

HYPERICUM HETEROPHYLLUM'A AİT SULU EKSTRAKTLARIN *IN-VITRO*
YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE FİTOKİMYASAL
BİLEŞENLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Mehmet SAVRIK

Danışman

Prof. Dr. Ömer HAZMAN

KİMYA ANABİLİM DALI

Temmuz 2025

Bu tez çalışması 22.FEN. BİL. 05 numaralı proje ile BAPK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

HYPERICUM HETEROPHYLLUM'A AİT SULU EKSTRAKTLARIN *IN-VITRO* YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE FİTOKİMYASAL BİLEŞENLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet SAVRIK

Danışman

Prof. Dr. Ömer HAZMAN

KİMYA ANABİLİM DALI

Temmuz 2025

TEZ ONAY SAYFASI

Mehmet SAVRIK tarafından hazırlanan “*Hypericum heterophyllum*’a ait sulu ekstraktların *in-vitro* yara iyileştirici etkisi, biyolojik aktiviteleri ile fitokimyasal bileşenlerinin değerlendirilmesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 28 / 07 / 2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ömer HAZMAN

Başkan : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Ömer HAZMAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Laçine AKSOY
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Halit Buğra KOCA
Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi,
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nilay İŞİTEZ
Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Bekir YALÇIN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

28 / 07 / 2025

Mehmet SAVRIK

ÖZET

Doktora Tezi

HYPERICUM HETEROPHYLLUM'A AİT SULU EKSTRAKTLARIN *IN-VITRO* YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE FİTOKİMYASAL BİLEŞENLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet SAVRIK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer HAZMAN

Hypericum L. cinsine ait taksonlar dünyada geleneksel tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu cinse ait türlerden birisi olan *Hypericum heterophyllum* ise ülkemize ait endemik türlerden birisi olup, halk arasında yara çiçeği olarak bilinmektedir. Gerek *Hypericum heterophyllum*, gerek ülkemizde bulunan diğer endemik türler hakkında yeterince araştırılma yapılmadığı için, toplum sağlığına katkıları ve olası ekonomik potansiyelleri anlaşılamamaktadır. Bu türlerin içeriklerinin, biyolojik/farmakolojik etkinliklerinin araştırılarak aydınlatılması, hastalıkları iyileştirmede olası mekanizmaların açıklanması, endüstride olası kullanım alanlarının saptanması ülkemiz değerlerini kıymetlendirmek adına önemlidir. Bu sebeple sunulan tez çalışmasında Türkiye için endemik *Hypericum heterophyllum* türüne ait sulu ekstraktların yara iyileştirici, antikanserojen, antimikrobiyal, antioksidan potansiyellerinin araştırılması ve fitokimyasal bileşenlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla ilk olarak *Hypericum heterophyllum* türünün çiçek, dal-yaprak ve toprak üstü kısımlarının birlikte kullanılması (mix) ile üç farklı (HH_{mix}, HH_{çiçek} ve HH_{dal-yaprak}) sulu ekstraktı hazırlanmıştır. Ekstraktların içeriğinde olması muhtemel 53 farklı fitokimyasal standart maddenin varlığı kalitatif ve kantitatif olarak LC-MS/MS sistemi ile belirlenmiştir. Ekstraktların total fenolik madde miktarı, total antioksidan statüsü (TAS), total oksidan statüsü (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* referans suşları kullanılarak disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyon (MİC) belirleme yöntemleri ile analiz edildi. Sitotoksik ve antikanserojenik aktivitenin tespiti için sağlıklı hücre hattı olarak insan gingival fibroblast (HGF) hücreleri, kanser hücreleri olarak ise küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) hücreleri ile cilt kanseri (G-361) hücreleri kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda ekstraktlar hücrelere uygulanarak MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2-i)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) yöntemi ile sitotoksik düzeyleri tespit edildi. Sitotoksik olmadığı belirlenen en düşük (100 µg/mL) konsantrasyonlardaki ekstrakt içeren besiyerleri, hücre çizdiği yara modeli oluşturulan HGF ve G-361 hücrelerine uygulandı. Böylelikle ekstraktların yara iyileşmesi, hücre yenilenmesi (proliferasyon) ve hücre göçüne (migrasyon) etkileri tespit edilmeye çalışıldı.

Elde edilen sonuçlar ekstraktların içeriğinde çoğu fenolik yapıda olan; 5-dikafeoilquinik asit, vanilin, kafeik asit, 4-OH benzoik asit, siringik asit, siringik aldehit, vanilik asit isimli bioaktif maddelerin farklı miktarlarda bulunduğu belirlendi. 4-OH benzoik asit oranlarının HH_{Dal-Yaprak} (%9,56), HH_{Mix} ekstraktında ise %7 oranında bulunduğu, bu sebeple *Hypericum heterophyllum*'un 4-OH benzoik asit (*p*-hidroksibenzoik asit) için doğal kaynak olarak kullanılabilceğini akla getirmektedir. Ekstraktlardan özellikle HH_{Mix} ve HH_{çiçek} ekstraktların antioksidan aktivitesi yüksek iken, HH_{dal-yaprak} ekstraktının TOS düzeyleri yüksek bulundu. Verilere bağlı olarak HH_{dal-yaprak} ekstraktının *E. coli* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi en yüksek olan ekstrakt olduğu tespit edildi. TAS düzeyleri daha yüksek olduğu belirlenen HH_{Mix}'in yara iyileştirici etkinliğinin HGF hücrelerinde diğer ekstraktlardan daha iyi olduğu bulundu. G-361 hücrelerinde HH_{çiçek} ekstraktının hücre proliferasyonu ve migrasyonunu artırdığı bu sebeple, cilt kanseri olan bireylerde HH_{çiçek} ekstraktının kullanılmasının uygun olmadığı belirlendi. Bununla beraber HH_{dal-yaprak} ekstraktının G361 hücrelerinde; hücre proliferasyonu ve migrasyonunu azalttığı, hücre ölümünü uyardığı bulundu. Bu veriler sağlıklı HGF hücrelerinde herhangi bir toksikasyona sebep olmayan ama melonama (G361) hücrelerine karşı sitotoksik etkiler gösteren HH_{dal-yaprak} ekstraktının, cilt kanserinin tedavisinde yeni alternatifler sunabileceğini göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasından elde edilen veriler, ülkemizde endemik bir tür olan *Hypericum heterophyllum*'un içerdiği bileşenler ve biyolojik/farmakolojik etkileri nedeni ile ekonomik bir değere dönüşerek, hem toplum sağlığına hem de refahına katkı sunabilecek potansiyele sahip olabileceğine işaret etmektedir. Bu kapsamda ülkemizin zenginliği olan *Hypericum heterophyllum* gibi endemik türler üzerine temel çalışmaların yapılarak, elde edilen veriler ışığında gerekli görülen türler veya elde edilebilecek inovatif ürünlerle ilişkili olarak deney hayvanı modelleri veya gönüllülerle ileri çalışmalara geçilerek, ülke ekonomisine ve toplum sağlığına katkıda bulunulabileceği önerilmektedir.

2025, xiii + 66 sayfa

Anahtar kelimeler: *Hypericum heterophyllum*, Antioksidan, Antikanserojen, Antimikrobiyal, Yara İyileştirme .

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

EVALUATION OF IN-VITRO WOUND HEALING EFFECTS, BIOLOGICAL ACTIVITIES AND PHYTOCHEMICAL COMPONENTS OF AQUEOUS EXTRACTS OF *HYPERICUM HETEROPHYLLUM*

Mehmet SAVRIK

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Ömer HAZMAN

Taxa belonging to the genus *Hypericum* L. are widely used in traditional medicine worldwide. *Hypericum heterophyllum*, one of the species of this genus, is endemic to our country and is commonly known as "wound flower." Due to insufficient research on both *Hypericum heterophyllum* and other endemic species found in our country, their contributions to public health and potential economic potential remain elusive. Investigating and elucidating the composition and biological/pharmacological activities of these species, elucidating their potential mechanisms for disease healing, and identifying potential industrial applications are crucial for assessing our country's assets. Therefore, the presented thesis aims to investigate the wound-healing, anticarcinogenic, antimicrobial, and antioxidant potential of aqueous extracts of the endemic species *Hypericum heterophyllum* in Türkiye, and to determine their phytochemical components.

For this purpose, three different aqueous extracts (HH_{Mix} and HH_{Flower}, and HH_{Branch-leaf}) were prepared by using the flower, branch-leaf, and aerial parts (mix) of *Hypericum heterophyllum*. The presence of 53 different phytochemical standard substances likely to be present in the extracts was determined qualitatively and quantitatively by LC-MS/MS system. Total phenolic content, total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), and oxidative stress index (OSI) levels of the extracts were determined by spectrophotometric method. The antimicrobial activities of the extracts were determined

by disk diffusion and minimal inhibitory concentration (MIC) determination methods using *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* reference strains. For the determination of cytotoxic and anticarcinogenic activities, human gingival fibroblast (HGF) cells were used as a healthy cell line, and non-small cell lung cancer (A549) cells and skin cancer (G-361) cells were used as cancer cells. Different concentrations of extracts were applied to the cells and cytotoxicity levels were determined by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method. Media containing the lowest concentrations of extracts (100 µg/mL), which were determined to be non-cytotoxic, were applied to HGF and G-361 cells created in a cell scratch wound model. Thus, the effects of the extracts on wound healing, cell renewal (proliferation), and cell migration were determined.

The results obtained indicated that the extracts contained varying amounts of bioactive substances, mostly phenolic in structure, including 5-dicaffeoylquinic acid, vanillin, caffeic acid, 4-OH benzoic acid, syringic acid, syringic aldehyde, and vanillic acid. The 4-OH benzoic acid levels were found to be 9.56% in HH_{Branch-leaf} extract and 7% in HH_{Mix} extract, suggesting that *Hypericum heterophyllum* can be used as a natural source of 4-OH benzoic acid (*p*-hydroxybenzoic acid). Among the extracts, antioxidant activities were particularly high in HH_{Mix} and HH_{Flower} extracts, while TOS levels were high in HH_{Branch-leaf} extract. Based on these data, HH_{Branch-leaf} extract was determined to have the highest antimicrobial activity against *E. coli*. HH_{Mix}, which was found to have higher TAS levels, was found to have better wound healing activity than other extracts in HGF cells. In G-361 cells, HH_{flower} extract increased cell proliferation and migration, making it unsuitable for use in individuals with skin cancer. However, in G361 cells, HH_{Branch-leaf} extract was found to reduce cell proliferation and migration and induce cell death. These data indicate that HH_{Branch-leaf} extract, which did not cause any toxicity in healthy HGF cells but exhibited cytotoxic effects against melanoma (G361) cells, may offer new alternatives in the treatment of skin cancer.

The data obtained from the presented thesis indicate that *Hypericum heterophyllum*, an endemic species in our country, may have economic value due to its components and biological/pharmacological effects, potentially contributing to both public health and welfare. In this context, it is recommended that fundamental studies on endemic species

such as *Hypericum heterophyllum*, a rich resource for our country, be conducted, and that further studies with experimental animal models or volunteers, based on the data obtained, can contribute to the national economy and public health by developing species deemed necessary or innovative products.

2025, xiii + 66 pages

Keywords: *Hypericum heterophyllum*, Antioxidant, Anticarcinogenic, Antimicrobial, Wound Healing.



TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yardımlarını esirgemeyen yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı ve bu tezin ortaya çıkmasından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ömer HAZMAN' a, ders döneminden son aşamaya kadar bana destek veren Sayın Prof. Dr. İbrahim EROL, Sayın Prof. Dr. Laçine AKSOY' a tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi Ahmet BÜYÜKBEN' e ve yeterlilik döneminden son ana kadar yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Zehra Betül KUMRAL, Gofur KHAMİDOV, Özlem KAYAOĞLU ve Feyza EFİLOĞLU' na teşekkür ederim. Ayrıca

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi her türlü destek ve fedakârlıklarından dolayı aileme teşekkür ederim.

Mehmet SAVRIK
Afyonkarahisar 2025

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 <i>Hypericum heterophyllum</i>	3
2.1.1 Türkiye’deki <i>Hypericum</i> Türleri ve Endemizm.....	4
2.2 Türkiye’de Endemik bir tür <i>Hypericum heterophyllum</i>	6
2.2.1 <i>Hypericum heterophyllum</i> ile Yapılan Bilimsel Çalışmalar.....	7
3. MATERYAL ve METOT.....	15
3.1 Bitki Materyali.....	15
3.2 Bitki Materyalinin Ekstraksiyonu	15
3.3 Ekstraktlarda Total Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	16
3.4 Ekstrakt Fitokimyasal Profillerinin LC-MS/MS Analizleri ile Belirlenmesi...17	
3.5 Oksidan/Antioksidan Düzeylerinin Belirlenmesi	20
3.6 Bitki Ekstraktlarında Antimikrobiyal Aktiviteyi Belirlemeye Yönelik Çalışmalar	20
3.6.1 Disk Diffüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Etkinliğin Belirlenmesi	21
3.6.2 Mikrodilüsyon (Minimum inhibitory concentration- MIC) ile Antibakteriyel Etkinliğin Belirlenmesi	21
3.7 Hücre Kültürü Çalışmaları	21
3.7.1 Hücrelerin Çoğaltılması için Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	22
3.7.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi.....	23
3.7.3.1 MTT Analizi.....	25
3.8 Bitki Ekstraktlarının Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	26
3.9 İstatistiksel Yöntem.....	27

4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	28
4.1 Ekstrakt Fitokimyasal Profilinin Değerlendirilmesi.....	28
4.2 Çalışmada Kullanılan Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi	33
4.3 Oksidan/Antioksidan Özelliklerin Değerlendirilmesi	34
4.4 Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	36
4.5 <i>Hypericum heterophyllum</i> 'a ait Ekstraktların Sitotoksik ve Antikanserojenik Etkinliğinin Değerlendirilmesi	40
4.6 <i>Hypericum Heterophyllum</i> Ekstraktlarının HGF Hücrelerinde Yara İyileştirici Etkinliğinin Araştırılması	45
4.7 <i>Hypericum Heterophyllum</i> Ekstraktlarının Kanseri (G361) Hücrelerinde Hücre Yenilenmesi ve Göçüne Etkisi.....	47
5. SONUÇLAR.....	51
6. KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
cm	Santimetre
gr	Gram
m	Metre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre

Kısaltmalar

A549	İnsan Küçük Olmayan Akciğer Kanseri Hücresi
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle Medium
DMSO	Di Metil Sülfoksit
DPPH	2,2-di fenil-1-pikril Hidrazil
FBS	Fetal Bovine Serum
G361	İnsan Cilt Kanseri Hücresi
HGF	İnsan Gingival Fibroblast Hücreleri
L929	Fare Fibroblast Hücreleri
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazolil-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
RPMI	RPMI 1640
TAS	Total AntiOksidan Statü
TOS	Total Oksidan Statü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1 Total fenolik madde miktarlarının hesaplanmasında kullanılan gallik asite ait kalibrasyon eğrisi	16
Şekil 3.2 Numunelerde miktarsal tayini yapılan 53 fitokimyasal standarda ait kromotogram	19
Şekil 3.3 Hücre çizici yara modeli mikroskop görüntüleri	26
Şekil 4.1 <i>Hypericum heterophyllum</i> 'a ait ekstraktlara ait LC-MS/MS kromotogramları,	29
Şekil 4.2 <i>Hypericum heterophyllum</i> 'a ait ekstraktlara ait LC-MS/MS kromotogramları.....	30
Şekil 4.3 <i>Hypericum heterophyllum</i> ekstraktlarının (HH _{mix} , HH _{çiçek} ve HH _{dal-yaprak}) HGF hücrelerinde sitotoksite düzeyleri	41
Şekil 4.4 G361 hücrelerinde HH ekstraktının sitotoksite düzeyleri	42
Şekil 4.5 A549 hücrelerinde <i>Hypericum heterophyllum</i> ekstraktları sitotoksite düzeyleri	43
Şekil 4.6 <i>Hypericum heterophyllum</i> 'a ait ekstraktların yara iyileştirici etkisi	47
Şekil 4.7 <i>Hypericum heterophyllum</i> 'a ait toprak üstü kısımları (mix), çiçek ve yaprak sulu ekstraktlarının yara iyileştirici etkisi.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Türkiye’de bulunan endmik <i>Hypericum L.</i> türleri	5
Çizelge 3.1. Ekstraktların Fitokimyasal bileşimini belirlemek amacıyla kullanılan standart maddeler.....	17
Çizelge 4.1 Ekstraktların içerisinde varlığı belirlenen bileşen maddeler ve konsantrasyonları.....	28
Çizelge 4.2 Çalışmada kullanılan ekstraktların total fenolik madde düzeyleri	33
Çizelge 4.3 Çalışmada kullanılan ekstraktların TAS, TOS ve OSI düzeyleri	35
Çizelge 4.4 Çalışmada kullanılan ekstraktların disk diffüzyon yöntemine göre antimikrobiyal etkinliği.....	37
Çizelge 4.5 Çalışmada Kullanılan ekstraktların MIC sonuçları	38
Çizelge 4.6 Ekstraktlara ait MİC düzeyleri	39
Çizelge 4.7 Çalışmada kullanılan ekstraktların yara iyileştirici etkinliği.....	45
Çizelge 4.8 Çalışmada kullanılan ekstraktların G361 hücrelerinde yara kapanma oranlarına etkisi.....	48

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 Çalışmada kullanılan <i>Hypericum heterophyllum</i> Vent. türünün doğal ortamından görüntüler	6
Resim 2.2 <i>Hypericum perforatum</i> ve <i>Hypericum heterophyllum</i> Vent. türleri arasındaki bazı farklılıklar	7
Resim 3.2 Hücre kültürü analizlerinde kullanılan besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan pes membran filtre düzeneği.....	23
Resim 3.3 A549 hücrelerinde MTT analizine ait görseller	26



1. GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler birçok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, doğal kaynaklardan elde edilen biyolojik olarak aktif özütler ve bileşikler üzerine yapılan araştırmalar, hastalıklarla mücadelede faydalı olabilecek ilaçlar için yeni kaynaklar keşfetme adına en büyük ilgi noktası olarak görülmektedir. Tıbbi ve aromatik kullanımları ile öne çıkan bitkiler arasında *Hypericum* L. cinsine ait taksonlar dünyada geleneksel halk tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu türler dünyada çok geniş bir yayılım göstermekte olup, genel olarak sarı kantaron olarak bilinmekte ve antik dönemlerden beri hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ülkemizde ise sarı kantaron, binbirdelik otu, mayasıl otu gibi isimlerle farklı bölgelerde kullanıldığı bilinmektedir. Farmakolojik çalışmalar bu türün anti-depresan, anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal, antiviral, anti-nosiseptif ve yara iyileştirici gibi çeşitli aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. *Hypericum* türünün kimyasal bileşimi naftodianthronlar (özellikle hiperisin ve psödohiperisin), asilfloroglusinol türevleri (özellikle hiperforin ve adiperforin), flavonoidler (özellikle kuersetin, kuersitrin, hiperosid ve biapigenin), tanenler ve uçucu yağlardan oluşur (Özkan ve Mat 2013).

Sarı kantarona ait türlerden birisi olan *Hypericum heterophyllum* ise ülkemize ait endemik türlerden birisi olup, halk arasında yara çiçeği olarak bilinmektedir. *Hypericum heterophyllum* türünü diğer *Hypericum* türlerinden ayıran en önemli özellik, çoğu *Hypericum* türünün aksine hiperisin ve psödohiperisin içermemesidir (Ayan ve Çırak, 2008). Çoğu *Hypericum* türünün yara iyileştirici etkinliği incelenmiş olmasına rağmen *Hypericum heterophyllum* türünün böyle bir etkinliği var mı, varsa bu etkilerini hangi bileşenleri aracılığı ile oluşturuyor olabilir, henüz bu konularda bir araştırma yapılmadığı yapılan literatür taramaları sonucu anlaşılmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalar genel olarak ele alındığında *Hypericum heterophyllum* türünün yaprak, çiçek ve dal kısımlarına ait sulu ekstraktlarının ayrı ayrı hazırlanarak yapılan ve sonuçları kıyaslanan çalışma literatürde bulunamamıştır. Bu kapsamda sunulan çalışma ile *Hypericum heterophyllum* türünün çiçek, yaprak ve toprak üstü kısımlarının birlikte kullanılması ile hazırlanan sulu ekstraktlarının yara iyileştirici, antikanserojen, antimikrobiyal, antioksidan potansiyellerinin araştırılması ve fitokimyasal bileşenlerinin belirlenmesi

amaçlanmıştır. Elde edilen bulguların *Hypericum heterophyllum*' un olası faydalarını ve ekonomik değerini açıklayabilmek adına literatüre katkı yapacağı düşünülmektedir.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 *Hypericum heterophyllum*

Hypericum L. Clusiaceae (Guttiferae) ailesine üye bir bitki cinsidir. Dünya florasında 500'den fazla türü olduğu belirtilmektedir. *Hypericum* türleri Antarktika, geniş çöller ve alçak tropik bölgeler hariç, ılıman alanlardan tropiklerdeki yüksek dağlık bölgelere kadar çeşitli habitatlar dahil olmak üzere dünyanın her yerinde bulunur (Zhang vd. 2020, Şenkal ve Uskutoğlu 2021). *Hypericum* türleri arasında en çok bilinen ve kullanılan türü *Hypericum perforatum* türüdür. Bu tür, aktif farmasötik bileşenlerin doğal bir kaynağı olarak kullanılması nedeniyle büyük ekonomik öneme sahiptir. *Hypericum* L. cinsine bu ismin verilmesinde *Hypericum perforatum* türünün antik çağlardan beri kullanılma şekliyle ilişkili olabileceği ifade edilmektedir. Eski Yunanlılar ve Romalılar bitkinin (*Hypericum perforatum*) onları kötü ruhlardan korumak için mistik güçleri olduğuna inanırlardı. Bu sebeple *Hypericum* dallarını evlerindeki resimlerin veya heykellerin üzerine yerleştirirlerdi. Bu sebeple cins isminin bu inanişaya bağlı bir şekilde türemiş olabileceği belirtilmektedir. *Hypericum* kelimesi Yunanca hyper (yukarıda) ve eikon (ikon veya resim) kelimelerinden türetilmiştir. Tür ismini ifade eden Pefaratum terimi ise bilimsel olarak türün özellikleri belirlendikten sonra verilmiştir. Perforatum terimi türün yaprakların deliklere benzeyen minik yarı saydam boşaltım bezleri içerdiği gerçeğini tasvir eder (Di Carlo vd. 2001). Hristiyan inancında kutsal bir yeri olan bu bitkinin çiçeklerinin açması, bir aziz olarak kabul edilen St. John'un doğduğu zamana (24 Haziran) denk geldiği için bitkiye "Saint John'un otu" (St John's wort - SJW) adının verildiği tahmin edilmektedir (Can vd. 2009).

