea* yaprak ekstraktının fraksiyonlanması.

ORANLAR		
DCM	EtAc	HACİM (ml)
1	-	100
98	2	100
96	4	100
9	1	100
1	1	100
-	1	100
MeOH		
-	1	100
1	9	100
2	8	100
3	7	100
4	6	100
1	1	100
1	-	100

Centaurea helenioides ve *Anthemis cretica* ssp. *argaea*'dan elde edilen fraksiyonların sayı ve ağırlıkları Tablo 8 ve 9'da verilmiştir.

Centaurea helenioides'ten elde edilen Fraksiyon 5'ten sonra gelen 5 elüant tüpünde F5'te bulunan bir banda ilaveten yakın bir bant daha gözlemlendi. Bu fraksiyon F5b olarak adlandırıldı.

Tablo 8. *Centaurea helenioides*'ten elde edilen fraksiyonların ağırlıkları.

Fraks.No	Fraksiyon Ağırlığı (mg)
F1	55.3
F2	13.8
F3	29.2
F4	5.0
F5a	57.4
F5b	15.5
F6	20.3
F7	13.7
F8	46.4
F9	44.5
F10	77.5
F11	35.6
F12	27.1
F13	7.8
F14	108.7
F15	11.6

Tablo 9. *Anthemis cretica* ssp. *agaea*'dan elde edilen fraksiyonların ağırlıkları.

Fraks.No	Fraksiyon Ağırlığı (mg)
F1	104.4
F2	69
F3	298
F4	95.1
F5	119.5
F6	172.8
F7	96.1
F8	107.1
F9	39.3
F10	22.3

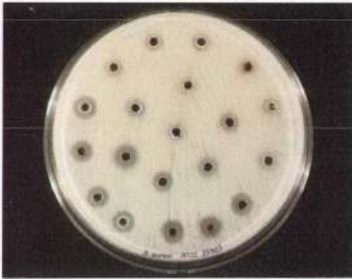
Fraksiyonlar, ağırlıkları göz önünde bulundurularak DMSO:PBS içinde çözüldü. Fraksiyonların bakteri ve mantar suşları için MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon (*H. pylori* için) yöntemleri kullanılarak belirlendi. *E. coli*'yi inhibe eden kaba ekstrakta rastlanmadığı için fraksiyonların bu mikroorganizma üzerine olan inhibitör etkileri araştırılmadı.

4. BULGULAR

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetişen ve toplayabildiğimiz 22 endemik bitkiye ait 76 ekstrakt ve bunların ikisinden elde edilen fraksiyonların çeşitli bakteri, mantar ve virus suşları üzerine antimikrobiyal etkileri sırasıyla aşağıda verilmiştir.

4.1. Antibakteriyel Aktivite Deneyleri

Agar kuyucuk yayılma yöntemi ile yapılan ön antimikrobiyal aktivite tarama deney sonuçlarına göre bazı ekstraktların antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Buna karşın hiçbir ekstraktın *E. coli*'ye karşı inhibitör etki göstermediği tespit edildi. Mikroorganizmalara karşı, ekstraktlar arasında değişiklik gösteren inhibisyon zonlarında antibakteriyel aktivite belirlendi (Şekil 29). Her bir deney en az iki kez tekrarlanıp bağımsız deney sonuçlarının ortalama zon çapları kaydedildi (Tablo10).



Şekil 29. Agar kuyucuk yayılma yöntemiyle antibakteriyel aktivite aranması (Örnek pleyt, *S. aureus*).

Tablo 10. Ekstraktların antibakteriyel aktivitelerinin araştırılması

Ekstrakt ^a	B.c. ^b	E.c.	S.a.	B.s.	H.p.
1S/k	- ^c	-	13 ^d	-	-
1S/s	16	-	-	13	-
1F/k	9	-	12	8	11
1F/s	9	-	-	-	-
2F/k	8	-	9	-	8
2F/s	-	-	-	-	-
2S/k	-	-	-	-	-
2S/s	-	-	-	-	-
3Fr/k	-	-	-	-	-
3Fr/s	-	-	-	-	-
3F/k	-	-	-	-	-
3F/s	10	-	15	8	10
4Fl/k	-	-	-	-	-
4Fl/s	-	-	-	-	-
4F/k	-	-	-	-	-
4F/s	-	-	-	-	-
5Fl+S/k	8	-	13	-	8
5Fl+S/s	13	-	-	11	9
5H/k	-	-	8	-	-
5H/s	15	-	14	16	12
6F/k	8	-	13	9	12
6F/s	17	-	-	-	18
7H/k	-	-	-	-	-
7H/s	-	-	-	-	-
8H/k	15	-	15	8	30
8H/s	-	-	-	-	-
9F/k	9	-	10	-	9
9F/s	-	-	-	-	-
9Fl/k	8	-	-	-	-
9Fl/s	8	-	-	-	-
10F/k	-	-	-	-	-
10F/s	-	-	-	-	-
11F ⁺ /k	-	-	-	-	-
11F/k	-	-	-	-	-
11F ⁺ /s	13	-	8	9	9
11F/s	8	-	8	8	8
11Fl+S/k	-	-	-	-	-
11Fl+S/s	13	-	13	9	-
12F/k	8	-	12	9	11
12F/s	10	-	-	-	-
12Fr/k	12	-	15	12	10
12Fr/s	17	-	13	11	16
13F/k	-	-	8	-	-
13F/s	15	-	-	8	16
14Fl+S/k	19	-	14	13	18
14Fl+S/s	-	-	-	-	-
14F/k	10	-	16	-	9
14F/s	-	-	-	-	-

Tablo 10'un devamı

15F/k	15	-	14	18	21
15F/s	-	-	-	-	10
15Fl/k	8	-	-	8	15
15Fl/s	-	-	-	-	-
16F/k	9	-	13	9	10
16F/s	-	-	-	-	-
16Fl/k	10	-	13	-	10
16Fl/s	-	-	-	-	-
17Fr/k	8	-	-	-	9
17Fr/s	18	-	-	8	21
17F/k	13	-	-	-	-
17F/s	13	-	-	10	10
18S/k	8	-	13	8	12
18S/s	-	-	-	-	-
18Fl/k	8	-	-	-	8
18Fl/s	-	-	-	-	-
18F/k	8	-	9	8	8
18F/s	-	-	-	-	-
19H/k	-	-	-	-	-
19H/s	-	-	-	-	-
20F/k	16	-	13	20	35
20F/s	-	-	-	-	-
20Fl+S/k	11	-	10	-	9
20Fl+S/s	-	-	-	-	-
21F/k	-	-	-	-	-
21F/s	8	-	8	8	-
22F/k	-	-	-	-	-
22F/s	-	-	-	-	-
Çözücü ^e	-	-	-	-	-
Ampisilin ^f	45	18	30	25	45

^a Kod numaraları ile ilişkili bitki adları: 1. *A. sylvestris* var. *stenoptera*, 2. *V. varians* var. *trapezunticum*, 3. *S. rizeensis*, 4. *P. russeliana*, 5. *A. rizeensis*, 6. *R. pisiformis*, 7. *J. supina* ssp. *pontica*, 8. *P. longipes*, 9. *C. appendicigera*, 10. *C. betulifolia*, 11. *Rh. ponticum* ssp. *ponticum* var. *heterophyllum*, 12. *B. medwediewii*, 13. *Q. pontica*, 14. *H. platytaenium*, 15. *C. helenioides*, 16. *D. formosum*, 17. *Q. macranthera* ssp. *sympirensis*, 18. *P. lateritium*, 19. *L. sulfureum*, 20. *A. cretica* ssp. *argaea*, 21. *O. armena*, 22. *S. armenum*

^b Mikroorganizmalar: (B.c.) *B. catarrhalis*; (E.c.) *E. coli*; (S.a.) *S. aureus*; (B.s.) *B. subtilis*; (H.p.) *H. pylori*

^c İnhibisyon yok

^d zon çapı, mm

^e PBS : DMSO (1:1)

^f Ampisilin (10 µg/kuyucuk)

Yetmiş altı ekstraktan 42'sinin (% 55.3) test edilen bakterilerden en az birine karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi. 8H/k ve 20F/k'nın, 30 cm'nin üzerinde zon çaplarıyla en fazla antibakteriyel etkiye sahip ekstraktlar olduğu görüldü. Antibakteriyel aktiviteye sahip bu 42 ekstrakt, bağımsız deney sonuçlarının zon çapları ortalamaları göz önünde bulundurularak skorlandı (Tablo 11).

Tablo 11. Antibakteriyel etkili ekstraktlar.

Ekstrakt ^a	B.c.	E.c.	S.a.	B.s.	H.p.
1S/k	- ^b	-	++	-	-
1S/s	+++	-	-	++	-
1F/k	±	-	+	±	+
1F/s	±	-	-	-	-
2F/k	±	-	±	-	-
3F/s	+	-	++	±	+
5Fl+S/k	±	-	++	-	±
5Fl+S/s	++	-	-	+	±
5H/k	-	-	±	-	-
5H/s	++	-	++	+++	+
6F/k	±	-	++	±	+
6F/s	+++	-	-	-	+++
8H/k	++	-	++	±	+++
9F/k	±	-	+	-	±
9Fl/k	±	-	-	-	-
9Fl/s	±	-	-	-	-
11F [*] /s	++	-	±	±	±
11F/s	±	-	±	±	±
11Fl+S/s	++	-	++	±	-
12F/k	±	-	+	±	+
12F/s	+	-	-	-	-
12Fr/k	+	-	++	+	+
12Fr/s	+++	-	++	+	+++
13F/k	-	-	±	-	-
13F/s	++	-	-	±	+++
14Fl+S/k	+++	-	++	++	+++
14F/k	+	-	+++	-	±
15F/k	++	-	++	+++	+++
15F/s	-	-	-	-	+
15Fl/k	±	-	-	±	++
16F/k	±	-	++	±	+
16Fl/k	+	-	++	-	+
17Fr/k	±	-	-	-	±
17Fr/s	+++	-	-	±	+++
17F/k	++	-	-	-	-
17F/s	++	-	-	+	+
18S/k	±	-	++	±	+
18Fl/k	±	-	-	-	±
18F/k	±	-	±	±	±
20F/k	+++	-	++	+++	+++
20Fl+S/k	+	-	+	-	±
21F/s	±	-	±	±	-
Çözücü	-	-	-	-	-
Ampisilin	+++	+++	+++	+++	+++

^a Kod numaraları ile ilişkili bitki adları: 1. *A. sylvestris* var. *stenoptera*, 2. *V. varians* var. *trapezanticum*, 3. *S. rizeensis*, 5. *A. rizeensis*, 6. *R. pisiformis*, 8. *P. longipes*, 9. *C. appendicigera*, 11. *Rh. ponticum* ssp. *ponticum* var. *heterophyllum*, 12. *B. medwediewii*, 13. *Q. pontica*, 14. *H. platytaenium*, 15. *C. helenioides*, 16. *D. formosum*, 17. *Q. macranthera* ssp. *sympirensis*, 18. *P. lateritium*, 20. *A. cretica* ssp. *argaea*, 21. *O. armena*.

^b Skorlar: - Antimikrobiyal aktivite yok, ± Önemsiz antimikrobiyal aktivite (7-9mm), + Orta derecede antimikrobiyal aktivite (10-12mm), ++ Açık antimikrobiyal aktivite (13-15), +++ Güçlü antimikrobiyal aktivite (>15mm)

Ekstraktların 11'inde, tarafımızdan güçlü (+++) olarak kabul edilen antibakteriyel etki olduğu belirlendi (Tablo 12).

Tablo 12. Güçlü antibakteriyel etkili ekstraktlar.

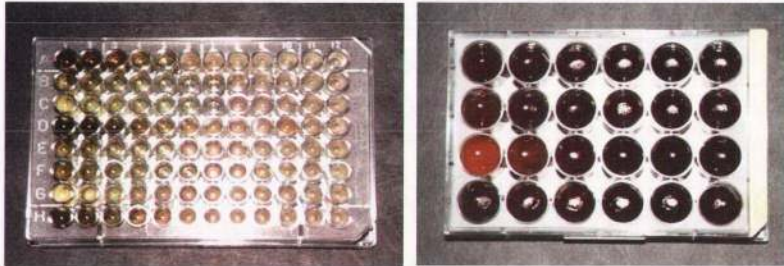
Ekstrakt ^a	B.c.	E.c.	S.a.	B.s.	H.p.
1S/s	+++ ^b	-	-	++	-
5H/s	++	-	++	+++	+
6F/s	+++	-	-	-	+++
8H/k	++	-	++	±	+++
12Fr/s	+++	-	++	+	+++
13F/s	++	-	-	±	+++
14Fl+S/k	+++	-	++	++	+++
14F/k	+	-	+++	-	±
15F/k	++	-	++	+++	+++
17Fr/s	+++	-	-	±	+++
20F/k	+++	-	++	+++	+++

^a Kod numaraları ile ilişkili bitki adları: 1. *A. sylvestris* var. *stenoptera*, 5. *A. rizeensis*, 6. *R. pisiformis*, 8. *P. longipes*, 12. *B. medwediewii*, 13. *Q. pontica*, 14. *H. platytenium*, 15. *C. helenioides*, 17. *Q. macranthera* ssp. *sympirensis*, 20. *A. cretica* ssp. *argaea*.

^b Skorlar: - Antimikrobiyal aktivite yok, ± Önemli antimikrobiyal aktivite (7-9mm), + Orta derecede antimikrobiyal aktivite (10-12mm), ++ Açık antimikrobiyal aktivite (13-15), +++ Güçlü antimikrobiyal aktivite (>15mm)

Antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları ön deneylerle saptanan ekstraktların MİK ve MBK değerleri *H. pylori* için agar dilüsyon, diğer bakteriler için sıvı mikrodilüsyon ve yöntemleriyle (Şekil 30) belirlendi (Tablo 13).

Bazı ekstraktların MİK değerlerinin MBK değerlerine eşit olduğu (bakterisid etki), bazılarının ise MİK değerlerinin MBK değerlerinden oldukça düşük (bakteriostatik etkili) olduğu tespit edildi.



Şekil 30. Ekstraktların MİK'lerinin belirlenmesi. **Örnek pleyt A** (*S. aureus*): A sırasında MİK 5., B ve C sıralarında MİK 7. kuyucuk, G sırasında tüm kuyucuklarda üreme var. **Örnek pleyt B** (*H. pylori*): A sırasında MİK 2. kuyucuk, B sırasında 3. kuyucuk, C sırasında MİK denenen 6 konsantrasyondan da düşük olduğu için deney düşük konsantrasyonlar da dahil edilerek tekrarlandı, D sırasında inhibisyon gözlenmedi.

Tablo 13. Antibakteriyel aktiviteye sahip ekstraktların MİK ve MBK değerleri.

Ekstrakt	B.c.		S.a.		B.s.		H.p.	
	MİK ^a	MBK ^b	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
1S/k			2.500	5.000				
1S/s	0.156	0.625			1.250	2.500		
1F/k	0.625	0.625	1.250	5.000	1.250	1.250	0.312	0.312
1F/s	0.625	1.250						
2F/k	5.000	5.000	-					
3F/s	1.250	2.500	0.156	0.312	1.250	5.000	0.312	0.625
5Fl+S/k	1.250	1.250	0.312	5.000			1.250	1.250
5Fl+S/s	0.312	0.625			2.500	5.000	0.625	1.250
5H/k			-					
5H/s	0.312	0.625	0.625	2.500	2.500	2.500	0.078	0.156
6F/k	1.250	1.250	1.250	5.000	2.500	2.500	0.625	1.250
6F/s	0.078	0.312					0.039	0.078
8H/k	0.156	0.156	0.078	2.500	0.625	1.250	0.039	0.078
9F/k	1.250	2.500	2.500	5.000				
9Fl/k	2.500	5.000						
9Fl/s	1.250	2.500						
11F ⁺ /s	0.312	0.625	0.625	0.625	1.250	2.500	0.312	0.312
11F/s	0.625	1.250	0.625	0.625	2.500	2.500	0.625	0.625
11Fl+S/s	1.250	5.000	0.312	0.312	0.312	0.625	0.625	0.625
12F/k	1.250	1.250	1.250	5.000	2.500	2.500	0.625	0.625
12F/s	0.312	0.312						
12Fr/k	0.312	0.312	0.078	0.312	0.078	0.078	0.019	0.019
12Fr/s	0.312	0.312	0.039	0.312	0.312	0.625	0.156	0.156
13F/k			-					
13F/s	0.156	0.312			1.250	2.500	0.156	0.312
14Fl+S/k	0.156	0.156	0.312	2.500	0.625	1.250	0.156	0.156
14F/k	0.625	0.156	0.312	2.500			0.019	0.019
15F/k	0.312	0.312	0.156	1.250	1.250	1.250	0.156	0.156
15F/s							0.625	1.250
15Fl/k	2.500	2.500			1.250	1.250	0.625	0.625
16F/k	0.625	0.625	0.625	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250
16Fl/k	0.625	0.625	1.250	2.500	0.625	0.625	0.312	0.625
17Fr/k	1.250	1.250					0.312	0.625
17Fr/s	0.156	0.312			0.625	1.250	0.078	0.156
17F/k	1.250	1.250						
17F/s	0.312	0.625			1.250	2.500	0.625	1.250
18S/k	0.625	0.625	1.250	5.000	2.500	2.500	0.625	0.625
18Fl/k	2.500	2.500					2.500	2.500
18F/k	1.250	1.250	2.500	-	2.500	2.500		
20F/k	0.156	0.312	0.156	1.250	0.625	1.250	0.156	0.156
20Fl+S/k	1.250	2.500	2.500	5.000			1.250	1.250
21F/s	2.500	5.000	0.625	0.625	1.250	2.500		
Çözücü	-		-		-		-	
Ampisilin ^c	0.781	0.781	0.781	0.781	1.562	1.562	0.390	0.390

^a Minimal İnhibitör Konsantrasyon^b Minimal Bakterisidal Konsantrasyon^c µg/ml

C. helenioides'e (15F/k) ait 16 fraksiyon (Fx) ve *A. cretica* L. ssp. *argaea*'ya (20F/k) ait 10 fraksiyonun MIC ve MBC değerleri Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14. Fraksiyonların antibakteriyel MİK ve MBK değerleri.

Fraks.No	<i>B.c.</i>		<i>S.a.</i>		<i>B.s.</i>		<i>H.p.</i>	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
15F/k ^a	0.312 ^b	0.312 ^c	0.156	1.250	1.250	1.250	0.156	0.156
Fx1 ^c	-	-	1.250	5.000	-	-	-	-
Fx2	0.312	0.312	0.625	1.250	0.625	1.250	-	-
Fx3	0.312	0.312	0.625	1.250	-	-	-	-
Fx4	-	-	-	-	-	-	-	-
Fx5a	0.078	0.078	0.039	0.312	0.078	0.625	0.156	0.312
Fx5b	0.078	0.078	0.039	0.312	0.156	0.625	0.156	0.156
Fx6	0.019	0.039	0.039	0.312	0.078	0.312	0.078	0.156
Fx7	0.019	0.039	0.156	0.156	0.312	0.312	0.019	0.039
Fx8	0.039	0.078	0.312	0.312	0.625	0.625	0.078	0.156
Fx9	0.078	0.078	0.312	0.625	0.312	0.625	0.156	0.156
Fx10	0.078	0.078	0.156	0.312	0.156	0.312	0.078	0.156
Fx11	-	0.156	-	0.625	-	0.625	0.156	0.312
Fx12	0.156	0.156	0.312	0.625	0.312	0.312	0.156	0.156
Fx13	0.156	0.156	0.625	2.500	-	-	0.156	0.312
Fx14	0.156	0.156	2.500	2.500	1.250	2.500	0.312	0.312
Fx15	0.625	0.625	2.500	2.500	-	-	0.312	0.312
20F/k ^a	0.156	0.312	0.156	1.250	0.625	1.250	0.156	0.156
Fx1	0.312	0.312	2.500	5.000	-	-	-	-
Fx2	0.039	0.039	0.312	0.312	1.250	1.250	0.312	0.312
Fx3	0.019	0.019	0.078	0.156	0.156	0.312	0.039	0.078
Fx4	0.009	0.019	0.078	0.078	0.156	0.156	0.039	0.039
Fx5	0.039	0.039	0.312	0.625	0.625	0.625	0.078	0.078
Fx6	0.039	0.039	0.625	1.250	0.625	1.250	0.156	0.312
Fx7	0.312	0.312	1.250	1.250	1.250	2.500	0.312	0.625
Fx8	0.312	0.312	2.500	5.000	1.250	5.000	0.625	0.625
Fx9	-	-	-	-	-	-	-	-
Fx10	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Ekstraktın kendisi

^b mg/ml

^c Fraksiyonlar

4.2. Antifungal Aktivite Deneyleri

Ekstraktların *C. albicans* ve *T. rubrum*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyucuk yayılma, sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleriyle belirlendi (Tablo 15).

Tablo 15. Antifungal etkili ekstraktlar.

Ekstraktlar ^a	Zon çapı ^b	<i>C. albicans</i>			<i>T. rubrum</i>	
		Skor ^c	MİK ^d	MFK ^e	MİK	MFK
1S/k	-	-	-	-	0.625	0.625
1S/s	-	-	-	-	1.250	1.250
1F/k	-	-	-	-	0.039	0.078
2F/k	8	±	2.500	-	0.625	0.625
3F/s	-	-	-	-	0.625	0.625
5F1+S/k	-	-	-	-	0.625	1.250
5F1+S/s	-	-	-	-	0.625	1.250
5H/k	-	-	-	-	1.250	1.250
5H/s	-	-	-	-	0.625	1.250
6F/k	14	++	2.500	-	0.625	1.250
6F/s	-	-	-	-	0.312	1.250
8H/k	16	+++	0.312	0.312	0.019	0.019
9F/k	-	-	-	-	0.625	1.250
11F ⁺ /s	-	-	-	-	0.625	1.250
11F/s	-	-	-	-	1.250	1.250
11F1+S/s	-	-	-	-	0.625	0.625
12F/k	12	+	-	-	1.250	1.250
12F/s	-	-	-	-	1.250	2.500
12Fr/k	-	-	-	-	1.250	1.250
12Fr/s	-	-	-	-	0.625	0.625
13F/k	-	-	-	-	0.625	1.250
13F/s	-	-	-	-	1.250	1.250
14F1+S/k	11	+	2.500	2.500	0.078	0.078
14F/k	-	-	-	-	0.156	0.156
15F/k	-	-	-	-	0.625	0.625
15F1/k	-	-	-	-	1.250	1.250
16F/k	-	-	-	-	1.250	1.250
16F1/k	-	-	-	-	1.250	1.250
17Fr/k	-	-	-	-	0.625	1.250
17Fr/s	-	-	-	-	0.625	0.625
18S/k	13	++	1.250	-	0.625	1.250
18F1/k	8	±	2.500	-	1.250	1.250
18F/k	-	-	-	-	0.625	0.625
20F/k	11	+	1.250	1.250	0.078	0.156
20F1+S/k	-	-	-	-	1.250	1.250
21F/s	-	-	-	-	0.625	0.625
Çözücü ^f	-	-	1/8	1/4	1/8	1/4
Amfoterisin B ^g	-	-	-	-	-	-
Flukonazol ^h	18	+++	0.312	0.312	0.078	0.078

^a Kod numaraları ile ilişkili bitki adları: 1. *A. sylvestris* var. *stenoptera*, 2. *V. varians* var. *trapezunticum*, 3. *S. rizeensis*, 5. *A. rizeensis*, 6. *R. pisiformis*, 8. *P. longipes*, 9. *C. appendicigera*, 11. *Rh. ponticum* ssp. *ponticum* var. *heterophyllum*, 12. *B. medwediewii*, 13. *Q. pontica*, 14. *H. platytaenium*, 15. *C. helenioides*, 16. *D. formosum*, 17. *Q. macranthera* ssp. *sysspirensis*, 18. *P. lateritium*, 20. *A. cretica* ssp. *argaea*, 21. *O. armena*.