Ülkemizde yara çiçeği, sarı kantaron, binbirdelik otu veya mayasıl otu olarak da bilinen *Hypericum* L. cinsi bitkiler, romatizmal ağrıların hafifletilmesinde, yara iyileştirmede, ishalde, sarılıkta kullanılabilmektedir (Öcal ve Eroğlu 2012). *Hypericum* L. cinsinin alternatif tıpta yüzyıllardır kullanılmasının en önemli nedenleri arasında içeriğinde bulunan biyoaktif bileşenlerin zenginliğinden kaynaklanmaktadır. *Hypericum* türleri naftodiantronlar (örn. hiperisin ve türevleri), floroglusinoller (örn. hiperforin) ve flavonoidler (örn. rutin, kuersetin, kuersitrin ve biapigenin) dahil olmak üzere çok

sayıda biyolojik olarak aktif bileşen içerir. Özellikle depresyonun tedavisi için *Hypericum perforatum* türünün, standardize edilmiş alkollü (60% etanol veya 80% metanol) ekstraktları yaygın olarak kullanılır. Bunlar kurutulmuş bitkiden hazırlanır ve oral uygulama için tabletler, kapsüller ve şuruplar halinde formüle edilir. Alkollü ekstraktlar %0,1–0,3 hiperisin, %2–4 flavonoidler ve %6'ya kadar hiperforin içerebilir. Ticari ekstraktlar %0,3 hiperisin içerecek şekilde standardize edilmiştir (Di Carlo vd. 2001). Bununla beraber *Hypericum perforatum* türüne ait patent almamış homejenize edilmiş bitki parçacıkları da kapsüller halinde satışa sunulabilmektedir. Fakat bu ürünlerin içeriklerinin ve biyolojik etkilerinin farklılık gösterebileceği unutulmamalıdır (Tavlı vd. 2020). Bununla birlikte içeriği ve etkileri araştırılmamış *Hypericum L.* türleri de bulunmaktadır.

2.1.1 Türkiye'deki *Hypericum* Türleri ve Endemizm

Endemik kavramı Latince endemos (indigenous) kelimesinden türemiş olup, "yerli" anlamında kullanılmaktadır. Yetiştirme alanı bir bölge ile sınırlı olan türlere endemik tür adı verilmektedir. Endemizm sadece bir ada, yarımada, dağ, göl veya vadi gibi alanları ile sınırlı kalabileceği gibi daha geniş alanları da kapsayabilir. Bu haliyle endemik kavramı; sadece bir bölgeye, şehre veya ülkeye ait bir türü tanımlamak için kullanılır. Endemik türler açısından zengin ülkeler arasında Türkiye de bulunmaktadır. Türkiye'deki bitki çeşitliliği ve endemizm oranı dünyanın bir çok ülkesine göre fazladır. Bu zenginliğin en büyük sebebi dünyada mevcut yedi biyocoğrafik bölgeden üçünün (Akdeniz, Avrupa ve Sibirya, İran-Turan) Türkiye'de yer almasıdır. Farklı biyocoğrafik bölgelerin iklim ve toprak özellikleri de farklılık gösterdiği için her bölgenin kendine has bir florası olmaktadır. Ayrıca biyocoğrafik bölgeler arası geçişler yeni hibrit türlerin oluşmasına da imkan verebilir. Bu sebeplerle Türkiye florasında 11.707 bitki taksonu vardır ve bunların 3.649'u endemiktir (Güner vd., 2012).

Türkiye, *Hypericum* türleri açısından önemli bir merkezdir. Türkiye florasında bulunan 119 taksonun 49'u endemiktir (Şenkal ve Uskutoğlu 2021). Türkiye'de bulunan endemik *Hypericum L.* türleri Çizelge 2.1'de sunulmuştur. Bu endemik türler ile ilgili sınırlı sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Endemik türlerin fitokimyasal içerikleri ve

biyolojik özelliklerinin araştırılması var olan zenginliğimizin ortaya çıkarılabilmesi adına önem arz etmektedir. Bu bağlamda sunulan doktora çalışmasıyla *Heterophylla* taksonomik türler kısmında tek tür olan *Hypericum heterophyllum* endemik türünün sulu ekstraktlarının fitokimyasal ve biyolojik bazı özellikleri araştırma konusu olarak seçilmiştir.

Çizelge 2.1. Türkiye’de bulunan endemik *Hypericum L.* türleri (Şenkal ve Uskutoğlu 2021)

1- <i>H. adenotrichum</i> Spach	25- <i>H. minutum</i> P.H.Davis & Poulter
2- <i>H. albiflorum</i> (Hub.-Mor.) N.Robson	26- <i>H. monadenum</i> N.Robson
3- <i>H. auriculatum</i> (N.Robson & Hub.-Mor.) N.Robson	27- <i>H. neurocalycinum</i> Boiss. & Heldr.
4- <i>H. aviculariifolium</i> Jaub. & Spach	28- <i>H. depilatum</i> (Freyn & Bornm.) N.Robson
5- <i>H. bilgehan-bilgili</i> Başköse & Savran	29- <i>H. pamphylicum</i> N.Robson & P.H.Davis
6- <i>H. bourgaei</i> (Boiss.) N.Robson	30- <i>H. papillare</i> Boiss. & Heldr.
7- <i>H. capitatum</i> Choisy	31- <i>H. peshmenii</i> Yıld.
8- <i>H. confertum</i> Choisy	32- <i>H. pseudorepens</i> N.Robson
9- <i>H. crenulatum</i> Boiss	33- <i>H. pumilio</i> Bornm.
10- <i>H. cymbiferum</i> Boiss. & Balansa	34- <i>H. rupestre</i> Jaub. & Spach
11- <i>H. lythrifolium</i> (Boiss.) N.Robson	35- <i>H. salsolifolium</i> Hand.-Mazz.
12- <i>H. fissurale</i> Woronow	36- <i>H. salsugineum</i> N.Robson & Hub.-Mor.
13- <i>H. havvae</i> Güner	37- <i>H. saxifragum</i> N.Robson & Hub.-Mor.
14- <i>H. hedgei</i> N.Robson	38- <i>H. scabroides</i> N.Robson & Poulter
15- <i>H. heterophyllum</i> Vent.	39- <i>H. sechmenii</i> Ocak & O.Koyuncu
16- <i>H. huber-morathii</i> N.Robson	40- <i>H. sorgerae</i> N.Robson
17- <i>H. ichelense</i> N.Robson	41- <i>H. spectabile</i> Jaub. & Spach
18- <i>H. imbricatum</i> Poulter	42- <i>H. ternatum</i> Poulter
19- <i>H. kotschyannum</i> Boiss.	43- <i>H. thymbrifolium</i> Boiss. & Noë
20- <i>H. laxiflorum</i> N.Robson	44- <i>H. thymopsis</i> Boiss.
21- <i>H. leprosum</i> Boiss.	45- <i>H. trachyphyllum</i> Griseb.
22- <i>H. lycium</i> (N.Robson & Hub.-Mor.) N.Robson	46- <i>H. uniflorum</i> Boiss. & Heldr.
23- <i>H. malatyanum</i> Peşmen	47- <i>H. uniglandulosum</i> Hausskn. ex Bornm.
24- <i>H. marginatum</i> Woronow	48- <i>H. vacciniifolium</i> Hayek & Siehe
	49- <i>H. vaccinioides</i> N.Robson

2.2 Türkiye’de Endemik bir tür *Hypericum heterophyllum*

Hypericum heterophyllum Vent. Türkiye’de Marmara, Doğu Karadeniz ve Batı Anadolu bölgelerinde dağılım göstermektedir (Şenkal ve Uskutoğlu 2021). Yetiştği bölgelerden birisi de sunulan doktora tezinin yürütüldüğü Batı Anadolu’da yer alan Afyonkarahisar ilidir. *Hypericum heterophyllum* Vent. halk arasında yara yaprağı (çiçeği) olarak isimlendirilmektedir. Aromatik ve hoş kokulu olması nedeni ile halk arasında çayı da yapılan çiçekli bir bitkidir

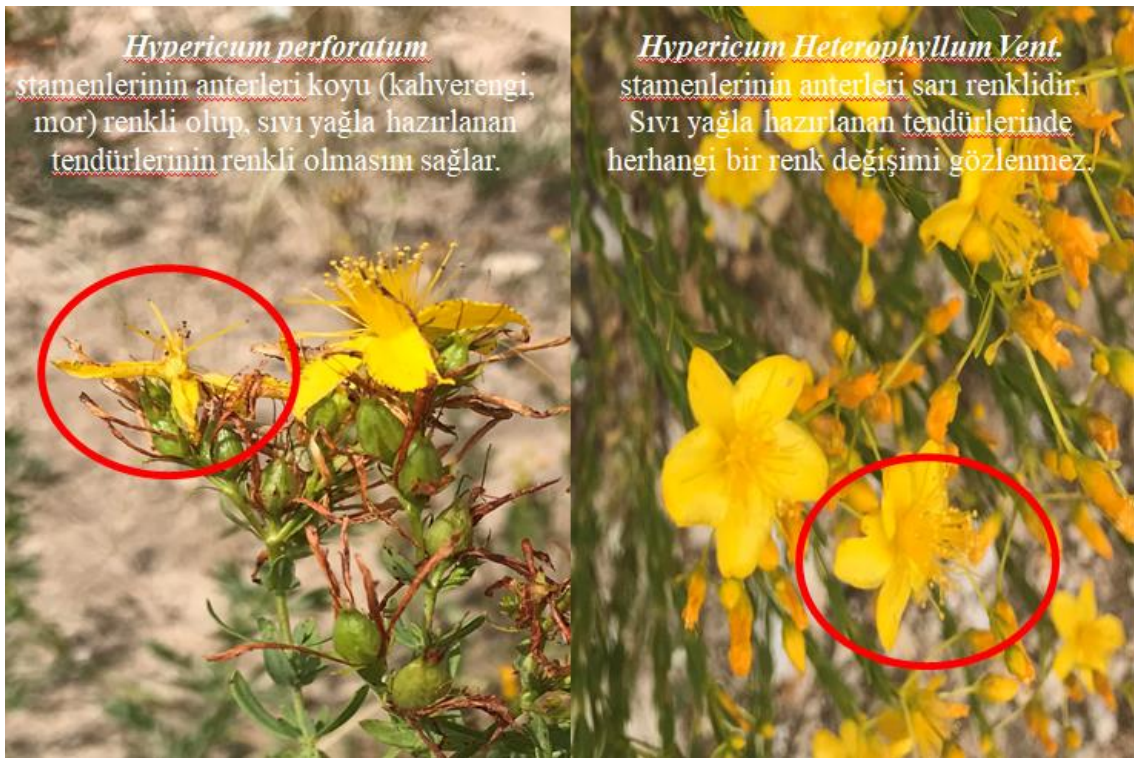
(Resim 2.1).



Resim 2.1. Çalışmada kullanılan *Hypericum heterophyllum* Vent. türünün doğal ortamından görüntüler

Hypericum heterophyllum Anadolu’da genellikle 1200-1600 m rakımlı; kurak, taşlı veya kayalık kalkerli alanlarda yetişen endemik bir türdür. Çalı formunda tek yıllık olarak yetişen bitki 20-60 cm uzunluğunda, dipten itibaren dallı yapraklı bir yapıya sahiptir. Ana gövdedeki yapraklar 5-13 mm, dar eliptik-dikdörtgen ile doğrusal, sivri yapıda, kısa koltuk altı strobiloid sürgünlerdeki yapraklar ise 0-5 mm, genişçe oval, yoğun şekilde sıkışmıştır. Çanak yapraklar 2-3,5 mm, dikdörtgen ile mızrak şeklinde, sivri, bütündür. Taç yapraklar 5-8 mm, oblanceolattır. Sarı çiçekleri yapraklara benzer şekilde çok sayıda ve beneksizdir (Davis 1988). Alternatif tıpta kullanımı yaygın olan *Hypericum perforatum* ile kıyaslandığında en önemli farkları arasında *Hypericum heterophyllum* Vent. türünün stamenlerinin anterleri sarı olması gelmektedir.

Hypericum perforatum stamenlerinin anterleri ise koyu (kahverengi, mor) renklidir. Bu koyu renkli stamenlerde bulunan pigment maddeleri *Hypericum perforatum* kullanılarak sıvı yağ veya zeytinyağı içerisinde renkli tendürler hazırlanmasına imkan verir. Sıvı yağ içerisinde muhtemelen apolar yapılı pigment maddeleri (antioksidan etkili biyoaktif sekonder metabolitler) çözünerek renk değişikliğine neden olabilmektedir. Bu tendürler özellikle yara iyileşmesindeki olumlu etkileri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. *Hypericum heterophyllum* Vent. türünün türü ile hazırlanan tendürlerde ise herhangi bir renk değişimi olmadığı ifade edilmektedir (Hazman ve Kargıoğlu 2019).



Resim 2.2 *Hypericum perforatum* ve *Hypericum heterophyllum* Vent. türleri arasındaki bazı farklılıklar

2.2.1 *Hypericum heterophyllum* ile Yapılan Bilimsel Çalışmalar

Yapılan araştırmalar *Hypericum heterophyllum* ile ilgili sınırlı sayıda çalışma yapıldığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda ise *Hypericum heterophyllum* türünün yağ içeriğinin belirlendiği, aseton ve metanol ekstraktlarında fenolik madde miktarı, antioksidan ve antibakteriyel etkinliğin analiz edildiği (Yaman 2020; Hazman vd.

2022), bununla beraber sulu ekstraktlarında literatürde detaylı bir araştırma yapılmadığı görülmektedir. Oysa *Hypericum heterophyllum* türünün halk arasında en çok tercih edilen formu infüzyon ve dekoksasyon formunda çay olarak sulu ekstraktlar halinde tüketilmektedir. Bu nedenle sulu ekstraktlarının etkinliğinin belirlenmesi farmakolojik etkilerini açıklamak adına yararlı olabilir.

Hypericum türlerinin kimyasal bileşimindeki ana grup, hiperisin, psödohiperisin ve bunların prekürsörleri olan protohiperisin ve protopsödohiperisini içine alan naftodiantronlardır. Hiperforin, adhiperforin ve bunların oksijenli türevleri de çok önemlidir. Ayrıca kimyasal bileşimlerinde ksantonlar, flavonoidler (rutin, hiperosid, kersitrin, izokersitrin), biflavonoidler, tanenler, proantosiyanidinler, fenolik asitler ve uçucu yağlar bulunmaktadır (Ernst 2003). Çakır (2004) yaptığı çalışmada *H. heterophyllum* yağının seskiterpenler açısından zengin olduğu (toplam yağın %72,9'u) tespit edilmiş ve baskın bileşenler olarak; izokaryofilen (%17,1), α -pinen (%11,6), δ -kadinen (%9,5), γ -murolen (%8,2), n-dekan (%5,8), γ -kadinen (%5,5) ve β -karyofilen (%4,5) bulunmuş ve türe ait ekstraktların antifungal etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada Ayan ve Çırak (2008) *Hypericum Heterophyllum* türünün yalnızca hiperisin/psödohiperisin içeriklerini incelenmiştir. Türün toprak üstü kısımlarının (çiçek, yaprak ve gövde) hiperisin ve psödohiperisin içermediği rapor edilmiştir. *Hypericum heterophyllum* türünün bileşenlerinin analiz edildiği başka bir çalışmada ise aseton ve metanol ekstraktlarında metanol ekstraktında en yüksek miktarda bulunan beş bileşenin; Quinik Asit (56,430 mg/g ekstrakt), Klorogenik asit (38,948 mg/g ekstrakt), Fumarik asit (26,156 mg/g ekstrakt), Miquelianin (18,551 mg/g ekstrakt) ve Isoquercitrin (10,289mg/g ekstrakt) olduğu belirlenmiştir. Aseton ekstresi ise Miquelianin (24,601 mg/g ekstrakt), Quinik Asit (20,064 mg/g ekstrakt), Klorogenik asit (20,005 mg/g ekstrakt), Isoquercitrin (16,582 mg/g ekstrakt) ve Fumarik asit (3,271 mg/g ekstrakt) bileşenlerini yüksek oranda içerdiği ifade edilmektedir (Hazman vd. 2022). Sunulan çalışmada bu çalışmadan farklı olacak şekilde sulu ekstraktların fitokimyasal profili belirlenmeye çalışılacaktır.

Hypericum heterophyllum türünün çiçeklenme dönemi başlangıcı ve çiçeklenme dönemi içerisinde toplanan bitkilerden alkolle hazırlanan ekstraktları ile yapılan başka bir çalışmada ise biyoelement (P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn ve Cu) düzeyleri

spektrofotometrik olarak, içerdği Azot miktarı Kjeldahl damıtma yöntemine göre belirlenmiştir. Ayrıca etanol ekstraktlarının özellikleri (DPPH, ABTS, toplam fenol ve flavonoid içeriği), dört bakteri (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*) ve iki *Candida* türü (*Candida albicans* ve *Candida tropicalis*) kullanılarak antimikrobiyal etkinliği, enzim inhibisyon (α -glukozidaz, α -amilaz, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, tirozinaz) aktivitesi ve MDA-MB-231 insan göğüs kanseri hücreleri kullanılarak sitotoksite düzeyleri değerlendirildiği belirtilmektedir. Çiçeklenme döneminin başlangıcından elde edilen ekstraktların daha güçlü biyolojik aktivite gösterdiği, ayrıca ekstraktların antioksidan, antibakteriyel (*Staphylococcus aureus*'a karşı), antikanser aktivite (meme kanseri hücreleri üzerinde) ve BChE ve α -glukozidaz inhibisyon etkilerine sahip olduğu belirlenmiştir. *Hypericum heterophyllum* Vent. içerisinde bulunan kimyasalların α -glukozidaz enzimi (PDB ID: 1R47), AChE enzimi (PDB ID: 4M0E), BChE enzimi (PDB ID: 5NN0), alfa-amilaz (PDB ID: 3BAJ), meme kanseri proteini (PDB ID: 1A52 ve 1JNX) olmak üzere çeşitli proteinlere karşı aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Yüksek aktiviteye sahip moleküllerin ADME/T analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar *H. heterophyllum*'dan elde edilen ekstraktların önemli farmakolojik aktivitelere sahip olabileceğini göstermektedir (Eruygur vd. 2024).

Hypericum türlerinin tarım zararlılarına karşı etkili bir koruyucu olabileceği belirtilmektedir. Bu konuda üç *Hypericum* türünün (*Hypericum perforatum* L., *Hypericum heterophyllum* Vent., *Hypericum scabrum* L.) çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından elde edilen etanol ekstraktları, dünyanın birçok bölgesinde depolanmış tahılların önemli zararlısı olan *Rhyzopertha dominica* (Fab.) (Coleoptera: Bostrichidae) erginlerine karşı toksisiteyi değerlendirilmiştir. Böcek öldürücü aktivitesi, %10 etanol ekstrakt konsantrasyonunda analiz edilmiş ve ölçümler, üç farklı zamanda (24, 48 ve 72 saat) alınmıştır. Bu tür üzerine analiz edilen faktörler değerlendirildiğinde *Hypericum* türleri, bitki kısmı, maruz kalma süresi ve *Hypericum* türleri ile bitki kısmı arasındaki etkileşimin istatistiksel olarak önemli bir etkisi olduğu görülmüştür. *H. perforatum*, *H. heterophyllum* ve *H. scabrum*'dan elde edilen ekstraktların ölüm değerleri, 72 saat sonra *R. dominica* ergini için sırasıyla %44.8 ila %88.9, %26.0 ila %78.8 ve %26.1 ila %50.3 arasında değişmiştir. *H. perforatum* diğer türlere göre daha güçlü etki göstermiştir. Bitki

kısımları arasında yaprak, tür üzerinde üstün ölüm oranı göstermiştir. Ek olarak, maruz kalma süresinin artmasıyla ölüm oranı artmıştır. *Hypericum* türleri ile bitki kısmı arasındaki etkileşime göre en yüksek ölüm oranını *H. perforatum* yaprağı (%79.4) gösterirken, onu *H. heterophyllum* yaprağı (%70.6) izlemiştir. 72 saat sonra, en yüksek ölüm *H. perforatum*'un yaprak kısımlarında kaydedilmiştir. Mevcut sonuçlar, ekstraktlardan, özellikle *H. perforatum* ve *H. heterophyllum*'un yaprak ekstraktlarının, depolanmış tahılların önemli zararlıları arasında sayılan *R. dominica*'ya karşı koruyucu olarak kullanılabilecek doğal potansiyel ürün olarak değerlendirilebileceği rapor edilmektedir (Yaman ve Şimşek 2022).

H. heterophyllum'un içerisinde bulunduğu Türkiye'de yetişen 18 farklı *Hypericum* türünün total fenolik madde miktarları araştırılarak karşılaştırılmıştır. Sulu ekstraktlar dekoksasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu amaçla 2 g örnek 100 mL kaynayan su içerisine atılarak 15 dakika inkübe edilerek ekstraktlar elde edilmiştir. Alkol ekstraksiyonu ise 2 g bitki ve etanol kullanılarak soxhlet cihazında yapılmıştır. Elde edilen veriler µg-pyrocatechol-equivalent şeklinde ifade edilmiştir. Veriler incelendiğinde *H. Heterophyllum* etanol ekstraktının total fenolik madde içeriği 43,63 µg olup, 18 tür *Hypericum* türü içerisinde en çok üçüncü fenolik içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir. Su ekstraktı fenolik madde içeriği ise 24,47 µg – pyrocatechol-equivalent şeklinde belirlenmiş olup, analiz edilen diğer türlerin fenolik maddeleri ile kıyaslandığında 13. Sırada olduğu görülmüştür (Özen vd. 2005).

Yapılan başka bir çalışmada ise *Hypericum heterophyllum*'un sadece yaprakları kullanılarak hazırlanan metanol, etanol, aseton ve kloroform ekstraktlarının fitokimyasal bileşenlerinin bazı biyolojik özellikleri detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Fitokimyasal analiz sonuçları özütlerin hiçbirinin içerisinde çoğu *Hypericum* türünde bulunan biyoaktif bileşenler olan hiperisin, psödohiperisin ve hiperforin bileşiklerini içermediğini göstermektedir. Çalışılan ekstraktlar arasında, etanol ve aseton ekstraktlarında bileşen sayısının diğer ekstraktlara (metanol, kloroform ekstraktları) göre daha fazla bulunduğu belirtilmektedir. Toplam fenolik içerik en fazla metanol ekstraktında (132,7 mg GAE/g), toplam flavonoid (61,8 mg QE/g) ve flavanol (0,89 mg CE/g) içeriği ise en yüksek aseton ekstraktında elde edilmiştir. Metanol özütü en fazla

DPPH aktivitesini (24,9 mg TE/g) gösterdi, ancak etanol özütü (59,8 mg TE/g) en yüksek ABTS aktivitesini gösterdi. Aseton özütü sırasıyla 351,5 mg AAE/g ve 197,3 mg TE/g değerleriyle en iyi hidroksil ve süperoksit radikal temizleme aktivitelerini gösterdi. Kloroform özütü en iyi AChE inhibisyon aktivitesini (11,07 µg/ml) gösterdi. Yerleştirme çalışmasında, kuersetin-7-O-glukozid, diosgenin ve kuersetin-3-glukozidin referans ligan Donepezil'den daha güçlü bir MolDock Puanına sahip olduğu hesaplandı. Yerleştirme sonuçlarımız, özütlerin asetilkolinesteraz enzimine karşı yüksek afiniteye sahip bileşikler içerdiğini gösterdi. Bu veriler, bu özütlerin potansiyel olarak önemli antioksidan takviyeleri ve AChE inhibisyon aktivitesi için ilaç adayları olabileceğini düşündürmektedir (Yaman vd. 2024).