^b mm

^c Skorlar: - Antikandidal aktivite yok, ± Önemli antikandidal aktivite (7-9mm), + Orta derecede antikandidal aktivite (10-12mm), ++ Açık antikandidal aktivite (13-15), +++ Güçlü antikandidal aktivite (>15mm).

^d Minimal İnhibitör Konsantrasyon

^e Minimal Fungusidal Konsantrasyon

^f DMSO:PBS (1:1)

^g *C. albicans* için, (µg/ml)

^h *T. rubrum* için, (mg/ml)

Fraksiyonlanan 15F/k ve 20F/k numaralı ekstraktların mantar suşlarına olan etkileri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı. Her fraksiyon için MİK ve MFK değeri tesbit edildi (Tablo 16).

Tablo 16. Fraksiyonların antifungal MİK ve MFK değerleri.

	Fraksiyon No	<i>C. albicans</i>		<i>T. rubrum</i>	
		MİK	MFK	MİK	MFK
<i>Centaurea helenioides</i>	15F/k ^a	-	-	0.625 ^b	0.625
	Fx1 ^c	-	-	0.625	0.625
	Fx2	-	-	-	-
	Fx3	-	-	0.312	0.625
	Fx4	-	-	-	-
	Fx5a	-	-	0.156	0.156
	Fx5b	-	-	0.078	0.156
	Fx6	-	-	0.039	0.039
	Fx7	-	-	0.004	0.019
	Fx8	-	-	0.312	0.312
	Fx9	0.625	1.250	0.312	0.312
	Fx10	-	-	0.312	0.625
	Fx11	0.625	1.250	0.312	0.625
	Fx12	0.625	1.250	0.156	0.625
	Fx13	-	-	-	-
	Fx14	-	-	-	-
	Fx15	-	-	-	-
<i>A. cretica</i> L. ssp. <i>argaea</i>	20F/k	1.250	1.250	0.078	0.156
	Fx1	-	-	0.625	0.625
	Fx2	-	-	0.156	0.156
	Fx3	0.312	0.625	0.039	0.078
	Fx4	0.625	0.625	0.156	0.156
	Fx5	0.625	0.625	0.312	0.312
	Fx6	0.625	0.625	0.312	0.312
	Fx7	-	-	0.625	1.250
	Fx8	-	-	0.625	1.250
	Fx9	-	-	-	-
	Fx10	-	-	-	-

^a Ekstraktın kendisi

^b mg/ml

^c Fraksiyonlar

4.3. Antiviral Aktivite Deneyleri

Yirmi iki bitkiye ait 76 ekstrakt, antiviral aktivitelerini değerlendirmek amacıyla HSV-1 ve HSV-2'ye karşı test edildi. HSV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan asiklovir, deneyin çalışma etkinliğini test etmek için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Antiviral etkili ekstraktların bulunduğu kuyucuklarda plak oluşmadığı veya plak sayısının azaldığı belirlendi (Şekil 31). Yedi bitkiye ait 9 ekstraktta antiviral aktivite gözlemlendi. Kuyucuklarda oluşan plaklar invert mikroskopta bir şablon yardımıyla sayıldı. Eşli kuyucuklardaki plak sayılarının ortalaması alındı (Tablo 17).

Tablo 17. Antiviral etkili ekstraktlar (ortalama pfu/ml).

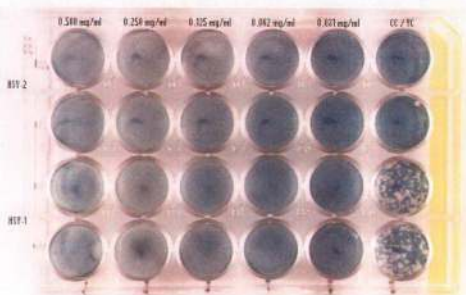
	Ekstrakt	Kontrol	Ekstrakt konsantrasyonu (mg/ml)					
			1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031
HSV-1	1S/s	104±3 ^a	T ^b	T	5±1	104.9±2.5	VKA ^c	BM ^d
	5Fl+S/s	104±3	T	39±2	VKA	VKA	VKA	BM
	6F/s	95.5±3.5	T	0	0	23.5±3.5	103±2	BM
	11F'/s	86.5±0.5	T	0	81.5±0.5	89±3	VKA	BM
	11F/s	86.5±0.5	T	0	90.5±9.5	VKA	VKA	BM
	12F/s	95.5±3.5	T	7.5±4.5	106±3	VKA	VKA	BM
	12Fr/s	97±5	T	T	0	10±4	60±4	97±1
	13F/s	108.5±1.5	T	0	67.5±10.5	VKA	VKA	BM
	17Fr/s	108.5±1.5	T	T	0.5±0.5	104±11	VKA	BM
HSV-2	1S/s	91.5±3.5	T	T	5±1	64.5±9.5	VKA	BM
	5Fl+S/s	91.5±3.5	T	32.5±5.5	74±4	VKA	VKA	BM
	6F/s	82±3	T	0	0	34.5±2.5	74±2	BM
	11F'/s	95.5±5.5	T	0	0	85.5±5.5	VKA	BM
	11F/s	95.5±5.5	T	1±1	35±12	77±2	VKA	BM
	12F/s	82±3	T	2±1	79±4	73±3	VKA	BM
	12Fr/s	118.5±2.5	T	T	0	0	23±8	108±2
	13F/s	120.5±2.5	T	0.5±0.5	32±13	112.5±9.5	VKA	BM
	17Fr/s	118.5±2.5	T	T	0	64.5±10.5	VKA	BM

^a Ortalama plak sayısı (pfu/kuyucuk)

^b Toksik

^c Virus Kontrol ile aynı sayıda plak

^d Belirlenmedi



Şekil 31. PRA ile ekstraktların antiviral etkilerinin araştırılması (Örnek pleyt. *B. medwedewii*, 12Fr/s)

Her pleyt için kullanılan virus kontrol kuyucuklarında oluşan plakların ortalama sayılarından faydalanılarak ekstraktların verilen konsantrasyonlarına karşılık inhibisyon oranları yüzde olarak hesaplandı (Tablo 18). Yüzde inhibisyon değerleri ve ekstrakt konsantrasyonları kullanılarak grafikler oluşturuldu. Plak oluşumunu %50 azaltan ekstrakt konsantrasyonu (IC_{50}), regresyon analizi ile hesaplandı Tablo 18). **Asiklovirin** IC_{50} değeri HSV-1 için 0.84 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

Tablo 18. Antiviral etkili ekstraktların yüzde inhibisyon ve IC_{50} değerleri

Tablo 10: Herkuleran Ekstraktının yavaş inhibisyon ve IC ₅₀ değeri								
Ekstrakt	Konsantrasyon (mg/ml)						IC ₅₀ (µg/ml)	
	1	0.5	0.250	0.125	0.062	0.031		
HSV-1	1S/s	T ^a	T	95.2	0	0	190.6	
	5Fl+S/s	T	62.5	0	0	0	450.0	
	6F/s	T	100	100	75.5	0	103.7	
	11F'/s	T	100	5.8	0	0	367.3	
	11F/s	T	100	0	0	0	375.0	
	12F/s	T	92.1	0	0	0	385.7	
	12Fr/s	T	T	100	89.7	38.1	0	76.5
	13F/s	T	100	37.8	0	0	299.0	
	17Fr/s	T	T	99	0	0	188.1	
HSV-2	1S/s	T	T	94.5	29.5	0	164.4	
	5Fl+S/s	T	64.5	19.1	0	0	420.1	
	6F/s	T	100	100	57.9	0	116.4	
	11F'/s	T	100	100	0	0	187.5	
	11F/s	T	98.9	63.3	19.4	0	212.1	
	12F/s	T	97.6	0	0	0	378.1	
	12Fr/s	T	T	100	100	80.6	0	50.2
	13F/s	T	99.2	73.4	0	0	210.1	
	17Fr/s	T	T	100	45.6	0	135.1	

^a Toksik

5. TARTIŞMA

Çoklu ilaç direncine sahip mikroorganizmaların ortaya çıkışı, antibiyotiklerin yan etkileri ve güvenilir tedavi seçenekleri olmayan viral hastalıklar, bitkisel kaynaklı antimikrobiyal ilaçların araştırılmasına yönelik ilgiyi artırmaktadır. Özellikle tıbbi bitkiler bu konuda temel potansiyel olarak görülmekte ve buna yönelik olarak araştırılmaktadır (4, 5, 6, 7, 8, 9).

Çeşitli araştırmalarda geleneksel tıpta kullanılmayan bitkilerin de antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşikler içerdikleri ortaya konmuştur (14, 15, 62, 63).

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetişen 22 endemik bitkiye ait 76 ekstraktın antimikrobiyal etkileri 9 patojen mikroorganizma üzerinde araştırıldı.

5.1. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

Agar kuyucuk yayılma yöntemi, ekstraktların antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri ile ilgili ön bilgiler sağlaması açısından kullanışlıdır (1). Etkili ekstraktın agar içinde yayılabilme yeteneği inhibisyon zonunun oluşumunda ve büyüklüğünde önemli bir faktördür (64). Ekstraktların MİK'lerinin belirlenmesi aktivitenin gerçek gücünü belirler.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, iş gücü azlığı, kolay uygulanabilir ve ekonomik oluşu sebebiyle MİK değerlerinin belirlenmesinde etkin olarak kullanılmaktadır. Ancak bulanık ekstrakt süspansiyonlarında MİK değeri çıplak gözle tespit edilememektedir. Bu sebeple, uygulama kolaylığı açısından sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre dezavantajları olmasına rağmen, agar dilüsyon yöntemi MİK değerlerinin tespitinde yanlıgıyı önlemektedir.

Küf mantarlarının ekstraktlara olan duyarlılıklarının tespitinde, kuyucuklar arasında oluşan üremenin inhibisyon zonunu örtmesi sebebiyle agar kuyucuk yayılma yönteminin başarılı olmadığı görüldü. Bu sebeple sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle doğrudan MİK değerleri belirlendi.

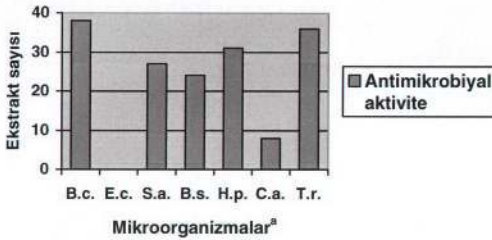
Bağımsız deneyler arasındaki sonuç benzerliği göz önünde bulundurulduğunda PRA'nın, antiviral aktivitenin belirlenmesinde en geçerli yöntem olduğu görülmektedir.

5.2. Ekstraktların Antibakteriyel ve Antifungal Aktiviteleri

Yetmişaltı ekstrakttan 42'sinin (%55.3) test edilen bakterilerden en az birine karşı etkili olduğu tespit edildi. Etkili 42 ekstraktın 38'i *B. catarrhalis*'i, 27'si *S. aureus*'u, 24'ü *B. subtilis*'i, 31'i *H.pylori*'yi inhibe ederken, hiçbir ekstraktın *E. coli*'ye karşı etkili olmadığı gözlemlendi (Şekil 32). Zavala ve ark. (4), Alves ve ark. (5), Sokmen ve ark. (11) yaptıkları çalışmalarda, çalışmamıza benzer olarak *E. coli*'yi güçlü olarak inhibe eden ekstrakta rastlamamışlardır. Bu mikroorganizmanın doğal çevresi itibariyle sıklıkla bitkisel ürünlerle karşılaşması, bitkisel metabolitlere karşı dirençli oluşlarında önemli bir faktör olabileceği akla gelmektedir.