Tarımda böcek zararlılarını kontrol etmek için böcek öldürücü özelliklere sahip yeni bitkisel doğal ürünlerin araştırılması son yıllarda önem kazanmıştır. Bu kapsamda *Hypericum heterophyllum* ve beraberinde iki *Hypericum* (*Hypericum perforatum*, *Hypericum scabrum*) türünün çiçek, yaprak ve gövdesinden elde edilen özütlerinin, üç önemli depolanmış tahıl böcek zararlısı (*Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* ve *Tribolium confusum*) yetişkinlerine karşı böcek öldürücü aktivitesi araştırılmıştır. Bu amaçla böcekler, %10'luk *Hypericum* özütleri konsantrasyonundaki besinlerle inkübe edilmiş ve ölüm oranları 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetten sonra kaydedilmiştir. Araştırma sonucunda *Hypericum* türlerinin özütlerinin ve maruziyet süresinin üç böcek zararlısına karşı istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. 72 saatlik maruziyetten sonra ölüm oranı tüm böcekler için %4,3 ila %94,1 arasında değiştiği belirtilmektedir. Test edilen böcekler arasında *R. dominica*, *T. confusum* ve *S. oryzae*'den daha duyarlı olduğu, her üç *Hypericum* türünden de böcekler karşı istenen böcek öldürücü etki kaydedilmiş olsa da, her birinin etkisinin türlere karşı farklılık gösterdiği belirlenmiştir. *H. perforatum*'un yaprak özütü *R. dominica* üzerinde daha etkili iken, *H. scabrum*'un çiçeği ve sapı sırasıyla *T. confusum* ve *S. oryzae* üzerinde yüksek toksik etki gösterdiği rapor edilmektedir. Özellikle *H. perforatum*'un yaprak özütleri, depolanmış tahıllarda *R. dominica*'ya karşı yeni potansiyel botanik böcek öldürücülerin kaynağı olarak kullanılabileceği rapor edilmektedir (Yaman vd. 2021).

Hypericum heterophyllum ve Türk geleneksel tıbbında çeşitli hastalıklara karşı ilaç olarak kullanılan 25 bitkinin kloroform, aseton, etanol ve su özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri, 10 patojenik bakteri ve bir mantara (*Candida albicans*) karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak bir araştırma (Ünal vd.2008) kapsamında test edilmiştir. Test edilen bitki türleri arasında *Ziziphora clinopodioides* Lam (Labiatae), *Thymus fallax* Fisch et Mey. (Labiatae) ve üç *Hypericum* (*H. heterophyllum* Vent., *H. hyssopifolium* Chaix. subsp. *elongatum* (Ledeb.) Woron var. *elongatum* ve *H. scabrum* L.) türünün daha geniş bir spektrumda antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Aynı çalışmada 20 bitkinin aseton, etanol ve su ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ayrıca lipid peroksidasyon inhibisyonu ve DPPH serbest radikal temizleme yöntemleriyle değerlendirilmiştir. *Z. clinopodioides*, *T. fallax*, *Hypericum heterophyllum* dahil üç *Hypericum* türü, *Artemisia santonicum* L. (Compositae) ve *Echinophora tenuifolia* L. subsp. *Sibthorpiena* (Umbelliferae)'nın su, etanol ve aseton ekstraktlarının test edilen bitki türleri arasında güçlü antioksidan aktivitelere sahip olduğu bulundu. Genel olarak, ekstraktların antioksidan potansiyeli ile toplam fenolik içerikleri arasında bir korelasyon olduğu ifade edilmektedir (Ünal vd.2008).

Ünal ve ark. (2008) araştırmalarında *H. heterophyllum* Vent. türü farklı ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan aktivite ve total fenolik miktarları da analiz edilmiştir. *H. heterophyllum* Vent. türüne ait kloroform (%12,09), aseton (%9,74), etanol (11,8) ve su (%14) ekstraktlarının % verim oranları kıyaslandığında en yüksek verimin su ekstraktında olduğu belirtilmektedir. *H. heterophyllum* Vent türü ekstraktların *B. megaterium*, *B. Subtilis*, *E. coli*, *E. cloacae*; *K. Pneumonia*, *P. Mirabilis*, *P. Vulgaris*, *S. enteritidis*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *C. albicans* suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliği kıyaslandığında ise; *B. Megaterium* suşuna karşı kloroform, aseton ve etanol ekstraktlarının, *K. Pneumonia* suşuna karşı etanol ekstraktının, *P. Vulgaris* suşuna karşı kloroform ve aseton ekstraktının, *S. aureus* suşuna karşı ise etanol ekstraktının antibakteriyel etkili olduğu, *C. albicans* suşuna karşı hiçbir ekstarktın antifungal aktivite göstermediği ifade edilmektedir. Her bir ekstraktın 100 µg/mL'sinin DPPH radikal süpürücü etkinliği kıyaslandığında su ekstraktının DPPH indirgenme oranının yaklaşık % 90, etanol ekstraktının %80, aseton ekstraktının ise %60 civarında olduğu belirtilmektedir. 100 µg/mL konsantrasyonundaki ekstraktların total fenolik madde

miktarı ise gallik asit eşdeğeri cinsinden; su ekstraktı için 14 µg/mL, etanol için yaklaşık 9,5 µg/mL, aseton ekstraktı için 11 µg/mL bulunduğu rapor edilmektedir. Bu veriler *H. heterophyllum* Vent türüne ait sulu ekstraktın total fenolik içeriği ve DPPH radikali süpürücü aktivitesinin etanol ve aseton ekstraktlarından daha yüksek olabileceğini göstermektedir. Bunun yanında ekstraktların lipidperoksidasyonuna etkisi incelendiğinde aseton ekstraktının en etkili ekstrakt olduğu rapor edilmektedir (Ünal vd.2008).

Başka bir çalışmada (Öcal ve Eroğlu 2012) ise *Hypericum heterophyllum*'un genotoksik etkisini belirlemek için insan lenfositleri kullanılmıştır. Bu amaçla sulu ekstraktlar dekoksasyon (kaynatma) yöntemi ile hazırlanmıştır. Türün toprak üstü kısımlarının kullanıldığı çalışmada mekanik olarak parçalanıp toz haline getirilen numuneler kaynayan durumdaki suda 5 dakika inkübe edilmiş, süzülerek elde edilen filtratlar sterilize edilerek + 4°C'de saklanmıştır. İnsan kanından elde edilen lenfositlere son konsantrasyon 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL olacak şekilde uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar *Hypericum heterophyllum*'un artan ekstrakt konsantrasyonlarının lenfositlerde mikronükleus oluşumunu artırdığı belirtilmektedir. Mikronükleusun yükselişi, *Hypericum heterophyllum*'un yüksek konsantrasyonlarda kanserojen ve genotoksik olabileceğini göstermektedir.

Hypericum türlerinin en yaygın kullanım alanları arasında yara iyileşmesi gelmektedir. Ama *Hypericum heterophyllum* türünün böyle bir etkinliği var mı, varsa bu etkilerini hangi bileşenleri aracılığı ile oluşturuyor olabilir, henüz bu konularda bir araştırma yapılmadığı yapılan literatür taramaları sonucu anlaşılmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalar genel olarak ele alındığında *Hypericum heterophyllum* türünün yaprak, çiçek ve dal kısımlarına ait sulu ekstraktlarının ayrı ayrı hazırlanarak yapılan ve sonuçları kıyaslanan çalışma literatürde bulunamamıştır. Bu nedenle sunulan çalışma ile bitki türünün yaprak, çiçek ve dal kısımlarına ait sulu ekstraktlarının yara iyileşmesi üzerine etkilerinin sunulan tez çalışmasıyla araştırılması düşünülmektedir.

Bununla beraber türe ait sulu ekstraktlarda antioksidan, antikanserojen ve antibakteriyel etkilerinin araştırıldığı çalışmaların yapılması, farmakolojik etkinliğini ve olası ekonomik değerini açıklama adına önemli olabilir. Bu nedenle sunulan çalışma ile *Hypericum heterophyllum* sulu ekstraktlarının yara iyileştirici, sitotoksik, antikanserojen, antimikrobiyal, oksidan/antioksidan potansiyellerinin araştırılması ve fitokimyasal bileşenlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.



3. MATERİYAL ve METOT

Yapılan tez çalışması kapsamında deneysel çalışmamızda kullanılan bitki ekstraktlarının hazırlanması, bu ekstraktların fitokimyasal profillerinin belirlenmesi, antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik/antikanserojenik ve yara iyileştirici etkinlikleri ile ilgili yapılan analizlerde kullanılan yöntemler sırası ile bu kısımda sunulmuştur.

3.1 Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan *Hypericum heterophyllum* bitkisinin toprak üstü kısımları Afyonkarahisar İli, Bayat İlçesi Köroğlubeli Mevkiinden (38° 58' 59" N, 30° 55' 29" E) 2022 yılının Temmuz ayında Moleküler Biyoloji Bölümü ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa Kargioğlu tarafından yerinde teşhis edilerek toplanmıştır. Laboratuvarımızda saf su ile yıkandıktan sonra güneş görmeyen ortamda kurutuldu. Sarı Kantoron (*Hypericum heterophyllum*) bitkisinin gövde, yaprak ve çiçeklerinden oluşan karışım öncelikle musluk suyuyla iyice yıkandıktan sonra saf sudan geçirildi ve küçük parçalara ayrılıp oda sıcaklığında gölgede kurutuldu. İyice kurutulduktan sonra *Hypericum heterophyllum* bitki örnekleri blenderde (Waring 32BL80, Connecticut, USA) öğütülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen bitki örneklerinden sulu ekstraktları hazırlandı.

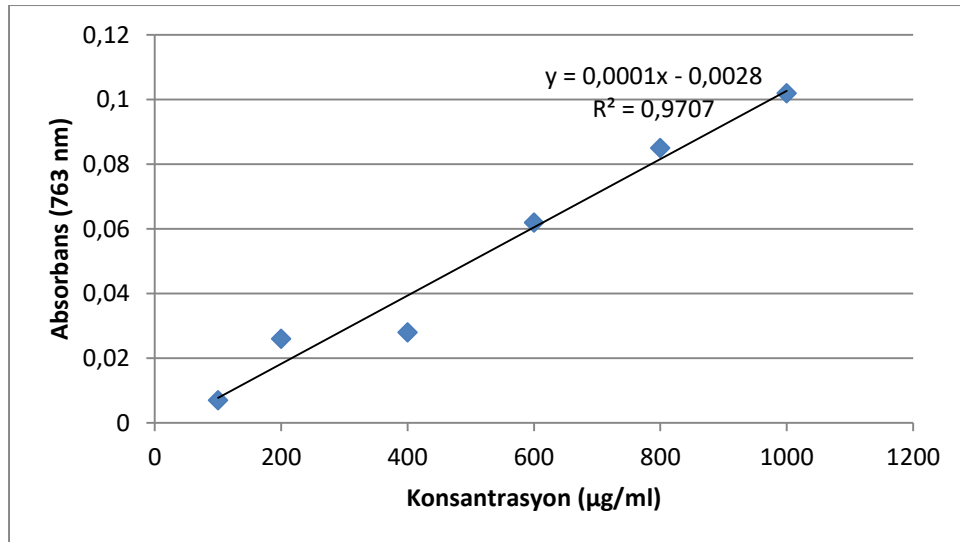
3.2 Bitki Materyalinin Ekstraksiyonu

Çalışmalarda *Hypericum heterophyllum*'a ait üç farklı sulu ekstrakt hazırlandı. Bunlar; çiçek ekstraktı, Dal-Yaprak ekstraktı ve toprak üstü kısımlarından oluşan ekstrakt (Mix) olarak planlandı. Ekstraksiyonda çözücü olarak su tercih edildi. Numunelerin sulu ekstraktını hazırlamak için 50 g tartılarak üzerine 500 mL (1:10 w/v oranında) hacminde (su) çözücü ilave edildi. Su banyosu 50 ° C sıcaklığına ayarlandı, sonra hazırlanan cam şişelerdeki bitki çözücü karışımları su banyosunda 1 saat bekletildi. Su banyosundan çözeltiler çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığında 24 saat karanlıkta bekletildi. Hazırlanan ekstreler bitki parçalarından arındırmak için süzgeç kâğıdından süzülerek, ayrı bir balonda toplandı. Bu şekilde elde edilen *Hypericum heterophyllum* 'un sulu ekstraktlarının çözücüleri vakum altında evaporatör cihazında uzaklaştırıldı.

Elde edilen ekstraktlar cam petri kaplara dökülerek oda sıcaklığında içindeki çözücülerden daha iyi arınarak, kuruması için birkaç gün beklendi. Petri kaplarındaki iyice kuruyan *Hypericum heterophyllum* ekstraktları kazıyıcı ile kazınarak küçük cam şişelere konuldu.

3.3 Ekstraktlarda Total Fenolik Madde Miktarı Tayini

Total fenolik asit miktarı Folin-Ciocalteu metoduyla ölçüldü. Analizde ekstraktlardaki fenolik madde miktarlarını kıyaslayabilmek için fenolik bir antioksidan olan kafeik asitin de total fenolik madde miktarı belirlendi. Öncelikle gallik asite ait bir standart eğri oluşturuldu. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda (100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml) gallik asitin standart çözeltileri hazırlandı (Şekil 3.1). Analizlerde bitki ekstraktı, kafeik asit ve standartların hazırlanan çözeltilerine Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. 5 dakika sonra Na₂CO₃ eklenerek 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Karışımın absorbansı suya karşı 763 nm de UV spektrofotometrede (Nuve NF 400) ölçüldü. Bitki ekstraktlarının analizi sonucunda elde edilen absorbanslar ve gallik asit standart eğrisinden elde edilen doğru denklemi kullanılarak (Şekil 3.1), ekstraktların 1 mg'ında bulunan toplam fenolik asit miktarı gallik asit eşdeğeri (µg GAE/mg-ekstrakt) şeklinde hesaplandı (Hazman vd. 2021a, Balkir vd. 2023).



Şekil 3.1 Total fenolik madde miktarlarının hesaplanmasında kullanılan gallik asite ait kalibrasyon eğrisi.

3.4 Ekstrakt Fitokimyasal Profillerinin LC-MS/MS Analizleri ile Belirlenmesi

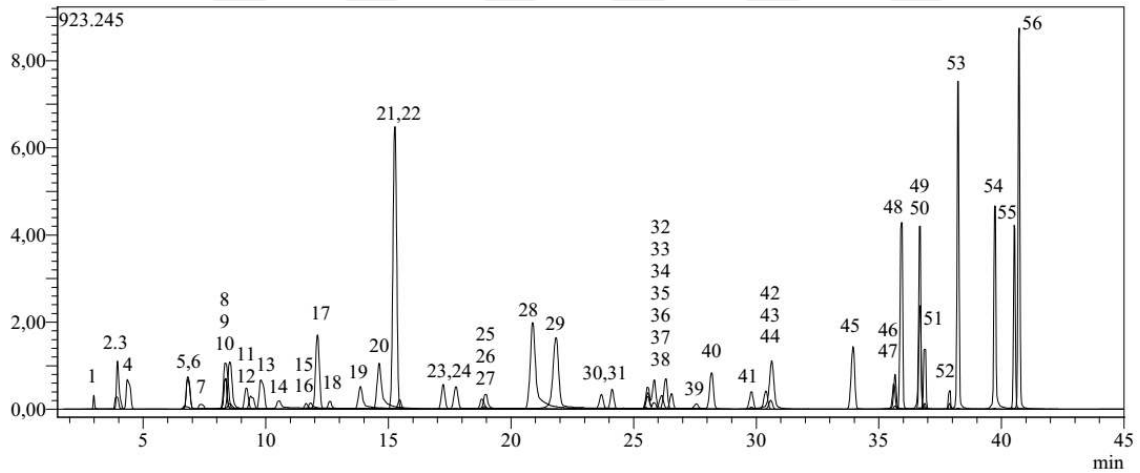
Bitki ekstraktlarında bulunan fenolik bileşenlerin türü ve miktarları Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından daha önce validasyonu yapılmış bir metot ve kromatogram kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan analiz yönteminde 53 fitokimyasal maddenin miktarsal analizi için Shimadzu-Nexera model UHPLC cihazına bağlı tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS sistemi) kullanılmıştır (Yılmaz 2020). Sunulan çalışmada üç adet non-fenolik asit, üç adet fenolik aldehit, bir adet benzopron, bir adet stilbenoid glikozidi, bir adet biflavanoid, 17 adet fenolik asit ve 27 adet flavanoid yapılı bileşik olmak üzere toplamda 53 fitokimyasal madde standardı ile oluşturulan kromatogram kullanılarak, LC-MS/MS sistemi aracılığı her bir standardın numunede hangi miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan standartların isimleri ve hangi bileşik grubuna dahil oldukları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Ekstraktların Fitokimyasal bileşimini belirlemek amacıyla kullanılan standart Maddeler

Standardın Dahil Olduğu Bileşik Grubu	Kullanılan Standart Bileşiklerin İsimleri
Non-fenolik asit	Quinik asit, fumarik asit, akonitic asit
Fenolik aldehit	Protocatechuic aldehit, syringic aldehit, vanillin
Benzopron	Kumarin
Stilbenoid glikozid	Piceid
Biflavanoid	Amentoflavone
Fenolik asit	Gallik asit, protokateşik asit, gentisik asit, klorogenik asit, tannik asit, 1.5-dikafeoilquinik asit, 4-OH Benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, sirinjik asit, p-kumaric asit, ferulik asit, sinapik asit, salisilik asit, o-kumarik asit, rosmarinik asit, ellagik asit
Flavanoid	Epigallokateşin, kateşin, epigallokteşin gallate, epicatechin, daidzin (daidzein 7-O-glukosit), epicatechin gallate, cynaroside (luteolin 7-O-glukosit), miquelianin (kuarsetin 3-O-glukuronit), rutin (kuarcetin-3-O-rutinoside), isokuarcetin (kuarcetin-3-O-glukozit), hesperidin (hesperidin 7-rutinoside), genistin (genistein-7-glukozit), cosmoisin (apigenin 7-glukozit), kuarcitrin (kuarcetin-3-ramnosit), astrajalin (kamferol-3-O-glukozit), nicotiflorin (kamferol-3-O-rutinosit), fisetin, daidzein, kuarcetin, naringenin, hesperedin, luteolin, genistein, kamferol, apigenin, kirizin, akasetin.

3.4.1 Kütle Spektrometre ve Kromatografi Şartları

Bitki ekstraktlarında içeriğinde bulunan 53 farklı maddenin (Şekil 3.2, Çizelge 3.1) varlığı kalitatif/kantitatif olarak araştırılmıştır. Bu amaçla 53 fitokimyasal maddenin miktarsal analizi için (Yılmaz 2020) Shimadzu-Nexera model UHPLC cihazına bağlı tandem kütle spektrometresi kullanılmıştır. Kullanılan ters faz UHPLC sistemi bir otoörnekleyici (SIL-30AC model), bir kolon fırını (CTO-10ASvp model), gradient pompa sistemi (LC-30AD model) ve bir degazer (DGU- 20A3R model) bileşenlerinden oluşmuştur. Kromatografik ayırım Agilent Poroshell 120 EC-C18 model (150 mm×2.1 mm, 2.7 µm) bir kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlıdır. Elüsyon gradiyenti mobil faz A (ultrasaf su+5 mM amonyum format+0.1% formik asit) ve mobil faz B (ultrasaf su+5 mM amonyum format +% 0.1 formik asit)'den oluşmuştur. Şu şekilde bir gradiyent elüsyon profil kullanılmıştır: 20-100% B (0-25 dk), % 100 B (25-35 dk), % 20 B (35-45 dk). Ayrıca mobil faz akış hızı ve enjeksiyon hacmi sırasıyla 0.5 mL/min ve 5 µL olarak belirlenmiştir (Yılmaz 2020).



Şekil 3.2. Numunelerde miktarsal tayini yapılan 53 fitokimyasal standarda ait kromatogram

(1; Kuinik asit, 2; Fumarik asit, 3; Akonitik asit, 4; Gallik asit, 5; Epigallokateşin, 6; Protokatekuik asit, 7; Kateşin, 8; Gentisik asit, 9; Klorogenik asit, 10; Protokatekuik aldehit, 11; Tannik asit, 12; Epigallokateşin gallat, 13; 1,5-dicaffeoilkuinik asit, 14; 4-OH Benzoik asit, 15; Epikateşin, 16; Vanilik asit, 17; Kafeik asit, 18; Sirinjik asit, 19; Vanilin, 20; Sirinjik aldehit, 21; Daidzin, 22; Epikateşin gallat, 23; Piseid, 24; p-Kumarik asit, 25; Ferulik asit-D3-IS^h, 26; Ferulik asit, 27; Sinapik asit, 28; Kumarin, 29; Salisilik asit, 30; Sinarozid, 31; Mikuelianin, 32; Rutin-D3-IS^h, 33; Rutin, 34; isokuarsitrin, 35; Hesperidin, 36; o-Kumarik asit, 37; Genistin, 38; Rosmarinic acid, 39; Ellagic acid, 40; Kosmosiin, 41; Kuarsitrin, 42; Astragalin, 43; Nicotiflorin, 44; Fisetin, 45; Daidzein, 46; Kuarsetin-D3-IS^h, 47; Kuarcetin, 48; Naringenin, 49; Hesperedin, 50; Luteolin, 51; Genistein, 52; Kamferol, 53; Apigenin, 54; Amentoflavon, 55; Kirişin, 56; Akasetin).

Kullanılan LC-MS/MS sisteminin kütle spektrometre dedeksiyonu için hem pozitif hem de negative modda çalışan bir elektrosprey iyonlaşma kaynağı ile donanmış Shimadzu LCMS-8040 model sıralı kütle spektrometresi kullanılmıştır. LC-ESI-MS/MS verileri LabSolutions yazılımı (Shimadzu) ile alınmış ve işlenmiştir. Fitokimyasalların kantitasyonu için MRM (multiple reaction monitoring/Çoklu Reaksiyon Görüntüleme) modu kullanılmıştır. MRM metodu, belirli ana iyon-parçalanma iyonu geçişlerinin taranmasına dayalı olarak fitokimyasalların seçici olarak tespit edilip miktarsal tayininin yapılması için optimize edilmiştir. Optimum fitokimyasal fragmentasyonu ve arzulanan parçalanma iyonlarının maksimal geçişini elde etmek için çarpışma enerjileri (CE) optimize edilmiştir. Uygulanan MS çalışma şartları: kurutucu gaz (N₂) akışı, 15 L/dk; nebulizer gaz (N₂) akışı, 3 L/dk; DL sıcaklığı, 250°C; heat block sıcaklığı, 400°C ve ara yüz sıcaklığı, 350°C olarak belirlenmiştir. Analzilerde kullanılan LC-MS/MS yöntemine ait analitik yöntem doğrulama parametreleri tez metninin ekler kısmında sunulmuştur. Şekil 3.2’de sunulan standart kromatogramda 56 maddeye ait pik tanımlanmıştır. Bu piklerden ekstraktlarda aranan 53 farklı bileşene (Çizelge 3.1) ait standarta, 3’ü (Ferulic acid-D3-IS^h, Rutin-D3-IS^h, 46; Quercetin-D3-IS^h) ise cihazın çalışmasının optimizasyonunu belirlemek için kullanılan standartlara aittir.

3.5 Oksidan/Antioksidan Düzeylerinin Belirlenmesi

Ekstraktların hem oksidan hem de antioksidan özellikleri spektrofotometrik yöntemlerle çalışan ticari kitler (Rell Assay, Türkiye) ile tespit edildi. Antioksidan etkinliğin belirlenmesinde total antioksidan statü (TAS) belirleme kiti, oksidan aktiviteyi belirlemek için ise total oksidan statü (TOS) belirleme kiti kullanıldı. Numuneler deiyonize suda çözülerek analizlere hazırlandı. Bu amaçla her bir ekstrak 10 mg tartılarak 15 mL’lik falkon tüplere konuldu ve üzerlerine 10 mL deiyonize su ilave edildi. Vorteks yardımıyla ekstraktların çözülmesi sağlandı. Her bir numune üç tekrarlı çalışıldı. TAS düzeylerinin belirlenmesinde standart olarak trolox kullanıldı. Elde edilen sonuçlar “mmolTroloxEquivalent / L” şeklinde ifade edildi. TOS düzeylerinin belirlenmesi amacıyla ise hidrojen peroksit (H₂O₂) standart olarak tercih edildi. Analizi gerçekleştirilen numunelerin TOS düzeylerinin ifadesinde “µmol H₂O₂ Equivalent / L”

birimi kullanıldı. Her bir numuneye ait OSI değerleri ise elde edilen TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranlanması ($OSI=TOS/TAS$) ile elde edildi (Hazman et al. 2023).

3.6 Bitki Ekstraktlarında Antimikrobiyal Aktiviteyi Belirlemeye Yönelik Çalışmalar

Hypericum heterophyllum Vent. türü sulu çiçek, dal-yaprak ve mix ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) yöntemleri kullanıldı. Analizlerde referans olarak mikroorganizma suşları olarak; bir gram pozitif bakteri *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), bir gram negatif bakteri *Escherichia coli* (ATCC 25292) ve bir adet mantar referans suşu olarak *Candida albicans* (ATCC 90028) kullanılmıştır. Referans suşlar, dilüsyon seyreltme yöntemi ile seyreltilerek konsantrasyonu 10^6 - 10^7 kob/mL olacak şekilde hazırlandı.

3.6.1 Disk Diffüzyon Yöntemi ile Antibakteriyel Etkinliğin Belirlenmesi

Hypericum heterophyllum'un ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon yöntemi ile belirlemek için Mueller-Hilton agar (Oxoid CM337) içeren her bir petri kabına bakteri/mantar kültürü eklendi. Disklere farklı konsantrasyonlarda (%5, %2,5 ve %1,25) *Hypericum heterophyllum*'un ekstreleri eklendi. Kontrol olarak, *Gentamicin 10 mg* (Oxoid) ve *Erythromycin 15 mg* (Oxoid) kullanıldı. Daha sonra 24 saat inkübasyon sonrası disklerin etrafında oluşan zonlar ölçülerek değerlendirildi (Bauer vd. 1966).

3.6.2 Mikrodilüsyon (*Minimum inhibitory concentration- MIC*) ile Antibakteriyel Etkinliğin Belirlenmesi

Ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü tarafından açıklanan metotlar (Anonim 2012) izlenerek, mikrodilüsyon yöntemine göre belirlenmiştir. Bu amaçla ekstraktlar 5 mg/ml, 2,5 mg/ml ve 1,25 mg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonda test edilmiştir (Başlangıç stok: 10 mg/mL).

Dilüe edilen ekstraktların üzerine 10^6 - 10^7 kob/mL’lik bakteri solüsyonlarından %1 (v/v) ilave edildi ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak, *Gentamicin 10 mg* (Oxoid) ve *Erythromycin 15 mg* (Oxoid) kullanıldı. İnkübasyondan sonra MIC değeri; bakteri gelişmesinin engellendiği en düşük ekstrak konsantrasyonları hem 450 nm’de ölçüm hem de besi yerine ekim yapılarak değerlendirildi.

3.7 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültüründe gerçekleştirilen in-vitro çalışmalar kapsamında dört farklı hücre hattı kullanıldı. Kullanılan hücre hatları; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) hücreleri, fare fibroblast (L929) hücreleri, human malignant melanoma (G361) hücreleri ve Human gingival fibroblast (HGF) hücreleri şeklinde sıralanabilir. Deneylerde kullanılan hücreler Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvar stoklarından temin edilmiştir. Hücreler ile çalışılmadan önce hücrelerin yaşamsal döngülerine uygun besiyerleri önceden steril ortamlarda hazırlandı. Çalışmada hücreler için gerekli 37 °C ve 5% CO₂ şartlarını sağlayan inkübatör (Nüve EC 160) kullanıldı. Hücrelere deney modellerine ve analizler yöntemlerinde belirtilen uygulamalar yapıldıktan sonra tüm inkübasyonlar inkübatörde gerçekleştirildi.

3.7.1 Hücrelerin Çoğaltılması için Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan G361 hücreleri için RPMI 1640 (Gibco) kullanılarak besiyeri hazırlandı. A549, L929 ve HGF hücreleri içinse besiyeri hazırlanmasında DMEM (Sigma) kullanıldı. Hücrelerin çoğaltılması için kullanılacak olan medium (besiyeri) 0,22 µm gözenekli pess membran filtreler (WVR) kullanılarak hazırlandı. Filtreye konacak komplete medium bileşenleri steril ortamda (flow kabinde) konuldu. 500 mL medium hazırlamak için filtreye öncelikle %10 (v/v) oranında ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serumu (FBS; Fetal bovine serum veya fetal calf serum), %1 (v/v) oranında penisilin streptomisin, %1 (v/v) oranında (1 mM) sodyum piruvat eklendi. İçeriğinde glutamin olan yüksek glukoz konsantrasyonuna sahip DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Serox, Germany) veya RPMI 1640 ile hacim 500 mL’ ye tamamlandı. Besiyeri elde etmek için hazırlanan karışım bir vakum pompası aracılığı ile filtreden (WVR, 0,22 µm’lik pess membran filtre) geçirildi (Resim 3.2), kullanılan vakum

pompası borusu flow kabin içine sokmadan önce %70'lik alkolden geçirilerek sterile edildi. Filtratta toplanan besiyeri filtreden ayrılarak şişe içine alınıp kapağı kapatıldı. Hücrelerin çözündürülmesi, yıkanması, pasajlanması ve üretilmesi amacıyla kullanılacak besiyeri, steril 50 mL'lik falkonlara konularak, kullanım süresine kadar +4°C'ye kaldırıldı. Bu şekilde 50'lik falkonlarda kullanıma hazır edilen besiyeri, hücre ekimi yapılacağı veya manüplasyonlarda kullanılacakları zaman, önceden çıkarılarak 37°C'deki su banyosunda 20-30 dakika ısıtılmıştır.



Resim 3.1. Hücre kültürü analizlerinde kullanılan besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan pes membran filtre düzeneği

3.7.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi

Çalışmada kullanılan hücreler (A549, L929, G361 ve HGF) Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücreleri sıvı azotta kriotüpler içinde laboratuvara getirildi. Donmuş halde kriotüp içinde bulunan hücreler öncelikle sıvı azottan -20 °C ye alındı. 10 dakika beklendikten sonra 37 °C deki sıcak su banyosunda 1-2 dk süre ile inkübe edilerek çözülmeye bırakıldı. Bu arada 15 mL'lik bir falkona 5 mL medium konuldu. Su banyosunda tamamı çözülmek üzere olan kriotüpteki hücreler hazırlanan (içine medium konan) falkona alındı. Sonrasında hassas pipetaj yapılarak

hemen santifüj edildi. Santrifürüj sonunda falkon tabanında biriken hücrelere temas edilmeden medium pipetle çekildi. Hücre peleti üzerine tekrar 2 mL medium eklenerek ve nazikçe pipetaj yapılarak ikinci kez yıkama işlemi yapıldı. Santrifürüjden sonra hücrelerin üzerinde kalan medium tekrar çekildi. Anlatıldığı üzere çözdürülerek 2 yıkama ile hücrelerin dondurulması sırasında kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) maddesinden arındırılan hücreler flaska ekilmek üzere son defa 1 mL medium içinde çözüldü.

Hücreler dondurulup çözüldüklerinde strese girerler. Hücrelerin stresten daha kolay çıkarak tekrar kısa zamanda bölünme yeteneğine kavuşabilmesi için hücrelerin besiyerinin temel protein unsuru olan FBS oranı %15-20 oranında olmalıdır. Halbuki standart olarak kullanılan besiyerinin FBS oranı %10'dur. Bu nedenle mevcut olan besiyerinden belirli bir hacimde alınarak, üzerine enjektör filtresinden geçirilerek steril hale getirilen FBS eklenerek, besiyeri içindeki FBS oranının %20 olması sağlandı. İlk ekim için hazırlanan ve %20 FBS içeren 37°C'deki besiyeri 75cm²'lik flaska 10 mL hacminde eklenir. Bu şekilde ekim için hazır hale getirilen flaska, ekim için çözdürülerek DMSO'dan arındırılarak hazırlanan A549 hücreleri yavaşça eklendi. Ekimi yapılacak hücre sayısı 500-600 binden az ise hücreler eklendikten sonra, hücreler fazla ayrı düşmesin diye flask fazla sallanmaz. Çünkü hücrelerin birbirine yakın olması adherent hücre kültüründe özellikle hücre sayısının az olduğu durumlarda, hücre bölünmesini pozitif yönde etkiler. Hücre sayısının çok olması durumunda (özellikle de 1-2 milyondan fazla) ekim yapılan 75cm²'lik flask ekim sonrası kibarca sallanarak hücrelerin flask içine homojen dağılması sağlanabilir. Bu işlem hücrelerin daha kısa sürede konfluent olmasına katkı sağlar. Bununla birlikte çözdürülerek ekilmesi düşünülen hücre sayısı çok ise ilk pasaj iki tane 75 cm²'lik flaska da yapılabilir. 75cm²'lik flaska ekimi yapılan hücreler üremesi için 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Günlük olarak takibi yapılan hücrelerin besiyerleri, hücreler %80-90 konfluent oluncaya kadar, 2 günde bir değiştirilmiştir. 75cm²'lik flask istenen oranda konfluent olunca birkaç tane 75cm²'lik flaska pasajlanmıştır.

3.7.3 Sitotoksite ve Antikanserojen Etkinliğin Belirlenmesi

Sentezi gerçekleştirilen malzemelerin sitotoksite düzeyleri sağlıklı (HGF) hücre hatları kullanılarak, antikanserojen etkinlikleri ise kanser (A549 ve G361) hücreleri kullanılarak 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi ile belirlendi. MTT analizlerinde bitki ekstraktlarının yedi farklı (0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL 10 mg/mL) konsantrasyonu kullanıldı. Hücrelere uygulanan ekstraktlar her hücrenin kendisine uygun besiyerinde çözülerek hazırlandı ve MTT analizlerine geçildi.

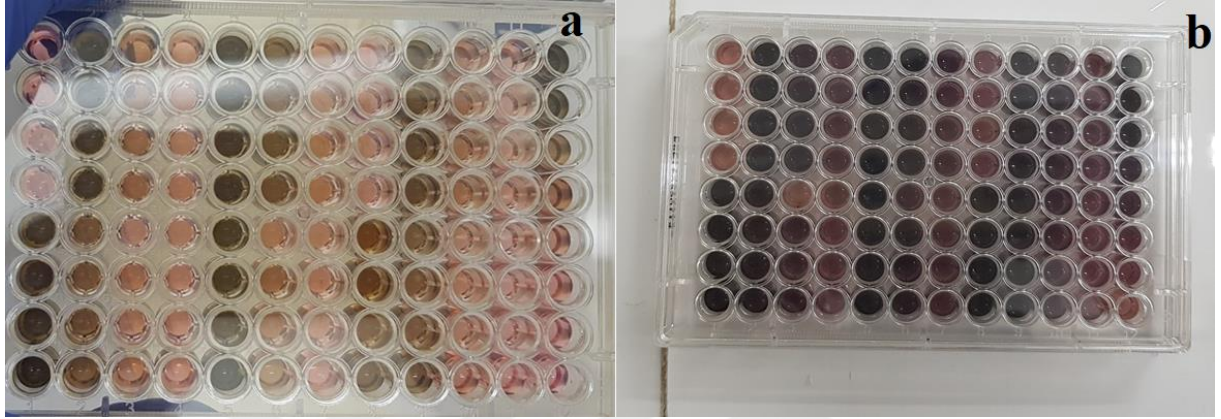
3.7.3.1 MTT Analizi

Hücre kültürü çalışmalarında bir aktif/toksik madde, ilaç veya ekstraktın hücre canlılığının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerin başında MTT yöntemi gelmektedir. MTT, pozitif yüklü bir bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir ancak indirgenme sonucu oluşan formazan, suda çözünmez niteliktedir ve dolayısıyla kristal şeklinde çökelmektedir. Canlı hücreler ilgili bileşikleri indirgeyip mor renkli formazana dönüştürerek renk değişimini gerçekleştirir. Renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlenir.

Sunulan çalışmada MTT analizlerini gerçekleştirmek amacıyla hücreler 96 kuyucuklu mikropate kültür kapları kullanıldı (Resim 3.3). Flasklarda yeterince çoğaltılan hücreler (HGF, A549 ve G361) her bir kuyucukta 10^4 hücre olacak şekilde mikro plate kaplarına ekildi. Her bir mikropate için well planı önceden yapıldı. Yirmidört saat sonra ekstraktların besiyeri içerisinde altı farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri önceden belirlenmiş kuyucuklara en az üç tekrarlı olacak şekilde ilave edildi. Bir gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa fosfat tamponu (pH= 7,4) içerisinde 5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan MTT çözeltisi (20 μ L) ilave edildi. Dört saat inkübatörde tutulan hücrelerin besiyerleri kuyucuk tabanında oluşan mor renkli formazan kristallerini etkilemeden aspire edildi. Her bir kuyucuğa 200 μ L DMSO eklenerek kuyucuk tabanında bulunan formazan kristallerinin çözünmesi

sağlandı. Son olarak her bir kuyucuğun absorbanısı 540 nm’de multiplate reader (Biotek, ELx800) ile ölçüldü. Herhangi bir madde ile uygulanmayan kontrol grubu wellerine ait hücre canlılığı % 100 kabul edilerek, her bir dozun hücre canlılığına etkisi aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı (Hazman vd. 2021).

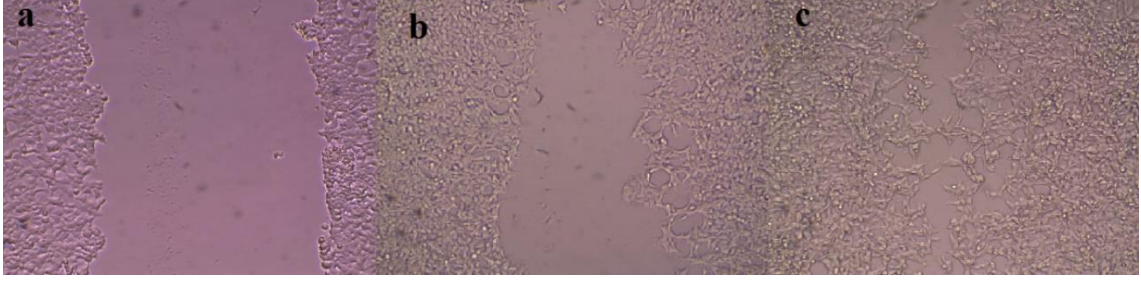
$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = [(\text{Numune Absorbansı}) / (\text{Kontrolün Absorbansı})] \times 100$$



Resim 3.2. A549 hücrelerinde MTT analizine ait görseller
a; Hücrelere ekstraktlar uygulandıktan 24 saat sonraki durum, b; MTT eklendikten, sonra durum

3.7 Bitki Ekstraktlarının Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan malzemelerin yara iyileşmesine etkisi, in-vitro hücre çiziği yara iyileşme testi kullanılarak değerlendirildi (Akdağ vd. 2024).. Yara iyileştirme modeli 24 kuyucuk doku kültürü kabı kullanılarak oluşturuldu. Her bir kuyucuk içerisine 800 µL besiyeri içerisinde 10^5 tane hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler kültür kabının tabanında konfülent (hücrelerin neredeyse boşluk kalmayacak şekilde tek tabaka halinde çoğalması) oluncaya kadar kültürlendi. Daha sonra her bir kuyucuk tabanındaki hücre tabakası üzerinde 200-µL’lik steril-plastik bir pipet ucu ile doğrusal çizik yapılarak yara modeli oluşturuldu (Şekil3.3).



Şekil 3.3. Hücre çizdiği yara modeli mikroskop görüntüleri, a; başlangıç (sıfırıncı saat), b; 24. Saat, c; 48.saat görüntüsü

Hücre çizdiği yöntemi ile yara modeli oluşturulduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Besiyeri kullanılarak kuyucuklar yıkandı. Ekstraktlar MTT analizleri ile sitotoksik olmadığı belirlenen en düşük (100 µg/mL) konsantrasyonda besiyeri içerisinde çözülerek hazırlandı. Sonrasında her bir numuneye ait 100 µg/mL konsantrasyonda aktif maddeler içinde 800 µL hacminde besiyerleri bulunan wellere eklendi. Kontrol kuyucuklarına ise aynı hacimde medium eklendi. Her bir mikro plate tabanında oluşturulan yara modellerinin görüntüleri alındı. Hücreler 24 saatliğine inkübatöre (Nüve EC 160) kaldırıldı. 24 saatin sonunda her bir kuyucuk tabanındaki yara modeli görüntüleri tekrar alındı. Çalışmalar en az üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. İnkübasyonlar sonunda elde edilen görüntüler imageJ yazılımı kullanılarak yara modelinin oluşumuna katılan hücrelerin kenarları konturlandı (hücre olmayan alanın sınırını belirleme) ve daha sonra piksellere dayalı olarak aradaki hücresiz alan (yara) miktarları % olarak hesaplandı. Sıfırıncı saat hücresiz alan miktarları ($Area_{t0}$) ve yirmidördüncü saat hücresiz alan miktarları ($Area_{t24}$) kullanılarak her bir çalışma grubundaki yara kapanma oranları (closure rate) miktarları aşağıda sunulan formül ile hesaplandı (Akdağ vd. 2024).

$$Sclosure\ rate = [(Area_{t0} - Area_{t24}) / Area_{t0}] \times 100$$

Çalışmada hücrelere uygulanan her bir malzemenin yara iyileştirme üzerine olası etkisi; kontrol grubu yara kapanma oranları ile diğer grupların yara kapanma oranları karşılaştırılarak açıklanmaya çalışıldı.

3.8 İstatistiksel Yöntem

Fitokimyasal içeriği belirlemeye yönelik gerçekleştirilen LC-MS/MS analizleri hariç, tezde gerçekleştirilen tüm analizler en az üç tekrarlı yapılmış olup, veriler “ortalama $\pm$ standart sapma” şeklinde ifade edildi. Elde edilen ham verilerin istatistiki değerlendirilmesinde SPSS20 paket programı kullanıldı. Deney grupları arasındaki istatistiki farklılıklar ANOVA testi ve Duncan post-testi ile saptandı.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Sunulan çalışma kapsamında *Hypericum heterophyllum*'a ait toprak üstü kısımlarının (Mix) ekstraktı, çiçek ve yaprak sulu ekstraktlarının fitokimyasal bileşenleri, toplam fenolik madde miktarları, oksidan/antioksidan özellikleri, antimikrobiyal, sitotoksik ve antikanserojen aktiviteleri ile yara iyileştirici etkinliği belirlendi. Elde edilen ham veriler kullanılarak yapılan istatistiki değerlendirmelerden elde edilen sonuçlar bu kısımda sunulmuştur.

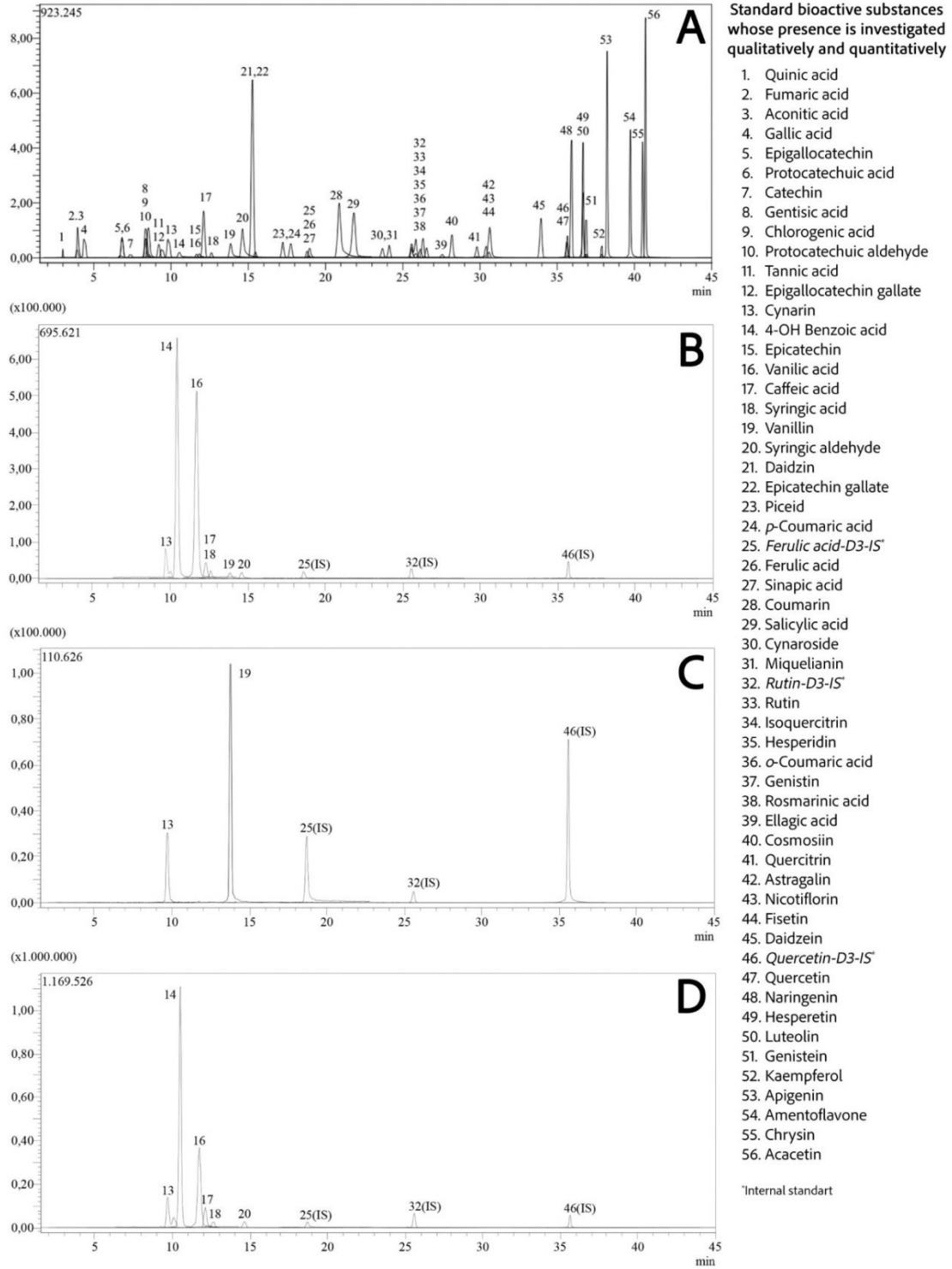
4.1 Ekstrakt Fitokimyasal Profilinin Değerlendirilmesi