Bu çalışmada gram negatif bakteri suşu başına ortalama etkili ekstrakt sayısı 23 iken, gram pozitif bakteri başına etkili ekstrakt sayısı 25 bulunmuştur. Sokmen ve ark. (11) yaptıkları çalışmada benzer olarak gram pozitif bakterilerin bitki ekstraktlarına karşı daha hassas olduklarını tespit etmiştir. Aynı çalışmada yine çalışmamıza benzer olarak suda çözünmeyen kısma ait ekstraktların suda çözünenlere göre antibakteriyel etkilerinin daha fazla olduklarını belirtmişlerdir. Ancak bizim çalışmamızda güçlü etkili olarak skorlanan ekstraktlar arasında fark görülmedi (Tablo 12).

Kendisine karşı herhangi bir aktivite gözlenmediği için, ekstraktların antibakteriyel aktivitelerinin tartışmalarında *E.coli* yorumlanmamıştır.



^a Mikroorganizmalar: (B.c.) *B.catarrhalis*; (E.c.) *E.coli*; (S.a.) *S.aureus*; (B.s.) *B.subtilis*; (H.p.) *H.pylori*, (C.a.) *C.albicans*, (T.r.) *T.rubrum*.

Şekil 32. İnhibitör etkili ekstraktların bakteri ve mantarlara göre dağılımı

Agar kuyucuk yayılma yöntemiyle yapılan antifungal aktivite deneylerinin sonucunda ekstraktlardan 8'inin *Candida albicans*'a karşı etkili olduğu belirlendi. En etkili ekstraktın *Primula longipes*'ten elde edilen ve apolar maddeleri içeren 8H/k olduğu tespit edildi. Antikandidal aktivite genel olarak kloroform ekstraktlarında saptandı (Tablo 15).

Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılan ekstraktlardan 36'sında *Trichophyton rubrum*'a karşı antifungal aktivite belirlendi. Bakterilere karşı etkili olduğu belirlenen ekstraktlar dışında *T. rubrum*'u inhibe eden ekstrakta rastlanmadı.

Yapılan literatür çalışmalarında, çalışmaya dahil edilen endemik bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nde kullanılan tıbbi bitkiler arasında, çalışmada kullanılan endemik bitkiler belirtilmemiştir (29). Benzer şekilde, bölgeden dışsatımı yapılan 45 bitki arasında, çalışmada kullanılan endemik bitkilerden herhangi biri rapor edilmemiştir (21).

Agar kuyucuk yayılma yöntemiyle *Angelica sylvestris* var. *stenoptera*, *Alchemilla rizeensis*, *Rosa pisiformis*, *Primula longipes*, *Betula medwediewii*, *Heracleum platytaenium*, *Quercus pontica*, *Centaurea helenioides*, *Quercus macranthera* ssp. *sympirensis* ve *Anthemis cretica* ssp. *argaea*'dan elde edilen bazı ekstraktların güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları tespit edildi (Tablo 12).

Angelica sylvestris var. *stenoptera* tohumlarından elde edilen su ekstraktının (1S/s) agar kuyucuk yayılma yöntemiyle *B. catarrhalis* ve *B. subtilis*'in üremesini güçlü bir şekilde inhibe etmesine karşın MİK ve MBK değerlerinin buna paralel olarak düşük olmadığı (MİK değerleri *B. catarrhalis* için 156 µg/ml, *B. subtilis* için 1.250 mg/ml) belirlendi (Tablo 11 ve 12). Aynı bitkiye ait yaprak ekstraktlarında da antibakteriyel aktivite tespit edildi. İlginç olarak, diğer suşlara göre ekstraktlara daha hassas olan *H. pylori* suşunda 1S/s'e karşı duyarlılık tespit edilememiştir. Bae ve ark. (65) *A. gigas* ve *A. dahurica* köklerinden elde edilen su ekstraktlarını fraksiyonladıktan sonra yaptıkları çalışmada *H. pylori*'ye karşı aktivite tespit etmişlerdir.

Inamori ve ark. (66) *A. keiskei*'den elde ettikleri bileşiklerde antibakteriyel aktivite bulmuşlardır. Çalışmamızla benzer şekilde, elde ettikleri bileşiklerde *Enterobacteriaceae* üyelerine karşı inhibitör etki gösterememişlerdir.

Bitkinin tohumlarından elde edilen ekstraktlar bakteri suşlarına karşı daha etkili bulunurken, yapraklarından elde edilen 1F/k no'lu ekstraktın *T. rubrum*'u güçlü bir şekilde inhibe ettiği (MİK, 39 µg/ml) saptandı.

Alchemilla rizeensis'in otsu bölümünden elde edilen su ekstraktının (5H/s) *B.catarrhalis*, *S.aureus*, *B.subtilis* ve *H.pylori*'ye karşı antibakteriyel etkili olduğu tespit edildi. Bu ekstraktın agar kuyucuk yayılma deneylerinde *S.aureus* ve *B.subtilis*'a karşı daha büyük bir inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmasına karşın MİK değerleri dikkate alındığında, *B.catarrhalis* ve *H.pylori* daha hassas (sırasıyla 312 ve 78 µg/ml) bulundu. Aynı bitkinin çiçek ve tohumlarından elde edilen ekstraktlarda da antibakteriyel etki gözlenmiştir.

A. rizeensis ekstraktlarının özellikle polar kısmında antibakteriyel aktivite tespit edildi. Djipa ve ark. (67) yaptıkları bir çalışmada kontrol olarak kullandıkları *A. vulgaris*'in önemsiz antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermiş ve bu bitkilerin antibakteriyel etkisinden tanenlerin sorumlu olduğunu belirtmişlerdir.

Rosa pisiformis'e ait 6F/s kodlu ekstraktın *B.catarrhalis* ve *H.pylori*'ye karşı MİK'leri sırasıyla 78 ve 39 µg/ml olarak tespit edilirken, gram pozitif suşlara karşı aktivite göstermediği izlendi. Aynı bitkiye ait 6F/k ekstraktında, 6F/s'e oranla daha az olmakla beraber tüm bakteri suşlarına karşı aktivite gözlemlendi. Yeşilada ve ark.

(32), Tuzlacı ve ark. (30), Türkiye'de, Miraldi ve ark. (27) Batı Azerbaycan'da (İran) çeşitli yörelerde *Rosa canina* bitkisinin halk tarafından benzer hastalıklara karşı kullanıldığını belirtmektedirler. Bu yöre ve kültürdeki kullanım yaygınlığına karşın biyolojik aktivitesi ile ilgili bilgiler oldukça azdır. Shiota ve ark. (68) yaptıkları bir çalışmada, *Rosa canina* ekstraktlarından elde edilen bir bileşik ve β -laktam ilaç kombinasyonunun metisiline dirençli *S. aureus* suşlarına karşı sinerjik etki gösterip β -laktam antibiyotiklerin MİK değerlerini düşürdüğünü göstermişlerdir.

Newton ve ark. (69) yaptıkları bir çalışmada *Rosa canina* ekstraktlarında antimikobakteriyel aktivite saptayamamışlardır.

Primula longipes'ten elde edilen ekstraktlardan 8H/k'nın, tüm bakteri suşlarında güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenirken, 8H/s'de aktivite gözlenmedi. 8H/k kodlu ekstraktın *H.pylori* için MİK'i 39 $\mu\text{g/ml}$, MBK'sı 78 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi. *S.aureus* için MİK'inin 78 $\mu\text{g/ml}$, MBK'sının 2.5 mg/ml olması, ekstraktın bu bakteri için bakteriyostatik etkili olduğunu göstermektedir.

Antifungal aktivitesi en yüksek ekstraktın; MİK değerleri *C.albicans* için 312 $\mu\text{g/ml}$, *T.rubrum* için 19 $\mu\text{g/ml}$ olan *Primula longipes*'ten elde edilen 8H/k olduğu belirlendi.

Betula medwediewii'den elde edilen kaba ekstraktların tümünde antibakteriyel etki tespit edildi. Çalışmada kullanılan kaba ekstraktlar içinde en düşük MİK ve MBK değerleri, 12Fr/k ekstraktından elde edildi. Bu ekstraktın MİK değerleri, *B.catarrhalis*, *S. aureus*, *B. subtilis* ve *H. pylori* için sırasıyla 312, 78, 78 ve 19 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi. Rauha ve ark. (61) yaptıkları bir çalışmada *B. pubescens* yaprak ekstraktlarında *S.aureus*'a karşı belirgin aktivite bulmuşlardır. Jones ve ark. (70) *B. alleghaniensis* ekstraktlarında antifungal aktivite tespit etmişlerdir. Matsuda ve ark. (71) bir başka *Betula* türünün (*B. platyphylla* var. *japonica*) ekstraktlarından saflaştırılan bileşiklerin, karaciğeri koruyucu ve antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermişlerdir.

Heracleum platytaenium'dan elde edilen, daha çok apolar bileşikler içeren 14F/k ve 14F1+S/k ekstraktlarının güçlü antibakteriyel etkiye sahip oldukları belirlendi. Polar ekstraktlarında ise herhangi bir aktivite görülmedi. 14F/k ekstraktının *H.pylori* için MİK'i 19 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi. Chacko ve ark. (72),

Heracleum candolleanum'dan hazırlanan drogların Hindistan'da bazı kabilelerce artrit ve felç tedavisinde kullanıldığını rapor etmekle birlikte, yapılan literatür çalışmalarında antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili veriye ulaşamadı.

Quercus pontica'dan elde edilen 13F/s ve *Q. macranthera* ssp. *sypirensis*'ten elde edilen 17Fr/s no'lu ekstraktlarda *B.catarrhalis* ve *H.pylori*'ye karşı belirgin bir aktivite tespit edilirken *B.subtilis*'e karşı minimal bir etki gözlemlendi. Bu ekstraktlarda *S.aureus*'a karşı aktivite bulunamadı. Bu bulgular, belirtilen ekstraktların gram negatif bakterilere karşı daha etkili olduklarını göstermektedir. Miraldi ve ark (27), Sezik ve ark. (31) ve Vazquez ve ark. (73) çeşitli *Quercus* türlerinin halk tarafından tedavi amacıyla kullanıldığını belirtmektedirler.

Cowan (1), *Quercus rubra*'dan elde edilen tannin ve quercetin (ticari preparat olarak mevcut) antimikrobiyal etkili olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada kullandığımız *Quercus* türlerine ait ekstraktların özellikle polar kısımlarında aktivite tespit edilmesi, tannin içeriğinden kaynaklanmış olabilir.

Alkofahi ve ark. (74), ratlarda etanol tarafından indüklenerek oluşturulan ülser modelinde bazı *Quercus* türlerine ait meyve ekstraktlarının güçlü anti-ülser etkileri olduğunu bulmuşlardır.

Centaurea helenioides'ten elde edilen ekstraktlardan 15F/k'nın, agar kuyucuk yayılma yöntemiyle güçlü antibakteriyel etkisinin olduğu belirlendi. Ancak, antibakteriyel MİK değerlerinin zon çaplarına paralel olarak düşük olmaması ekstraktın, agar içinde kolay yayılabilen bileşikler içerdiğini göstermektedir. Aynı genus içinde bulunan ve çalışmaya dahil edilen diğer endemik bitkiden (*Centaurea appendicigera*) elde edilen ekstraktların zayıf etkili oldukları tespit edildi. Sezik ve ark. (31) Orta Anadolu'da "boğa diken" olarak bilinen *Centaurea pulchella*'nın halk arasında apse tedavisinde kullanıldığını rapor etmişlerdir. Tuzlacı ve ark. (30) *Centaurea iberica*'nın Şile (İstanbul) yöresinde, Vazquez ve ark (73) *Centaurea ornata*'nın İspanya'da kullanılan tıbbi bitki olduğunu belirtmektedir. Yeşilada ve ark. (12) yaptıkları bir çalışmada geleneksel tıpta kullanılan *Centaurea solstitialis* L ssp. *solstitialis*'in çiçek ve otsu bölümünden elde edilen fraksiyonların *H. pylori*'ye karşı güçlü antibakteriyel aktiviteleri olduğunu belirlemişlerdir.

Centaurea helenioides'in yapraklarından elde edilen 15F/k no'lu ekstraktan 16 fraksiyon elde edildi. Kaba ekstraktın MİK değeri kullanılan bakteri suşları arasında 0.156 ile 1.25 mg/ml arasında değişmekteyken, fraksiyonların MİK'lerinin oldukça düşük olduğu belirlendi. En etkili fraksiyonların Fx6 ve Fx7 olduğu tesbit edildi (MİK'ler 19-78 µg/ml arasında).