Hypericum heterophyllum'un ekstraktlarının fitokimyasal bileşimleri LC-MS/MS sisteminde tespit edilmeye çalışılmıştır 53 biyoaktif önceden okunmuş ve sisteme tanımlanmış kromatogramları standart olarak kullanılmıştır. Sonrasında ekstraktların sistemde kalma süresi ve oluşturdıkları kromatogramlar kullanılarak, içerdikleri fenolik ve flavonoid bileşenlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de numunelere ait LC-MS/MS kromatogramları ise Şekil 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Ekstraktların içerisinde varlığı belirlenen bileşen maddeler ve konsantrasyonları

Standart No	Bileşen Türü*	HH _{Dal-Yaprak} (mg analit/g ekstrakt)	HH _{Çiçek} (mg analit/g ekstrakt)	HH _{Mix} (mg analit/g ekstrakt)
13	1,5-dikaffeoilquinik asit	2,098	1,137	2,465
14	4-OH Benzoic asit	95,603	N.D.	70,232
16	Vanilik asit	5,516	N.D.	6,579
17	Kaffeik asit	4,488	N.D.	6,508
18	Siringik asit	1,916	N.D.	1,231
19	Vanillin	0,211	0,367	N.D.
20	Siringic aldehid	4,097	N.D.	2,631

*Tabloda numunelerde varlığı/miktarı belirlenemeyen maddeler “not determined (N.D)” şeklinde ifade edilmiştir. Tabloda analizi gerçekleştirilen fakat verilmeyen 45 standart maddenin ekstraktlar içerisinde bulunmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. *Hypericum heterophyllum*’a ait ekstraktlara ait LC-MS/MS kromotogramları, A; Standart kromatogram, B; HH_{Dal-Yaprak}, C; HH_{Çiçek}, D; HH_{Mix} ekstraktına ait kromotogram

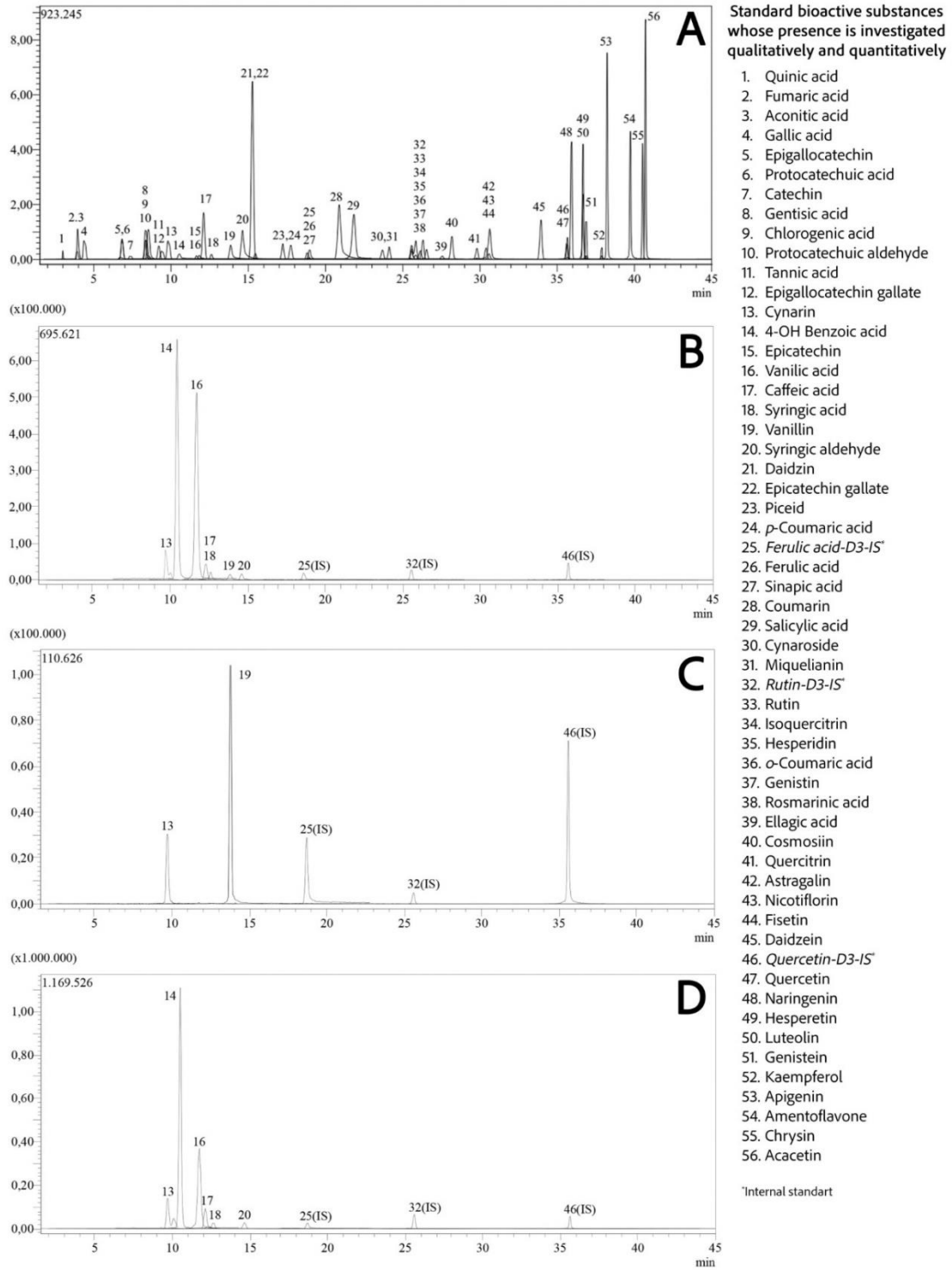
Analizde, ekstraktların içeriğinde varlığı kalitatif ve kantitatif taranan standartlardan HH_{mix} örneğinde 6, HH_{çiçek} 2, HH_{dal-yaprak} örneğinde ise 7 bileşenin varlığı saptandı. HH_{mix} ekstraktında; **4-OH benzoik asit** (2,465 mg/g ekstrakt), **vanilik asit** (6,579 mg/g ekstrakt), **kaffeik asit** (6,508 mg/g ekstrakt), **sirinjik asit** (**1,231** mg/g ekstrakt), **sirinjik aldehit** (**2,631** mg/g ekstrakt), 1,5-dikaffeoilkuinik asit (2,465 mg/g ekstrakt) tespit edildi. HH_{çiçek} ekstraktında; 5-dikaffeoilkuinik asit (1,137 mg/g ekstrakt), Vanilin (0,367 mg/g ekstrakt) varlığı belirlendi. HH_{dal-yaprak} ekstraktında ise 5-dikaffeoilkuinik asit (2,098 mg/g ekstrakt), Vanillin (0,211 mg/g ekstrakt), Kaffeik asit (4,438 mg/g ekstrakt), 4-OH Benzoik asit (95,603 mg/g ekstrakt), Sirinjik asit (1,916 mg/g ekstrakt), Sirinjik aldehit (4,097 mg/g ekstrakt), Vanilik asit (5,516 mg/g ekstrakt), varlığı tespit edildi. Literatür incelendiğinde *Hypericum* türlerinin kimyasal bileşiminde hiperisin, psödohiperisin ve bunların prekürsörleri olan protohiperisin ve protopsödohiperisin, hiperforin, adhiperforin ve bunların oksijenli türevleri, ksantonlar, flavonoidler (rutin, hiperosit, kersitrin, izokersitrin), biflavonoidler, tanenler, proantosiyanidinler, fenolik asitler ve uçucu yağlar bulunabilmektedir (Ernst 2003). *Hypericum heterophyllum* türünün bileşenlerinin analiz edildiği bir çalışmada ise aseton ve metanol ekstraktlarında metanol ekstraktında en yüksek miktarda bulunan beş bileşenin; Kuinik Asit (56,430 mg/g ekstrakt), Klorojenik asit (38,948 mg/g ekstrakt), Fumarik asit (26,156 mg/g ekstrakt), Mikuelianin (18,551 mg/g ekstrakt) ve Isokuarsitrin (10,289 mg/g ekstrakt) olduğu belirlenmiştir. Aseton ekstresi ise Mikuelianin (24,601 mg/g ekstrakt), Kuinik Asit (20,064 mg/g ekstrakt), Klorojenik asit (20,005 mg/g ekstrakt), Isokuarsitrin (16,582 mg/g ekstrakt) ve Fumarik asit (3,271 mg/g ekstrakt) bileşenlerini yüksek oranda içerdiği ifade edilmektedir (Hazman vd. 2022). Sunulan çalışmada ise *Hypericum Heterophyllum* sulu ekstraktları incelenmiş olup, ekstrakt içeriklerinde bileşen çeşitliliğinin daha az olduğu gözlenmiştir. Bu durum *Hypericum Heterophyllum* içeriğinde bulunan analizi yapılan bileşenlerin asetu/metanolda suya oranla daha iyi çözünmüş olabilebileceğini akla getirmektedir.

Ekstraktlar içerisinde miktarları belirlenen 5-dikaffeoilkuinik asit (Gray vd. 2014, Sharopov vd. 2020), vanillin (Dhanalakshmi vd. 2015, Wang vd. 2024, Kumar vd. 2023), kaffeik asit (Yamada vd. 1996), 4-OH benzoik asit (Pugazhendhi vd. 2005, El-Zawawy vd. 2022), sirinjik asit (Itoh vd. 2009), sirinjik aldehit (Shahzad vd. 2020),

Vanilic acid (Itoh vd. 2009) bioaktif maddelerinin farklı biyolojik özellikleri literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında *Hypericum heterophyllum* 'un halk tarafından geleneksel olarak kullanılmasının sebebi ile türün içerdiği bileşenlerin olası yararlı farmakolojik etkileri arasında sıkı bir ilişki kurulabilir.

Toksisitesi düşük olan ve antioksidan etkileri ile ön plana çıkan 4-OH Benzoik asidin HH_{Dal-Yaprak} ekstraktında %9,56 oranında, HH_{Dal-Yaprak} ekstraktında ise %7 oranında bulunduğu görülmektedir. Bu veri *Hypericum heterophyllum* 'un 4-OH Benzoik asit (*p*-hidroksibenzoik asit) için doğal kaynak olarak kullanılabileceğini akla getirmektedir. 4-OH Benzoic acid, hem doğal hem de sentetik olarak elde edilebilen organik bir kimyasaldır. Antimikrobiyal, antialg, antimutajenik, antiöstrojenik, hipoglisemik, antiinflamatuvar, antitrombosit agregasyonu, nematisidal, antiviral, antioksidan vb. gibi çeşitli biyolojik/farmakolojik etkileri bulunmaktadır. Ayrıca birçok ilaç, kozmetik ürün, ilaç, yiyecek ve içecekte koruyucu olarak kullanıldığı da bildirilmektedir (Manuja vd. 2013). Bu sebeple yüksek oranda 4-OH Benzoik asit içeren bitki türlerinden doğal ve saf olarak elde edilen 4-OH Benzoik asit, çoğunlukla kozmetik ve ilaç sektöründe sentetik olan versiyonlarına göre daha çok tercih edilmektedir. *Hypericum heterophyllum* 'dan 4-OH Benzoik asitin yüksek verimle saf olarak elde edilebilmesi konusunda ileri çalışmalar yapılması, bu bağlamda *Hypericum heterophyllum* 'un ekonomik katkı potansiyelini anlamamıza yardımcı olabilir.

Bununla beraber 4-OH Benzoik asit ile yapılan çalışmalar 4-OH Benzoik asidin östrojen agonisti gibi davranarak fitoöstrojenik etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir (Lemini vd. 1997). Bu durumda *Hypericum heterophyllum* kullanımının meme kanseri olan kişiler için risk oluşturabileceğini de akla getirmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda (Pugazhendhi vd. 2005) 4-OH Benzoik asidin meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu artırabileceği ifade edilmektedir.



Şekil 4.2. *Hypericum heterophyllum* 'a ait ekstraktlara ait LC-MS/MS kromotogramları

Hypericum heterophyllum'a ait toprak üstü kısımlarının (Mix) ekstraktı, çiçek ve yaprak sulu ekstraktlarının oksidan/antioksidan özellikleri, toplam fenolik madde miktarları ile yara iyileştirici etkinliği belirlendi. Elde edilen ham veriler kullanılarak yapılan istatistiki değerlendirmelerden elde edilen sonuçlar bu kısımda sunulmuştur.

4.2 Çalışmada kullanılan ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi

Hypericum heterophyllum'a ait ekstraktların (HH_{mix}, HH_{çiçek} ve HH_{dal-yaprak}) total fenolik madde miktarlarını kıyas yapabilmek amacıyla, 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan fenolik bir antioksidan olduğu bilinen kafeik asit çözeltisinde toplam fenolik madde miktarı da eş zamanlı yapıldı. *Hypericum heterophyllum*'a ait toprak üstü kısımları (Mix), çiçek ve yaprak sulu ekstraktlarının total fenolik madde miktarları incelendiğinde ise ufak farklılıklar olsa da üç ekstraktın total fenolik madde miktarları arasında herhangi bir istatistiki farklılık olmadığı belirlendi. Ekstraktların yaklaşık olarak %10-11,5 aralığında total fenolik içeriğe sahip olduğu görüldü. Çalışmamızda ekstraktlar içerisinde varlığı ve miktarları belirlenen bileşiklerden syringic aldehit ve vanillin fenolik aldehit yapısında iken diğerleri fenolik asit (5-dikafeoilquinik asit, Kafeik asit, 4-OH Benzoik asit, Sirinjik asit, Vanilik asit) yapısındadır. Kontrol ve kıyaslama amacıyla analizi gerçekleştirilen kafeik asitin fenolik madde içeriği ise 968,07±77,87 µg Gallic Asit Ekiivalent'e eşit olduğu bulundu (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan ekstraktların total fenolik madde düzeyleri

Deney grupları	Total Fenolik Madde Miktarı (µg Gallic Acid Ekiivalent / mg-extract)
HH _{mix}	115,21±3,78 ^a
HH _{çiçek}	99,97±3,59 ^a
HH _{dal-yaprak}	108,31±4,06 ^a
Kafeik asit	968,07±77,87 ^b
P	0,000

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (n≥3).

^{a, b} : Aynı sütunda ortak üst simgeyi taşımayan veriler (deney grupları) arasında istatistiki fark bulunmaktadır (p < 0.05).

Veriler incelendiğinde en yüksek antioksidan kapasiteye çiçek ekstraktının sahip olduğu, Mix ekstraktının ise TAS düzeylerinin daha düşük olduğu tespit edildi. Yaprak ekstraktının TAS düzeyleri en düşük bulunurken buna karşın TOS düzeyleri en yüksek çıktı. Mix ve çiçek ekstraktlarının TOS düzeyleri arasında ise istatistiki bir fark olmadığı belirlendi. OSI düzeyleri incelendiğinde Mix ve çiçek ekstraktlarına ait OSI değerlerinin birbirine yakın, yaprak ekstraktının OSI düzeylerinin ise istatistik düzeyde farklı olacak şekilde düşük olduğu görüldü (Çizelge 4.2).

Literatürde farklı *Hypericum* türleri ile yapılan çalışmalarda total fenolik madde içeriğinin kullanılan türe, çözücünün cinsine ve yöntemine göre değişebileceği belirtilmektedir. 30 farklı *Hypericum* türünün incelendiği bir çalışmada (Pilepić, vd. 2013), incelenen örneklerdeki toplam fenolik asit içeriğinin %1.1-10.4 arasında olduğu *H. perforatum* örneklerinin en yüksek fenolik asit miktarını (%10.4 ve %10.2) içerdiği, buna karşın *H. linariifolium* örneğinin en düşük fenolik asit miktarına (%1.1) sahip olduğu belirtilmektedir. Bu veriler ile çalışmamızda elde edilen veriler kıyaslanırsa *Hypericum heterophyllum*'un da fenolik madde içeriğinin yüksek olduğu söylenebilir. Çalışma grubumuz tarafından *Hypericum heterophyllum* kullanılarak hazırlanan aseton ve metanol ekstraktlarının da total fenolik madde içeriği %10'nun üzerinde (aseton ekstraktı %10,2, metanol ekstraktı %13) bulunduğu belirtilmektedir (Hazman vd. 2022). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda hazırlanan *Hypericum heterophyllum* sulu ekstraktların metanol ekstraktında daha az miktarda fenolik içeriğe sahip olduğu değerlendirilebilir.

4.3 Oksidan/Antioksidan Özelliklerin Değerlendirilmesi

Sunulan çalışmada türe ait ekstraktların oksidan/antioksidan etkinliğini açıklayabilmek adına analizi gerçekleştirilen TAS, TOS düzeyleri ve hesaplanan OSI seviyeleri Çizelge 4. 2'de sunulmuştur. Veriler incelendiğinde en yüksek antioksidan kapasiteye çiçek ekstraktının sahip olduğu, Mix ekstraktının ise TAS düzeylerinin daha düşük olduğu tespit edildi. Yaprak ekstraktının TAS düzeyleri en düşük bulunurken buna karşın TOS düzeyleri en yüksek çıktı. Mix ve çiçek ekstraktlarının TOS düzeyleri arasında ise istatistiki bir fark olmadığı belirlendi. OSI düzeyleri incelendiğinde Mix ve çiçek

ekstraktlarına ait OSI değerlerinin birbirine yakın, yaprak ekstraktının OSI düzeylerinin ise istatistik düzeyde farklı olacak şekilde düşük olduğu görüldü (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan ekstraktların TAS, TOS ve OSI düzeyleri

Deney Grupları	Analizi gerçekleştirilen parametre		
	TAS (mmol Trolox Equivalent /L)	TOS (μ mol H ₂ O ₂ Equivalent / L)	OSI (Arbitrary unit)
HH _{mix} ekstraktı	1,52 $\pm$ 0,08 ^b	21,07 $\pm$ 3,07 ^a	13,91 $\pm$ 2,55 ^a
HH _{çiçek} ekstraktı	1,87 $\pm$ 0,04 ^c	21,17 $\pm$ 3,99 ^a	11,29 $\pm$ 2,33 ^a
HH _{dal-yaprak} ekstraktı	0,93 $\pm$ 0,17 ^a	35,80 $\pm$ 7,13 ^b	40,42 $\pm$ 14,97 ^b
P	0,000	0,018	0,013

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir (n $\geq$ 3).

a, b, c : Aynı sütunda ortak üst simgeyi taşımayan veriler (deney grupları) arasında istatistiki fark bulunmaktadır (p < 0.05).

Bulgaristan coğrafyasında toplanan 13 farklı *Hypericum* türüne ait metanolik ekstraktların antioksidan özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, analiz edilen türlerin DPPH inhibisyonunu %32-78 aralığında farklı oranlarda sağladığı, en yüksek etkiyi ise *Hypericum perforatum* türünün gösterdiği belirtilmektedir. ABTS radikali ile yapılan analizlerde ise inhibisyon düzeylerinin %32-90 arasında olduğu en yüksek antioksidan etkiyi ise *Hypericum cerstoides* türünün gösterdiği belirtilmektedir (Zheleva-Dimitrova vd. 2010). *Hypericum heterophyllum* aseton ve metanol ekstraktları kullanılarak yapılan çalışmalarda da, *Hypericum heterophyllum*'un DPPH, ABTS, hidroksil ve süperoksit radikallerini süpürücü aktivite göstermeleri nedeniyle güçlü bir antioksidatif etki gösterebileceği ifade edilmektedir (Yaman vd. 2024).

Bizim çalışmamızda antioksidan aktivite belirlenirken E vitamininin suda çözünebilen bir analogu olan Troloks eşdeğeri kullanılmıştır. Troloks eşdeğeri kullanılan çalışmalardan birisi olan ve onbir farklı *Hypericum* türü ile yapılan bir çalışmada ise *Hypericum* türlerinin 0,57-3,5 mmolTroloks-Equivalent düzeyinde antioksidan aktiviteye sahip olabileceği, en yüksek antioksidan aktivitenin ise *H. androsaemum*'a ait

olduğu belirlenmiştir (Napoli vd. 2018). *Hypericum heterophyllum* aseton ve metanol ekstraktları ile yapılan başka bir çalışmada ise metanolik ekstraktın total antioksidan kapasitesi 0,79 mmol Troloks-Equivalent/L, aseton ekstraktının antioksidan kapasitesi 0,47 mmol Troloks-Equivalent/L bulunduğu (Hazman vd. 2022) rapor edilmektedir. Sunulan tez çalışmasında *Hypericum heterophyllum* metanol gibi polar yapıda olan su çözücü olarak kullanılarak ekstraktlar hazırlanmış olup, TAS düzeylerinin (yaklaşık olarak 0,93-1,52 mmol Troloks-Equivalent/L aralığında) literatürde belirtilen oranlara yakın ama yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3).

Ekstraktların oksidan aktiviteyi değerlendirilirse; HH_{Mix} ve HH_{Çiçek} ekstraktı TOS düzeylerinin birbirine yakın ve düşük olduğu belirlendi. HH_{dal-yaprak} ekstraktı TOS düzeylerinin ise daha yüksek çıktığı görüldü. TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranlanması ile belirlenen OSİ seviyelerinde ise HH_{dal-yaprak} ekstraktında en yüksek çıktığı görüldü. TAS düzeyi düşük, TOS düzeyi ise yüksek olan HH_{dal-yaprak} ekstraktının OSİ düzeylerinin yüksek çıkması olağandır. Öyleki HH_{mix}, ekstraktı OSİ seviyesi 13,91±2,55 AU, HH_{çiçek} ekstraktı OSİ düzeyi 11,29±2,33 AU iken, HH_{dal-yaprak} OSİ düzeyleri (40,42±14,97 AU) istatistiki olarak diğer gruplardan yüksek ve farklı çıktığı görülmektedir (Çizelge 4.3). Bu veriler HH_{dal-yaprak} kstraktı içeriğinde diğer ekstraktlardan farklı olarak oksidan etkiler gösterebilecek bazı bioaktif madde içeriğinin fazla olabileceğine işaret etmektedir. Oksidan aktivitesi yüksek olan biyoaktif bileşenler içeren maddelerin antimikrobiyal/antikanserojenik gibi farmakolojik etkileri olabileceği de düşünülebilir.

4.4 Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

Hypericum heterophyllum ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği belirlenirken hem disk difüzyon yöntemi hem de MIC yöntemi kullanıldı. Analizlerde karşılaştırma yapmak amacıyla pozitif kontrol olarak *Gentamicin 10 mg* (Oxoid) ve *Erythromycin 15 mg* (Oxoid) antibiyotikleri kullanıldı. Disk difüzyon yönteminde her bir ekstrakta ait üç farklı dilüsyon (%0,125, %0,25 ve %0,5) ve antibiyotik için belirlenen inhibisyon zon çapları Çizelge 4.4'de sunulmuştur. Çalışmada kontrol amacıyla kullanılan CN10 (*Gentamicin 10 mg*) ve E15 (*Erythromycin 15 mg*) antibiyotiklerine ait inhibisyon zon

Çapları incelendiğinde, farklı oranlarda inhibisyon oranlarının tüm mikroorganizmalarda görölmesi, disk difüzyon yöntemiyle oluşturulan antimikrobiyal aktivite belirleme analiz modelimizin doğru bir şekilde çalıştığını göstermektedir.