Bazı fraksiyonların antifungal etkilerinin kaba ekstraktlarınkine oranla çok daha fazla olduğu belirlendi. Fraksiyon Fx7'nin *T. rubrum*'u inhibe eden MİK'i 4 µg/ml olarak saptandı. Skaltsa ve ark. (57) *Centaurea thessala* ve *C. attica*'dan elde ettikleri sesquiterpene laktonların çok güçlü antifungal etkileri olduğunu tespit etmişlerdir. Vajs ve ark. (75) *Centaurea nicolai*'dan elde ettikleri guaianolidlerin güçlü antifungal aktiviteye sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Anthemis cretica ssp. *argaea*'nın yaprak ve çiçek/tohum kısımlarının apolar ekstraktlarında antibakteriyel etki saptandı. Çalışmada, agar kuyucuk yayılma yöntemiyle saptanan en büyük çaplı inhibisyon zonunu, *Anthemis cretica* ssp. *argaea*'nın yapraklarından elde edilen 20F/k no'lu ekstrakt *H.pylori*'ye karşı (35 mm) gösterdi. Ekstraktın bu bakteriye karşı MİK ve MBK değeri ise 156 µg/ml olarak belirlendi. Bu ekstraktın fraksiyonlanması ile 10 fraksiyon elde edildi. En aktif fraksiyon olan Fx4'ün, *B.catarrhalis*, *S.aureus*, *B.subtilis* ve *H.pylori* için MİK değerleri sırasıyla 0.009, 0.078, 0.156 ve 0.039 olarak tespit edildi. Sökmen ve ark. (15) ve Vardar-Ünlü ve ark. (76), *Anthemis* sp. toprak üstü kısımlarından çalışmamıza benzer şekilde elde ettikleri ekstraktların antifungal ve antibakteriyel etki belirleyememişlerdir. Buna karşın Quarengi ve ark. (77), *Anthemis cotula* çiçek ekstraktlarının antibakteriyel etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Verbascum varians var. *trapezunticum*'dan elde edilen tohum ekstraktlarında aktivite tespit edilemedi. Yaprak ekstraktında (2F/k) zayıf bir aktivite gözlemlendi. Sezik ve ark. (31) *Verbascum pumilum*'un Orta Anadolu'da tıbbi bitki olarak kullanıldığını belirtmektedirler. Baytop (21), *V. phlomoides* ve *V. thapsus*'u Doğu Karadeniz Bölgesi'nden dışsatımı yapılan bitkisel droglar içinde belirtmektedir. Yapılan literatür çalışmalarında *Verbascum* genusuna ait bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır.

Salix rizeensis'e ait yaprak ve meyve ekstraktlarından, suda çözünebilen bileşikleri içeren yaprak ekstraktında (3F/s) kullanılan bakteri suşlarına karşı etki belirlendi. Aynı genus içinde bulunan *Salix caprea*'nın kök ekstraktlarında Rauha ve ark. (63) güçlü olmayan antibakteriyel etki saptamışlardır. Salisilik asitin elde edildiği *Salix alba* (beyaz söğüt) ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin de olduğu, Cowan (1) tarafından rapor edilmiştir. Sezik ve ark. (31), söğüt yapraklarının analjezik ve antipiretik olarak Doğu Karadeniz Bölgesi'nde halk tarafından yoğurda karıştırılarak yenmek suretiyle kullanıldığını tespit etmişlerdir. *Salix alba* yapraklarının Kuzeybatı Anadolu'da kıl kurduna karşı kullanıldığı Yeşilada ve ark. (32) tarafından belirtilmektedir. Tuzlacı ve ark. (30) *Salix babylonica* (salkım söğüt) yapraklarının Şile civarında halk arasında öksürüğe karşı ve bronşitte kullanıldığını belirtmektedirler.

Rhododendron ponticum ssp. *ponticum* var. *heterophyllum*'un genç yaprakları, olgun yaprakları ve çiçek/tohum ekstraktları hazırlandı. Kloroformda çözünen hiçbir ekstraktta antibakteriyel aktivite gözlenmedi. Suda çözünen bileşikleri içeren ekstraktların tümünde aktivite gözlemlendi. Genç yapraklarına ait ekstraktın (11F'/s) *B. catarrhalis* ve *H. pylori*'ye karşı MİK'i 312 µg/ml olarak belirlenirken, bu değer *S. aureus* ve *B. subtilis* için daha yüksek olarak tespit edildi. Çiçek/tohum ekstraktının (11Fl+S/s) ise gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu belirlendi. Baytop (21), *Rhododendron lutei* yapraklarının Doğu Karadeniz Bölgesi'nden yurtdışına satıldığını rapor etmektedir. Yeşilada ve ark. (32) tarafından yapılan bir araştırmaya göre *Rhododendron ponticum* ssp. *ponticum* yaprakları Kuzeybatı Anadolu'da halk arasında diş ağrısını dindirmek için kullanılmaktadır. Demirbağ ve ark. (14), *Rhododendron ponticum* yaprak ekstraktlarının antibakteriyel etkili olduğunu ve çalışmamızla benzer şekilde *E. coli*'nin bu ekstrakta dirençli olduğunu tespit etmişlerdir.

Delphinium formosum'dan elde edilen kloroform ekstraktlarında (16F/k, 16Fl/k) antibakteriyel aktivite gözlemlendi. Yaprak ve çiçek ekstraktları arasında, aktivite açısından önemli bir fark saptanmadı.

Papaver lateritium'a ait yaprak, tohum ve çiçek ekstraktlarının kloroform fazlarında (18F/k, 18S/k ve 18Fl/k) güçlü olmayan antibakteriyel aktivite gözlemlendi.

Cowan (1), *Papaver somniferum* ekstraktlarının (içerdiği alkaloidler ile) genel olarak antimikrobiyal etkili olduğunu rapor etmiştir. Yeşilada ve ark. (32), *Papaver somniferum* tohumlarının Kuzeybatı Anadolu'da halk arasında peptik ülser tedavisinde kullanıldığını belirtmektedirler. Ancak çalışmamızda kullanılan *Papaver lateritium* ekstraktlarında *H. pylori*'ye karşı güçlü bir antibakteriyel etki bulunmadı.

Onobrychis armena'nın polar yaprak ekstraktlarında (21F/s) önemsiz antibakteriyel aktivite tespit edildi. Cowan (1) *Onobrychis viciifoli* bitkisinden elde edilen tanninlerin rumen (işkembe) bakterilerini inhibe ettiğini rapor etmiştir. *Onobrychis tournefortii* yaprak ekstraktları ile yaptıkları çalışmalarda Vardar-Ünlü ve ark. (76) antifungal etki tespit edemezken; Sökmen ve ark. (15) *Branhamella catarrhalis* ve *Corynebacterium glutamicum*'a karşı çalışmamızla benzer şekilde düşük düzeyde antibakteriyel aktivite saptamışlardır.

Çalışmamızda kullanılan *Campanula betulifolia*, *Jasione supina* ssp. *pontica*, *Lamium sulfureum*, *Phlomis russeliana* ve *Sempervivum armenum*'a ait hiçbir ekstraktta antibakteriyel aktivite tespit edilemedi.

Jasione ve *Lamium* türleri ile ilgili literatür araştırmalarında antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmadı.

Vardar-Ünlü ve ark. (77) ve Sökmen ve ark. (15) yaptıkları çalışmalarda *Campanula glomerata* ekstraktlarında çalışmamızla benzer şekilde antibakteriyel ve antikandidal aktivite tespit edememişlerdir.

Phlomis türlerinin yaraların ve solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde tıbbi bitki olarak kullanıldığı bilinmektedir (78). Couladis ve ark. (79) bir başka *Phlomis* türünden (*P. lantana*) elde ettikleri esansiyel yağların, bazı gram pozitif ve negatif bakterilere karşı orta düzeyde ve bir fungal suşa karşı güçlü aktiviteye sahip olduklarını göstermişlerdir. *Phlomis* türlerinin antibakteriyel etkileri, daha çok içerdikleri flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Flavonoidler, bitkinin metanolde ekstraksiyonu ile izole edilmektedir (78). Çalışmamızda da metanol ekstraksiyonu kullanılmasına rağmen aktivite tespit edilemeyişi, *P. russeliana*'nın antibakteriyel etkili flavonoidleri içermediğini düşündürmektedir. Vardar-Ünlü ve ark. (76) *P. pungens* ve *P. sieheana* ekstraktlarında antikandidal aktivite belirleyememişlerdir.

Sökmen ve ark. (15) ise Sivas yöresinde yetişen bu iki *Phlomis* türünden *P. sieheana*'nın *Streptococcus pneumonia* suşunu zayıf olarak inhibe ettiğini, ancak *P. pungens* ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. Aynı şekilde Sökmen ve ark. (11) *Phlomis kurdica*'nın toprak üstü kısımlarına ait ekstraktlarda antibakteriyel aktivite tespit edememişlerdir. Bu veriler *Phlomis* türlerinin genel olarak güçlü antimikrobiyal bileşik içermediklerini ortaya koymaktadır.

Abram ve ark. (80) yaptıkları bir çalışmada *Sempervivum tectorum* yaprak ekstraktlarının, özellikle gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkili olduklarını belirtmelerine karşın, çalışmamızda buna paralel bulgu elde edilmemiştir.

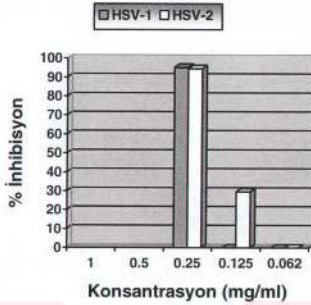
5.3. Ekstraktların Antiviral Aktiviteleri

Plak azalma deneyleri (PRA) ile 7 bitkiye ait 9 ekstraktta (% 11.8) anti-HSV etki belirlendi. Etkili ekstraktların tümü suda çözünen bileşikler içeren fazlara aitti. Cowan (1), suda çözünen bileşiklerin (polisakkaritlar, polipeptidlar ve çeşitli lektinler) daha çok virusların adsorbsiyonunu engelleyerek antiviral etki gösterdiklerini rapor etmektedir. Hiçbir ekstraktın kloroform fazında aktivite tespit edilememesinin sebebi olarak; ekstraktların antiviral etkili bileşik içermemesi veya sahip oldukları oldukça yüksek hücrel toksisite ile antiviral etkiyi maskeleydikleri düşünülmektedir. Bu ekstraktların fraksiyonlanarak mümkün ise toksik ve antiviral etkili bileşiklerin birbirinden ayrılmalari sağlanabilir.

Antiviral etkili 9 ekstraktın hem HSV-1 hem de HSV-2 suşlarına etkili olduğu saptandı. Plak oluşumunu %50 azaltan ekstrakt konsantrasyonlarına (IC₅₀) göre HSV-2'nin HSV-1'e oranla daha hassas olduğu görüldü.

Antiviral etkili ekstraktların yüksek konsantrasyonlarda hücrelere toksik olduğu görüldü. Sitotoksosite deneyleri yapılarak hücrelerin %50'sine toksik olan ekstrakt konsantrasyonları (TC₅₀) hesaplanmadığı için bu subjektif gözlem sonuçları tabloda belirtildi (Tablo 18).

Angelica sylvestris var. *stenoptera* tohumlarından elde edilen su ekstraktının (1S/s) antibakteriyel etkisinin yanında antiviral etkisinin de olduğu tespit edildi (Şekil 33).



Şekil 33. *Angelica sylvestris* var. *stenoptera* (1S/s).

IC₅₀ değerleri, HSV-1 için 190.6 µg/ml, HSV-2 için 164.4 µg/ml olarak hesaplandı.

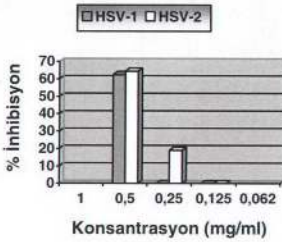
Inamori ve ark. (66) aynı genus içinde bulunan *A. keiskei*'nin halk arasında eskiden çiçek hastalığının tedavisinde kullanıldığını belirtmektedirler.

Ye ve ark. (81) *A. sinensis* ekstraktlarının geleneksel Çin tıbbında (Traditional Chinese Medicine) jinekolojik hastalıkların tedavisinde kullanıldığını ifade etmektedirler.

Her iki çalışma *Angelica* türlerinde antiviral etkili bileşikler bulunabileceğini göstermektedir. Yapılan literatür çalışmalarında *Angelica* türlerine ait ekstraktların antiviral aktiviteleri ile ilgili çalışmaya rastlanmadı.

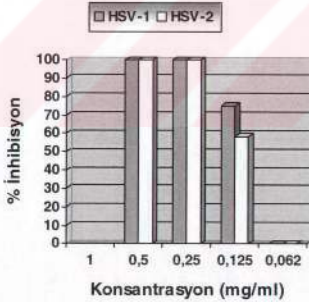
Alchemilla rizeensis'ten elde edilen 5F1+S/s numaralı ekstraktın yüksek konsantrasyonlarında, az da olsa antiviral etkili olduğu belirlendi (Şekil 34). IC₅₀ değerleri HSV-1 için 450 µg/ml, HSV-2 için 420.1 µg/ml olarak hesaplandı.

Yapılan literatür çalışmalarında *Alchemilla* türlerine ait ekstraktların antiviral aktiviteleri ile ilgili çalışmaya rastlanmadı.



Şekil 34. *Alchemilla rizeensis* (5Fl+S/s).

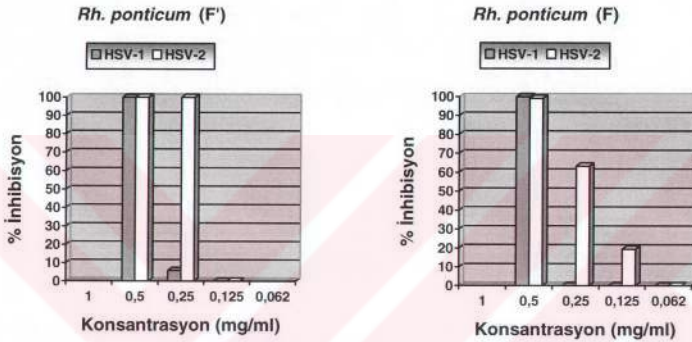
Rosa pisiformis'in yaprak ekstraktının (6F/s) güçlü antiviral aktiviteye sahip olduğu tespit edildi (Şekil 35). Ekstraktın HSV-1'e karşı daha etkili olduğu gözlemlendi. IC_{50} değerleri HSV-1 için 103.7 μ g/ml, HSV-2 için 116.4 μ g/ml olarak hesaplandı.



Şekil 35. *Rosa pisiformis* (6F/s).

McCutcheon ve ark. (8) bir başka *Rosa* türüne (*Rosa nutkana*) ait ekstraktlarda Corona virusa karşı antiviral aktivite tespit ederken HSV tip 1 üzerinde inhibitör etki belirleyememişlerdir. Minshi (82), anti-HSV-2 aktivite araştırdığı 500 bitkisel drug arasında *Rosa laevigata* ve *Rosa multiflora* ekstraktlarında orta düzeyde aktivite belirlemiştir.

Rhododendron ponticum ssp. *ponticum* var. *heterophyllum*'a ait genç yaprak (11F'/s) ve olgun yaprak (11F/s) ekstraktlarının antiviral etkili olduğu bulundu (Şekil 36). IC₅₀ değerlerine göre, genç yapraklardan elde edilen 11F'/s numaralı ekstraktın olgun yaprağa ait ekstrakta oranla daha etkili olduğu görüldü. Bu ekstraktın IC₅₀ değerleri HSV-1 için 367.3 µg/ml, HSV-2 için 187.5 µg/ml olarak hesaplandı. Olgun yapraklara ait olan ekstraktın IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 375 ve 212.1µg/ml olarak bulundu.

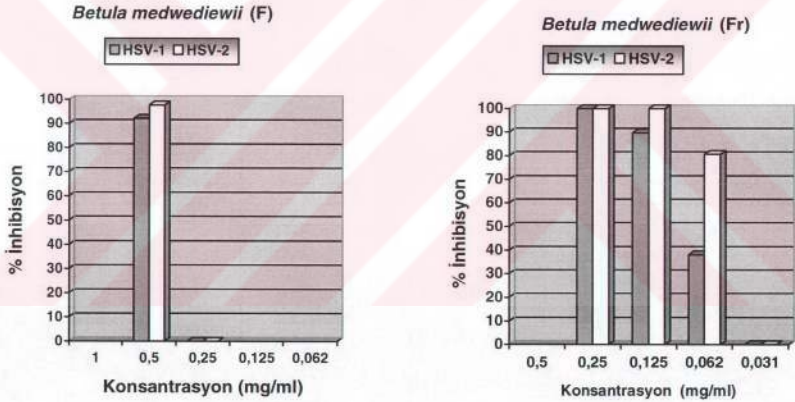


Şekil 36. *Rhododendron ponticum* ssp. *ponticum* var. *heterophyllum* (11F'/s, 11F/s)

Yeşilada ve ark. (32) tarafından yapılan bir araştırmaya göre *Rhododendron ponticum* ssp. *ponticum* yaprakları Kuzeybatı Anadolu'da soğuk algınlığı tedavisinde bir tane taze yaprak çiğnenmek suretiyle halk tarafından kullanılmaktadır. Bununla birlikte Rajbhandari ve ark. (83), *Rhododendron anthopogon* yaprak ekstraktlarında influenza A virusu üzerine herhangi bir antiviral aktivite tespit edemezken, ekstraktların HSV-1'i inhibe ettiğini belirlemişlerdir (IC₅₀, 38-70 µg/ml). Minshi (82), yaptığı bir çalışmada *Rhododendron simsii* sulu ekstraktlarının güçlü anti-HSV-2 aktiviteye sahip olduklarını tespit etti. Kashiwada ve ark. (84) da *Rhododendron dauricum* yaprak ekstraktlarının ve bunlardan elde edilen bazı bileşiklerin anti-HIV etkili olduklarını rapor etmişlerdir.

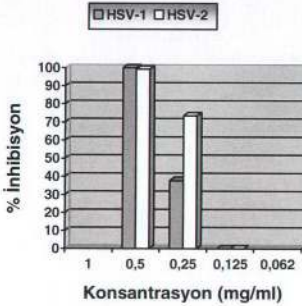
Betula medwediewii bitkisinin yaprak ve meyvelerine ait polar ekstraktlarda antiviral etki saptandı (Şekil 37). Bu bitkinin meyvelerinden elde edilen 12Fr/s, çalışmadaki en etkili antiviral ekstrakt olarak belirlendi (IC_{50} değerleri HSV-1 için 76.5 μ g/ml, HSV-2 için 50.2 μ g/ml). Yapraklarından ekstrakte edilen 12F/s'in IC_{50} değerlerinin HSV-1 ve 2 için sırasıyla 385.7 ve 378.1 μ g/ml olduğu belirlendi.

Çalışmada asiklovirin IC_{50} değeri HSV-1 için 0.84 μ g/ml olarak tespit edildi. Kaba ekstraktın içerdiği bileşiklerin sayıca fazla oluşu, muhtemelen antiviral etkisi olmayan bileşiklerin ağırlık olarak ekstrakt kompozisyonuna hakimiyetleri göz önüne alındığında, 12Fr/s kodlu ekstrakttan elde edilen IC_{50} değerler ümit verici olarak yorumlandı. McCutcheon ve ark. (8), yaptıkları bir çalışmada *Betula papyrifera* ekstraktlarında antiviral aktivite belirleyememişlerdir.



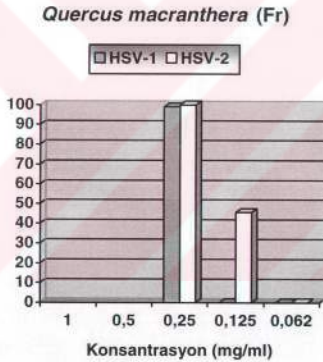
Şekil 37. *Betula medwediewii*.(12F/s, 12Fr/s)

Quercus pontica'nın yapraklarından elde edilen ekstraktın (13F/s), HSV-1 için 299 μ g/ml, HSV-2 için 210.1 μ g/ml IC_{50} değerleri ile antiviral etkili olduğu tespit edildi (Şekil 38). Cowan (1), *Quercus rubra*'dan elde edilen bazı flavonoidlerin integraz ve reverz transkriptaz enzimlerini inhibe ederek anti-HIV etki gösterdiğini rapor etmiştir.



Şekil 38. *Quercus pontica* (13F/s).

Quercus macranthera ssp. *sypirensis*'in meyvelerinden elde edilen 17Fr/s



Şekil 39. *Quercus macranthera* ssp. *sypirensis* (17Fr/s).

numaralı ekstraktın antiviral etkili olduğu belirlendi (Şekil 39). IC₅₀ değerleri HSV-1 için 188.1 µg/ml, HSV-2 için 135.1 µg/ml olarak hesaplandı. *Quercus pontica*'nın aksine yaprak ekstraktlarında aktivite bulunamadı.

Rusak ve ark. (85), *Centaurea rupestris*'ten elde edilen quercetagenin flavonoidlerinin bir bitki virusunu inhibe ettiğini göstermelerine rağmen, tarafımızdan endemik *Centaurea* türlerinde anti-HSV etki belirlenememiştir.

McCutcheon ve ark. (8), *Verbascum thapsus* yaprak ekstraktlarının HSV tarafından indüklenen sitopatik etkiyi kısmen de olsa inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada, *Delphinium nuttallianum*, *Salix bebbiana* ve *Heracleum maximum*'un çeşitli kısımlarına ait ekstraktlarda antiviral etki saptanamamıştır. Sökmen (16), *Phlomis kurdica* hücre kültür ekstraktlarında çalışmamızla benzer şekilde antiviral etki tespit edememiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde doğal olarak yetişen 22 endemik bitkiye ait 76 ekstrakt ve bunlardan ikisine ait 26 fraksiyon antimikrobiyal aktiviteleri yönünden araştırıldı. Bu amaçla yapılan deneylerin sonuçlarına göre;

1. Test edilen 76 ekstrakttan, 17 bitkiye ait 42 ekstrakt (% 55.3) en az bir bakteriye karşı etkili bulundu.
2. Su ve kloroform fazında elde edilen ekstraktların antibakteriyel aktiviteleri göz önünde bulundurulduğunda, suda çözünmeyen (kloroformda çözünen) ekstraktların sayıca daha fazla olduğu (%59.5) belirlendi.
3. Bazı bitkilerin (*Verbascum varians* var. *trapezunticum*, *Primula longipes*, *Heracleum platytaenicum*, *Delphinium formosum*, *Papaver lateritium*, *Anthemis cretica* ssp. *argaea*) sadece apolar ekstraktlarında antibakteriyel aktivite saptandı. Buna karşın, diğer bazı bitkilerin (*Salix rizeensis*, *Rhododendron ponticum* ssp. *ponticum* var. *heterophyllum* ve *Sempervivum armenum*) sadece suda çözünen ekstraktlarında antibakteriyel aktivite gözlemlendi.
4. Tanen içeriği nedeniyle antimikrobiyal etkili olduğu bildirilen bitkilerin bulunduğu genusa ait endemik bitkilerin, genel olarak polar ekstraktlarında aktivite tespit edildi.