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan ekstraktların disk difüzyon yöntemine göre antimikrobiyal etkinliğı

Grup	Konsantrasyon	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C.albicans</i>
HH_{mix},	%0,5	0	9,333±0,56	8,667±0,57
	%0,25	0	8,667±0,58	0
	%0,125	0	0	0
HH_{iek}	%0,5	12,667±2,25	10,333±0,57	8,667±0,58
	%0,25	10±1,00	0	0
	%0,125	0	0	0
HH_{dal-yaprak}	%0,5	10±1,00	8,667±0,56	8,667±0,58
	%0,25	9,667±0,58	0	0
	%0,125	0	0	0
E15		12,333±0,58	20,333±0,58	23,333±0,56
CN10		13,667±0,57	16,667±1,15	15,667±0,58

Farklı konsantrasyonlarda (dilüsyonlarda) hazırlanarak mikroorganizmalara uygulanan *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarına ait veriler incelendiğinde, düşük dilüsyon (%0,125) oranında uygulanan ekstraktların çalışmada kullanılan (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*) mikroorganizmaların hiçbirisinde inhibisyona neden olmadığı belirlenmiştir. Başka bir ifade ile düşük konsantrasyondaki (%0,125 dilüsyon oranındaki) ekstraktların herhangi bir antimikrobiyal aktivitesi olmadığı söylenebilir.

HH_{mix}, ekstraktının hiçbir dozu *E. Coli* suşuna karşı bir antimikrobiyal aktivite göstermezken, yüksek dozda hem *S. aureus* hem de *C.albicans* suşuna karşı antimikrobiyal etki gösterdiği, ama bu etkinin antibiyotiklere oranla düşük kaldığı belirlendi. HH_{iek} ekstraktına ait orta ve yüksek dozlardaki uygulamaları *E. Coli* suşuna karşı antibiyotiklere yakın oranlarda antimikrobiyal etkili olabileceğı görüldü. HH_{iek} ekstraktı *S. aureus* hem de *C.albicans* suşlarına orta dozda (%0,25 dilüsyonda) herhangi bir etkisi gözlenmez iken yüksek dozda (%0,5 dilüsyonda) antibiyotiklere oranla düşük düzeyde antimikrobiyal etkili olabileceğı belirlendi. HH_{dal-yaprak} ekstraktının ise orta dozda *E. Coli*’ye karşı, yüksek dozda ise hem *S. aureus* hem de *C.albicans* suşuna karşı antimikrobiyal etki gösterdiği söylenebilir. Bu veriler ekstraktların özellikle %0,5 ve

üzeri dilüsyon oranlarında antimikrobiyal aktivitesinin güçlü olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmada kullanılan ekstraktların Minimum inhibitory concentration (MIC) düzeyleri belirlenirken her bir ekstraktın üç farklı konsantrasyonu (1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5’ de sunulmuştur. Çalışmada kontrol amacıyla kullanılan CN10 (*Gentamicin 10 mg*) ve E15 (*Erythromycin 15 mg*) antibiyotiklerin çalışmada kullanılan *E. coli*, *S. aureus*, *C.albicans* suşlarının üçünüde inhibe ettiği belirlendi. Ne antibiyotik nede ekstrakt eklenmeden sadece mikroorganizmaların eklendiği tüplerde ise üremenin maksimum olduğu görüldü. Bu veriler MIC seviyelerini belirlemek üzere oluşturulan modelin çalıştığını göstermektedir.

Çizelge 4.5. Çalışmada Kullanılan ekstraktların MIC sonuçları

Grup	Konsantrasyon	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
HH_{mix},	5 mg/ml	+	+	+
	2,5 mg/ml	+	+	+
	1,25 mg/ml	+	+	+
HH_{çiçek}	5 mg/ml	+	+	+
	2,5 mg/ml	+	+	+
	1,25 mg/ml	+	+	-
HH_{dal-yaprak}	5 mg/ml	+	+	+
	2,5 mg/ml	+	+	-
	1,25 mg/ml	-	+	-
E15		+	+	+
CN10		+	+	+

Hypericum heterophyllum’ ya ait 5 mg/mL konsantrasyonunda ekstratlar eklendiğinde tüm ekstratların *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* suşlarının üçünü de inhibe edebildiği belirlendi. 2,5 mg/mL konsantrasyonunda dal, yaprak ekstraktının sadece *C.albicans* suşu üzerinde antimikrobiyal etki göstermediği gözlemlendi. 1,25 mg/mL konsantrasyonunda çiçek ekstraktının *C.albicans* suşu üzerinde dal, yaprak ekstraktında ise *E. Coli*, *C.albicans* suşları üzerinde anti mikrobial etkinlik göstermediği belirlendi. Bu bilgiler ışığına çalışmada kullanılan her bir ekstraktın MIC değerleri Çizelge 4.6’ da özetlenmiştir

Çizelge 4.6. Ekstraktlara ait MIC düzeyleri

	Uygulama yapılan mikroorganizmalara ait MİC değerleri		
	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
HH _{mix}	>5mg/mL	>5mg/mL	>5mg/mL
HH _{çiçek}	>5mg/mL	>5mg/mL	2,5 mg/mL
HH _{dal-yaprak}	2,5 mg/mL	>5mg/mL	5mg/mL

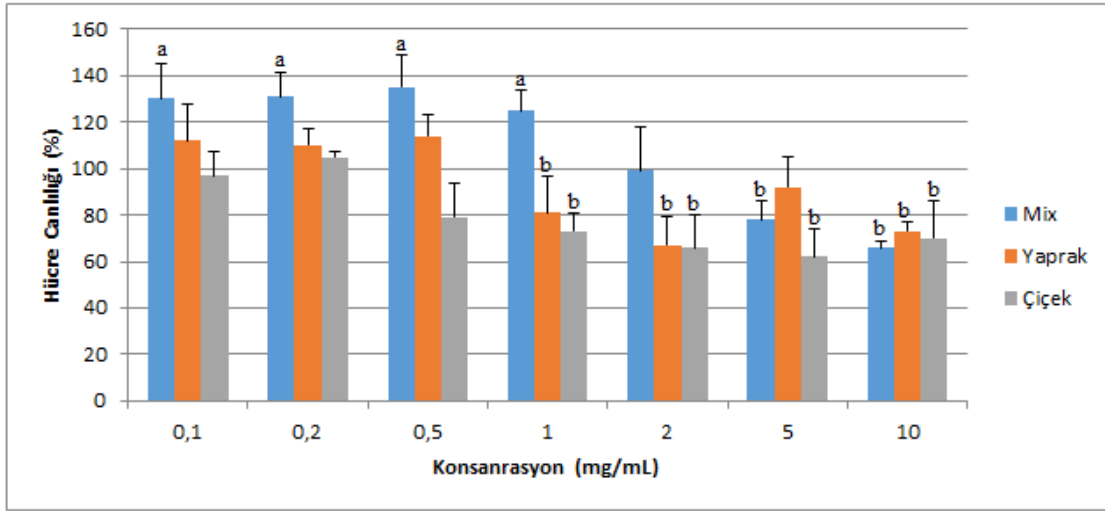
Çizelge 4.6’da görüldüğü üzere, HH_{mix}, ekstraktının *E. coli*, *S. aureus*, *C.albicans* suşlarına karşı MİC değerinin 5 mg/mL’den daha fazla (>5mg/mL) olduğu tespit edildi. HH_{çiçek} ekstraktının *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı MİC değerinin 5 mg/mL’den daha fazla (>5mg/mL), *C.albicans* suşu için ise 2,5 mg/mL olduğu belirlendi. HH_{dal-yaprak} ekstraktının MİC değerlerinin ise *E. coli* için 2,5 mg/mL, *S. aureus* için 5 mg/mL ve *C.albicans* 5 mg/mL’den daha fazla (>5mg/mL) olduğu görüldü.

Bu veriler ışığında *Hypericum heterophyllum* ekstraktların antifungal aktivitesinin daha yüksek olduğu söylenebilir. *Hypericum heterophyllum* türünün çiçeklenme dönemi başlangıcı ve çiçeklenme dönemi içerisinde toplanan bitkilerden alkolle hazırlanan ekstraktları ile yapılan bir çalışmada (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*) ve iki *Candida* türü (*Candida albicans* ve *Candida tropicalis*) kullanılarak antimikrobiyal etkinliği test edilmiş ve ekstraktın *Staphylococcus aureus*’a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Eruygur vd. 2024). Başka bir çalışmada ise *Hypericum heterophyllum* ve Türk geleneksel tıbbında çeşitli hastalıklara karşı ilaç olarak kullanılan 25 bitkinin kloroform, aseton, etanol ve su özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri, 10 patojenik bakteri ve bir mantara (*Candida albicans*) karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak bir araştırma (Ünal vd. 2008) kapsamında test edilmiştir. Test edilen bitki türleri arasında *Ziziphora clinopodioides* Lam (Labiatae), *Thymus fallax* Fisch et Mey. (Labiatae) ve üç *Hypericum* (*H. heterophyllum* Vent., *H. hyssopifolium* Chaix. subsp. *elongatum* (Ledeb.) Woron var. *elongatum* ve *H. scabrum* L.) türünün daha geniş bir spektrumda antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmektedir. *H. heterophyllum* Vent türüne ekstraktların *B. megaterium*, *B. Subtilis*, *E. coli*, *E. cloacae*; *K. Pneumonia*, *P. Mirabilis*, *P. Vulgaris*, *S. enteritidis*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *C. albicans* suşlarına

karşı antimikrobiyal etkinliği kıyaslandığında ise; *B. Megaterium* suşuna karşı kloroform, aseton ve etanol ekstraktlarının, *K. Pneumonia* suşuna karşı etanol ekstraktının, *P. Vulgaris* suşuna karşı kloroform ve aseton ekstraktının, *S. aureus* suşuna karşı ise etanol ekstraktının antibakteriyel etkili olduğu, *C. albicans* suşuna karşı hiçbir ekstraktın antifungal aktivite göstermediği ifade edilmektedir (Ünal vd. 2008). Bu veriler ile çalışmamızdan elde edilen veriler arasında farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu farklılıkların sebepleri, *H. heterophyllum* ekstraktı hazırlanırken kullanılan çözücü/yöntemlerin veya uygulanan konsantrasyonların farklı olmasıyla izah edilebilir.

4.5 *Hypericum heterophyllum*’a ait ekstraktların sitotoksik ve antikanserojenik etkinliğinin değerlendirilmesi

Hypericum heterophyllum ekstraktlarının sitotoksik düzeyleri sağlıklı bir hücre olan HGF hücreleri kullanılarak, antikanserojenik etkinliği ise kanser hücreleri olan A549 ve G361 hücreleri kullanılarak incelendi. *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının (HH_{mix}, HH_{çiçek} ve HH_{dal-yaprak}) HGF hücrelerinde sitotoksik düzeyleri Şekil 4.2’te sunulmuştur. Veriler incelendiğinde, *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının HGF hücrelerinde sitotoksitesinin düşük olduğu söylenebilir. Çünkü her üç ekstrakt için de sitotoksik doz 0,5 mg/mL konsantrasyonunun üzerindedir. Çalışmamızda kullanılan üç ekstrakt karşılaştırılacak olursa, HH_{mix} ekstraktının sitotoksitesinin en az olduğu söylenebilir. Çünkü HH_{mix} ekstraktının sitotoksik dozu 5 mg/mL iken, HH_{çiçek} ve HH_{dal-yaprak} ekstraktlarının sitotoksitesinin 1 mg/mL de başladığı belirlendi. Ayrıca HH_{mix} ekstraktının 0,1-1 mg/mL konsantrasyonlarda HGF hücre poliferasyonunu artırdığı görüldü (Şekil 4.2).



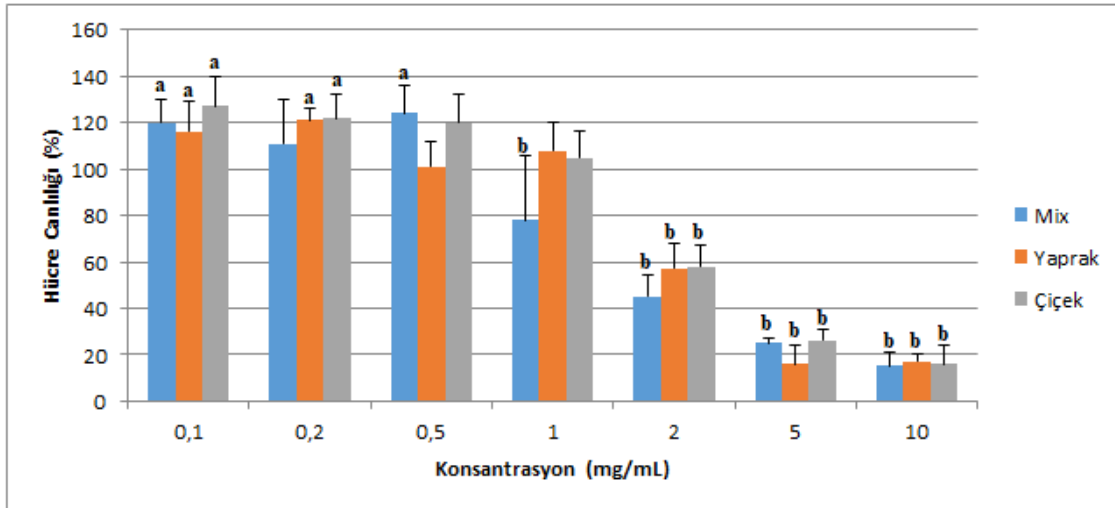
Şekil 4.2. *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının (HH_{mix}, HH_{çiçek} ve HH_{dal-yaprak}) HGF hücrelerinde sitotoksité düzeyleri

Veriler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir (n≥3). ^a; kontrol grubuna göre % hücre canlılığını istatistiki düzeyde artıran konsantrasyonu, ^b; kontrol grubuna göre % hücre canlılığını istatistiki düzeyde azaltan konsantrasyonu ifade eder (p<0.05).

Literatür incelendiğinde *Hypericum heterophyllum* ekstraktları kullanılarak sağlıklı hücrelerle henüz bir çalışma yapılmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte diğer *Hypericum* türleri, özellikle de *Hypericum perforatum* ekstraktları ile çok sayıda çalışma yapıldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda düşük dozlarda *Hypericum* ekstraktı uygulamalarını fibroblast hücrelerinde fibroblast migrasyonu ve kollojen sentezini uyarak proliferasyonu artırabileceği böylelikle yara iyileşmesine katkı sunabileceği rapor edilmektedir (Dikmen vd. 2011). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda kullanılan HGF hücrelerindeki proliferatif etkileri gözlenen HH_{mix} ekstraktının yara iyileştirici etkinliği olabileceğinden söz edilebilir. *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının yara iyileştirme potansiyelleri bir sonraki başlıkta ele alınacaktır.

Hypericum heterophyllum yöresel olarak (Afyonkarahisar yöresi) yara çiçeği olarak adlandırılmaktadır. Bu sebeple *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan hücre hatlarından birisi olarak G-361 melanoma hücreleri (cilt kanseri hücre hattı) tercih edilmiştir. Sitotoksik etkilerin belirlenmesinde kullanılan ikinci hücre hattı ise A549 hücreleridir. G-361 hücreleri ile yapılan analizler sonucunda *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının 0,1-0,5 mg/mL konsantrasyon aralığındaki dozlarda proliferasyonu artırabileceği görüldü. Sitotoksik aktivitenin ise

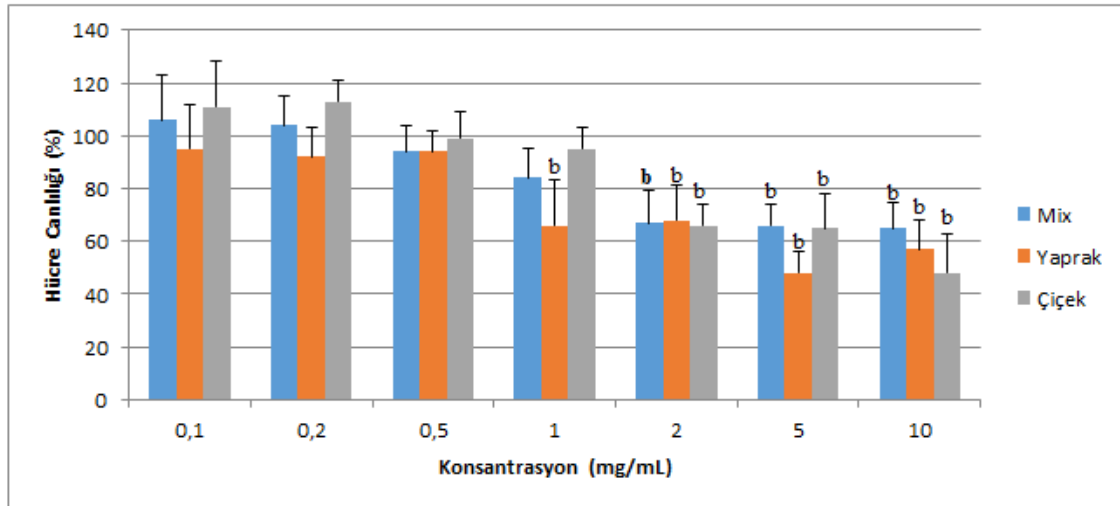
HH_{mix} için 1 mg/mL, diğer ekstraktlar için 2 mg/mL konsantrasyonda başladığı belirlendi (Şekil 4.3). Sitotoksik dozların yüksek (>1 mg/mL) olduğu göz önünde bulundurulursa, G361 hücreleri için *Hypericum heterophyllum* sulu ekstraktlarının antikanserojenik aktivite göstermekten uzak olduğu söylenebilir. Bu sebeple G-361 hücrelerinin temsil ettiği melanom türlerinin tedavisi sırasında kullanılmamalıdır. *Hypericum heterophyllum* ve G361 hücreleri kullanılarak yapılan herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılamamıştır. Diğer *Hypericum* türlerinin G361 hücrelerine etkisini araştıran çalışmalar da sınırlı sayıdadır. G-361, epitel morfolojiye sahip melanoma (cilt kanseri) hücre hattıdır. Sarı kantaron olarak bilinen *Hypericum perforatum* ve diğer *Hypericum* türlerinin en sık raslanan kullanım alanları arasında yara iyileşmesi ve dermatolojik rahatsızlıklar olduğu düşünülürse, cilt kanserine olası etkilerinin de araştırılması önemli olabilir.



Şekil 4.3. G361 hücrelerinde *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının sitotoksikite düzeyleri

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) hücrelerine *Hypericum heterophyllum* sulu ekstraktlarının etkileri incelendiğinde, 0,1-0,5 mg/mL konsantrasyonda hiçbir ekstraktın sitotoksik/proliferatif etkili olmadığı görülmektedir (Şekil 4.4). Bu veri akciğer kanserine yakalanan kişiler için türe ait sulu ekstraktların düşük konsantrasyonlarda güvenilir olabileceğini düşündürmektedir. A549 hücrelerinde türe ait kullanılan ekstraktların sitotoksikite düzeyleri karşılaştırıldığında HH_{dal-yaprak} ekstraktının sitotoksik etkisinin en yüksek olduğu belirlendi. Çünkü HH_{dal-yaprak} ekstraktı

sitotoksitesi 1 mg/mL konsantrasyonda başlarken, diğer (HH_{çiçek} ve HH_{mix}) ekstraktların sitotoksitesinin daha yüksek konsantrasyonlarda başladığı tespit edildi. Literatürde *Hypericum heterophyllum* ekstraktları ve A549 hücreleri kullanılarak yapılarak herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bununla beraber diğer *Hypericum* türleri ve A549 hücreleri kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. *Hypericum* türleri arasında en çok bilineni ve geleneksel tıpta en çok kullanılan tür olan *Hypericum perforatum* çiçekleri ve dal-yaprak kısımları kullanılarak hazırlanan metanol, etil asetat ve hekzan ekstraktlarının antikanserojenik etkinliği A549 hücrelerinde araştırılmıştır (Matić, vd. 2021). Çalışmada ekstraktların A549 için geçerli IC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiştir. Toksisitesi en düşük bulunan metanol dal-yaprak ekstraktının IC₅₀ konsantrasyonu 200 µg/mL üzerinde bulunurken, diğer ekstraktların IC₅₀ konsantrasyonları 20-100 µg/mL arasında olduğu belirtilmektedir. Özellikle çiçeklere ait etil asetat (20,2 µg/mL) ve hekzan (23,5 µg/mL) ekstraktlarının IC₅₀ değerinin çok düşük olduğu, bu sebeple A549 hücreleri için antikanserojenik etkileri olabileceği rapor edilmiştir.



Şekil 4.4. A549 hücrelerinde *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının sitotoksite düzeyleri

Çalışmamızda kullanılan hücre (HGF, G-361 ve A549) hatlarına *Hypericum heterophyllum* sulu ekstraktlarının etkileri birlikte değerlendirildiğinde; 0,1-0,5 mg/mL konsantrasyonlarda üç hücre hattında da sitotoksik etki görülmezken, bu konsantrasyon aralığında HGF ve G-361 hücrelerinde ekstraktların proliferatif etkiler gösterebileceği

beirlendi. HH_{mix} ekstraktı en yüksek sitotoksiteyi 1 mg/mL konsantrasyonla G-361 hücrelerinde, en düşük sitotoksiteyi ise 5 mg/mL konsantrasyonla HGF hücrelerinde gösterdi. A549 hücrelerindeki sitotoksite düzeyi se 2 mg/mL ile orta düzeyde idi. Bu bilgiler ışığında HH_{mix} ekstraktının çalışmada kullanılan hücre hatlarındaki sitotoksite sıralaması büyükten küçüğe doğru G-361 > A549 > HGF hücreleri şeklinde olduğu görüldü.

HH_{dal-yaprak} ekstraktının ise HGF ve A549 hücrelerindeki sitotoksik konsantrasyonu (2, 1 mg/mL) en düşük, G-361 hücrelerindeki sitotoksik konsantrasyonu 2 mg/mL bulundu. Bu durumda HH_{dal-yaprak} ekstraktının sitotoksite sıralaması büyükten küçüğe; HGF = A549 > G-361 hücreleri şeklinde oluştu. HH_{çiçek} ekstraktının ise HGF hücreleri için diğer hücelere oranla sitotoksik etkili olduğu belirlendi HGF hücrelerinde çiçek ekstraktı sitotoksik konsantrasyonu 1 mg/mL iken çalışmada kullanılan kanser (A549 ve G-361) hücrelerinde sitotoksik konsantrasyonun 2 mg/mL den başladığı görüldü. Bu durumda sitotoksite sıralaması ise büyükten küçüğe HGF > A549 = G-361 şeklinde gerçekleşti.

Bu veriler ışığında sağlıklı HGF hücrelerinde sitotoksitesi en düşük (5 mg/mL) olan HH_{mix} ekstraktının G-361 hücrelerinde ise en yüksek sitotoksiteyi sağladığı düşünülürse, hem A549 hücreleri hem de G-361 hücreleri için antikanserojen etkinlik gösterdiği söylenebilir. Bununla beraber A549 hücreleri için en düşük konsantrasyonda sitotoksik etkilerin HH_{dal-yaprak} ekstraktında gözlemlendiği, ama HGF hücrelerinde de aynı konsantrasyonda sitotoksik etkiler gözlemlendiği için HH_{dal-yaprak} ekstraktının A49 hücreleri için antikanserojenik etkinliği için tutarlı bir cevap verilemeyeceği söylenebilir.

Hypericum Heterophyllum türü ve farklı kanser hücreleri kullanılarak yapılan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar incelendiğinde *Hypericum Heterophyllum* türü çiçeklenme dönemi başlangıcı ve çiçeklenme dönemi içerisinde toplanan bitkilerden alkolle hazırlanan ekstraktları ile yapılan bir çalışmada MDA-MB-231 insan göğüs kanseri hücreleri kullanılarak sitotoksite düzeyleri değerlendirilmiştir. Çiçeklenme döneminin başlangıcından elde edilen ekstraktların daha güçlü biyolojik aktivite gösterdiği, ayrıca ekstraktların antioksidan, antibakteriyel (*Staphylococcus aureus*'a karşı), antikanser aktivite (meme kanseri hücreleri üzerinde) ve BChE ve alfa-glukozidaz

inhibisyon etkilerine sahip olduğu belirlenmiştir (Eruygur vd. 2024). Hem literatürde hem de sunulan tez çalışmasından elde edilen bulgular *H. heterophyllum*'dan elde edilen ekstraktların önemli farmakolojik aktivitelere sahip olabileceğini göstermektedir

4.5 *Hypericum Heterophyllum* Ekstraktlarının HGF Hücrelerinde Yara İyileştirici Etkinliğinin Araştırılması

Yara çalışmalarında in-vitro model oluşturmada en çok tercih edilen hücreler fibroblast hücreleridir. Çünkü fibroblast hücreleri, yara iyileşmesi sürecinde önemli roller üslenen birçok proteinin/metabolitin kolayca sentezlendiği hücrelerdir. Yara oluşturulduktan sonra fibroblastların aktivasyonu sonrasında sentez ve salınımı yapılan moleküller yardımıyla epitelyal onarım gerçekleşir. Bu sebeple sunulan tez çalışmasında da *Hypericum Heterophyllum* ekstraktlarının yara iyileşmesine etkisini araştırmak amacıyla bir fibroblast hücre hattı olan Human Gingival Fibroblast (HGF) hücreleri kullanılmıştır. Yöntem kısmında ayrıntılı bir şekilde açıklanan in-vitro hücre çiziyi yara modeli oluşturulduktan sonra *Hypericum heterophyllum* ekstraktları hücrelere uygulanmıştır. Ekstraktlar sitotoksik olmadığı (Şekil 4.2) belirlenen en düşük (100 µg/mL) konsanrasyonda HGF hücrelerine uygulanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

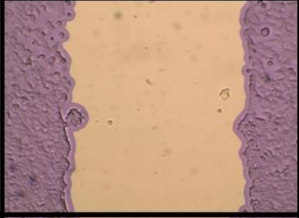
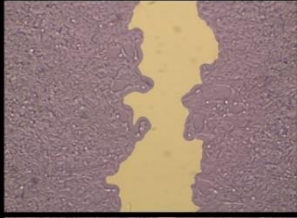
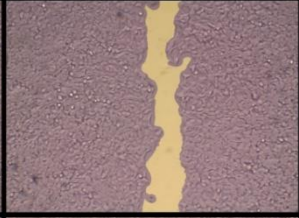
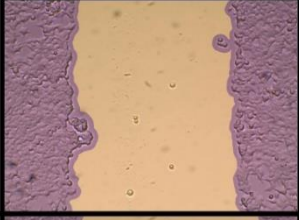
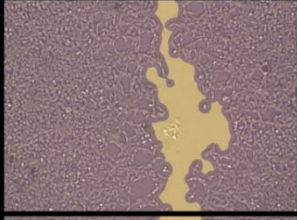
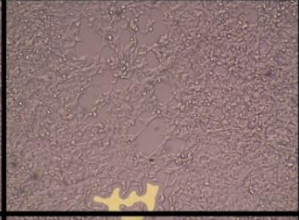
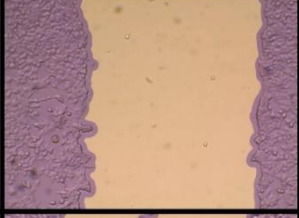
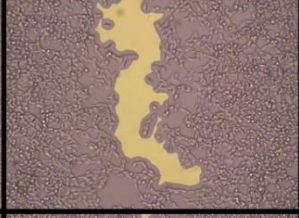
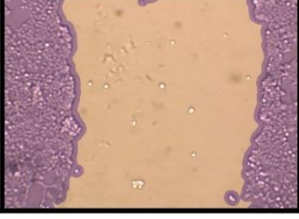
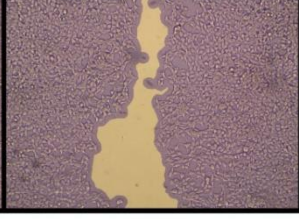
Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan ekstraktların yara iyileştirici etkinliği

Deney Grupları	Hücresiz alan (Yara alanı) (%)			Yara alanı kapanma oranı (%)
	Başlangıç	24. saat	48. saat	
Kontrol	55,31±2,44	21,47±2,41	12,78±3,16	77,01±5,04
HH _{Mix}	54,15±2,71	11,45±1,85*	2,50±1,13*	95,42±1,98*
HH _{Çiçek}	54,34±3,25	19,58±3,64	12,60±5,25	77,06±8,45
HH _{Yaprak-dal}	55,67±3,63	26,52±3,52	13,47±3,49	75,69±6,49
P	0,912	0,002	0,016	0,010

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (n≥3).

*Aynı sütundaki veriler arasında kontrol grubuna göre istatistiki farklılık gösteren veriyi göstermektedir (p<0,05).

Deney başlangıç verileri (Çizelge 4.7) incelendiğinde tüm deney gruplarına ait yara alanlarının (%) birbirine yakın olduğu, bu sebeple başarılı bir şekilde in-vitro yara modeli oluşturulduğu söylenebilir (Şekil 4.5). Deney gruplarına ait 24. Saat ve 48. Saat verileri incelendiğinde HH_{mix} ekstraktının HGF hücrelerinde proliferasyonu ve hücre göçünü önemli derecede artırarak, yara iyileştirici etkinlik gösterdiği söylenebilir. Nitekim HH_{mix} yara kapanma oranı % 95,42 iken, kontrol grubu yara kapanma oranı %77,01 olarak bulunmuştur. Diğer ekstraktların ise yara kapanma oranlarının kontrol grubuna yakın olduğu Çizelge 4.7’de görülmektedir. *Hypericum heterophyllum* türünün yara iyileştici etkinliği ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bununla beraber *Hypericum* türleri ile yapılan çalışmada bulgular, bu cinse ait türlerin yeniden epitelizasyon, anjiyogenez, yara kontraksiyonu ve bağ dokusu rejenerasyonu dahil olmak üzere yara iyileşme sürecinin her aşamasında rol oynayabileceğini göstermektedir. *Hypericum* türlerinin kollajen birikimini artırarak, inflamasyonu azalttığı, fibroblast göçünü engellediği (böylelikle yara bölgesinin daha çabuk kapanması sağlanabilir) ve çokgen şekilli fibroblastların sayısını ve fibroblastlar içindeki kollajen liflerinin sayısını artırarak epitelizasyonu teşvik ettiği böylelikle yara iyileşmesinde etkin bir rol üslendiği rapor edilmektedir (Farasati vd. 2024). *Hypericum* türlerinde bulunan bazı aktif bileşiklerin insan keratinositleri, fibroblastları ve kök hücrelerinin proliferasyonunu uyarak yara iyileşme sürecinde sinerjik ve etkin bir sürecin başlamasına aracılık edebileceği belirtilmektedir (Bridi vd. 2021).

Deney Grupları	Yara İyileşme Modeline Ait Mikroskop Görüntüleri		
	Başlangıç	24. Saat	48. Saat
Kontrol			
HH _{Mix}			
HH _{Çiçek}			
HH _{Yaprak-Dal}			

Şekil 4.5. *Hypericum heterophyllum* 'a ait ekstraktların yara iyileştirici etkisi

4.6 *Hypericum heterophyllum* Ekstraktlarının Kansere (G361) Hücrelerinde Hücre Yenilenmesi ve Göçüne Etkisi

Ekstraktlar sitotoksik olmadığı (Şekil 4.3) belirlenen en düşük (100 µg/mL) konsantrasyonda besiyeri içerisinde çözülerek hazırlandı. Önceden planlanan kuyucuklara eklendi. Daha sonra 0, 24, 48. saat fotoğrafları alınarak sonuçlar değerlendirildi. Çalışma başlangıcı olan sıfırıncı saat verileri incelendiğinde tüm deney gruplarında oluşturulan hücre çizdiği yara modelinin birbirine yakın oranlarda olacak bir şekilde oluşturulabildiğini göstermektedir. Kontrol grubu yara kapanma oranının

çalışma sonunda % 49,11±2,61 olduğu belirlendi. Çalışmamızda kullanılan türün toprak üstü kısımlarından elde edilen (HH_{mix}) ekstraktı G361 hücrelerine uygulandığında ise yara iyileştirici etkisi olabileceği, fakat yara kapatma oranının (% 34,70±10,36) kontrol grubu verilerine göre daha düşük kaldığı görüldü (Çizelge 4.8). Yara iyileştirici etkisi en iyi olduğu belirlenen ekstraktın çiçek ekstraktı olduğu belirlendi. Kontrol grubu yara kapanma oranından daha yüksek oranda yara kapatma etkinliği olan çiçek ekstraktının bu etkisi yara tedavileri için umut verici olabilir. Bununla birlikte aynı türün yaprak ekstraktı kullanılarak yapılan uygulamalarda tam tersi sonuçlar elde edilmiştir. Yaprak ekstraktının yara iyileştirici etkinliğinden ziyade yara oranını artırıcı etkisi olabileceği belirlendi. Her bir deney grubuna ait 0, 24, 48. saat mikroskopi görüntüleri Şekil 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Çalışmada kullanılan ekstraktların G361 hücrelerinde yara kapanma oranlarına etkisi

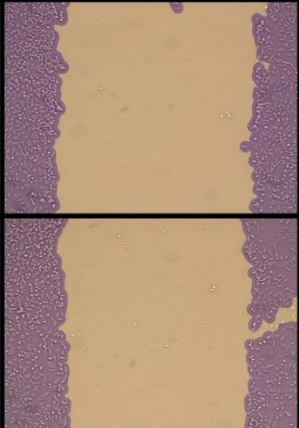
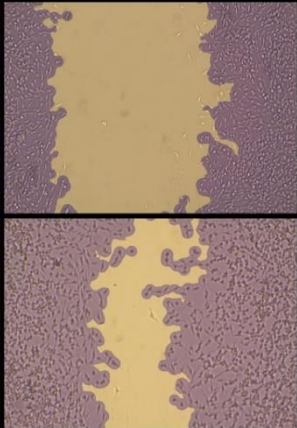
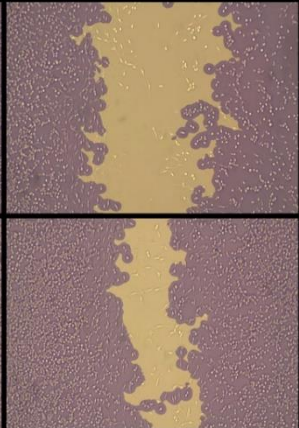
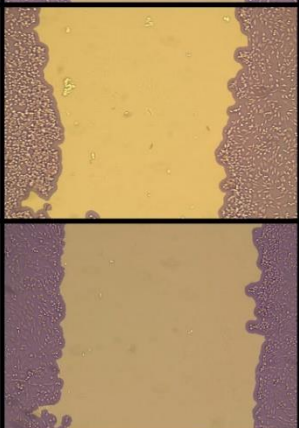
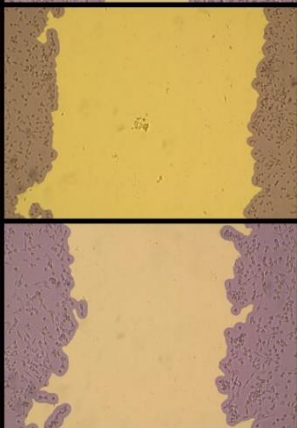
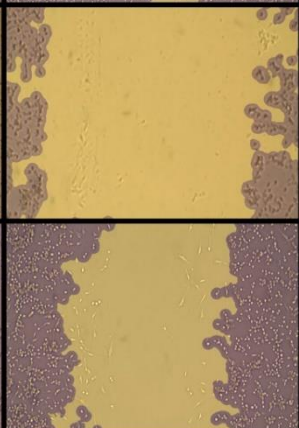
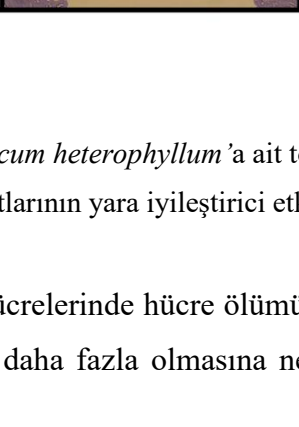
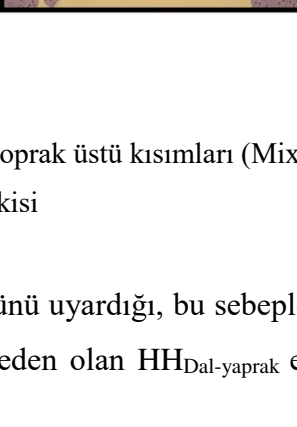
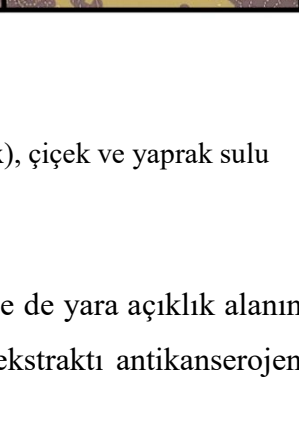
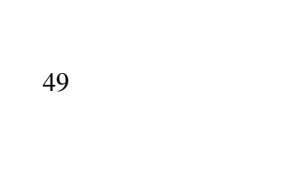
Deney grupları	Yara alanının hesaplandığı zaman dilimi			48. saat yara kapanma oranları (%)
	Sıfırıncı saat	Yirmi dördüncü saat	Kırk sekizinci saat	
Kontrol	64,39 ± 4,34	45,88±2,96 ^b	32,84±3,89 ^b	49,11±2,61 ^c
Mix ekstraktı	64,55±4,81	53,23±3,82 ^b	41,86±4,41 ^c	34,70±10,36 ^b
Çiçek ekstraktı	62,82±3,49	34,67±6,45 ^a	17,56±4,62 ^a	72,07±7,09 ^d
Yaprak ekstraktı	58,42±1,88	64,52±4,96 ^c	82,40±3,16 ^d	-41,08±4,96 ^a
P	0,244	0,000	0,000	0,000

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (n≥3).

a, b, c, d : Aynı sütunda ortak üst simgeyi taşımayan veriler (deney grupları) arasında istatistiki fark bulunmaktadır (p < 0.05).

G-361 hücrelerinin melonoma kanser hücreleri olduğu düşünülürse, kontrol grubuna oranla yara kapanma oranı daha fazla olan ekstraktların kanseri ilerletme konusunda olumsuz bir etkisi olacağı da söylenebilir. Bu sebeple bizim için ideal olan yara iyileştirici ekstraktın, sağlıklı hücrelerde yara kapanma etkisi olan ama kanser hücrelerinde kontrol grubuna oranla proliferasyona daha az sebep olan ekstrakt olabileceği söylenebilir. Bu açıdan hem HGF hücreleri hem de G-361 hücreleri ile yapılan yara iyileşmesine ait veriler beraber değerlendirilirse, HGF hücrelerinde yara iyileştirici etkisi olduğu belirlenen HH_{mix} ekstraktının (Çizelge 4.7, Şekil 4.5), G-361

hücrelerinde kontrol grubuna oranla yara kapanma oranlarının daha az olduğuna (Çizelge 4.8, Şekil 4.6) işaret etmektedir. Başka bir ifade ile sağlıklı HGF hücrelerinde yara iyileştirici etkisi olduğu belirlenen HH_{mix} ekstraktının G-361 hücrelerinde hücre yenilenmesi ve migrasyonunu azalttığı söylenebilir. Bu sebeple HH_{mix} ekstraktı hem sağlıklı hem de melanomaya yakalanmış bireylerdeki yaraların tedavisi için yararlı olabilir.

Deney Grupları	Yara İyileşme Modeline Ait Mikroskop Görüntüleri		
	0. Saat	24. Saat	48. Saat
Kontrol			
Çiçek Ekstraktı			
Yaprak Ekstraktı			
Toprak Üstü Kısım Ekstraktı			

Şekil 4.6. *Hypericum heterophyllum* 'a ait toprak üstü kısımları (Mix), çiçek ve yaprak sulu ekstraktlarının yara iyileştirici etkisi

Ayrıca G-361 hücrelerinde hücre ölümünü uyardığı, bu sebeple de yara açıklık alanının başlangıça göre daha fazla olmasına neden olan HH_{Dal-yaprak} ekstraktı antikanserojenik

etkinliği ile de değerlendirilebilir. Çünkü aynı konsantrasyonda (100 µg/mL) HGF hücrelerine uygulanan HH_{Dal-yaprak} ekstraktının, aynı deney grubunda başlangıç durumuna göre proliferasyonu artırdığı, bu artış sonucunda yara kapanma oranlarının kontrol grubuna yakın olduğu görülmüş (izelge 4.7, şekil 4.6), sağlıklı hücreler için herhangi bir toksikasyona sebep olmadığı belirlenmiştir. Bu veriler melonama kanserine karşı tedavide HH_{Dal-yaprak} ekstraktının yeni alternatifler sunabileceğini göstermektedir. Fakat bunun tam olarak söylenebilmesi için deney hayvanı modelleri veya sağlıklı/hasta gönüllülerle yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkisel ürünler, sağlık ve refahı teşvik etmedeki faydalı rolleri nedeniyle günümüzde yeniden ilgi görmeye başladı. Bitkilerin içeriğinde bulunan fenolikler gibi ikincil metabolitlerin hücre sinyal yollarıyla etkileşime girdiği, inflamatuvar yanıtı düzenlediği ve hücreleri serbest radikal kaynaklı oksidatif stresten koruduğu bilinmektedir. Bitkisel ürünlerde bulunan antioksidan özellikteki aktif maddeler ortamda bulunan serbest radikallere elektron vererek veya serbest radikallerin eşlenmemiş elektronlarını alarak, serbest radikal inaktivasyonu sağlar. Çoğu bitkide bulunan ve antioksidan özellikleri ile öne çıkan fenolik maddelerin antioksaiddan özellikleri, kimyasal yapılarıyla ilişkilidir. Fenolik maddeleri antioksidan etki mekanizması; fenolik bileşiklerin serbest radikallere bir hidrojen atomu bağışlaması ve bunun sonucunda fenoksil radikali isimli ara madde oluşumu ile başlar. Rezonans nedeniyle oluşan fenoksil radikali ara madde depolaması kalıcıdır ve bu da yeni bir zincir birimlerinin başlatılmasını zorlaştırır. Ek olarak, diğer serbest radikallerle reaksiyonlara girerek, fenoksil radikal değişim yolunu, ara maddeleri aynı zamanda son öldürücü görevi görür.

Antik çağdan beri geleneksel tedavide kullanılan *Hypericum* L., dikotiledonlar içindeki Hypericaceae familyasının bir cinsidir. *Hypericum* türlerinin bileşenleri önemli biyolojik özellikleri nedeniyle değerlidir. Depresyon tedavisinde ve antibakteriyel ajan olarak kullanımı birincil literatürde ve etnobotanik raporlarda iyi belgelenmiştir. Kimyasal bileşenleri olarak; floroglusinol türevleri, ksantonlar, diantronlar ve flavonoidler grubuna dahil olan yüzlerce farklı bileşeni içerebilmektedirler. Bu bileşikler; antimikrobiyal, sitotoksik, antidepresan benzeri ve antinosiseptif etkiler de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler gösterebilmektedir. *Hypericum* L. (Hypericaceae) cinsi, en son sayıma göre, Antarktika hariç her kıtaya dağılmış 469 tür içerir (Xiao vd. 2020). *Hypericum* L türlerinin bileşenleri türden türe değişebildiği gibi aynı türün yetiştirme alanı ile de farklılık gösterebilmektedir. Bu sebeple henüz özellikleri yeterince araştırılmamış türlerin içeriklerinin ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar bilim dünyasının ilgisini çekmektedir. Sunulan çalışma da bu kapsamda hazırlanmış olup, Türkiye endemik türlerinden birisi olan *Hypericum*

heterophyllum türüne ait sulu ekstraktların bazı biyolojik özellikleri ve fitokimyasal içerikleri belirlenmiştir.

Hypericum heterophyllum türü ile aseton ve metanol ekstraktlarında tez danışmanımın yürüttüğü bir çalışma ile araştırmalar yapılmış olup, bu araştırmalarda antibakteriyal, antioksidan ve antikanserojenik etkinliği ortaya konmuştur (Hazman vd. 2022a). Bu çalışma ile daha önce elde edilen bulgular ışığında daha ileri çalışmalara yer verilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarla *Hypericum heterophyllum* türünün sulu ekstraktlarında daha ayrıntılı bir araştırma yapılması mümkün olmuştur. *Hypericum heterophyllum* çoğunlukla suda hazırlanarak tüketilmektedir. Bu nedenle sulu ekstraktlarının etkinliğinin araştırılması farmakolojik etkinliğini açıklama adına daha yararlı olacağı düşünülmüştür. Ayrıca halk arasında yara çiçeği olarak bilinen *Hypericum heterophyllum*'un yara iyileştirici etkinliği konusunda herhangi bir araştırmaya rastlanılamamıştır. Elde edilen bulgular bu konuda ilk olma özelliğini taşımaktadır. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar maddeler halinde sunulmuştur.