5. Ekstraktların inhibitör etkilerine en hassas bakteri suşu *Branhamella catarrhalis* olarak belirlenirken, *Escherichia coli*'ye karşı inhibitör etki gözlenmedi.
6. *Alchemilla rizeensis*, *Angelica sylvestris* var. *stenoptera*, *Betula medwediewii*, *Quercus pontica* ve *Quercus macranthera* ssp. *syspirensis* bitkilerine ait tüm ekstraktlarda antimikrobiyal etki saptanırken; *Campanula betulifolia*, *Jasione supina* ssp. *pontica*, *Lamium sulfureum*, *Phlomis russeliana* ve *Sempervivum armenum*'a ait hiçbir ekstraktta antimikrobiyal aktivite gözlenmedi.
7. MİK değerleri dikkate alındığında, *Betula medwediewii* meyvelerinden elde edilen ve kloroformda çözünen bileşikleri içeren ekstraktın, çalışmada kullanılanlar içinde en düşük MİK değerine sahip ekstrakt olduğu belirlendi (MİK değerleri 19-312 µg/ml arası).
8. Ekstraktlardan 8'inin (% 10.5) *Candida albicans*'ı, 36'sının (% 47.4) *Trichophyton rubrum*'u inhibe ettiği tespit edildi. *Primula longipes*'in toprak üstü kısımlarına ait, apolar bileşikleri içeren ekstraktın antifungal etkisi en fazla (MİK değerleri *C. albicans* için 312, *T. rubrum* için 19 µg/ml) olan ekstrakt olduğu belirlendi.
9. *Centaurea helenioides*'ten elde edilen Fx7'nin en etkili antibakteriyel ve antifungal fraksiyon olduğu tespit edildi. Bu fraksiyonun MİK değerlerinin 4 - 312 µg/ml arasında olduğu (*T. rubrum* için 4 µg/ml, *B. subtilis* için 312 µg/ml) bulundu. Fx7'nin *C. albicans*'a karşı inhibitör etkisinin olmadığı saptandı.
10. *Anthemis cretica* L. ssp. *argaea* yaprak ekstraktlarının fraksiyonlanması ile elde edilen Fx3'ün antifungal, Fx4'ün antibakteriyel etkinin yoğunlaştığı fraksiyonlar olduğu belirlendi. En etkili fraksiyonların MİK'leri 9 ve 156 µg/ml arasında değiştiği görüldü.

11. Fraksiyonlanan *Centaurea helenioides*'ten elde edilen Fx7 ve *Anthemis cretica* L. ssp. *argaea*'dan elde edilen Fx3 ve Fx4'ün ileri çalışmalarının yapılmasının yararlı olacağı kanaatine varıldı
12. Suda çözünen 9 ekstraktın (% 11.8) antiviral etkili olduğu belirlendi. İlginç olarak antiviral etki genel olarak güçlü antibakteriyel etkili ekstraktlarda saptandı.
13. *Betula medwediewii* meyvelerinin ekstraktı, en etkili antiviral ekstrakt olarak (IC_{50} değerleri HSV-1 için 76.5 µg/ml, HSV-2 için 50.2 µg/ml) saptandı. Ayrıca *Rosa pisiformis*'in yaprak ekstraktunda belirgin antiviral aktivite gözlemlendi. *Angelica sylvestris* var. *stenoptera*, *Alchemilla rizeensis*, *Rhododendron ponticum* ssp. *ponticum* var. *heterophyllum*, *Quercus pontica* ve *Quercus macranthera* ssp. *sypirensis*'e ait bazı ekstraktlarda antiviral etki belirlendi. Bu çalışma ile *Angelica*, *Alchemilla* ve *Betula* genusuna ait bitkilerde antiviral etkili bileşikler olduğu ilk kez tespit edildi.
14. Antiviral etkileri bulunan ekstraktların etki spektrumlarının belirlenmesi için RNA viruslarının da dahil edildiği daha fazla sayıda virus suşuna karşı etki araştırılmalı ve in vivo olarak (hayvan modellerinde) ekstraktların etkinliği gösterilmelidir.
15. Agar kuyucuk yöntemi ile antimikrobiyal aktivite belirlenmesi ön bir işlem olarak uygundur. Ancak MİK değerlerinin belirlenmesi antimikrobiyal etkinin gücünün saptanmasında daha doğru bilgi vermektedir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi iş gücü azlığı, kolay uygulanabilir ve ekonomik oluşu sebebiyle MİK'lerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak bulanık ekstrakt süspansiyonlarında MİK tespiti zor olduğu için ya MBK bakılmalı ya da agar dilüsyon yöntemi kullanılmalıdır.

16. Çalışmada kullanılan 22 endemik bitkinin antimikrobiyal etkili bileşiklerinin varlığı ile ilgili bilgiler ilk defa ortaya kondu. Bazı ekstraktların güçlü antimikrobiyal etkilerinin varlığının gösterilmesi yeni antimikrobiyal ajan arayışlarında endemik bitkilere de önem verilmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, güçlü antimikrobiyal etki tespit edilen ekstraktların bu aşamadan sonraki faz çalışmaları ile antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirliklerinin araştırılmasının yararlı olacağı kanaatindeyiz.
17. Antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilen ekstraktların hücrelere toksisitesi subjektif olarak değerlendirilmiştir. Sitotoksikite deneyleri ile bu ekstraktların toksik konsantrasyonlarının belirlenmesi verilerin yorumlanmasına katkı sağlayacaktır.
18. Bitki florası açısından oldukça zengin olan Doğu Karadeniz Bölgesi yabancı bilim adamları tarafından yoğun ilgi görmekte, bölgeden toplanan örnekler araştırılmak üzere yurt dışına götürülmektedir (Dr. S. Terzioğlu, kişisel iletişim). Bu açıdan bölgede yetişen endemik ve tıbbi bitkiler üzerinde yapılacak çalışmaların Türk bilim adamları tarafından öncelikli olarak ele alınmasının ülkemize hem bilimsel hem ekonomik katkı sağlayacağı gerçeği göz önüne alınmalıdır.

7. ÖZET

Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetişen 22 endemik bitkiden elde edilen 76 kaba ekstraktın antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkileri patojen 5 bakteri, 2 mantar ve 2 virus suşu kullanılarak araştırıldı. Ayrıca güçlü antibakteriyel etkili olarak belirlenen 2 ekstraktan elde edilen fraksiyonların antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri incelendi.

Yetmişaltı ekstraktın 42'sinin (% 55.3) en az bir mikroorganizmaya karşı etkili olduğu tespit edildi.

Ekstraktların en etkili olduğu bakteri suşunun *Branhamella catarrhalis* olduğu belirlenirken, *Escherichia coli*'yi inhibe eden ekstrakta rastlanmadı. *Betula medwediewii* meyvelerinden elde edilen ve kloroformda çözünen bileşikler içeren ekstraktın 19-312 µg/ml arası değişen MİK değerleri ile en etkili antibakteriyel ekstrakt olduğu saptandı. Ayrıca *Alchemilla rizeensis*, *Rosa pisiformis*, *Primula longipes* ve *Heracleum platytaenium*'um toprak üstü kısımlarına ait bazı ekstraktların MİK değerleri itibariyle güçlü antibakteriyel aktiviteli oldukları tespit edildi.

Antifungal aktivitesi en yüksek ekstrakt *Primula longipes*'in toprak üstü kısımlarından (MİK değerleri *Candida albicans* için 312 µg/ml, *Trichophyton rubrum* için 19 µg/ml) elde edildi.

Centaurea helenioides ve *Anthemis cretica* L. ssp. *argaea*'dan elde edilen bazı fraksiyonların güçlü antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin olduğu (MİK değerleri 4-78 µg/ml) belirlendi.

Betula medwediewii meyvelerinden elde edilen bir ekstraktın sırasıyla 76.5 µg/ml ve 50.2 µg/ml IC₅₀ değerlerinde HSV-1 ve HSV-2'yi inhibe ettiği saptandı. Ayrıca *Rosa pisiformis* (yaprak), *Angelica sylvestris* var. *stenoptera* (tohum), *Alchemilla rizeensis* (toprak üstü kısımları), *Rhododendron ponticum* ssp. *ponticum* var. *heterophyllum* (genç ve olgun yaprak), *Quercus pontica* (yaprak) ve *Quercus*

macranthera ssp. *syspirensis*'e (meyve) ait bazı ekstraktlarda antiviral aktivite belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Doğu Karadeniz Bölgesi, endemik bitki, antibakteriyel aktivite, antifungal aktivite, antiviral aktivite.

8. SUMMARY

In this study, 76 extracts from 22 endemic plant species growing in Eastern Black Sea Region were investigated for their antibacterial, antifungal and antiviral activity against 5 pathogenic bacteria, 2 fungi and 2 viral strains. Also, fractions obtained from two extracts having strong antibacterial activity were studied for their antibacterial and antifungal features.

Forty two crude extracts from 17 plants were found to possess antibacterial activity against at least one (or more) test microorganisms.

While the most susceptible bacterial strain was *Branhamella catarrhalis*, none of the extracts showed inhibitory effect against *Escherichia coli*.

The chloroform soluble extract from fruits of *Betula medwediewii* was determined as the most prominent one for its antibacterial activity with MICs between 19-312 µg/ml. In addition, some extracts from aerial parts of *Alchemilla rizeensis*, *Rosa pisiformis*, *Primula longipes* and *Heracleum platytaenium* had strong antibacterial activity regarding MIC values.

The most prominent extract for its antifungal activity was obtained from aerial parts of *Primula longipes* (MIC values of 312 µg/ml for *Candida albicans*, 19 µg/ml for *Trichophyton rubrum*).

It was determined that some fractions from extracts belonging to leaves of *Centaurea helenioides* and *Anthemis cretica* L. ssp. *argaea* showed strong antibacterial and antifungal activity with MIC values between 4 and 78 µg/ml.

A water soluble extract from the fruit of *Betula medwediewii* inhibited HSV-1 and HSV-2 with IC₅₀ values 76.5 µg/ml and 50.2 µg/ml, respectively. Antiviral activity was also determined in some extracts from *Rosa pisiformis* (aerial), *Angelica sylvestris* var. *stenoptera* (seed), *Alchemilla rizeensis* (flower and seed),

Rhododendron ponticum ssp. *ponticum* var. *heterophyllum* (aerial), *Quercus pontica* (aerial) and *Quercus macranthera* ssp. *sypsiensis* (fruit).

Key words: Eastern Black Sea Region, endemic plants, antibacterial activity, antifungal activity, antiviral activity.



9. KAYNAKLAR

1. Cowan M.M.: Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:564-582, 1999.
2. Hamburger M. and Hostettmann K.: Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30:3864-3874, 1991.
3. Elvin-Lewis M.: Should we be concerned about herbal remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 75:141-164, 2001.
4. Zavala S.M.A., Perez G.S., Perez G.R.M.: Antimicrobial screening of some medicinal plants. *Phytotherapy Research*, 11:368-371, 1997.
5. Alves T.M.A., Silva A.F., Brandão M., et al.: Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 95:367-373, 2000.
6. Valsaraj R., Pushpangadan P., Smitt U.W., Adersen A., Nyman U.: Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. *Journal of Ethnopharmacology*, 58:75-83, 1997.
7. Fabry W., Okemo P., Ansorg R.: Activity of East African medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Chemotherapy*, 42:315-317, 1996.
8. McCutcheon A.R., Roberts T.E., Gibbons E., et al.: Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 49:101-110, 1995.
9. Quiroga E.N., Sampietro A.R., Vattuone M.A.: Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 74:89-96, 2001.
10. Cotton C.M.: *Ethnobotany principles and applications*. John Wiley & Sons, Chicester, England, 1999.
11. Sokmen A., Jones B.M., Erturk M.: The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 67:79-86, 1999.

12. Yeşilada E. Gurbuz İ., Shibata H.: Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 66:289-293, 1999.
13. Abbasoğlu U., Tosun F., Aydınioğlu A.: Antimicrobial activity of *Gonocytisus angulatus* (L.) Spach. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20:125-127, 1995.
14. Demirbağ Z., Beldüz A.O., Sezen K., Nalçacıoğlu R.: Bazı bitki özütlerinin antibakteriyel etkilerinin araştırılması. *Kükem Dergisi*, 20:47-53, 1997.
15. Sökmen A., Vardar-Ünlü G., Dancı N., Şahin S.: Antimicrobial activities of methanolic extracts of various plants growing in the Sivas district. *İnfeksiyon Dergisi*, 14:253-256, 2000.
16. Sökmen A.: Antiviral and cytotoxic activities of extracts from the cell cultures and respective parts of some Turkish medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 25:343-350, 2001.
17. Efe A.: Doğu Karadeniz Bölgesinde yetişen odunsu bitki taksonları (woody plants taxa in Black Sea region). *Herba Medica*, 5:12-15, 1999.
18. Principe P.P.:Valuing the biodiversity of medicinal plants. In: Akerele O., Heywood V., Synge H.:*The conservation of medicinal plants*. Cambridge University Press, England, pp.79-124, 1992.
19. Baytop T.:Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İkinci Baskı. İstanbul Üniversitesi Yayını, No.3255, İstanbul, 1999.
20. Blackwell W.H.: *Poisonous and medicinal plants*. Prentice Hall, New Jersey, USA, 1990.
21. Plotkin M.J.: Traditional knowledge of medicinal plants-the search for new jungle medicines. In: Akerele O., Heywood V., Synge H.: *The conservation of medicinal plants*. Cambridge University Press, England, pp53-63, 1992.
22. Baytop T.: Doğu Karadeniz Bölgesi’nin tıbbi ve zehirli bitkileri (medicinal and poisonous plants in East Black Sea Region). *Herba Medica*, 5:3-8, 1999.
23. Şanlı, Y.:*Veteriner Farmakoloji Kemoterapotik ilaçlar*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, No.412, Ankara, 1988.
24. Farnsworth N.R., and Soejarto D.D.: Global importance of medicinal plants. In: Akerele O., Heywood V., Synge H.:*The conservation of medicinal plants*. Cambridge University Press, England, pp. 25-51, 1992.

25. Baytop A.: *Farmasötik botanik ders kitabı*. İstanbul Üniversitesi Basımevi, No.3637, İstanbul, 1991.
26. Walsh G.: *Biopharmaceuticals: Biochemistry and biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd., England, 1999.
27. Srinivasan D., Nathan S., Suresh T., Perumalsamy P.L.: Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 74:217-220, 2001.
28. Miraldi E., Ferri S., Mostaghimi V.: Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *Journal of Ethnopharmacology*, 75:77-87, 2001.
29. Sezik E., Tabata M., Yeşilada E., Honda G., Goto K. And Ikeshiro Y.: Traditional medicine in Turkey I. Folk medicine in Northeast Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 35:191-196, 1991.
30. Tuzlacı E., Tolon E.: Turkish folk medicinal plants, part III: Şile (İstanbul). *Fitoterapia*, 71:673-685, 2000.
31. Sezik E., Yeşilada E., Honda G., Takaishi Y., Takeda Y., Tanaka T.: Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75:95-115, 2001.
32. Yeşilada E., Sezik E., Honda G., Takaishi Y., Takeda Y., Tanaka T.: Traditional medicine in Turkey IX: Folk medicine in north-west Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 64:195-210, 1999.
33. Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R., Krishna D.R.: Bioflavonoids classification, Biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33:2-16, 2001.
34. Hamilton-Miller J.M.T.: Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.) Minireview. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 39:2375-2377, 1995.
35. Davis P.H.: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol.4, University Press, Edinburgh, 1972.
36. Davis P.H.: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol.6, University Press, Edinburgh, 1978.
37. Güner A., Zielinski J.: *Salix rizeensis* (Salicaceae)- A New Willow from NE Turkey. *The Karaca Arboretum Magazine*, 2:1-5, 1993.

38. Davis P.H.: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. vol.7, University Press, Edinburgh, 1982.
39. Davis P.H.: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol.5, University Press, Edinburgh, 1975.
40. Anşın R., Terzioğlu S.: Mor Çiçekli Orman Güllü'nün Yeni Bir Varyetesi (*Rhododendron ponticum* L. subsp. *ponticum* var. *heterophyllum* Anşın, var. nova), Turkish Journal of Agricultural and Forestry, 18:137-140, 1994.
41. Anşın R., Özkan Z.C.: *Tohumlu Bitkiler*. KTÜ Basımevi, Trabzon, 1994.
42. Yaltırık F.: *Türkiye Meşeleri Teşhis Kitabı*. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Yayını, Yenilik Basımevi, İstanbul, 1984.
43. Davis P.H.: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol.1, University Press, Edinburgh, 1965.
44. Davis P.H.: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol.3, University Press, Edinburgh, 1970.
45. Kılıçturgay K.: *Klinik Mikrobiyoloji*. İkinci baskı. Güneş & Nobel Tıp Kitabevi, Bursa, 1994.
46. Brooks G.F., Butel J.S., Ornston L.N.: *Jevetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. 20th Ed., Appleton&Lange, Norwalk, Connecticut, USA, 1995.
47. Gerçeker D.: *Bacillus*. Konu 7. In: Ustaçelebi Ş.: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, Ankara, s.411-418, 1999.
48. Fazlı Ş.A.: *Neisseria ve Branhamella*, Konu 11. In: Ustaçelebi Ş.: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, Ankara, s.383-385, 1999.
49. Dunn B.E., Cohen H., Blaser M.J.: *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Reviews, 10:720-741, 1997.
50. Alarcon T., Domingo D., Lopez-Brea M.: Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. Internal Journal of Antimicrobial Agents, 12:19-26, 1999.
51. Ustaçelebi Ş.: *Genel Viroloji*. 1. Baskı. Hacettepe-Taş kitapçılık Ltd.Şti, Ankara, 1992.
52. Ertürk M.: Herpes Simplex Virusları. Konu 11. In: Ustaçelebi Ş.: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, Ankara, s.815-826, 1999.

53. Sheets R.: History and characterization of the Vero Cell Line. Accessed March 2002. Available at <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/backgrd/3616b1a/pdf>.
54. Monma Y., Kawana T., Shimizu F.: In vitro inactivation of herpes simplex virus by a biological response modifier, PSK. *Antiviral Research*, 35:131-138, 1997.
55. Yamada H, Kohno S, Maesaki S., et al.: Rapid and highly reproducible method for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:1009-1012, 1993.
56. Cellini L., Di Campli E., Masulli M., Di Bartolomeo S., Allocati N.: Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 13:273-277, 1996.
57. Skaltsa H., Lazari D., Panagouleas C., Georgiadou E., Garcia B., Sokovic M.: Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 55:903-908, 2000.
58. Cotarelo M., Catalán P., Sánchez-Carrillo C., et al.: Cytopatic effect inhibition assay for determining the in-vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44:705-708, 1999.
59. Safrin S., Palacios E., Leahy .: Comparative evaluation of microplate enzyme-linked immunosorbent assay versus plaque reduction assay for antiviral susceptibility testing of Herpes Simplex Virus isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40:1017-1019, 1996.
60. Pacheco P., Sierra J., Schmeda-Hirschmann G., Potter C.W., Jones B.M., Moshref M.: Antiviral activity of Chilean medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research*, 7:415-418, 1993.
61. De Logu A., Loy G., Pellerano M.L., et al.: Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Research*, 48:177-185, 2000.
62. Roming T.L., Weber N.D., Murray B.K., North J.A., Wood S.G., Hughes B.G., Cates R.G.: Antiviral activity of Panamanian plant extracts. *Phytotherapy Research*, 6:38-43, 1992.
63. Rauha J., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P.: Antimicrobial effects of Finnish plant extract containing flavonoids and phenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 56:3-12, 2000.

64. Ristić M.D., Duletić-Laušević S., Knežević-Vukčević J., et al.: Antimicrobial activity of essential oils and ethanol extract of *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*, 14:267-271, 2000.
65. Bae E., Han M.J., Kim N. And Kim D.: Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21:990-992, 1998.
66. Inamori Y., Baba K., Tsujibo H., Taniguchi M., Nakata K., Kozawa M.: Antibacterial activity of two chalcones, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, isolated from the root of *Angelica keiskei* KOIDZUMI. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39:1604-1605, 1991.
67. Djipa C.D., Delmée M., Quetin-Leclercq J.: Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 71:307-313, 2000.
68. Shiota S., Shimizu M., Mizusima T., et al.: Restoration of effectiveness of L-lactams on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by tellimagrandin I from rose red. *FEMS Microbiology Letters*, 185:135-138, 2000.
69. Newton S.M., Lau C., Gurucha S.S., Besra G.S., Wright C.W.: The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79:57-67, 2002.
70. Jones N.P., Arnason J.T., Abou-Zaid M., Akpagana K., Sanchez-Vindas P., Smith M.L.: Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by First Nations Peoples of eastern Canada. *Journal of Ethnopharmacology*, 73:191-198, 2000.
71. Matsuda K., Ishikado A., Nishida N., et al.: Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 8:2939-2944, 1998.
72. Chacko S., Sethuraman M.G., George V.: Monoterpenoids from the seeds of *Heracleum candolleianum*. *Fitoterapia*, 71:616-617, 2000.
73. Vázquez F.M. Suarez M.A., Pérez A.: Medicinal plants used in the Barros Area, Badajoz Province (Spain). *Journal of Ethnopharmacology*, 55:81-85, 1997.
74. Alkofahi A.S., Abdelaziz A., Mahmoud I., Abuirjie M., Hunaiti A., El-Oqla A.: Cytotoxicity, mutagenicity and antimicrobial activity of forty Jordanian medicinal plants. *Int.J. Crude Drug Res.*, 2:139-144, 1990.

75. Vajs V., Todorović., Ristić M., et al.: Guaianoloids from *Centaurea nicolai*: antifungal activity. *Phytochemistry*, 52:383-386, 1999.
76. Vardar-Ünlü G., Sökmen A., Darıcı N., Şahin S.: Sivas yöresinde yetişen çeşitli bitkilerin metanol özütlerinin antikandidal aktiviteleri. *İnfeksiyon Dergisi*, 14:257-259, 2000.
77. Quarenghi, M.V., Tereschuk M.L., Baigori M.D., Abdala L.R.: Antimicrobial activity of flowers from *Anthemis cotula*. *Fitoterapia*, 71:710-712, 2000.
78. Bucar F., Ninov S., Ionkova I., et al.: Flavonoids from *Phlomis nissolii*. *Phytochemistry*, 48:573-575, 1998.
79. Couladis M., Tanimanidis A., Tzakou O., et al.: Essential oil of *Phlomis lanata* growing in Greece: Chemical composition and antimicrobial activity. *Planta Medica*, 66:670-672, 2000.
80. Abram V., Donko M.: Tentative identification of polyphenols in *Sempervivum tectorum* and assesment of the antimicrobial activity of *Sempervivum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:485-489, 1999.
81. Ye Y.N., Lui E.S.L., Shin V.Y., et al.: A mechanistic study of proliferation induced by *Angelica sinensis* in a normal gastric epithelial cell line. *Biochemical Pharmacology*, 61:1439-1448, 2001.
82. Minshi Z.: An experimental study of the anti-HSV-II action of 500 herbal drugs. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 9:113-116, 1989.
83. Rajbhandari M., Wegner U., Jülich M., Schöpke T., Mentel R.: Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 74:251-255, 2001.
84. Kashiwada Y., Yamazaki K., IkeshiroY., et al.: Isolation of rhododaurichroman acid B and the anti-HIV principles rhododaurichroman acid A and rhododaurichromenic acid from *Rhododendron dauricum*. *Tetrahedron*, 57:1559-1563, 2001.
85. Rusak G., Krajačić M., Pleše N.: Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. *Antiviral Research*, 36:125-129, 1997.

ÖZGEÇMİŞ

Celal Kurtuluş BURUK 1969 yılında Trabzon’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Akçaabat’da tamamladıktan sonra, 1986-1987 öğretim yılında Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi’nde yüksek öğrenimine başladı. 1991 yılında aynı fakülteden “Veteriner Hekim” ünvanı ile mezun oldu. Askerlik hizmetini 1991-1992 yıllarında Erzincan’da yedek subay olarak tamamladı. 1993 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Ordu Ziraat Fakültesi’nde görev aldı.

1995-1996 öğretim yılında KTÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora Programı’na başladı. Doktora programından 21 Haziran 2002 tarihinde mezun oldu.

Evli ve 2 çocuk babasıdır.