- Türün literatürde belirtilen ve bu çalışma ile ortaya konulan biyolojik/farmakolojik özelliklerinin en önemli nedenleri arasında içeriğinde bulunan fenolik bileşenlerle ilişkili olabileceği belirlendi. Öyleki ekstraktlar içerisinde miktarları belirlenen 5-dikaffeoilquinik acid (Gray vd. 2014, Sharopov vd. 2020), vanillin (Dhanalakshmi vd. 2015, Wang vd. 2024, Kumar vd. 2023), kafeik asit (Yamada vd. 1996), 4-OH benzoik asit (Pugazhendhi vd. 2005, El-Zawawy vd. 2022), sirinik asit (Itoh vd. 2009), sirinik aldehit (Shahzad vd. 2020), vanilik asit (Itoh vd. 2009) biyoaktif maddelerinin farklı biyolojik özellikleri literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında *Hypericum heterophyllum*'un halk tarafından geleneksel olarak kullanılmasının sebebi ile türün içerdiği bileşenlerin olası yararlı farmakolojik etkileri arasında sıkı bir ilişki kurulabilir.
- Sunulan çalışmanın ilgi çekici sonuçlarından birisi de *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının 4-OH benzoik asit içerikleridir. Sentetik olarak da üretilebilen 4-OH benzoik veya *p*-hidroksibenzoik asit toksisitesi düşük olan ve antioksidan etkileri ile ön plana çıkan bir bileşik olup, HH_{Dal-Yaprak} ekstraktında %9,56

oranında, HH_{Mix} ekstraktında ise %7 oranında bulunduğu belirlenmiştir. Bu veri *Hypericum heterophyllum* 'un 4-OH benzoik asit (*p*-hidroksibenzoik asit) için doğal kaynak olarak kullanılabileceğini akla getirmektedir. Bu durumda ise ülkemiz için endemik bir tür olan *Hypericum heterophyllum* 'un ekonomik olarak değer kazanabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

- *Hypericum heterophyllum* 'a ait ekstraktların (HH_{Mix}, HH_{Çiçek} ve HH_{Dal-yaprak}) yaklaşık olarak %10-11,5 aralığında total fenolik içeriğe sahip oldukları, bu fenolik içerikle beraber diğer olası biyoaktif maddelerin ekstraktların oksidan/antioksidan aktivitesine katkı sunduğu belirlendi.
- *Hypericum heterophyllum* çiçek ve mix ekstraktının TAS düzeylerinin birbirine yakın ve yüksek, TOS seviyelerinin ise düşük çıktığı belirlendi. Bu bilgiler HH_{Mix} ve HH_{Çiçek} ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin daha belirgin olabileceğine işaret etmektedir. Dal-yaprak ekstraktı TAS seviyelerinin düşük, TOS seviyelerinin yüksek çıkması, HH_{Dal-yaprak} ekstraktının oksidan özelliklerinin etkili olabileceğini akla getirmektedir. Öyleki HH_{Mix} ekstraktı OSİ seviyesi 13,91±2,55 AU, HH_{Çiçek} ekstraktı OSİ düzeyi 11,29±2,33 AU iken, HH_{Dal-yaprak} OSİ düzeyleri (40,42±14,97 AU) istatistiki olarak diğer gruplardan yüksek ve farklı çıktığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bu veriler HH_{Dal-yaprak} ekstraktı içeriğinde diğer ekstraktlardan farklı olarak oksidan etkiler gösterebilecek bazı biyoaktif madde içeriğinin fazla olabileceğine işaret etmektedir. Oksidan aktivitesi yüksek olan biyoaktif bileşenler içeren maddelerin antimikrobiyal/antikanserojenik gibi farmakolojik etileri olabileceğide düşünülebilir. Nitekim *E. coli* suşu için antibakteriyel aktivitesi en yüksek olan ekstraktın, MİC değeri (2,5 mg/mL) en düşük hesaplanan, HH_{Dal-yaprak} ekstraktı olduğu belirlendi.
- Türe ait ekstraktların antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Disk difüzyon yöntemi ile yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar düşük (%0,125) dilüsyon oranlarında ekstraktların antimikrobiyal etkisinin olamayabileceğine işaret ederken, MİC analizlerinde özellikle yüksek (5 mg/mL) konsantrasyonda

çalışmada kullanılan tüm (*E. coli*, *S. aureus*, *C.albicans*) mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinin güçlü olduğunu göstermektedir.

- *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının HGF, A549 ve G361 hücreleri kullanılarak belirlenen sitotoksite düzeyleri birlikte değerlendirilirse; düşük dozlarda HH_{mix}, HH_{çiçek} ve HH_{dal-yaprak} ekstraktlarını sitotoksik olmadığı, özellikle sağlıklı HGF hücrelerinde proliferatif etkili olabilecekleri tespit edildi. Yüksek konsantrasyonlarda ise özellikle G-361 hücrelerinde antikanserojenik aktivitenin daha belirgin ortaya çıktığı tespit edildi.
- Sunulan çalışmada *Hypericum heterophyllum* ekstraktlarının yara iyileşmesi üzerine, başka bir ifade ile hücre yenilenmesi ve migrasyonuna etkisini belirleyebilmek için, biri sağlıklı (HGF hücreleri) diğeri cilt kanseri (G361) hücreleri kullanıldı. Yara iyileştirici etkinlikte oluşturulan modelin iki farklı hücre hattıyla belirlenmeye çalışılmasındaki temel amaç, yara iyileştirici etkinliğin cilt kanserli hastalarda da geçerli olup/olmadığını belirlemek içindi. Her iki hücre hattında hücre çizik yöntemi ile yara modeli oluşturulduktan sonra aynı konsantrasyonda (100 µg/mL) ekstraktlar (HH_{Mix}, HH_{Çiçek} ve HH_{Dal-yaprak}) hücrelere uygulandığında elde edilen sonuçlar, HH_{Mix} ekstraktının yara iyileştirici etkinliğinin güçlü bir şekilde öne çıktığı belirlendi. HH_{Mix} ekstraktının HGF hücrelerindeki yara kapanma oranlarını kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde artırırken (Çizelge 4.6, Şekil 4.5), aynı ekstraktın G-361 hücrelerinde kontrol grubuna oranla yara kapanma oranlarını artırmadığı (aksine azalttığı) belirlendi (Çizelge 4.8, Şekil 4.6). Yani HGF hücrelerinde yara iyileştirici etkisi olduğu belirlenen HH_{Mix} ekstraktının, cilt kanseri G-361 hücrelerinde hücre yenilenmesi ve migrasyonunu azalttığı söylenebilir. Bu sebeple HH_{Mix} ekstraktı hem sağlıklı hem de melanomaya yakalanmış bireylerdeki yaraların tedavisi için yararlı olabileceği düşünülebilir.
- G-361 hücrelerinde HH_{Çiçek} ekstraktının hücre proliferasyonu ve migrasyonunu artırdığı, bu sebeple, cilt kanseri olan bireylerde HH_{Çiçek} ekstraktının kullanımının önerilmediği söylenebilir. Bununla beraber HH_{Dal-yaprak} ekstraktının

G361 hücrelerinde hücre proliferasyonu ve migrasyonunu azaltması, aksine hücre ölümünü uyarması sonucu yara açıklık oranlarını başlangıca göre çalışma sonunda artırdığı görüldü (Çizelge 4.8, Şekil 4.6), Bu sebeple sağlıklı HGF hücrelerinde herhangi bir toksikasyona sebep olmayan ama melanoma (G361) hücrelerine karşı sitotoksik etkiler gösteren HH_{Dal-yaprak} ekstraktının, cilt kanserinin tedavisinde yeni alternatifler sunabileceğini göstermektedir. Fakat bunun tam olarak söylenebilmesi için deney hayvanı modelleri veya sağlıklı/hasta gönüllülerle yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sunulan tez çalışmasından elde edilen veriler, ülkemizde endemik bir *Hypericum* türü olan *Hypericum heterophyllum*'un içerdiği bileşenler ve biyolojik/farmakolojik etkileri nedeni ile ekonomik bir değere dönüşerek, hem toplum sağlığına hem de refahına katkı sunabilecek potansiyele sahip olabileceğine işaret etmektedir. Tarihten günümüze sarı kantaron olarak bilinen *Hypericum perforatum*'un dünya genelinde oluşturduğu hem ekonomik potansiyel, hem de geniş kullanım alanları olmasının, türle ilişkili sayısız bilimsel araştırmaların yapılmasıyla yakından ilişkilidir. Bu sebeple Türkiye'de halk arasında farklı amaçlarla kullanımı olan *Hypericum heterophyllum* gibi endemik türlerin içerikleri, biyolojik ve farmakolojik etkinlikleri üzerine yapılacak çalışmalar, bu türlerin fitoterapide kullanımına sebep olabilecek bilgiler edinmemizi sağlarken aynı zamanda olası ekonomik potansiyellerini anlamamıza katkı sunabilir. Bu nedenle ülkemizin zenginliği olan endemik türler üzerine temel çalışmaların yapılarak, elde edilen veriler ışığında gerekli görülen türler veya elde edilebilecek inovatif ürünlerle ilişkili olarak deney hayvanı modelleri veya gönüllülerle ileri çalışmalara geçilerek, ülke ekonomisine ve toplum sağlığına katkıda bulunulması olasıdır.

6. KAYNAKLAR

- Ahmadi S M, Farhoosh R, Sharif A, Rezaie M, 2020, Structure-Antioxidant Activity Relationships of Luteolin and Catechin, *Journal of food science*, 85(2), 298–305.
- Akdağ G, Hazman Ö, Aksoy L, Savrik M, Büyükben A, Yılmaz M A, vd., 2024, "Phytochemical composition, antimicrobial, antioxidant, and wound healing activities of *Thermopsis turcica*" *Zeitschrift für Naturforschung C*, 80 (5-6), 261-274
- Akgöz Y, 2013, Türkiye Florası'na Ait Hypericum L. Cinsinin Tehlike Kategorileri ve Bulunan Yeni Türleri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/ Journal of The Institute of Natural & Applied Sciences, 18 1-(2) 62-69.
- Anonim 2012, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Antimicrobial Susceptibility Testing Standards.
- Avcı M, 2005, Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü, İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü, Coğrafya Dergisi, Sayı:13, Sayfa:27-55.
- Ayan A K, Çırak C, 2008, Hypericin and pseudohypericin contents in some Hypericum Species growing in Turkey, *Pharmaceutical Biology*, 46: 288-291.
- Balkir Ş, Hazman Ö, Aksoy L, Yılmaz M A, Cakir O, Kara R, vd., 2023, Phytochemical Profile, Antioxidant and Antimicrobial Potency of Aerial Parts of *Salvia tomentosa* Miller, *Acta Chimica Slovenica*, 70.
- Bauer R W, Kirby M D K, Sherris J C, Turck M, 1966, Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method, *Am J Clin Pathol*, 45: 493-496.

- Bridi H, Beckenkamp A, Maurmann N, Elingson B, Buffon A, Pranke P, vd., 2021, Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species induce *in vitro* proliferation of cells involved in the wound healing process, *Natural product research*, 35(22), 4648–4652.
- Can Ö D, Öztürk Y, Demir Ö Ü, 2009, Doğal Bir Antidepresan: Hypericum Perforatum L. Türkiye Klinikleri, J Med Sci, 29(3), 708-715. Erişim adresi: <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-dogal-bir-antidepresan-hypericum-perforatum-l-54822.html>
- Çakır A, Kordali S, Zengin H, Izumi S, Hirata T, 2004, Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*”, *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 1, pp.62-68.
- Davis P H, Mill R R, Kit T, 1988, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands.*, Edinburgh University Press, 10.
- Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Nataraj J, Thenmozhi A J, Essa M M, 2015, Neurosupportive Role of Vanillin, a Natural Phenolic Compound, on Rotenone Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Evidence-Based, *Complementary and Alternative Medicine*, 1-11
- Di Carlo G, Borrelli F, Ernst E, Izzo A A, 2001, St John's wort: Prozac from the plant kingdom, *Trends in pharmacological sciences*, 22(6), 292–297.
- Dikmen M, Öztürk Y, Sagratini G, Ricciutelli M, Vittori S, Maggi F, 2011, Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of *Hypericum perforatum* on cultured NIH3T3 fibroblasts, *Phytotherapy research: PTR*, 25(2), 208–214.
- Ernst E, 2003, *Hypericum-the Genus Hypericum, Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles*, 31, Taylor & Francis, London.

- Ersin G, Çelik S, Ulasli S S, Ozyurek A, Hazman O, Gunay S, vd., 2016, Comparison of the Anti-inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthal on Benzo(a)pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line. *Inflammation* 39: 744-751.
- Farasati Far B, Gouranmohit G, Naimi-Jamal M R, Neysani E, El-Nashar H A, S El-Shazly M, vd., 2024, The potential role of *Hypericum perforatum* in wound healing: A literature review on the phytochemicals, pharmacological approaches, and mechanistic perspectives. *Phytotherapy research: PTR*, 38(7), 3271–3295.
- Gray N E, Morre J, Kelley J, Maier C, S Stevens J, F Quinn J F, vd., 2014, Caffeoylquinic Acids in *Centella asiatica* Protect against Amyloid-Toxicity, *Journal of Alzheimer's Disease*, 40, 359-373.
- Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç M T, 2012, List of Turkish Flora (Vascular Plants). _Istanbul: Publication of Nezahat Go'kyig'it Botanical Garden and Flora Research Fondation. [cite 2012 Jun 24]. Available from: <http://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?c¼Hypericum>.
- Hazman Ö, Sarıova A, Bozkurt M F, Ciğerci İ H, 2021, The anticarcinogen activity of β -arbutin on MCF-7 cells: Stimulation of apoptosis through estrogen receptor- α signal pathway, inflammation and genotoxicity. *Mol Cell Biochem.* Jan;476(1):349-360. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32964394.
- Hazman Ö, Aksoy L, Büyükben A, Kara R, Kargıoğlu M, Kumral Z B, vd. 2021a, Evaluation of antioxidant, cytotoxic, antibacterial effects and mineral levels of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 93
- Hazman Ö, Bozkurt M F, Kumral Z B, Savrik M, Sindarov B, Bhaya N M, vd., 2023, The effects of β -escin on inflammation, oxidative stress and Langerhans islet cells in high-fat diet and streptozotocin injection induced experimental type-2

diabetes model, *Biologia*, 78:549–561.

Hazman Ö, Evin H, Bozkurt M F, Ciğerci İ H, 2022, Two faces of arbutin in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells: Anticarcinogenic effect in high concentration and protective effect against cisplatin toxicity through its antioxidant and anti-inflammatory activity in low concentration. *Biologia* **77**, 225–239.

Hazman Ö, Kargioğlu M, 2019, Investigation of antioxidant properties of *Hypericum heterophyllum* Vent. as an endemic St. John's wort (yellow centaury) species in Turkey. International Conference on Recent Advances in Medical Sciences (ICRAMS)- 2019, The IIER International Conference, Barcelona, Spain (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).

Hazman Ö, Khamidov G, Yilmaz M A, Bozkurt M F, Kargioğlu M, Tukhtaev, vd., 2024, Environmentally friendly silver nanoparticles synthesized from *Verbascum nudatum* var. extract and evaluation of its versatile biological properties and dye degradation activity. *Environ Sci Pollut Res* **31**, 33482–33494.

Hazman Ö, Aksoy L, Büyükben A, Kara R, Kargioğlu M, Cigerci İ H, vd., 2022, LC-MS/MS profiles, multi-element levels and biological activities of *Hypericum heterophyllum* Vent. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*, 60 (10), 743-752.

Hazman Ö, Ciğerci İ H, Aksoy L, Kargioğlu M, Büyükben A, Kara R, 2022, Türkiye'de endemik bir sarı kantaron türü olan *Hypericum Heterophyllum*'un antioksidan, antibakteriyel, antikanserojen özelliklerinin ve mineral madde düzeylerinin araştırılması, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, 18.KARİYER 149 nolu proje raporu.

- Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Kobayashi M, Tamesada M, vd., 2009, Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on Concanavalin A-Induced Liver Injury, *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1215-1219.
- Kaptaner İğci B, Aytaç Z, 2019, An Investigation on the *In Vitro* Wound Healing Activity and Phytochemical Composition of *Hypericum pseudolaeye* N. Robson Growing in Turkey, *Turk J Pharm Sci.* 17(6):610-619.
- Kaur G, Shivanandappa T B, Kumar M, Kushwah A S, 2020, Fumaric acid protect the cadmium-induced hepatotoxicity in rats: owing to its antioxidant, anti-inflammatory action and aid in recast the liver function, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 393(10), 1911–1920.
- Khan A K, Rashid R, Fatima N, Mahmood S, Mir S Khan, S Jabeen, vd., 2015, Pharmacological Activities Of Protocatechuic Acid, *Acta poloniae pharmaceutica*, 72(4), 643–650.
- Kumari A, Kumar A, 2023, Metal nanocomposites-based electrochemical sensor for the detection of Vanillin (foodadditives): Experimental and theoretical approach, *Food Bioscience* 52, 1-15.
- Kumari R, Kumar H, Yadav A, Sharma R, Eruygur N, Uçar E, vd., 2024, Evaluation of antioxidant, antimicrobial, enzyme inhibition activity, and cell viability capacity of *Hypericum heterophyllum* vent., an endemic species in Turkey's Flora, *Journal of Molecular Structure* 1307, 1-12.
- Lemini C, Silva G, Timossi C, Luque D, Valverde A, Gonzalez Martinez M, vd., 1997, Valenzuela F, Estrogenic effects of p-hydroxybenzoic acid in CD1 mice, *Environ Res.*, 75, 130-134.
- Manuja R, Sachdeva S, Jain A, Chaudhary J, 2013, A Comprehensive Review on Biological Activities of P-Hydroxy Benzoic Acid and Its Derivatives *Int. J.*,

Pharm. Sci. Rev. Res., 22(2), 109-115.

Matić I Z, Ergün S, Đorđić Crnogorac, M Misir, S Aliyazicioğlu, Y Damjanović A, vd. 2021, Cytotoxic activities of *Hypericum perforatum* L. extracts against 2D and 3D cancer cell models. *Cytotechnology*, 73(3), 373–389.

Napoli E, Siracusa L, Ruberto G, Carrubba A, Lazzara S, Speciale A, vd., 2018, Phytochemical profiles, phototoxic and antioxidant properties of eleven *Hypericum* species A comparative study, *Phytochemistry*, 15, 162-173.

Öcal A, Eroğlu H E, 2012, Genotoxic Effects of *Hypericum heterophyllum* Vent. In Human Lymphocytes Cultures, *Advances in Life Sciences*, 2(3): 65-67.

Öcal A, Eroğlu E, 2012a, In vitro cytogenetic effects of *Hypericum heterophyllum* in human peripheral blood lymphocytes. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 7: 36-41.

Özen T, Ayan A K, Cirak C, Kevseroğlu K, 2005, Total Phenol content of some *Hypericum* species growing in Turkey, *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 41, No.2, 232-233.

Özkan E E, Mat A, 2013, An overview on *Hypericum* species of Turkey, *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 5, 38-46

Pero R, W Lund H, Leanderson T, 2009, Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(3), 335–346.

Pilepic K H, Males Z, 2013, Quantitative analysis of polyphenols in eighteen *Hypericum* taxa, *Periodicum Biologorum* 115, 459-462.

- Pinto B I, Cruz N D, Lujan O R, Propper C R, Kellar R S, 2019, In Vitro Scratch Assay to Demonstrate Effects of Arsenic on Skin Cell Migration. *J. Vis. Exp.* (144), e58838,
- Saito S, Okamoto Y, Kawabata J, Kasai T, 2003, Quinone hemiacetal formation from protocatechuic acid during the DPPH radical scavenging reaction. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(7), 1578–1579.
- Shahzad S, Mateen S, Kausar T, Naeem S S, Hasan A A M, Nayeem S M, vd., 2020, Effect of syringic acid and syringaldehyde on oxidative stress and inflammatory status in peripheral blood mononuclear cells from patients of myocardial infarction, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393, 691-704
- Sharopov F, Wetterauer B, Gulmurodov I, Khalifaev D, Safarzoda R, Sobeh M, vd., 2020, Chlorogenic and 1,5-Dicaffeoylquinic Acid-Rich Extract Of Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) Exhibits Strong Antioxidant Activity And Weak Cytotoxicity, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 54, 745-754
- Slinkard K, Singleton V L, 1977, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1):49–55.
- Smelcerovic A, Zuehlke S, Spiteller M, Raabe N, Özen T, 2008, *Phenolic constituents of 17 Hypericum species from Turkey*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(4), 316–319.
- Şenkal B C, Uskutoğlu T, 2021, *Hypericum* taxa of Turkey's flora and intra-population variation of morpho-agronomic traits in *H. heterophyllum* Vent., an endemic species, *J. Inst. Sci. Technol.*, 11 (1) 743–752.
- Tavlı Ö F, Hazman Ö, Büyükben A, Yılmaz F N, Özbek Çelik B, Eroğlu Özkan E, 2020, İstanbul Aktarlarında Satılan *Hypericum Perforatum* Örneklerinin

Farmakognozik Açıdan İncelenmesi, Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 44 (2) , 265-280.

Unal E L, Mavi A, Kara A A, Cakir A, Şengül M, Yildirim A, 2008, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plants Used as Remedies in Turkish Traditional Medicine, Pharmaceutical Biology, 46:3, 207-224,

Wang J, An W, Wang Z, Zhao Y, Han B, Tao H, vd., 2024, Vanillin Has Potent Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities In Vitro and in Mouse Colitis Induced by Multidrug-Resistant Escherichia coli, Antioxidants 13, 1-21

Xiao C, Y Mu Q, Gibbons S, 2020, The Phytochemistry and Pharmacology of Hypericum. *Progress in the chemistry of organic natural products*, 112, 85–182.

Yamada J, Tomita Y, 2014, Antimutagenic Activity of Caffeic Acid and Related Compounds, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 60, 328-329

Yamada J, Tomita Y, 1996, Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 60, 328-329.

Yaman C, Şimşek Ş, 2021, Insecticidal effect of from three Hypericum species extracts against Rhyzopertha dominica, Sitophilus oryzae and Tribolium confusum," *ciencia e agrotecnologia*, vol.45, e001921.

Yaman C, 2020, Phytochemicals and antioxidant capacity of wild growing and in vitro Hypericum heterophyllum. Rom Biotechnol Lett., 25(6): 2111-2117.

Yaman C, Erenler R, Atalar M N, Adem Ş, Çalışkan U K, 2024, Phytochemical Properties, Antioxidant and in Vitro/in Silico Anti-Acetylcholinesterase Activities of Hypericum heterophyllum Leaf from Türkiye. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol.67: e24230043, 2024,

- Yaman C, Şimşek Ş, Contact toxicity of 2022, *Hypericum* Extracts against *Rhyzopertha dominica* (Fab.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(4), 737-744.
- Yilmaz M A, 2020, Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC--MS/MS method validation, *Industrial Crops & Products*, 149, 112347.
- Zhang R, Ji Y, Zhang X, Kennelly E J, Long C, 2020, Ethnopharmacology of *Hypericum* species in China: A comprehensive review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, 254, 112686.
- Zheleva-Dimitrova D, Nedialkov P, Kitanov G, 2010, Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from *Hypericum* species growing in Bulgaria, *Pharmacognosy Magazine*, 6, 74-78.

- Çifci C, Savrik M, Erol İ, 2019, [Poli(5-bromo-1-benzofuran-2-il)(fenil)-O-metakrilketoksim-ko-2- (4asetilfenoksi-2-oksoetil-2 metakrilat) – [Poli(metil metakrilat-ko-etil akrilat)]/ Poli(vinil alkol)-Selüloz Membranların Hazırlanması ve Fe(III)'ün Sudan Arıtımında Kullanılması, European Journal of Science and Technology, 15 252-258
- Çifci C, Savrik M, Erol İ, 2019, Sulu Ortamdan Co(II) İyonlarının Ultrafiltrasyonla Uzaklaştırılması, Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering, 19 67-70
- Erol I, Hazman Ö, Khamidov G, Savrik M, 2023, Improved physical, thermal, and biological properties of green synthesized Ag-containing nanocomposites of a novel chitosan-based blend, Journal of Molecular Liquids, 392 1-17.
- Hazman Ö, Bozkurt F M, Kumral B Z, Savrik M, Sindarov B, Bhaya N M, vd., 2023, The effects of β -escin on inflammation, oxidative stress and Langerhans islet cells in high-fat diet and streptozotocin injection induced experimental type-2 diabetes model Biologia, 78 549–561.
- Hazman Ö, Khamidov G, Yılmaz M A, Bozkurt M F, Kargioğlu M, Savrik M, vd., 2024, Green synthesis of Ag nanoparticles from *Verbascum insulare* Boiss. and Heldr.: Evaluation of antimicrobial, anticancer, antioxidant properties and photocatalytic degradation of MB Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry, 453, 1-16.